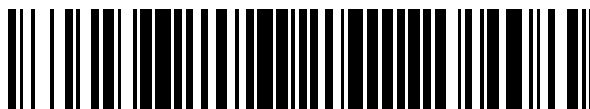


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 007**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

C07H 17/08 (2006.01)

A61K 31/424 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

C07D 498/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2009** **PCT/US2009/061977**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010** **WO10048600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2009** **E 09822827 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2362727**

54 Título: **Procedimientos para tratar enfermedades resistentes usando macrólidos que contienen triazol**

30 Prioridad:

24.10.2008 US 108110 P

24.10.2008 US 108137 P

24.10.2008 US 108112 P

24.10.2008 US 108168 P

20.03.2009 US 162109 P

24.10.2008 US 108134 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PEREIRA, DAVID, E. y
FERNANDES, PRABHAVATHI, B.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 677 007 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para tratar enfermedades resistentes usando macrólidos que contienen triazol

5 CAMPO TÉCNICO

- La invención descrita en el presente documento se refiere al tratamiento de enfermedades resistentes o, más particularmente, enfermedades provocadas, al menos en parte, por uno o más organismos resistentes. En particular, la invención descrita en el presente documento se refiere al tratamiento de enfermedades resistentes o, más particularmente, enfermedades provocadas, al menos en parte, por uno o más organismos resistentes con antibióticos macrólidos y cetólidos que contienen triazol.

ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION

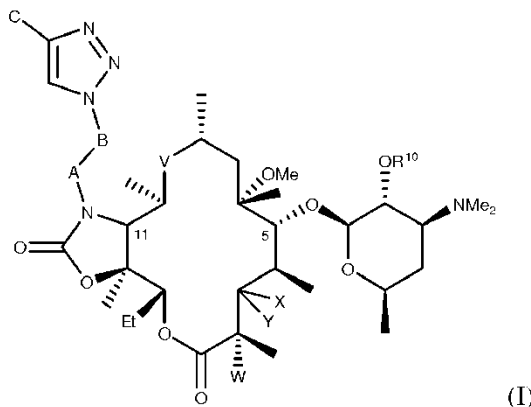
- Desde el descubrimiento de la eritromicina A (ERI), los antibióticos macrólidos (macrólidos) han sido una clase de moléculas importante para tratar una amplia variedad de infecciones bacterianas. Además, la investigación sobre macrólidos ha proporcionado el descubrimiento de varias generaciones nuevas de antibióticos macrólidos. Un grupo es la clase de compuestos claritromicina (CLR), en la que la estructura de anillo fue estabilizada mediante la metilación del hidroxilo del C-6. Otro grupo son los análogos aza con anillo de 15 miembros, de los que la azitromicina (AZI) es un miembro destacado. Otro grupo son los análogos 3-desglicosil-3-oxo, también conocidos como cetólidos, de los que la telitromicina (TEL) y la cetromicina (CET) son miembros destacados. Sin embargo, al igual que ha ocurrido para otras clases de moléculas antibióticas, tales como las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, la vancomicina y otras, han surgido organismos resistentes por todo el mundo. La resistencia a macrólidos, que actualmente es predominante en algunos países tales como Japón y Corea, se ha achacado al uso excesivo de AZI y CLR durante los últimos 15 años. También se ha observado que la resistencia a macrólidos generalmente también se produce acompañada de resistencia a la penicilina G (aunque no está vinculada genéticamente). Por ejemplo, aunque todas las cepas de estreptococos del grupo A siguen siendo susceptibles a los betalactámicos, se ha producido resistencia a macrólidos, especialmente en Asia y en el sur, centro y este de Europa. Las infecciones provocadas por estreptococos del grupo A resistentes a fármacos se encuentran a escala mundial y, algunas veces, se encuentran infecciones provocadas por estos organismos que suponen un peligro para la vida. Además, las cepas de *Streptococcus pyogenes*, aunque retienen su susceptibilidad a los betalactámicos, se están volviendo más resistentes a macrólidos. Se estima que, en los Estados Unidos, cerca del 40 % de cepas de estreptococos son resistentes tanto a penicilina como a antibióticos macrólidos.
- De hecho, se ha sugerido que la introducción de la TEL en el arsenal terapéutico estaba destinada a resolver el problema de la resistencia a macrólidos en los estreptococos. La TEL es efectiva contra *S. pneumoniae* resistente a penicilina y eritromicina y es un no inductor de resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B (MLE_B). Sin embargo, incluso con TEL, que es activa contra muchos genotipos de *S. pyogenes* resistentes a macrólidos, han surgido y continúan haciéndolo especies resistentes. En particular, se ha informado de especies resistentes a cetólidos, es decir, a TEL, pero también posiblemente con resistencia cruzada con la CET, a escala mundial y, más recientemente, en *S. pyogenes* de Europa. Además, la TEL no es activa contra los estreptococos del grupo A erm(B) (que son naturalmente resistentes a TEL). Asimismo, las toxicidades de la TEL observadas han limitado la utilidad clínica de este fármaco. La rápida aparición de cepas resistentes puede no resultar sorprendente; cuando se examina atentamente el ABC/la CMI libre de TEL contra neumococos resistentes a macrólidos, incluso con bajas CMI, se observa que el número no es significativamente superior a 25. Por tanto, se podría predecir que se va a producir una alta probabilidad de desarrollo de resistencia.

- Además, aunque la vacuna conjugada pediátrica ha reducido drásticamente la meningitis y bacteriemia provocadas por la mayoría de los clones neumocócicos resistentes a fármacos habituales, se ha informado de brotes de casos graves de otitis media provocados por cepas panresistentes con un serotipo (19A) no incluidas en la vacuna. Por tanto, el problema de los neumococos resistentes a fármacos que provocan infección respiratoria extrahospitalaria, especialmente en niños, es probable que empeore con la propagación de este clon.

- Se ha informado de varios mecanismos de resistencia a macrólidos específicos, incluyendo la resistencia por metilación ribosómica (erm(A), erm(B)), la resistencia por eflujo (mef(A), mef(E), mef(I)) y la resistencia generada por mutación del ARNr o las proteínas ribosómicas, tal como mutaciones en 23S y L4.

- Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad continua de nuevos antibióticos y agentes antibacterianos. Además, sería deseable que esos nuevos agentes tuvieran la propiedad de un bajo potencial de desarrollo o inducción de resistencia y un bajo potencial de resistencia presente de forma natural.

En el presente documento, sorprendentemente, se ha descubierto que los macrólidos que contienen triazol, cetólidos incluidos, presentan alta actividad *in vitro* e *in vivo* contra numerosos organismos. Asimismo, se ha descubierto que los macrólidos que contienen triazol descritos en el presente documento presentan alta actividad *in vitro* e *in vivo* contra numerosos organismos resistentes, incluyendo organismos resistentes tanto a macrólidos como a cetólidos. En el presente documento se describen compuestos de Fórmula (I)



(I)

10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que:

R10 es hidrógeno o acilo;

X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar carbonilo;

V es C(O);

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

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

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

C es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo

20 opcionalmente sustituido, aminoarilo, alquilaminoarilo, acilo, aciloxi, sulfonilo, ureido o carbamilo;

para uso en el tratamiento de una enfermedad provocada, al menos en parte, por un organismo que es resistente a una o más penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas.

25 En el presente documento se describen composiciones que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I), o los diversos subgéneros de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, diluyentes, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En el presente documento se describen procedimientos para tratar enfermedades generadas por poblaciones de organismos patógenos. Los procedimientos incluyen la etapa de administrar una cantidad terapéutica de uno o más compuestos de fórmula (I), o los diversos subgéneros de los mismos descritos en el presente documento, a un paciente con necesidad de alivio o que padece una enfermedad provocada por un organismo patógeno. En el presente documento se describen usos para la fabricación de medicamentos. Los medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I), o los diversos subgéneros de los mismos descritos en el presente documento, o una o más composiciones de los mismos descritas en el presente documento.

30 Los medicamentos son adecuados para tratar enfermedades generadas por poblaciones de organismos patógenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

FIG. 2. Efecto destructivo en función del tiempo a corto plazo de CEM-101 y AZI sobre *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo (paneles izquierdos; pH 7,4) o tras fagocitosis por macrófagos THP-1 (paneles derechos). Ambos fármacos se usaron en una concentración extracelular de 0,7 (paneles superiores) o 4 (paneles inferiores) mg/litro. Las CMI de CEM-101 y AZI fueron 0,06 y 0,5 mg/litro, respectivamente. Todos los valores son medias $\pm$ desviaciones estándar (DE) de tres experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras de DE son más pequeñas que los

símbolos).

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

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

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

FIG. 6. Actividad intracelular: estudios comparativos con otros agentes antiestafilocócicos. Dosis-respuesta estática comparativa de los antibióticos contra *Staphylococcus aureus* intracelular (cepa ATCC 25923) en macrófagos THP-1. Las barras representan las CMI (en mg/L) o la dosis estática extracelular.

FIG. 7. Actividad intracelular de CEM-101 en comparación con AZI, CLR y TEL, expresada como una curva dosis-respuesta de $\Delta \log$ UFC desde el tiempo 0 a las 24 horas frente a la dosis logarítmica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento que incluyen macrólidos y cetólidos que contienen triazol son útiles en el tratamiento de diversas enfermedades provocadas por poblaciones de organismos patógenos resistentes a una o más penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas. Se sabe que tales organismos patógenos provocan una variedad de enfermedades y estados de enfermedad. Se entiende que, en algunos casos, la enfermedad o estado de enfermedad puede ser caracterizable como un síntoma de otra enfermedad subyacente. En tales casos, se entenderá que tal síntoma o síntomas son una enfermedad tratable usando los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar infecciones del tracto respiratorio (ITR), incluyendo ITR extrahospitalarias, tales como las que generan, o se complican por, patógenos bacterianos susceptibles y/o patógenos resistentes a mLE_B. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por *H. influenzae*, tales como infecciones del tracto respiratorio inferior, bacteriemia, neumonía, otitis media, conjuntivitis, sinusitis y meningitis bacteriana aguda, tal como pueden producirse en lactantes y niños pequeños, y provocadas más específicamente por *H. influenzae* tipo b (Hib). En otra realización, las enfermedades incluyen celulitis, osteomielitis, epiglotitis e infecciones articulares.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, micoplasmas, incluyendo *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* y similares. Tanto los micoplasmas, incluyendo *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, y *M. fermentans*, como los ureaplasmas, incluyendo *U. parvum* y *U. urealyticum*, pueden ser responsables de infecciones

- en los tractos respiratorio y urogenital. Las enfermedades ilustrativas que pueden tratarse usando los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento que pueden ser provocadas por micoplasmas incluyen, pero no se limitan a, trastornos respiratorios, incluyendo neumonía atípica, neumonía atípica primaria (NAP) humana, neumonía errante y similares, tal como pueden ser provocadas por *M. pneumoniae*, enfermedades inflamatorias pélvicas, tal como pueden ser provocadas por *M. genitalium*, pleuroneumonía contagiosa bovina (PCB), tal como puede ser provocada por *M. mycoides*, o subespecies de *Mycoides SC* (tipo colonia pequeña) y similares. Las enfermedades ilustrativas que pueden tratarse usando los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento que pueden ser provocadas por ureaplasmas incluyen, pero no se limitan a, trastornos por amniólisis, trastornos por parto prematuro y similares.
- 10 *M. pneumoniae* es una bacteria muy pequeña de la clase *Mollicutes*, y se sabe que provoca neumonía por micoplasma, una forma de neumonía bacteriana. *M. hominis* es una cepa bacteriana presente en la vagina, y se cree que es una causa de la enfermedad inflamatoria pélvica. Se sabe que *M. hominis* coloniza frecuentemente el tracto genital de hombre y mujeres sexualmente activos. Esta bacteria también se ha asociado a la fiebre posaborto y posparto. *M. genitalium* se aisló originalmente en 1980 a partir de muestras uretrales de dos pacientes masculinos
- 15 con uretritis no gonocócica. La infección por *M. genitalium* es bastante común y puede transmitirse entre parejas durante el coito sin protección. En otra realización, las composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento en una cantidad terapéutica de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es capaz de presentar actividad bactericida contra uno o más organismos de tipo micoplasma y/o ureaplasma. En otra realización, los compuestos, composiciones,
- 20 procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, micoplasmas que son resistentes a macrólidos, cetólidos incluidos. En otra realización, los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, micoplasmas que son resistentes a CLR.
- 25 Se entiende que, según se ha informado, los macrólidos han sido los tratamientos de elección para infecciones respiratorias por *M. pneumoniae* de adultos y niños, porque tienen las ventajas de ser seguros y bien tolerados en formulaciones orales, poseen propiedades antiinflamatorias independientes de sus actividades antibacterianas y actividad contra otros microorganismos que pueden provocar enfermedades clínicamente similares. Estas propiedades también han hecho que los macrólidos sean atractivos para tratamiento empírico, ya que la mayoría de
- 30 infecciones por micoplasmas nunca se confirman mediante pruebas microbiológicas. Sin embargo, muchos macrólidos carecen de actividad contra *M. fermentans* y *M. hominis*. Asimismo, se ha sugerido la probabilidad de que es plausible que la resistencia a macrólidos se desarrolle naturalmente en *M. pneumoniae*, ya que solo hay un único operón de ARNr en el genoma y las mutaciones puntuales en el dominio V del ARNr 23S seleccionadas *in vitro* reducen su afinidad por los ribosomas.
- 35 Por ejemplo, publicaciones recientes han confirmado la aparición de resistencia a macrólidos en el 10-33 % de aislados de *M. pneumoniae* que puede tener implicaciones clínicas en la evolución del paciente. Se ha informado de que esos aislados habitualmente tienen mutaciones en el dominio V del ARNr 23S y CMI de eritromicina de 32->64 µg/mL. Un informe reciente de Shanghái, China, describió que 39/50 (78 %) *M. pneumoniae* eran resistentes a
- 40 macrólidos. Los Centros para el control y la prevención de enfermedades de Estados Unidos describieron 3 de 11 casos (27 %) de infecciones por *M. pneumoniae* de un brote reciente que eran resistentes a macrólidos y tenían una mutación en el ARNr 23S. Además, se ha informado de que dos pacientes pediátricos de Birmingham, Alabama, con infecciones del tracto respiratorio inferior por *M. pneumoniae* resistente a macrólidos no respondieron inicialmente a tratamiento con AZI y necesitaron varios días de hospitalización (Xiao y col., Emerging macrolide resistance in
- 45 *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J* In Press (2009)). Se ha descrito resistencia a fluoroquinolona en micoplasmas genitales (Bebear y col., In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2557-60 (2000); Duffy y col., Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United
- 50 States. *J Clin Microbiol* 44:1590-1 (2006)) y la resistencia a tetraciclina puede superar actualmente el 40 % en algunas poblaciones (Waites y col., Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 18:757-89 (2005)). También se ha documentado resistencia a AZI asociada a fracaso del tratamiento clínico en *M. genitalium* (Jensen y col., AZI treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis* 47:1546-53 (2008)). A pesar de estos retos,
- 55 se ha descubierto que los macrólidos y cetólidos que contienen triazol descritos en el presente documento son útiles en el tratamiento de enfermedades provocadas, al menos en parte, por micoplasmas y/o ureaplasmas, tales como uretritis y otras infecciones de la uretra y el tracto urogenital que incluyen micoplasmas y/o ureaplasmas. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, *Legionella sp.*, tales como *L. pneumophila*, y similares.
- 60 Se sabe que *L. pneumophila* provoca legionelosis, también conocida como enfermedad de los legionarios.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, organismos de tipo estafilococos y/o estreptococos, tales como infecciones cutáneas y de los tejidos blandos (ICTB). En una variación, la ICTB es una ICTB complicada. En otra variación, la ICTB es una ICTB no complicada. Las enfermedades ilustrativas provocadas por, o complicadas por, *S. aureus* incluyen, pero no se limitan a, infecciones cutáneas menores, tales como acné, impétigo, diviesos, celulitis, foliculitis, forúnculos, carbúnculos, necrólisis epidérmica tóxica y abscesos, y enfermedades más graves, o que incluso suponen un peligro para la vida, tales como neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y septicemia.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, gonococos. Los síntomas de infección por *N. gonorrhoeae* difieren dependiendo del sitio de infección. Las enfermedades ilustrativas provocadas por, o complicadas por, gonococos incluyen uretritis tanto gonocócica como no gonocócica, que pueden derivar en una descarga purulenta (o similar al pus) desde los genitales, inflamación, enrojecimiento, tumefacción, disuria y/o sensación de ardor durante la micción. La infección de los genitales en hembras con *N. gonorrhoeae* puede derivar en enfermedad inflamatoria pélvica y, si no se trata, derivar en infertilidad. La enfermedad inflamatoria pélvica puede derivar, si no se trata, en que la *N. gonorrhoeae* se propague al peritoneo pélvico (a través del cérvix, el endometrio y las trompas de falopio). Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, una o más neisserias, tales como *N. meningitides*, incluyendo organismos que son resistentes al ácido nalidíxico. En el presente documento, se entiende que la resistencia al ácido nalidíxico puede correlacionarse con resistencia a fluoroquinolonas. Por consiguiente, los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, una o más neisserias, tales como *N. meningitides*, que son resistentes a fluoroquinolonas. Pueden producirse infecciones por *N. meningitides* en la nasofaringe.

N. gonorrhoeae puede provocar también conjuntivitis, faringitis, proctitis o uretritis, prostatitis y orquitis cuando está presente en otros tejidos. Por ejemplo, según se ha informado, la conjuntivitis es habitual en recién nacidos; por consiguiente, con frecuencia, se aplica nitrato de plata o antibióticos a los ojos de los recién nacidos como medida preventiva contra la gonorrea. La conjuntivitis neonatal por gonorrea se contrae cuando el lactante es expuesto a *N. gonorrhoeae* en el canal del parto, y puede derivar en formación de cicatrices o perforación de la córnea. También pueden producirse infecciones por *N. gonorrhoeae* diseminadas, que derivan en endocarditis, meningitis y/o síndrome de artritis-dermatitis gonocócica. Con frecuencia, el síndrome de artritis-dermatitis va acompañado de artralgia, tenosinovitis y/o dermatitis no prurítica indolora.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*. *Enterococcus spp.*, que provoca, o contribuye a, enfermedades tales como infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis bacteriana, diverticulitis y meningitis. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, *Ureaplasma sp.*, tales como *U. parvum*, *U. urealyticum* y similares. Según se ha informado, *U. urealyticum* se ha asociado a diversas enfermedades en humanos, incluyendo uretritis no específica (UNE), infertilidad, corioamionitis, mortalidad al nacer, parto prematuro y, en el periodo perinatal, neumonía, displasia broncopulmonar y meningitis.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, *Chlamydia sp.*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y similares. Al igual que los gonococos, la clamidia provoca diferentes enfermedades dependiendo del órgano o tejido infectados. *Chlamydia sp.*, según se ha informado, provocan enfermedades genitales. Por ejemplo, *C. pneumoniae* es bien conocida como un importante patógeno de infecciones del tracto respiratorio a escala mundial, siendo responsable de casi el 10 % de los casos de neumonía extrahospitalaria. La infección por clamidia del cuello uterino (cervicitis) es una enfermedad de transmisión sexual que es asintomática para aproximadamente el 50-70 % de las mujeres infectadas con la enfermedad. Sin embargo, la infección puede transmitirse a través del sexo vaginal, anal y/o oral. Incluso cuando es asintomática, la infección por clamidia que no se detecta progresará a enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) en aproximadamente la mitad de las personas afectadas. EIP es un término genérico para la infección de útero, trompas de falopio y/o ovarios. La EIP puede provocar formación de cicatrices en los órganos reproductivos, provocando posteriormente complicaciones más graves, incluyendo dolor pélvico crónico, dificultad para conseguir embarazo, embarazo ectópico (tubárico) y otras complicaciones peligrosas del embarazo. Además, se ha informado de que, las mujeres infectadas por clamidia, es hasta cinco veces más probable que se infecten por el VIH, en caso de exposición. En los hombres, según se ha informado, la clamidia muestra síntomas de uretritis infecciosa (inflamación de la uretra) en aproximadamente el 50 % de los casos. En los hombres, si no se trata, es posible que la clamidia se propague a los testículos provocando epididimitis que, si no se trata, en casos raros puede provocar esterilidad. También se ha sugerido que la clamidia es una causa potencial de la prostatitis en

hombres.

Según se ha informado, la clamidia también provoca enfermedad ocular y, en particular, conjuntivitis debida a infección por clamidia. La conjuntivitis por clamidia o el tracoma fueron, en su día, la causa más importante de ceguera a escala mundial, pero, según se ha informado, su papel ha disminuido. Los recién nacidos también pueden desarrollar infección ocular por clamidia en el parto por exposición al organismo en el canal del parto. Según se ha informado, la clamidia también provoca afecciones reumatológicas, tales como artritis reactiva o la tríada de artritis, conjuntivitis y uretritis, especialmente en hombres jóvenes. Según se ha informado, la clamidia también provoca infecciones perinatales. Se ha informado de que la mitad de todos los lactantes nacidos de madres con clamidia nacerán con la enfermedad. La clamidia puede afectar a los lactantes provocando aborto espontáneo; parto prematuro y conjuntivitis, que puede llevar a ceguera y neumonía. También, según se ha informado, la clamidia puede provocar otras afecciones, tales como linfogranuloma venéreo, una infección de los nódulos y ganglios linfáticos provocada por *C. trachomatis*. Normalmente, el linfogranuloma venéreo se presenta con ulceración genital y aumento de los ganglios linfáticos de la ingle, pero también puede manifestarse como proctitis (inflamación del recto), fiebre o aumento de los ganglios linfáticos en otras regiones del cuerpo.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades provocadas por, o complicadas por, *Streptococci sp.*, tales como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, estreptococos alfa-hemolíticos, estreptococos del grupo viridans, los estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A y B de Lancefield (también conocidos como «estreptococos del Grupo A» y «estreptococos del Grupo B») y similares. Además de la faringitis estreptocócica, también se ha informado de que ciertas especies de estreptococos son responsables de casos de meningitis, neumonía bacteriana, endocarditis, erisipelas y fascitis necrosante (también conocida como infección bacteriana devoradora de carne). Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades infecciosas transmitidas por la sangre, tales como bacteriemia, que pueden ser provocadas por diversos organismos patógenos.

Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades tales como infecciones del tracto respiratorio (ITR), incluyendo ITR extrahospitalarias, tales como neumonía extrahospitalaria (NEH), neumonía bacteriana extrahospitalaria (NBEH) e ITR nosocomiales, sinusitis, bronquitis crónica, faringitis, otitis media, asma y similares, infecciones cutáneas y de los tejidos blandos (ICTB), incluyendo ICTB tanto complicadas como no complicadas y similares, infecciones del tracto urinario (ITU), incluyendo uretritis, gonorrea, uretritis no GC, prostatitis y similares, infecciones bacterianas transmitidas por la sangre, tales como bacteriemia y similares, diarrea del viajero y otras.

Se entenderá que los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de enfermedades generadas por diversos organismos que son resistentes a otros compuestos, incluyendo organismos que son resistentes a penicilinas, cefalosporinas y/o quinolona. Ilustrativamente, en el presente documento se describen compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos útiles para tratar enfermedades provocadas por especies de micoplasmas y ureaplasmas clínicamente importantes de humanos, incluyendo *M. pneumoniae* resistente a AZI.

Los procedimientos incluyen la etapa de administrar uno o más compuestos de fórmula (I), y/o cualquiera de los diversos subgéneros de fórmula (I) descritos en el presente documento, y/o una composición farmacéutica de uno o más de los compuestos anteriores. El uno o más compuestos y la una o más composiciones se administran a un paciente que padece, o con necesidad de alivio de, una enfermedad provocada, al menos en parte, por uno o más de los organismos descritos en el presente documento. En una realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más de los organismos que presentan resistencia a una o más penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas. En otra realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más organismos seleccionados de entre SARM, SARM 300 (EH), SARV, neumococos MR, *S. pneumoniae* serotipo 19A (también conocida como serotipo 19A neumocócico multirresistente). En otra realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más *S. pyogenes*. En otra realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más *S. pneumoniae*. En otra realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más organismos resistentes a CLR. En otra realización, la enfermedad es provocada, al menos en parte, por uno o más organismos resistentes a AZI. Los procedimientos incluyen la etapa de administrar uno o más compuestos de fórmula (I), y/o cualquiera de los diversos subgéneros de fórmula (I) descritos en el presente documento, y/o una composición farmacéutica de uno cualquiera, o más, de los compuestos anteriores a un paciente que padece, o con necesidad de alivio de, una enfermedad provocada, al menos en parte, por uno o más organismos seleccionados de entre gonococo, tal como *Neisseria gonorrhoeae*, micoplasma, tal como *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans* y *M. hominis*, ureaplasma, incluyendo *U. parvum* y *U. urealyticum*, moraxella, incluyendo *M. catarrhalis*, enterococo, incluyendo *E. faecalis*, estafilococo, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*, SASM, SARM, SARM 300 y SARV, estreptococo, incluyendo *S. pneumoniae*, tal como *S. pneumoniae* serotipo 19A, *S. pyogenes* resistente a eritromicina, estafilococos coagulasa negativos, *H. haemolyticus*, incluyendo estreptococos beta hemolíticos, *S. mitis* y estreptococos del grupo viridans, clamidia, incluyendo *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Legionella*, tal como *L. pneumophila*,

listeria, tal como *L. monocytogenes*, neisseria, tal como *N. meningitidis*, *Mycobacterium leprae*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, y organismos anaerobios. Los compuestos descritos en el presente documento presentan el espectro más amplio y la mejor actividad contra patógenos de ITR entre todos los agentes cetólidos mLEB probados, AZI y CLR incluidas.

- 5 Por ejemplo, los valores de CMI de CEM-101 se encontraban en $\leq 0,5$ y ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ para *S. pneumoniae*, *L. pneumophila* y *H. influenzae*, respectivamente.

Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la eficacia observable con los compuestos descritos en el presente documento puede deberse, al menos en parte, a una o más características de los compuestos, incluyendo la acumulación intracelular, la actividad intracelular, la distribución a muchos compartimentos a concentración alta, la alta actividad sobre organismos resistentes, el bajo potencial de desarrollo de resistencia y la baja resistencia inducible, y la actividad bactericida de los compuestos descritos en el presente documento. Sorprendentemente, en el presente documento se descubrió que los compuestos descritos en el presente documento no son sustratos PGP, o son sustratos pobres de la GpP.

- 15 Los cetólidos difieren estructuralmente de los macrólidos en que, (1) carecen de la 3-O-cladinsa, (2) incluyen la presencia del grupo 3-ceto y (3) en el caso de los compuestos descritos en el presente documento, incluyen la presencia de una funcionalidad aromática para interactuar con el dominio II del ribosoma bacteriano. En el presente documento se cree que, además de las otras interacciones comunes a los macrólidos, los cetólidos, tales como los compuestos descritos en el presente documento, tienen interacciones adicionales con el ribosoma, incluyendo enlaces de H al 2-fluoro, cuando está presente, interacciones con el grupo 3-oxo e interacciones con el grupo aromático pendiente unido al carbamato cíclico entre C-11 y C-12. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que estas características pueden contribuir a la actividad contra organismos resistentes, la baja resistencia inducible observada y/o la actividad bactericida de los compuestos descritos en el presente documento.
- 20 En el presente documento se describen compuestos que son activos contra organismos resistentes a macrólidos, incluyendo cetólidos, y que también tienen un bajo potencial de desarrollo de resistencia y/o bajas tasas de resistencia inducible. Sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento se cree que los compuestos se unen más fuertemente al ribosoma del organismo infeccioso. Además, aunque nuevamente sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento se cree que los compuestos se unen al ribosoma del organismo infeccioso más fuertemente y/o de una forma diferente a otros macrólidos o, incluso, otros cetólidos. En particular, en el presente documento se cree que los compuestos descritos en el presente documento se unen al ribosoma con una orientación diferente. Además, en el presente documento se cree que los compuestos descritos en el presente documento tienen un sitio de unión al ribosoma adicional a otros macrólidos o cetólidos, lo que permite una unión más fuerte. En cada uno de los anteriores, en el presente documento se cree que el 1,2,3-triazol es responsable de las diferencias en las interacciones de unión entre los compuestos descritos en el presente documento y otros macrólidos y cetólidos.

- Por ejemplo, un mecanismo común que lleva a la resistencia a macrólidos implica la metilación mediada por Erm de un nucleótido del ribosoma bacteriano clave (A2058EC) encontrado en el dominio V del ARN 23S. Se ha demostrado que este nucleótido juega un papel principal en la unión al ribosoma de los antibióticos macrólidos a través de interacciones con el azúcar desosamina del macrólido. La metilación de A2058 interfiere efectivamente con la unión del azúcar desosamina, reduciendo de ese modo la afinidad de unión del macrólido al ribosoma bacteriano. Una posible explicación para la actividad mejorada de los compuestos descritos en el presente documento contra bacterias resistentes a macrólidos proviene de interacciones en el dominio II adicionales a través de la cadena lateral pendiente aril-1,2,3-triazolilo. Se ha sugerido que esta interacción adicional ayuda a compensar las alteraciones en el sitio de unión del dominio V en las bacterias resistentes. Además, aunque sin ceñirnos a la teoría, y a diferencia de otros macrólidos o cetólidos, se cree que los compuestos descritos en el presente documento son capaces de unir ambos dominios II y V del ARN ribosómico y son capaces de mantener actividad *in vitro* contra *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos que tienen sitios de unión alterados en el dominio V debido a la mutación A2063G. Por ejemplo, uno de tales compuestos, CEM-101, tiene CMI inferiores a la TEL para los micoplasmas humanos. CEM-101 mantuvo actividad *in vitro* contra dos *M. pneumoniae* resistentes a AZI con CMI de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las CMI de TEL de 4 $\mu\text{g/mL}$ superaron el valor crítico de 1 $\mu\text{g/mL}$ usado para determinar susceptibilidad a otras especies bacterianas. La diferencia entre la CMI₅₀ para el grupo *M. pneumoniae* en general y las CMI para dos aislados resistentes fue la misma en 14 diluciones a la mitad para cada fármaco. Por lo tanto, la modesta reducción de la CMI *in vitro* de CEM-101 puede ser más profunda *in vivo* cuando se tratan enfermedades provocadas, al menos en parte, por micoplasmas. Sorprendentemente, también se encontró que tanto CEM-101 como CEM-103 (3-cladinsa del 101) muestran unión considerable al ribosoma dimetilado por erm en A2058. CEM-103 es el análogo macrólido de CEM-101 que tiene una 3-cladinsa en lugar de un grupo 3-oxo y, por lo tanto, respalda la teoría de que el 1,2,3-triazol es responsable de las diferencias en las interacciones de unión entre los compuestos descritos en el presente documento y otros macrólidos y cetólidos.

60

Además, los compuestos descritos en el presente documento tienen bajo potencial de desarrollo de resistencia y/o baja resistencia inducible. En la resistencia mutacional monoetapa y también en el pase multietapa a resistencia, no se observó crecimiento de mutantes cuando se expusieron las cepas a 4X, 8X y 16X la CMI de CEM-101 con ninguna de las 4 cepas probadas. Las tasas de mutación por organismo fueron: *E. faecium* a $<4,0 \times 10^{-9}$, *S. aureus* a $<6,0 \times 10^{-9}$ y *S. pneumoniae* a $<6,4 \times 10^{-8}$ a $<1,4 \times 10^{-9}$. Entre los 18 aislados probados para selección de resistencia durante pases en concentraciones subinhibitorias de agentes antimicrobianos, no se observó variación significativa (superior a $\pm$ un $\log_2$ de dilución) de los valores de CMI de CEM-101 con ocho cepas (44,4 %), incluyendo un *S. aureus*, tres enterococos, tres *S. pneumoniae* y un estreptococo β -hemolítico. Las 10 cepas restantes presentaron aumentos modestos de las CMI de CEM-101 de cuatro veces (siete cepas) a ocho veces (tres cepas), sin reversión, o tan solo con una reducción a la mitad, en el valor de CMI tras tres pases diarios consecutivos en medio libre de antimicrobianos. La selección de resistencia durante pases en concentraciones subinhibitorias fue inferior, en general, para CEM-101 en comparación con otros agentes evaluados.

En el presente documento se describen compuestos que son activos intracelularmente. También se ha descubierto en el presente documento que la acumulación intracelular y la actividad intracelular de los macrólidos que contienen triazol no se veía afectada por los inhibidores de la GpP o la proteína de multirresistencia (PMR). Por consiguiente, se cree que los compuestos descritos en el presente documento no son sustratos, o son sustratos pobres, de la glicoproteína P (glicoproteína plasmática o de permeabilidad, GpP). Se entiende que la GpP es un mecanismo de eflujo que puede llevar a resistencia de algunos organismos contra ciertos antibióticos, tal como se ha informado para AZI y ERI en macrófagos en los que ambos antibióticos son sustratos de la glicoproteína P. Por consiguiente, sorprendentemente, se ha encontrado que los compuestos descritos en el presente documento se acumulan intracelularmente. Además de la acumulación intracelular, sorprendentemente, se ha descubierto que los compuestos macrólidos y cetólidos que contienen triazol descritos en el presente documento tienen alta actividad intracelular. Sorprendentemente, también se ha encontrado en el presente documento que los compuestos descritos en el presente documento tienen una unión a proteínas inferior a la habitual para macrólidos a pH inferior, tal como el pH encontrado en las infecciones bacterianas, que incluyen, pero no se limitan a, abscesos. Se entiende que la falta de actividad intracelular observada habitualmente con los agentes antibacterianos, incluyendo otros macrólidos y cetólidos, puede deberse a una alta unión a proteínas y/o al pH relativamente bajo de los compartimentos intracelulares, tal como el presente en los abscesos.

Sin embargo, incluso cuando no se eliminan mediante eflujo activo, la concentración de otros agentes bacterianos, incluyendo otros macrólidos y cetólidos, en los macrófagos puede no ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad debido al bajo pH del compartimento lisosomal. Por ejemplo, el ambiente ácido que prevalece en los fagolisosomas (en los que *S. aureus* reside durante su etapa intracelular) puede afectar a la actividad de antibióticos tales como AZI, CLR y TEL. Inesperadamente, se ha descubierto que los compuestos descritos en el presente documento retienen su actividad antibacteriana a pH bajo. Se sabe que la actividad intracelular de los compuestos descritos en el presente documento puede ser un determinante importante para la erradicación rápida y completa y, probablemente también, para la prevención de resistencia en el organismo diana.

La falta de terapia antimicrobiana efectiva deriva en supervivencia intracelular de las bacterias, que sigue siendo la causa principal de la propagación bacteriana, fracasos terapéuticos con peligro para la vida y establecimiento de infecciones crónicas recidivantes. Estas situaciones se observan durante el curso de infecciones provocadas por muchos organismos, incluyendo meningitis por *L. monocytogenes*, invasión de macrófagos pulmonares por *L. pneumophila* y endocarditis, osteomielitis e infecciones cutáneas y de los tejidos blandos por *S. aureus*.

A pesar de que se ha informado de que la acumulación intracelular de un antibiótico es indicativa de actividad eficiente contra las bacterias, la evaluación farmacodinámica de una gran serie de antibióticos habitualmente usados ha revelado que otros parámetros tales como la biodisponibilidad intracelular y la modulación de la actividad en el compartimento infectado también son importantes. Las observaciones descritas en el presente documento confirman y amplían las observaciones previas hechas para macrólidos en este contexto debido al comportamiento sorprendentemente diferente presentado por los macrólidos que contienen triazol descritos en el presente documento en comparación con macrólidos y cetólidos conocidos tales como TEL, AZI y CLR.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los macrólidos que contienen triazol se acumulan en una magnitud considerablemente mayor que los comparadores, incluyendo AZI, y expresan consistentemente una potencia mayor (valores reducidos de E_{50} y C_s) a la vez que muestran una eficacia máxima similar ($E_{m\max}$) a los comparadores. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que esto indica que las mejoras resultantes de las modificaciones estructurales introducidas en CEM-101 se refieren a la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la actividad intrínseca (incluyendo su reducida susceptibilidad a las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en el compartimento infectado) en lugar de a un cambio en su modo de acción. Por tanto, los macrólidos que contienen triazol presentan el carácter esencialmente bacteriostático de los macrólidos, pero lo expresan mejor en el medio intracelular, y a

concentraciones extracelulares considerablemente inferiores, que los comparadores.

- Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la acumulación celular de macrólidos que contienen triazol, tales como CEM-101, es consecuencia del mecanismo general de captura protónica de las bases orgánicas débiles previsto para todos los macrólidos, ya que la acumulación se suprime prácticamente por completo, en paralelo con la AZI, mediante exposición a pH ácido o al ionóforo de protones monensina. Basándonos en el modelo general de difusión/segregación de bases débiles en los compartimentos limitados por membrana ácidos, la acumulación se determina mediante el número de grupos ionizables y las proporciones entre los coeficientes de permeabilidad de membrana de las formas no ionizadas e ionizadas del fármaco. A pesar de que CEM-101 tiene dos funciones ionizables, se calcula que el pKa del aminofeniltriazol es inferior a 4, lo que sugiere que la molécula es en gran medida monocatiónica (similar a CLR y TEL) a pH neutro e incluso lisosomal (~5). En cambio, la AZI tiene dos funciones ionizables con $pK_a > 6$ y, por lo tanto, es dicatiónica intracelularmente. Sin embargo, CEM-101 posee un sustituyente fluoro en la posición 2, que debería hacerlo más lipofílico que la CLR o TEL. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la relación de las constantes de permeabilidad de las formas no ionizadas e ionizadas de CEM-101, en comparación con LR o TEL, puede ser tan importante como el número de funciones ionizables para determinar el nivel de acumulación celular de bases orgánicas débiles. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la mayor acumulación celular de CEM-101 puede deberse parcialmente a su falta de susceptibilidad al eflujo mediado por GpP (que es expresada por los macrófagos THP-1 en nuestras condiciones de cultivo) a diferencia de la AZI.
- Se ha observado que muchos macrólidos conocidos tienen un gran volumen de distribución, que se cree que está relacionado con su capacidad para acumularse en el interior de células eucariotas mediante difusión/segregación en compartimentos ácidos, es decir lisosomas y vacuolas relacionadas. Como consecuencia, los macrólidos conocidos se han considerado candidatos para el tratamiento de infecciones localizadas en estos compartimentos. Por tanto, basándonos en un amplio abanico de datos, tanto *in vitro* como clínicos, se podría asumir que los macrólidos son adecuados para tratar infecciones provocadas por patógenos intracelulares típicos tales como legionela y clamidia. Sin embargo, las comparaciones cuantitativas directas entre las actividades intracelular y extracelular usando patógenos intracelulares facultativos, tales como *S. aureus* o *L. monocytogenes*, sugieren que los macrólidos conocidos expresan solo una fracción mínima de su potencial antibacteriano intracelularmente, especialmente, considerando su gran acumulación intracelular. Se cree que este potencial antibacteriano minimizado contra organismos que se replican en fagolisosomas y vacuolas relacionadas está relacionado con el pH ácido, que se sabe que reduce la actividad de los macrólidos conocidos. Otro factor es que algunos organismos, tales como *L. monocytogenes*, en realidad pueden replicarse en compartimentos subcelulares. Además, ciertos macrólidos, tales como AZI, están sometidos a eflujo activo desde los macrófagos, lo que contribuye adicionalmente a la actividad intracelular subóptima.
- En cambio, la acumulación celular y la actividad intracelular de los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento, usando modelos que han sido desarrollados para el estudio de la farmacodinámica intracelular de los antibióticos, son sustancialmente mejores que las de macrólidos conocidos, incluyendo los cetólidos. Por tanto, los compuestos descritos en el presente documento mantienen la eficacia máxima de sus CMI y muestran mayor potencia contra formas intracelulares de, por ejemplo, estafilococos, listeria y legionela en comparación con la TEL, AZI y CLR. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que esta potencia intracelular mejorada de los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento es consecuencia de la combinación de la actividad intrínseca más alta contra estafilococos, listeria y legionela acoplada a la actividad retenida a pH bajo y la capacidad de distribuirse a una amplia variedad de compartimentos intracelulares.
- En otra realización, los compuestos macrólidos y cetólidos que contienen triazol tienen actividad intracelular, tal como actividad intracelular contra estafilococos tales como *S. aureus*. La supervivencia de *S. aureus* en el interior de las células eucariotas es crítica para la persistencia de la infección. Se sabe que las pruebas rutinarias de susceptibilidad normalmente se determinan únicamente contra bacterias extracelulares y, por lo tanto, pueden inducir a error en su predicción de la eficacia contra organismos intracelulares. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos, composiciones, procedimientos y usos para tratar una enfermedad provocada por, al menos en parte, una infección por estafilococos intracelulares. En otra realización, la enfermedad provocada por la infección por estafilococos es SARM extrahospitalaria (SARM-EH), neumonía extrahospitalaria (N-EH) o una infección cutánea y de los tejidos blandos (ICTB). Se entiende además que *S. aureus* se considera una cepa virulenta y, por tanto, el tratamiento con agentes bacteriostáticos puede resultar inefectivo. Por ejemplo, la recurrencia puede ser un problema cuando se tratan tales cepas. Inesperadamente, se ha descubierto en el presente documento que los compuestos descritos en el presente documento son también bactericidas y, por lo tanto, útiles en el tratamiento de enfermedades provocadas por estafilococos y, en particular, estafilococos intracelulares, tales como *S. aureus*, en cualquier caso.
- Los compuestos macrólidos y cetólidos que contienen triazol tienen actividad intracelular, tal como actividad

intracelular contra listerias, tales como *L. monocytogenes*. En otra realización, los compuestos macrólidos y cetólidos que contienen triazol tienen actividad intracelular, tal como actividad intracelular contra legionelas, tales como *L. pneumophila*.

- Los compuestos macrólidos y cetólidos que contienen triazol tienen actividad intracelular, tal como actividad intracelular contra micobacterias, tales como *M. leprae*. En otra realización, se describen en el presente documento composiciones, procedimientos y medicamentos para tratar enfermedades provocadas, al menos en parte, por *M. leprae*, que incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Hansen (lepra). En un aspecto, las composiciones, procedimientos y medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos para tratar enfermedades provocadas, al menos en parte, por *M. leprae* que son resistentes a CLR. Por ejemplo, se ha descubierto que CEM-101 es de 2-4 veces más activo que otros antibióticos de la misma clase, principalmente CLR y TEL. Es activo contra cepas patógenas de *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* resistentes a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas.
- Los compuestos, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para presentar actividad antibacteriana intracelular. En el presente documento se describen compuestos que son bactericidas. En otra realización, los compuestos, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para presentar actividad bactericida, incluyendo actividad bactericida *in vivo*. Se ha informado de que los macrólidos son generalmente bacteriostáticos. Los compuestos bacteriostáticos no matan la bacteria, sino que, en su lugar, por ejemplo, inhiben el crecimiento y la reproducción de bacterias sin matarlas; la muerte se logra mediante agentes bactericidas. Se entiende que los agentes bacteriostáticos deben trabajar con el sistema inmune para eliminar los microorganismos del cuerpo. Los antibióticos bacteriostáticos pueden limitar el crecimiento de bacterias por medio de diversos mecanismos, tales como interfiriendo con la producción de proteína bacteriana, la replicación del ADN u otros aspectos del metabolismo celular bacteriano. En cambio, los antibióticos bactericidas matan las bacterias; los antibióticos bacteriostáticos solo ralentizan su crecimiento y reproducción. La penicilina es un bactericida, al igual que las cefalosporinas, todas ellas pertenecientes al grupo de los antibióticos β -lactámicos. Actúan de forma bactericida, alterando el precursor de la pared celular, lo que lleva a la lisis. Además, los antibióticos aminoglicosídicos normalmente se consideran bactericidas, aunque pueden ser bacteriostáticos con algunos organismos. Actúan uniéndose irreversiblemente a la subunidad ribosómica 30s, reduciendo la fidelidad de la traducción, lo que lleva a síntesis incorrecta de las proteínas. Además, inhiben la síntesis de proteínas debido a la separación prematura del complejo entre el ARNm y las proteínas ribosómicas. El resultado final es la muerte celular bacteriana. Otros antibióticos bactericidas incluyen las fluoroquinolonas, los nitrofuranos, la vancomicina, los monobactámicos, el cotrimoxazol y el metronidazol.
- Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para presentar actividad bactericida contra uno o más neumococos. Se ha informado de que la resistencia por neumococos se produce muy rápidamente. Por consiguiente, sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento se cree que el tratamiento de tales enfermedades usando agentes bacteriostáticos puede resultar infructuoso en dos sentidos. Primero, la simple detención de la progresión de la enfermedad con un agente bacteriostático puede resultar insuficiente porque el sistema inmune puede que no intervenga para ayudar a curar la enfermedad a un nivel necesario. Por ejemplo, algunos organismos bacterianos no son destruidos por el sistema inmune porque residen en compartimentos intracelulares. Por tanto, una vez que el ciclo de tratamiento ha finalizado, puede producirse una rápida recurrencia de la enfermedad. Segundo, porque alguna parte de la población bacteriana probablemente será eliminada; la población restante puede seleccionarse para desarrollo de resistencia. En el presente documento, se cree que un agente activo intracelularmente y/o un agente activo intracelularmente y bactericida serán eficaces en el tratamiento de tales enfermedades. En una realización ilustrativa, se describen en el presente documento compuestos que consiguen una concentración intracelular de 20X la CMI de la bacteria a la que van dirigidos. Se ha informado de que la mayoría de, si no todos, los antibióticos macrólidos, aunque son bactericidas *in vitro*, solo son bacteriostáticos *in vivo*. Por ejemplo, como se describe a continuación en el presente documento, cuando se prolongaba el tiempo entre la última dosis de compuesto, los niveles de reducción de la biocarga permanecían iguales para los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento, lo que indica una respuesta bactericida. En cambio, los grupos de dosis de TEL y CLR demostraron aumentos de la biocarga cuando se prolongaba el intervalo de tiempo. Por tanto, esos dos últimos agentes macrólidos/cetólidos demostraron una respuesta bacteriostática más clásica.

En el presente documento se describen compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos que tienen un efecto posantibiótico largo (EPA). En otra realización, se describen en el presente documento compuestos,

composiciones, procedimientos y medicamentos que son sinérgicos a otros agentes antibacterianos. En otra realización, los otros agentes antibacterianos se seleccionan de entre antibióticos aminoglicosídicos, cefalosporinas e inhibidores de dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintetasa, tales como gentamicina (GEN), ceftriaxona (CRO), trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX). Se entenderá que la enfermedad tratable con los compuestos, 5 composiciones y procedimientos descritos en el presente documento está provocada por al menos un organismo distinto de uno o más de los siguientes: *S. aureus* (ATCC 29213, SASM, mLE-S), *E. faecium* (ATCC 19434), *K. pneumoniae* (13883), *E. coli* (ATCC 25922), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. pneumoniae* (ATCC 49619), *S. pyogenes* (ATCC 19615), *S. pneumoniae* (163, Mef A), *S. pneumoniae* (303, ErmB), *S. aureus* (SRAM, 33591), *H. influenzae* (ATCC 49247), *S. pneumoniae* (3773, ErmB), *S. pneumoniae* (5032), *S. pyogenes* (1721), *S. pyogenes* 10 (1850), *S. pyogenes* (3029) y *S. pyogenes* (3262). En el presente documento se describen compuestos de Fórmula (I) en los que W es fluoro. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que A y B se toman juntos para formar un grupo alquileo que incluye, pero no se limita a, propileno, butileno y pentileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que A y B se toman juntos para formar butileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de 15 Fórmula (I) en los que A y B se toman juntos para formar pentileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que A y B se toman juntos para formar butilenos y C es 2-piridinilo o aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que A y B se toman juntos para formar propilenos, butilenos o pentilenos y C es aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los 20 que A y B se toman juntos para formar pentileno y C es 3-piridinilo o benzotriazol. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que C es un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I) en los que R¹⁰ es hidrógeno. En otra realización, C es 3-piridinilo o benzotriazolilo.

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

En otra realización, A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno y X e Y se toman junto con el carbono al 30 que están unidos para formar un grupo C(O).

En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde W es H o F. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A es CH₂, B es (CH₂)_n y n es un número entero de 2-4. En otra realización, se describen compuestos descritos en 35 cualquiera de las realizaciones anteriores donde C es arilo o heteroarilo. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde C es 3-aminofenilo o 3-piridinilo. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde R₁₀ es hidrógeno. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno y X e Y se toman junto con el carbono al que están 40 unidos para formar un grupo C(O). En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno, X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un grupo C(O) y W es F.

En el presente documento se describe una composición antibacteriana, en la que la composición incluye una cantidad efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, y un vehículo, excipiente o 45 diluyente de los mismos farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos.

Tal como se usa en este documento, el término «composición» se refiere generalmente a cualquier producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que 50 procede, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Ilustrativamente, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes. Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en una cantidad terapéuticamente efectiva, en formas de dosificación convencionales, para los procedimientos descritos en el presente documento que incluyen uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes de los mismos. Tales composiciones de la formulación pueden administrarse mediante una amplia variedad de vías convencionales para los procedimientos descritos en el 55 presente documento y en una amplia variedad de formatos de dosificación, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. En general, véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, (16^a ed. 1980). Se entenderá que las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse a partir de compuestos aislados descritos en el presente documento o a partir de sales, soluciones, hidratos, solvatos y otras formas de los compuestos descritos en el presente documento. También se entenderá que las composiciones pueden prepararse a partir de diversas 60 formas amorfas, no amorfas, parcialmente cristalinas, cristalinas y/o otras formas morfológicas de los compuestos

descritos en el presente documento.

El término «cantidad terapéuticamente efectiva», tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, un animal o un ser humano al que atiende un investigador, un veterinario, un médico u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que se está tratando. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva es aquella que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento puede ser decidido por el médico responsable dentro del alcance de los criterios médicos fundados. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva específico para cualquier paciente concreto dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación con, o simultáneamente a, el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

En una realización, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un humano oralmente en una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/kg o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal del paciente. En otra realización, la dosis diaria para un humano adulto es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 mg, que pueden administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día y similares. En otra realización, la dosis diaria para un humano adulto es de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 mg, que pueden administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día y similares. Tales dosis pueden administrarse una vez, dos veces o tres veces al día. Las dosificaciones unitarias orales ilustrativas son 50, 100, 200 y 400 mg (únicas o divididas). Sin ceñirnos a la teoría, se cree que tales dosificaciones ilustrativas son suficientes para conseguir niveles plasmáticos de aproximadamente 1 µg/mL, que pueden ser suficientes para observar actividad bactericida de los compuestos descritos en el presente documento, tal como para neumococos susceptibles a macrólidos. Se sabe que, como se describe en el presente documento, los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo CEM-101, alcanzan una concentración alta en los tejidos, tal como en los tejidos pulmonares. Sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento se cree que los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo CEM-101, pueden conseguir niveles tisulares que son al menos 10 veces la CMI para cepas, incluyendo cepas resistentes a macrólidos, tales como, pero no limitadas a, *H. influenzae* y *H. influenzae* resistente a AZI, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* resistentes a una cualquiera de AZI o CLR y otros organismos resistentes descritos en el presente documento.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse como se describe en el presente documento o según la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de publicación 2006/0100164 y la publicación internacional PCT n.º WO 2009/055557.

En resumen, la síntesis de cetólidos que contienen triazol comienza con la conocida preparación en dos etapas del producto intermedio 4 de 12-acilimidazol (Esquema I) a partir de CLR (2). El producto intermedio 4 se convierte en los 11,12-carbamatos cíclicos 5a-c mediante reacción con los correspondientes aminoalcoholes conectados por 3, 4 o 5 carbonos. El tratamiento de 5a-c con cloruro de tosilo proporciona los tosيلات 6a-c. El desplazamiento del grupo tosilo con NaN₃ genera los correspondientes compuestos azido 7a-c. La escisión del azúcar cladinosa de 7a-c a 8a-8c se logra mediante tratamiento con HCl en MeOH. La oxidación de Swern del grupo 3-hidroxi de 8a-c genera los correspondientes cetólidos protegidos 9a-c que, posteriormente, se desprotegen con metanol para proporcionar los cetólidos azido requeridos 10a-c, respectivamente. Estos compuestos azido se hicieron reaccionar con alquinos sustituidos terminalmente en presencia de yoduro de cobre en tolueno a 60 °C para proporcionar regioselectivamente los correspondientes [1,2,3]-triazoles 4-sustituidos 11a-18a, 11b-18b y 11c-18c.

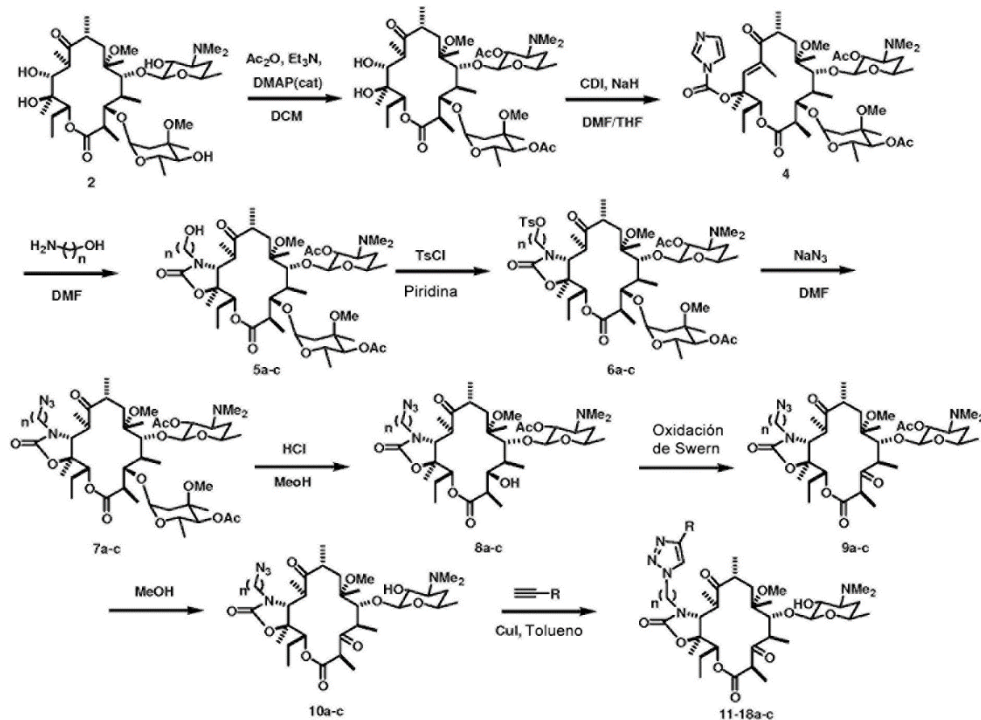
La azida de los productos intermedios 10a-c se convierte en los [1,2,3]-triazoles 4-sustituidos por medio de una reacción de cicloadición con acetilenos sustituidos. Los anillos de triazol pueden formarse por medio de una reacción de cicloadición (1+3) de Huisgen entre una azida y un alquino que genera una mezcla de 1,4- y 1,5-regioisómeros como se representa en la Vía A del Esquema II. Como alternativa, se puede seguir el procedimiento de Rostovtsev y col.⁸ usando la adición de un catalizador de Cu a la reacción para producir selectivamente o exclusivamente el 1,4-regioisómero como se representa en la Vía B del Esquema II.

La cadena lateral del anillo de triazol también se incorpora al sistema de anillo de la CLR. En una realización, se elige una cadena lateral de butilalquilo. Basándonos en resultados de la CMI *in vitro*, se sabe que muchos análogos de las cadenas laterales de butilo en las series de cetólidos han mejorado la actividad antibacteriana. El producto

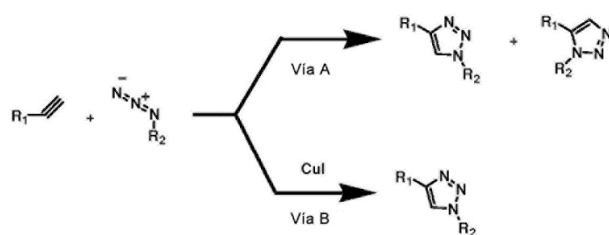
intermedio 7b se convierte directamente en el [1,2,3]-triazol 4-sustituido por medio de ciclación catalizada por cobre con acetilenos sustituidos terminalmente, como se muestra en el Esquema III. Los grupos protectores de acetato de 19a-e se eliminan con LiOH en metanol para proporcionar los correspondientes [1,2,3]-triazoles 4-sustituidos 20a-e.

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

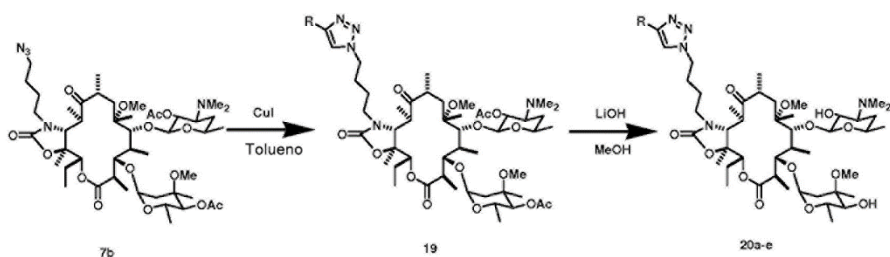
Esquema I



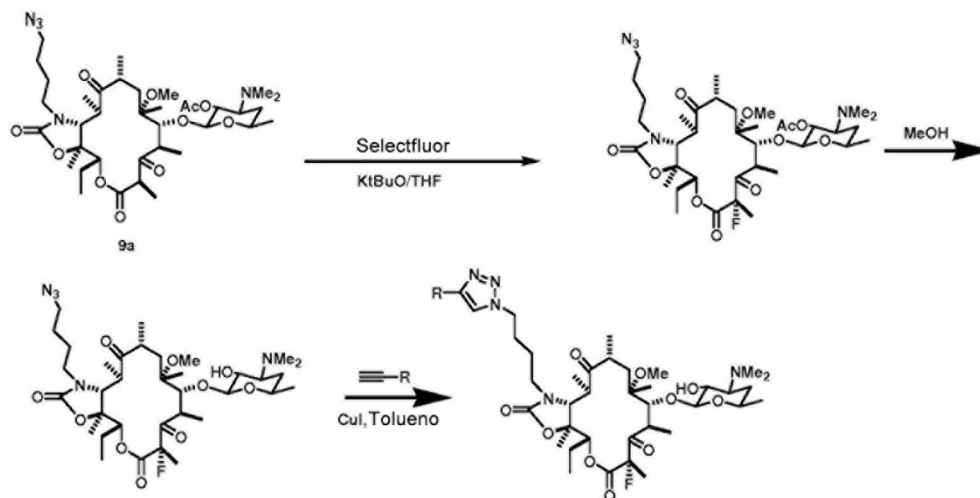
Esquema II



Esquema III

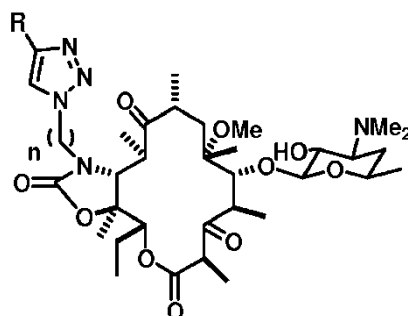


Esquema IV

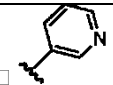
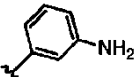
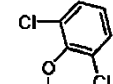
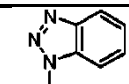


Se describen los siguientes compuestos:

5

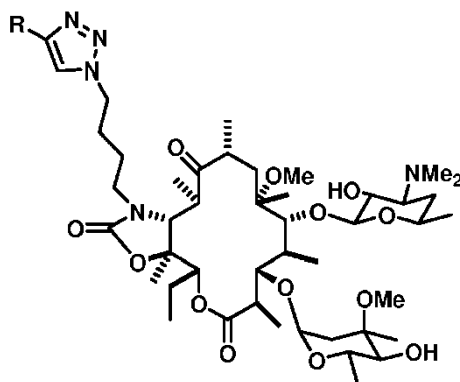


Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) ^a								
Entrada	R	n	<i>S. aureus</i>		<i>S. pneumoniae</i>			<i>H. influenzae</i>
			29213 Eri-S	96:11480 Eri-R (MLEb)	49619 Eri-S	163 Eri-R (MefA)	303 Eri-R (ermB)	49247 Eri-S
TEL			$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	4
AZI			$\leq 0,125$	>64	$\leq 0,125$	>64	>64	2
11a		3	1	1	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	>64	>64
11b		4	$\leq 0,125$	0,25	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	2	8
11c		5	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	0,25	16
12a		3	0,25	0,5	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	8	64
12b		4	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	8	8
12c		5	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	1	16
13a		3	1	2	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	16	>64
13b		4	0,25	0,25	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	8	8
13c		5	0,5	1	$\leq 0,125$	0,5	2	64
14a		3	2	2	$\leq 0,125$	0,5	>64	>64
14b		4	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	4
14c		5	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	0,25	64

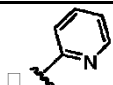
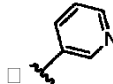
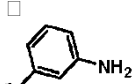
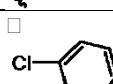
15a		3	2	2	≤0,125	1	>64	>64
15b		4	≤0,125	4	≤0,125	2	64	64
15c		5	≤0,125	0,25	≤0,125	0,25	4	16
16a		3	0,5	np	≤0,125	≤0,125	>64	16
16b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2
16c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,25	8
17a		3	1	1	≤0,125	≤0,125	>64	>64
17b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,12	≤0,12	1	16
17c		5	0,25	0,5	≤0,125	≤0,125	2	32
18a		3	1	2	≤0,125	0,5	>64	>64
18b		4	1	2	≤0,125	4	64	32
18c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	64	8

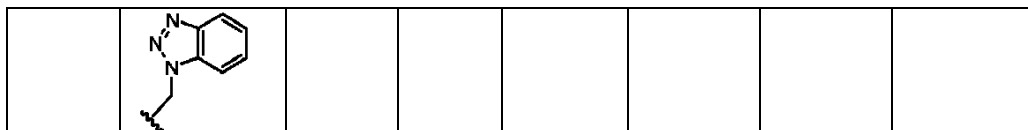
^a Comité nacional de normas de laboratorios clínicos. Procedimientos de determinación de sensibilidad antimicrobiana de bacterias que crecen aeróbicamente, 6^a ed.; Norma homologada: NCCLS Documento M7-A6, 2003.

Se describen también los siguientes compuestos:

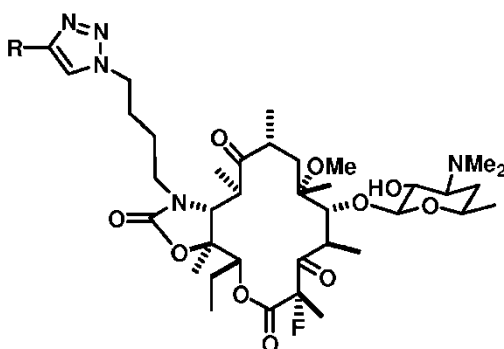


5

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



También se describen los siguientes compuestos:



5

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

En cada una de las realizaciones anteriores, el panel de cribado primario consistió en *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* relevantes (incluyendo cepas resistentes a AZI y TEL). Las CMI contra todos los patógenos se determinaron usando el procedimiento de microdilución en caldo según las directrices del NCCLS. Se encontró que los compuestos descritos en el presente documento, tales como CEM-101, eran muy potentes, con CMI contra *S. pneumoniae* (3773) de ≤0,125 µg/mL y *S. pyogenes* (1850) de 0,5 µg/mL, en comparación con 1 y 8 µg/mL para TEL, respectivamente. Se encontró que CEM-103 (20c), un análogo de CEM-101 que contiene la 3-O-cladinosina, era menos activo. Los cetólidos que contenían triazol no heteroaromático sustituido eran menos activos.

15 Los cetólidos se probaron contra cepas de *S. aureus* sensibles a eritromicina (Eri-S) y resistentes a eritromicina (Eri-R) (29213 (Eri-S) y 96:11480 (Eri-R)), *S. pneumoniae* (49619 (Eri-S) y 163 y 303 (Eri-R)) y *H. influenzae* (49247 (Eri-S)) (Tablas 1-3). El procedimiento de microdilución en caldo se usó para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) contra todos los patógenos según el Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).

20

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

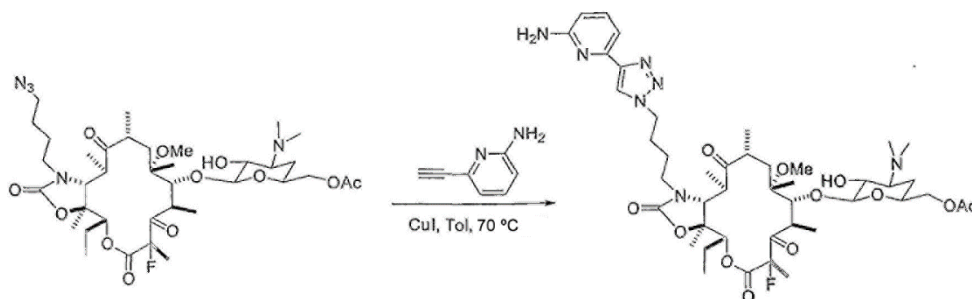
25

El triazol sustituido con 2-piridilo conectado por 4 carbonos 14b y el triazol sustituido con 3-aminofenilo 16b poseían la potencia más alta contra *S. pneumoniae* 303, teniendo ambos valores de CMI (≤0,125 µg/mL) comparables a la

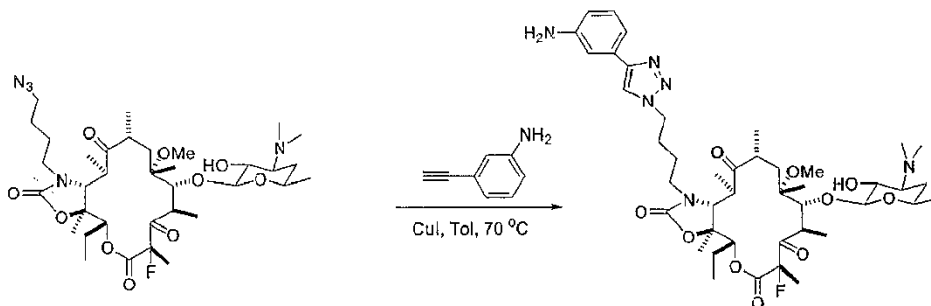
TEL. El cetólido que contenía triazol sustituido con 3-piridilo conectado por 4 carbonos 15b era menos activo contra esta cepa (CMI de 64 µg/mL). En esta serie, se mejoró la actividad antibacteriana prolongando el conector de carbono a 5 átomos; por ejemplo, la CMI contra *S. pneumoniae* 303 para el compuesto 15c mejoró de 64 a 4 µg/mL. Se observó un efecto similar para el cetólido que contenía benzotriazol 18c contra *S. aureus*, pero 18c seguía siendo inactivo contra *S. pneumoniae* 303. Se entiende que un equilibrio entre la longitud del conector y la naturaleza de la sustitución aromática del triazol puede afectar a la actividad general contra *S. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a macrólidos.

- Se observó una correlación entre la longitud del conector y la actividad para *H. influenzae* (49247), donde la serie de cetólidos más potente tenía el triazol sustituido conectado a través de una cadena de 4 carbonos (11b-14b, 16b, 17b) o 5 carbonos (15c, 18c). Resulta interesante que la serie aromática más potente contra *H. influenzae* era la 3-aminofenilo con un conector de 3, 4 o 5 carbonos (16a, 16b, 16c), que tenía CMI de 16, 2 y 8 µg/mL, respectivamente.
- Los macrólidos que contenían cladinosa en la posición 3 fueron todos muy activos contra *S. pneumoniae* Eri-S (49619) (Tabla 2). Sin embargo, estos análogos eran menos potentes que la TEL contra cepas Eri-R. Las CMI eran significativamente superiores para los análogos que contenían cladinosa con sustituyentes del triazol tanto 2-piridilo, 2-aminofenilo como 2,6-diclorofenilo que para los cetólidos correspondientes (20a, 20c y 20d frente a 14b, 16b y 17b). En cambio, la actividad antibacteriana se reestablecía para los análogos de cetólido 15b (3-piridilo) y 18b (benzotriazol) sustituyendo el ceto por el grupo cladinosa en los análogos 20b (3-piridilo) y 20e (benzotriazol). Las CMI mejoraron de 64 µg/mL para 15b y 18b a 1 y 2 µg/mL para 20b y 20e, respectivamente. Se observó también una tendencia de actividad similar para *S. pneumoniae* 163 (MefA) Eri-R.

EJEMPLOS DE COMPUESTOS

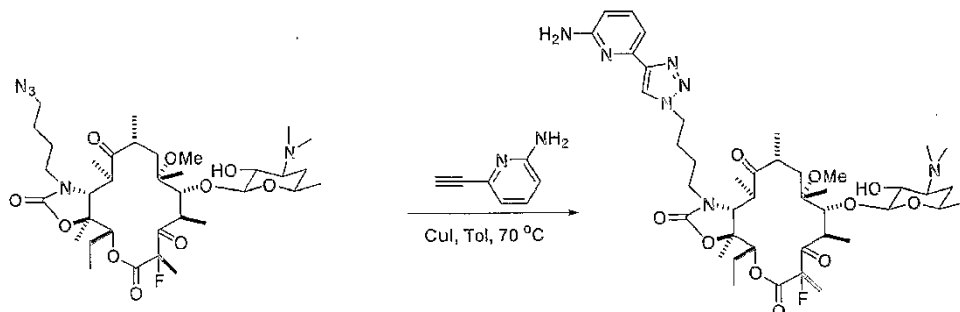


- Se calentó una mezcla de 11,12-carbamato de 11-N-(4-azidobutil)-6-O-metil-5-(3-dimetilamina-4-desoxi-6-O-acetilglucopiranosil)-2-fluoro-3-oxo-eritronólido A (15 mg, 0,019 mmol), 6-etinilpiridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 mL) a 70 °C. Tras 16 h, se concentró la mezcla y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 14 mg del compuesto deseado. EM: M^+ calculada para $C_{44}H_{66}FN_7O_{12}$ = 903,5; encontrada: $M+H^+$ = 904,5.



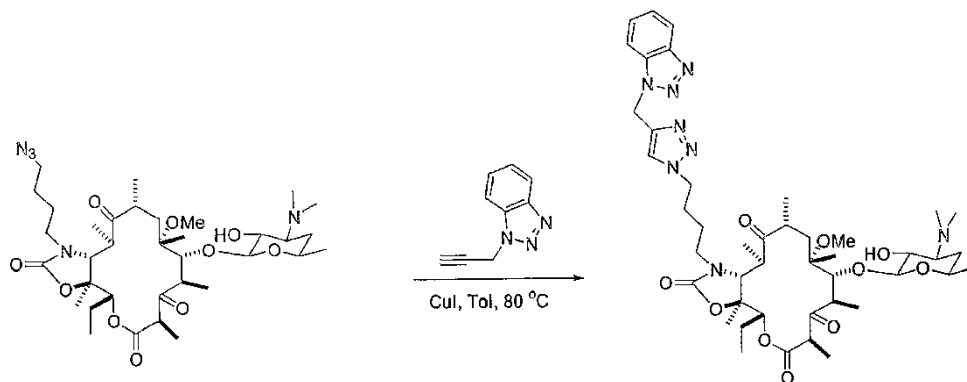
- 11,12-carbamato cíclico de 11-N-4-(3-aminofenil)-[1,2,3]triazol-1-il-butyl-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronólido A (CEM-101). Se calentó una mezcla de 11,12-carbamato de 11-N-(4-azidobutil)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronólido A (17 mg, 0,023 mmol), 3-etinilfenilamina (5,4 mg, 0,046 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 mL) a 70 °C. Tras 16 h, se concentró la mezcla y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1,

cloroformo: metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 17 mg del compuesto deseado, EM M^+ calculada para $C_{43}H_{65}FN_6O_{10} = 844,47$; encontrada: $M+H^+ = 845,5$

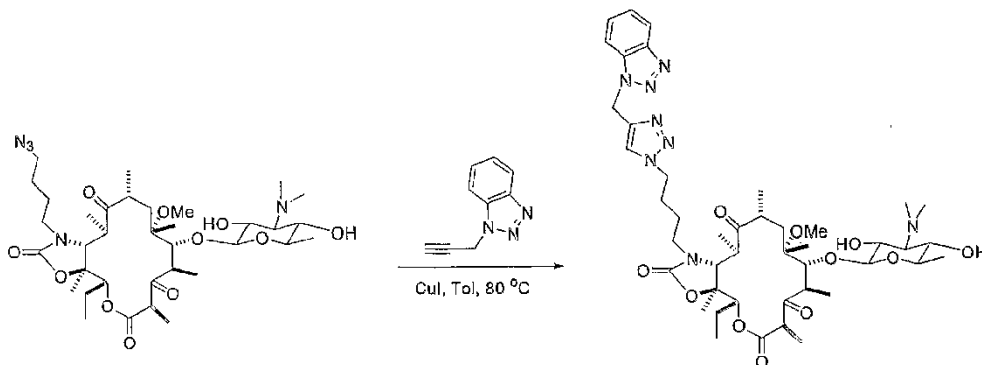


5

11,12-carbamato cíclico de 11-N-{4-[4-(6-aminopiridin-2-il)-[1,2,3]triazol-1-il]-butil}-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronólido A. Se calentó una mezcla de 11,12-carbamato de 11-N-(4-azidobutil)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronólido A (15 mg, 0,02 mmol), 6-etinilpiridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 mL) a 70 °C. Tras 16 h, se concentró la mezcla y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 14 mg del compuesto deseado OP1357. EM: M^+ calculada para $C_{42}H_{64}FN_7O_{10} = 845,5$; encontrada: $M+H^+ = 846,5$.



15 11,12-carbamato de 11-N-[4-(4-benzotriazol-1-ilmetil-[1,2,3]triazol-1-il)-butil]-6-O-metil-5-O-desosaminil-3-oxo-eritronólido A. Se calentó una mezcla de 11,12-carbamato de 11-N-(4-azidobutil)-6-O-metil-5-O-desosaminil-3-oxo-eritronólido A (3 mg, 0,0039 mmol), 1-prop-2-yn-1-yl-1H-benzotriazole (3 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 mL) a 80 °C. Tras 16 h, se concentró la mezcla y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 3 mg del compuesto deseado. EM: M^+ calculada para $C_{44}H_{66}N_8O_{10} = 866,5$; encontrada: $M+H^+ = 867,5$.



11,12-carbamato de 11-N-[4-(4-benzotriazol-1-ilmetil-[1,2,3]triazol-1-il)-butil]-6-O-metil-5-micaminosil-3-oxo-eritronólido A. Se calentó una mezcla de 11,12-carbamato de 11-N-(4-azidobutil)-6-O-metil-5-micaminosil-3-oxo-

eritronólido A (3 mg, 0,004 mmol), 1-prop-2-inil-1H-benzotriazol (3 mg, 0,4 mmol), Cul (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 mL) a 80 °C. Tras 16 h, se concentró la mezcla y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 3 mg del compuesto deseado. EM: M^+ calculada para $C_{44}H_{66}N_8O_{11}$ = 882,5; encontrada: $M+H^+$ = 883,5.

5

EJEMPLOS DE PROCEDIMIENTOS

EJEMPLO. Se comparan las actividades in vitro de CEM-101 con las de AZI, CLR, TEL y doxiciclina contra 10 aislados de *C. pneumoniae* y 10 cepas de *C. trachomatis* en células HEp-2. La CMI a la que el 50 % y 90 % de los
10 aislados de *C. pneumoniae* fueron inhibidos por CEM-101 fue 0,25 µg/mL (intervalo: de 0,25 a 1,0 µg/mL). La CMI a la que el 50 % y 90 % de las cepas de *C. trachomatis* fueron inhibidas fue 0,25 µg/mL (intervalo: de 0,125 a 0,5 µg/mL). Las CMI90 para ambas, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, contra AZI, CLR, TEL y doxiciclina fueron 0,125, 0,06, 0,06 y 0,06 µg/mL, respectivamente. Las CMI de CEM-101 fueron consistentes de aislado a aislado, variando por solo una o dos diluciones, lo que es especialmente impresionante dada la amplia distribución
15 geográfica de los aislados probados. Estos resultados indican que CEM-101, y los compuestos descritos en el presente documento, es un antibiótico efectivo para tratar *C. trachomatis* e infecciones del tracto respiratorio provocadas por *C. pneumoniae*.

EJEMPLO. Se recogieron 36 *M. pneumoniae* del tracto respiratorio de adultos y niños con neumonía entre 1992 y
20 2006. 2 aislados recogidos de niños en Birmingham (AL) en 2005 fueron resistentes a macrólidos (CMI de AZI >32 µg/mL); ambas habían mostrado que tenían una mutación A2063G en el dominio V del gen del ARNr. 5 *M. genitalium* incluyeron cepas de referencia obtenidas de los tractos urogenitales de pacientes en los Estados Unidos (3 aislados) y Dinamarca (2) aislados. Se obtuvieron 15 *M. fermentans* de los tractos respiratorio o urogenital de la colección de micoplasmas en los Institutos nacionales de la salud de Estados Unidos y de pacientes en Birmingham
25 (AL) entre 1992 y 2004. Se obtuvieron 13 *M. hominis* de muestras clínicas del tracto urogenital o heridas entre 1994 y 2007. 2 aislados fueron resistentes a doxiciclina (CMI 8-16 µg/mL). Se obtuvieron 10 *Ureaplasma parvum* de muestras urogenitales entre 2002 y 2005. 7 fueron resistentes a doxiciclina (CMI 4-16 µg/mL). Se obtuvieron 10 *U. urealyticum* de diversas muestras de tracto urogenital, placentas o secreciones respiratorias neonatales entre 1990 y 2005. 4 fueron resistentes a doxiciclina (CMI 4-32 µg/mL).

30

Todos los aislados de micoplasma y ureaplasma fueron inhibidos por CEM-101 a concentraciones <0,5 µg/mL, lo que lo hace el compuesto más potente probado de todos. Las CMI de CEM-101 para *M. pneumoniae* variaron de 0,000000063-0,5 µg/mL con CMI90 = 0,000125, lo que hace esta actividad 4 veces mayor que la de la AZI y 8 veces mayor que la de la TEL. El LZD fue inactivo contra *M. pneumoniae*, pero algunas *M. fermentans* y *M. hominis*
35 tuvieron CMI <1 mg/mL. 2 MP resistentes a macrólidos con AZI y TEL con CMI superiores a 32 µg/mL fueron inhibidas por CEM-101 a 0,5 µg/mL. Las CBM de CEM-101 fueron más de 16 veces superiores a las CMI para 9 *M. pneumoniae*, lo que indica que el fármaco es bacteriostático contra este organismo. CEM-101 fue activo contra todas las *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* resistentes a doxiciclina. A excepción de 2 *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos, ningún aislado de cualquiera de las especies probadas tuvo una CMI superior a 0,063 µg/mL para CEM-
40 101.

Pruebas de CMI. Se disolvieron los polvos antimicrobianos según las instrucciones del fabricante y se congelaron en alícuotas de 1 mL que contenían 2048 µg/mL. Fármacos probados incluidos: CEM-101, AZI, TEL, doxiciclina, levofloxacina y linezolid. Se preparó una dilución de trabajo de cada fármaco en el día de cada ensayo basada en
45 los intervalos de CMI previstos para cada fármaco. Se realizaron diluciones seriadas antimicrobianas a la mitad en caldo 10B para *Ureaplasma spp.* y en caldo SP4 para *Mycoplasma spp.* en placas de microtitulación de 96 pocillos. Para los macrólidos y cetólidos probados contra *M. pneumoniae*, se redujeron las diluciones a 0,000000063 µg/mL para medir el criterio de valoración CMI para estos potentes agentes. Se añadieron 0,175 mL de inóculo de 104-105 UCC/mL, obtenido mediante inoculación de organismos a partir de solución madre congelada de concentración
50 conocida en caldo precalentado e incubado 2 h a 37 °C, a las diluciones de fármaco. Las placas se sellaron, se incubaron aeróbicamente a 37 °C en aire y se examinaron diariamente hasta que se detectó un cambio de color en el control de crecimiento libre de fármaco. CMI = la menor concentración de un fármaco en la que se inhibió el metabolismo de los organismos, como se detecta por la falta de cambio de color en el momento en que el control libre de fármaco muestra por primera vez cambio de color.

55

Control de calidad. Se verificó el inóculo de cada aislado mediante diluciones seriadas y recuentos en placa. Las cepas de control de calidad usadas para validar la exactitud de las CMI para los agentes antimicrobianos comparadores incluyeron *M. pneumoniae* (UAB-834), *M. hominis* (UAB-5155) y *U. urealyticum* (UAB-4817); todas ellas son aislados clínicos de bajo número de pases para los que se ha establecido un intervalo de CMI de 3
60 diluciones.

<i>M. pneumoniae</i> (36 aislados)				
	Intervalo de CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	
CEM-101	≤0,000000063-0,5	0,000032	0,000125	
AZI	≤0,000016-≥32	0,00025	0,0005	
TEL	0,000031-≥32	0,00025	0,001	
Doxiciclina	0,016-0,25	0,125	0,25	
Levofloxacin	0,125-1	0,5	0,5	
Linezolid	32-128	64	128	
<i>M. genitalium</i> (5 aislados)				
CEM-101	≤0,000032		NA	NA
AZI	≤0,000032-0,005		NA	NA
TEL	≤0,00003-0,00025		NA	NA
Doxiciclina	≤0,008-0,031		NA	NA
Levofloxacin	0,125-1		NA	NA
Linezolid	4-128		NA	NA
<i>M. fermentans</i> (15 aislados)				
CEM-101	≤0,008	≤0,008	≤0,008	
AZI	0,125-1	0,5	0,5	
TEL	0,002-0,031	≤0,008	0,016	
CLN	≤0,008-0,063	0,016	0,031	
Doxiciclina	0,016-0,5	0,125	0,5	
Levofloxacin	≤0,008-0,25	0,031	0,125	
Linezolid	0,5-4	1	4	
<i>M. hominis</i> (13 aislados)				
CEM-101	0,002-0,008	0,004	0,008	
AZI	0,5-4	4	2	
TEL	0,125-0,5	0,25	0,5	
CLN	≤0,008-0,031	≤0,008	0,016	
Doxiciclina	0,008-0,016	0,125	8	
Levofloxacin	0,125-0,5	0,25	0,5	
Linezolid	1-8	2	4	
<i>U. parvum</i> (10 aislados)				
CEM-101	0,002-0,031	0,008	0,016	
AZI	0,5-4	2	4	
TEL	0,008-0,063	0,063	0,125	
Doxiciclina	0,031-16	8	16	
Levofloxacin	0,125-2	0,5	2	
Linezolid	128->256	>256	>256	
<i>U. urealyticum</i> (10 aislados)				
CEM-101	0,004-0,063	0,008	0,031	
AZI	0,5-4	2	4	
TEL	0,016-0,25	0,063	0,25	
Doxiciclina	0,031-32	1	16	
Levofloxacin	0,5-2	0,5	1	
Linezolid	256->256	>256	>256	

5

Distribución de la CMI de macrólidos para *M. pneumoniae*. Todos excepto dos de los aislados probados contra CEM-101 mostraron una CMI de 0,0001 µg/mL o inferior. En cambio, más de la mitad de todos los aislados probados contra AZI o TEL mostraron una CMI de 0,0001 µg/mL o superior.

- 10 Pruebas de CBM. Se probaron 9 *M. pneumoniae* para determinar las CBM para CEM-101. Se añadieron alícuotas (30 µl) de cada pocillo que no había cambiado de color en el momento en que se leyó la CMI a 2,97 mL de caldo (dilución 1:100) para garantizar que el fármaco estuviera diluido por debajo de la concentración inhibitoria y así permitir que los organismos vivos crecieran a niveles detectables. El control de crecimiento se subcultivó para garantizar la presencia de organismos viables en ausencia de fármaco. Los caldos se incubaron a 37 °C. CBM =
- 15 concentración de antimicrobiano en la que no hubo crecimiento aparente por ausencia de cambio de color en el

caldo tras incubación prolongada. Las CBM para las 9 *M. pneumoniae* fueron todas >16 veces mayores que las CMI correspondientes, lo que indica que CEM-101 es bacteriostático contra este organismo.

EJEMPLO. Se desarrolló un modelo *in vitro* de detención del crecimiento micobacteriano usando de *Mycobacterium bovis* BCG. Cuando se transfería un cultivo en crecimiento exponencial a un tubo evacuado, el crecimiento continuaba; sin embargo, el tratamiento con una fuente de óxido nítrico (DETA-NO 50 mM) detenía el crecimiento inmediatamente. Crecimiento restaurado por aireación. Cuando el periodo de detención del crecimiento superaba 4 h, se producía un periodo de retardo antes de que la aireación pudiera restaurar el crecimiento. Este periodo de tiempo era máximo tras 16 h de detención del crecimiento, momento en el que el retardo antes de la restauración del crecimiento era de 24 h. Sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento se cree que estos periodos de retardo pueden indicar que era necesario un periodo de transición para conseguir la detención total del crecimiento y otro para la recuperación totalmente de la detención del crecimiento. Sin ceñirnos a la teoría, en el presente documento también se cree que la detención del crecimiento inducida por DETA-NO fracasó a la hora de proteger de los efectos letales del shock anaerobio, que puede haber provocado lisis celular rápida de las células tanto en crecimiento como con crecimiento detenido. Mientras que la detención del crecimiento no tuvo efecto alguno sobre la acción letal de la rifampicina, redujo la letalidad de la fluoroquinolona de 4 a 20 veces. Dos fluoroquinolonas, moxifloxacina y gatifloxacina, fueron igualmente letales con células en crecimiento exponencial, pero la moxifloxacina fue 2 veces más activa durante la detención del crecimiento.

EJEMPLO. La alta potencia de CEM-101 contra *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos β -hemolíticos y del grupo viridans, *Staphylococcus spp.* y enterococos se ha documentado en estudios de cribado temprano realizados usando procedimientos de referencia del Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI). Puesto que los mecanismos y las ocurrencias de resistencia aumentan tan rápidamente que pueden comprometer a la clase de cetólidos mLEB, cuando se probaron subgrupos de organismos resistentes de tipo salvaje (TS) y fenotípicamente/genotípicamente definidos, se evaluaron los efectos posantibiótico (EPA), la actividad bactericida (CBM y curvas de muerte) y las sinergias potenciales de CEM-101 con cinco clases de agentes antimicrobianos seleccionadas. Las determinaciones de la CBM para CEM-101, TEL y CLR usaron procedimientos del CLSI para 40 cepas (6 grupos de especies). Las CM usaron 8 cepas (6 grupos de especies). Los EPA se probaron (5 cepas) a 4X la concentración durante 1 o 2 horas de exposición; control de TEL. Los estudios de interacción de fármacos (sinergia) se realizaron en 20 cepas (7 *S. aureus*, 6 estreptococos β -hemolíticos y 7 *S. pneumoniae*) mediante el procedimiento del tablero de ajedrez. Se combinó CEM-101 con cinco agentes (ceftriaxona, gentamicina, levofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol [TMP/SMX] y vancomicina), representando cada uno una clase antimicrobiana distinta.

La caracterización de las interacciones antimicrobianas en categorías se definió como: sinergia completa = reducción de cuatro veces o más de los valores de CMI de ambos agentes; sinergia parcial = reducción de cuatro veces o más del valor de CMI para un agente y una reducción de dos veces en la CMI del otro; aditiva = reducción de dos veces de los valores de CMI de ambos agentes probados; antagonismo = aumento de cuatro veces o más de los valores de CMI de ambos agentes; e indiferencia = sin reducción de los valores de CMI de los agentes o únicamente una reducción o aumento de la CMI de un agente.

Las categorías de interacción de fármacos (sinergia) para CEM-101 se probaron en combinación con otros antimicrobianos.

	Sinergia					
Cofármaco	Completa	Parcial	Aditiva	Indiferente	Antagonismo	Indeterminada
CRO	0	2	5	12	0	1
GEN	2	2	4	12	0	0
LEV	0	0	3	17	0	0
TMP/SMX	0	2	4	14	0	0
VAN	0	1	6	13	0	0
Todos	2	7	22	68	0	1

La categoría de interacción más común observada para los estudios de combinación del fármaco CEM-101 fue la indiferencia (68 ocurrencias), seguida de efectos aditivos (22) y de sinergia parcial (7). La sinergia solo se observó con CEM-101 y gentamicina para dos cepas de *S. pneumoniae*. Las combinaciones de CEM-101 con gentamicina, ceftriaxona, TMP/SMX, vancomicina y levofloxacina presentaron interacciones favorables (sinergia completa/parcial o aditiva; 31 % de todos los resultados) cuando se probaron cepas de *S. pneumoniae*; pero predominaron las interacciones indiferentes entre las *S. aureus* y *S. pyogenes* probadas. Ninguna de las combinaciones evaluadas demostró antagonismo.

Estudios de CBM y curvas de muerte: se probó la CMI de un total de 40 cepas (10 *S. pneumoniae*, 10 *S. aureus* y 5 de cada una de estreptococos β -hemolíticos, estreptococos del grupo viridans, estafilococos coagulasa negativos [ECoN] y enterococos) seguida de determinaciones de la CBM usando los procedimientos del CLSI (intervalo de CMI y CBM, 0,008-16 $\mu\text{g/mL}$). La concentración más baja de un agente probado que mató $\geq 99,9\%$ del inóculo inicial se definió como el criterio de valoración de la CBM (Tablas 2 y 3). Se realizó el estudio de la actividad bactericida como muerte en función del tiempo para CEM-101, TEL, CLR y AZI en ocho cepas seleccionadas según los procedimientos descritos por Moody & Knapp, NCCLS M21-A3 y M26-A. Los compuestos se probaron a 2X, 4X, 8X la CMI y los recuentos de colonias se realizaron a T0, T2, T4, T8 y T24.

10

CEM-101 presentó bajas relaciones CBM/CMI (≤ 4) para BSA, SA y estafilococos coagulasa negativos; y una potencia 2 veces mayor que la TEL. SA, los enterococos y algunas cepas resistentes (R) a macrólidos/CLN tuvieron relaciones mayores. Los resultados de las curvas MC mostraron una actividad bactericida mayor y más rápida (dependiente de la concentración) para CEM-101 en comparación con TEL. Los EPA para CEM-101/TEL (horas) fueron: SA (2,3/2,6 horas), SPN (3,0/1,9), BSA (6,1/3,4), *H. influenzae* (3,7/1,2), *M. catarrhalis* (5,3/4,0). Los resultados de la interacción con CEM-101 mostraron no antagonismo y efectos aditivos o indiferentes dominantes. CEM-101 presentó actividad bactericida contra varias especies gram-positivas con tasas y magnitud mayores que la TEL. El EPA para CEM-101 fue 2,3-6,1 y 3,7-5,3 horas para cepas gram-positivas y gram-negativas, respectivamente. No se encontró antagonismo alguno en los análisis de sinergia; con inhibición mejorada más destacada para las combinaciones con CRO, GEN y TMP/SMX.

20

Distribución de aislados según la relación CBM/CMI para CEM-101, TEL, CLR y AZI

Organismo/Agente antimicrobiano (n.º probado)	N.º de cepas con valor CBM/CMI de:					
	1	2	4	8	16	≥ 32
<i>S. pneumoniae</i> (10)						
CEM-101	3	5	0	0	0	2
Telitromicina	2	6 ^a	0	0	0	2
Claritromicina	2	3	1	0	0	^b
Azitromicina	2	4	0	0	0	^b
Estreptococos β -hemolíticos (5)						
CEM-101	0	1	2	0	0	2
Telitromicina	0	1	1	1	0	2
Claritromicina	0	0	1	1	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	2	2 ^b
Estreptococos del grupo viridans (5)						
CEM-101	3	0	1	0	0	1
Telitromicina	2	1	1	0	0	1
Claritromicina	0	0	1	0	0	3 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	1	3 ^b
<i>S. aureus</i> (10)						
CEM-101	1	0	0	0	1	8
Telitromicina	0	0	0	0	0	10
Claritromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
Estafilococos coagulasa neg. (5)						
CEM-101	1	1	0	3	0	0
Telitromicina	0	0	0	0	2	3
Claritromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
<i>Enterococcus spp.</i> (5)						
CEM-101	0	0	0	0	0	5
Telitromicina	0	0	0	0	0	5
Claritromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
a. Incluye seis aislados con una CMI de $\leq 0,008 \mu\text{g/mL}$ y una CBM de $0,015 \mu\text{g/mL}$ (comparaciones fuera de escala).						
b. La CBM no se evaluó en aislados con resultados de CMI a nivel resistente.						

CEM-101 mostró actividad bactericida rápida (reducción de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL) contra cepas susceptibles a macrólidos de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (solo a 8X la CMI) y estreptococos del grupo viridans, así como contra un *S. pyogenes* resistente a macrólidos. CEM-101 produjo una mayor reducción de 5 UFC/mL y una muerte más rápida en comparación tanto con TEL como con los macrólidos CLR y AZI.

Resumen de los resultados de las curvas de muerte en función del tiempo.

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

- 10 CEM-101 presentó actividad bactericida cuando se probó contra estreptococos susceptibles a macrólidos, ECoN y *S. pneumoniae* resistente a macrólidos y susceptible a CLN. Las relaciones CBM/CMI para CEM-101 pueden ser altas para *S. aureus*, pero algunas cepas mostraron resultados de CBM que permanecían dentro del intervalo de concentraciones susceptible.
- 15 Pruebas de EPA: los valores del EPA para CEM-101 y TEL se determinaron usando procedimientos establecidos que son consistentes con los recomendados por Craig y Gudmundsson. Ambos agentes antimicrobianos se probaron contra cada aislado a 4X y 8X la CMI. Los recuentos de colonias se realizaron en el momento preexposición microbiana T0) y tras una o dos horas posexposición microbiana (T1 o T2). Tras «diluir» los agentes antimicrobianos (1:1000), se realizaron recuentos de colonias cada hora hasta que se apreció turbidez (hasta 10 horas posdilución) para determinar la duración del EPA. Los patógenos gram-positivos y gram-negativos probados fueron los siguientes: *S. aureus* ATCC 29213; *H. influenzae* ATCC 49247; *S. pneumoniae* ATCC 49619; *S.*
- 20

pyogenes WT (177-1612A) y *M. catarrhalis* WT (117-10142A).

Resultados del EPA para CEM-101 en comparación con TEL medido en horas.

Concentración antimicrobiana	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. pyogenes</i> 117-1612A	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>M. catarrhalis</i> 117-10142A
CEM-101 (4X la CMI)	2,3	3,0	6,1	3,2	6,3
Telitromicina (4X la CMI)	2,6	1,9	3,4	1,2	4,0
Exposición (horas)	2	1	2	1	2

5

Tras dos horas de exposición, el EPA de CEM-101 (2,3 horas) fue similar al de la TEL (2,6 horas) cuando se probaron contra *S. aureus* a un valor de 4X la CMI. Aumentando la concentración durante la exposición a 8X la CMI, el EPA de CEM-101 se prolongó a 3,9 horas (datos no mostrados). El EPA de CEM-101 probados contra *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* fue de 3,0 y 6,1 horas, en comparación con las 1,9 y 3,4 horas para TEL, respectivamente. El EPA de CEM-101 contra patógenos gram-negativos también favoreció al agente nuevo frente al cetólido más antiguo.

Los compuestos descritos en el presente documento muestran un EPA dependiente de la concentración y exposición significativo contra patógenos gram-positivos, como se muestra mediante CEM-101 (EPA promedio, 3,8 horas) y gram-negativos (EPA promedio, 4,5 horas) habitualmente asociados a ITR-EH e ICTB no complicadas. En general, el EPA de CEM-101 fue más duradero que el de la TEL.

EJEMPLO. Actividad sobre clamidia. Se proporcionaron CEM-101, TEL, AZI, CLR y doxiciclina como polvos y se solubilizaron según las instrucciones de los fabricantes. Se hicieron suspensiones de los fármacos frescas cada vez que se realizaba un ensayo.

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

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

30

Pruebas de susceptibilidad *in vitro*: se realizaron pruebas de susceptibilidad de *C. pneumoniae* y *C. trachomatis* en cultivo celular usando células HEp-2 que crecieron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 0,1 mL de la cepa probada diluida para producir de 10^3 a 10^4 UFI por mL, se centrifugó a 1700 x g durante 1 h y se incubó a 35 °C durante 1 h. Los pocillos se aspiraron y se recubrieron con 0,2 mL de medio que contenía 1 µg de cicloheximida por mL y se realizaron diluciones seriadas a la mitad del fármaco de prueba.

Se inocularon placas duplicadas. Tras incubación a 35 °C durante 48-72 h, se fijaron los cultivos y se tiñeron para inclusiones con anticuerpo conjugado con fluoresceína para el antígeno del género lipopolisacárido (Pathfinder, Kallestad Diagnostics, Chaska, Minn). La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de antibiótico a la que no se vieron inclusiones. La concentración bactericida mínima (CBM) se determinó aspirando el medio que contenía antibiótico, lavando los pocillos dos veces con solución salina tamponada con fosfato y añadiendo medio libre de antibiótico. Los cultivos se congelaron a -70 °C, se descongelaron, se pasaron sobre células nuevas, se incubaron durante 72 h y, a continuación, se fijaron y tiñeron como se indicó anteriormente. La CBM es la concentración más baja de antibiótico que deriva en ausencia de inclusiones tras el pase. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

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

Fármaco	CMI (µg/mL)			CBM (µg/mL)	
	Intervalo	50 %	90 %	Intervalo	90 %
CEM-101	0,25-1,0	0,25	0,25	0,25-1,0	0,25
Telitromicina	0,015-0,25	0,06	0,06	0,015-0,25	0,06
Azitromicina	0,015-0,125	0,125	0,125	0,015-0,125	0,125
Claritromicina	0,015-0,125	0,06	0,06	0,015-0,125	0,06
Doxiciclina	0,015-0,06	0,06	0,06	0,015-0,06	0,06

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

Fármaco	CMI (µg/mL)			CBM (µg/mL)	
	Intervalo	50 %	90 %	Intervalo	90 %
CEM-101	0,125-0,5	0,25	0,25	0,125-0,5	0,25
Telitromicina	0,015-0,25	0,06	0,06	0,015-0,25	0,06
Azitromicina	0,015-0,125	0,125	0,125	0,015-0,125	0,125
Claritromicina	0,015-0,125	0,06	0,06	0,015-0,125	0,06
Doxiciclina	0,015-0,06	0,06	0,06	0,015-0,06	0,06

5

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

10 EJEMPLO. Distribución tisular. CEM-101 se absorbió y distribuyó bien en el tejido. En la rata a 250 mg/kg/d, las concentraciones medias en pulmón e hígado de CEM-101 fueron 17 y 15 veces superiores a las plasmáticas. Las concentraciones en pulmón e hígado fueron 503 y 711 veces superiores a las concentraciones plasmáticas a la dosis de 200 mg/kg/d en monos. Las concentraciones de CEM-101 en el corazón fueron significativamente inferiores a los niveles encontrados en el pulmón o hígado, con niveles 5 y 54 veces superiores a las concentraciones plasmáticas en rata y mono, respectivamente.

15

EJEMPLO. Actividad de CEM-101 contra aislados invasivos de *N. meningitidis* (NM) de una colección a escala mundial. La colonización de la nasofaringe (NF) por NM puede llevar a enfermedad meningocócica invasiva. Se usó quimioprofilaxis para erradicar la colonización de NF e impedir la transmisión a contactos no inmunes. En el presente documento se describe la determinación de la actividad de CEM-101 probado contra aislados clínicos invasivos de NM. Se recogieron 62 aislados (91,9 % de cultivo sanguíneo) de NM de 29 centros médicos de Norteamérica, Sudamérica y Europa (1997-2008). Se probó la susceptibilidad (S) de las cepas a CEM-101 y 10 comparadores que incluían β-lactámicos, fluoroquinolonas (FQ), macrólidos y otras tres clases mediante procedimientos de microdilución en caldo del CLSI. Se realizó identificación serológica para los serogrupos (SG) B, C, Y y W135.

25 La susceptibilidad a penicilina fue del 82,3 %, sin detección de cepas resistentes (R). Todos los aislados fueron susceptibles a ceftriaxona, AZI, minociclina y rifampina. Los aislados fueron susceptibles a FQ (≤0,015 µg/mL); sin embargo, 13 cepas tuvieron susceptibilidad reducida al ácido nalidíxico (CMI ≥8 µg/mL), que puede correlacionarse con menor susceptibilidad a FQ. La resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (T/S) fue del 59,7 %. Entre los agentes de la clase mLE_B, CEM-101 fue el más activo (CMI₉₀, ≤0,015 µg/mL) en comparación con la TEL (0,03 µg/mL), AZI y CLR (0,12 µg/mL) y eritromicina (0,25 µg/mL). Las tasas de prevalencia (%) de los SG fueron C (41,7), B (38,3), Y (16,7) y W135 (3,3). CEM-101 fue el compuesto más activo probado contra cepas de NM mLE_B (todas las CMI, ≤0,06 µg/mL) con una potencia ≥2 a 32 veces superior a agentes de otra clase. CEM-101 fue activo contra aislados de NM no-S a β-lactámicos y T/S.

30

Agente antimicrobiano	CMI (µg/mL)				
	50 %	90 %	Intervalo	% susc. ^a	% de res. ^a
CEM-101	≤0,015	≤0,015	≤0,015-0,06	- ^b	-
TEL	≤0,015	0,03	≤0,015-0,12	-	-
AZI	0,06	0,12	≤0,015-0,12	100,0	-
CLR	0,03	0,12	≤0,015-0,25	-	-
Eritromicina	0,12	0,25	0,03-0,5	-	-
Penicilina	0,03	0,12	≤0,015-0,25	82,3	0,0
Ceftriaxona	≤0,015	≤0,015	≤0,015	100,0	-
Ciprofloxacina	≤0,008	≤0,008	≤0,008-0,015	100,0	0,0

Levofloxacin	≤0,008	≤0,008	≤0,008-0,015	100,0	0,0
Minociclina	0,12	0,12	≤0,008-0,25	100,0	-
Rifampina	0,015	0,06	≤0,008-0,12	100,0	0,0
Trimetoprim/sulfametoxazol	0,5	2	≤0,06-4	37,1	59,7
a. Criterios de susceptibilidad basados en el CLSI (M100-S19, 2009).					
b. No se han propuesto criterios de susceptibilidad, pero la AZI a ≤2 µg/mL se considera susceptible.					

EJEMPLO. Capacidad de CEM-101 para seleccionar clones de *S. pyogenes* resistentes mediante el procedimiento multietapa. Se ha informado de que los *S. pyogenes* retienen la susceptibilidad a β-lactámicos, pero, a veces, son resistentes a macrólidos. La TEL es activa contra todos los genotipos de *S. pyogenes* resistentes a macrólidos excepto erm(B). En el presente documento, se ha descubierto que CEM es de 2 a 4 veces más activo que la TEL. En el presente documento, se describe la capacidad de CEM, AZI, CLR, TEL y CLN probada para seleccionar clones de *S. pyogenes* resistentes en 5 cepas con resistotipos variables.

Se probó una cepa de cada uno de los siguientes: susceptible a macrólidos, erm(B), mef(A), erm(A), mutación en la proteína ribosómica L4. Para las pruebas de CMI se usó macrodilución según el CLSI. Se realizaron diariamente pases seriados en caldo de Mueller-Hinton (MHB, por sus siglas en inglés) + 5 % de sangre de caballo lisada para cada cepa a concentraciones de fármaco subinhibitorias, tomando para cada pase posterior un inóculo del tubo 1-2 diluciones por debajo de la CMI que coincidía con la turbidez de un control de crecimiento. Se continuaron los pases diarios hasta que la CMI aumentó >4 veces (máx. 50 pases). Los clones resistentes se subcultivaron 10x en medio libre de fármaco para probar la estabilidad de la resistencia seleccionada. Se confirmó identidad entre clones parentales y resistentes mediante EGCP y se identificaron los fenotipos resistentes a macrólidos mediante RCP.

Las CMI parentales (µg/mL) fueron: CEM-101, 0,008-1; AZI, 0,06-4; CLR, 0,03-4; TEL, 0,03-8 y CLN, 0,06 (1 cepa con CMI de AZI, CLR y CLN >64 µg/mL no se probó). Las CMI de CEM-101 aumentaron tras 18-43 días en 3/5 cepas, subiendo de 0,03-1 µg/mL (parentales) → 0,25-8 µg/mL (clones resistentes). Las CMI para 2 de los clones no subieron por encima de 0,25 µg/mL cuando se continuaron los pases durante el plazo máximo de 50 días. La AZI tenía clones resistentes tras 5-35 días en 3/4 cepas probadas, con CMI que subían de 0,06-4 µg/mL (parentales) → 1->64 µg/mL (clones R). La CLR tenía clones resistentes tras 6 días en 1/4 cepas probadas, con CMI que subían de 0,5 µg/mL (parental) → >64 µg/mL (clon resistente). La TEL tenía clones resistentes tras 6-22 días en 2/4 cepas probadas, con CMI que subían de 0,03-8 µg/mL (parentales) → 0,25->64 µg/mL (clones resistentes). La CLN tenía clones resistentes tras 34-43 días en 2/3 cepas probadas, con CMI que subían de 0,06 µg/mL (parentales) → 0,5->64 µg/mL (clones resistentes). En 2 de los 3 clones resistentes con CEM-101 [parentales erm(A), L4], las CMI fueron de 0,25 µg/mL y, únicamente en la 1 cepa con erm(B), la CMI de CEM-101 subió de 1-8 µg/mL.

EJEMPLO. Capacidad de CEM-101 para seleccionar clones neumocócicos resistentes (R) mediante el procedimiento multietapa. Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a fármacos se dan a escala mundial. En el presente documento, se ha descubierto que CEM-101 es de 2 a 4 veces más activo que la TEL contra neumococos resistentes a macrólidos. En el presente documento, se describe la capacidad de CEM probada para seleccionar clones de *S. pneumoniae* resistentes en comparación con AZI, CLR, TEL y CLN en 8 cepas neumocócicas con resistotipos variables.

Se probó una cepa de cada uno de los siguientes: susceptible a macrólidos, erm(B), mef(A), ermB + mefA, erm(A), mutaciones en la proteína ribosómica L4, L22 y ARNr 23S. Para las pruebas de CMI se usó macrodilución según el CLSI. Se realizaron diariamente pases seriados en MHB + 5 % de sangre de caballo lisada para cada cepa a concentraciones de fármaco subinhibitorias, tomando para cada pase posterior un inóculo del tubo 1-2 diluciones < CMI que coincidía con la turbidez de un control de crecimiento. Se continuaron los pases diarios hasta que la CMI aumentó >4 veces (mín. 14, máx. 50 pases). Los clones resistentes se subcultivaron 10X en medio libre de fármaco para probar la estabilidad de la resistencia seleccionada. Se confirmó identidad entre clones parentales y resistentes mediante EGCP y se identificaron los fenotipos resistentes a macrólidos mediante RCP.

Las CMI parentales (µg/mL) fueron: CEM-101, 0,004-1; AZI, 0,03-8; CLA, 0,016-16; TEL, 0,004-0,5 y CLI, 0,016-1 (cuatro cepas con AZI, 2 CLR, 2 CLN de CMI >64 µg/mL no se probaron). Las CMI de CEM-101 aumentaron tras 14-43 días en las 8 cepas probadas. Para 7 cepas, las CMI subieron de 0,004-0,03 µg/mL (parentales) → 0,06-0,5 µg/mL (clones resistentes) en 14-43 días. Para la octava cepa, que contenía erm(B) + mef(A), las CMI subieron de 1 µg/mL (parental) → 32 µg/mL (clon resistente) en 18 días. La AZI tenía clones resistentes tras 14-29 días en 3/4 cepas, con CMI que subían de 0,03-2 µg/mL (parentales) → 0,5->64 µg/mL (clones resistentes). La CLR tenía clones resistentes tras 14-49 días en 5/6 cepas, con CMI que subían de 0,03-16 µg/mL (parentales) → 16->64 µg/mL (clones resistentes). La TEL tenía clones resistentes tras 14-38 días en 5/8 cepas, con CMI que subían

de 0,004-0,5 µg/mL (parentales) → 0,06->64 µg/mL (clones resistentes). La CLN tenía clones resistentes tras 14-43 días en 2/5 cepas, con CMI que subían de 0,03-0,06 µg/mL (parentales) → 0,25->64 µg/mL (clones resistentes). CEM-101 produjo clones con CMI superiores en las 8 cepas, pero 7 de 8 tuvieron clones con CMI de CEM-101 ≤0,5 µg/mL y, únicamente en la 1 cepa con erm(B) + mef(A) con una CMI parental = 1 µg/mL, se encontró un clon resistente con una CMI = 32 µg/mL.

EJEMPLO. Se usaron macrófagos THP-1 humanos. La acumulación se midió mediante ensayo microbiológico. Se determinó la actividad intracelular contra *S. aureus* fagocitado (ATCC 25923; CMI: CEM-101, 0,125 mg/L; AZI, 0,5 mg/L) usando una estrategia de dosis-respuesta (AAC 2006;50:841-51). Se usaron verapamilo (100 µM) y gemfibrozilo (250 µM) como inhibidores de la glicoproteína P y la PMR, respectivamente (AAC, 2007;51:2748-57).

Las acumulaciones y actividades tras incubación de 24 h, con y sin inhibidores de los transportadores de eflujo, se muestran en la tabla siguiente, en la que Cc/Ce es la relación de concentración celular a extracelular aparente y E_{máx} es la máxima reducción de UFC intracelulares en comparación con el inóculo posfagocitosis (calculada a partir de regresión no lineal [sigmoidea] de experimentos de respuesta dosis-efecto).

Condición	AZI			CEM-101		
	Cc/Ce ¹ (24 h)	Actividad intracelular (Δ log UFC a 24 h)		Cc/Ce ¹ (24 h)	Actividad intracelular (Δ log UFC a 24 h)	
		Dosis estática (mg/L)	E _{máx} ²		Dosis estática (mg/L)	E _{máx} ²
control	127,7 ± 23,5	~ 7,0	0,10 ± 0,09	268,1 ± 7,1	~ 0,02	-0,85 ± 0,23 ^(b)
Verapamilo	216,37 ± 46,6 ^(a)	~ 0,2	-0,37 ± 0,15	290,2 ± 12,9	~ 0,03	-0,59 ± 0,22 ^(b)
Gemfibrozilo	129,12 ± 2,69	~ 3,8	-0,12 ± 0,20	308,2 ± 47,8	~ 0,03	-0,73 ± 0,20 ^(b)
^(a) Estadísticamente significativo tanto de control como de gemfibrozilo; ^(b) no estadísticamente significativo.						

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

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

Primero, se midió la acumulación celular de CEM-101 en comparación con la de AZI en células THP-1, FIG. 5 (panel A). A las 24 h, ambos antibióticos se concentran en grandes cantidades en las células, pero con un valor superior (Cc/Ce) para CEM-101. En una segunda etapa, se investigó si CEM-101 es un sustrato de la GpP o los transportadores de eflujo de PMR, FIG. 5 (panel B). Usando un inhibidor de la GpP (verapamilo) o las PMR (gemfibrozilo), no se observan variaciones significativas de la acumulación celular de CEM-101, mientras que el verapamilo aumenta significativamente la acumulación celular de AZI.

La absorción de CEM-101 fue lineal a lo largo del tiempo, alcanzando niveles de acumulación de aproximadamente 375 veces en 24 h (AZI, 160X, CLR, 30X, TEL, 21X). La acumulación se suprimió mediante pH ácido o adición del ionóforo de protones monensina, pero no se vio modificada por el verapamilo o gemfibrozilo (inhibidores preferentes de la GpP y PMR, respectivamente). El panel B muestra que la acumulación de CEM-101 y AZI se reducía cuando los experimentos se llevaban a cabo a pH ácido, produciéndose el cambio prácticamente en su totalidad cuando el pH se llevaba de 7 a 6. El panel C muestra que la monensina, que se sabe que reduce la acumulación celular de

muchas bases orgánicas débiles, también suprimía casi completamente la acumulación tanto de CEM-101 como de AZI. En cambio, el verapamilo, un inhibidor del transportador de eflujo de glicoproteína P (GpP, también conocida como PMR1), aumentaba la acumulación de AZI sin afectar a la de CEM-101, mientras que el gemfibrozilo, un inhibidor de las proteínas multirresistentes (PMR) y otros transportadores de aniones orgánicos, no afectaba a ninguno de los compuestos. Ni el verapamilo ni el gemfibrozilo afectaron a la acumulación de TEL o CLR (datos no mostrados). Se examinó el eflujo de CEM-101 desde células incubadas con 10 mg/L de CEM-101 durante 1 h y, a continuación, transferidas a medio libre de fármaco. El eflujo continuó de forma bimodal, siendo la mitad del fármaco asociado a las células liberado en aproximadamente 10 min, seguido de una fase de liberación lenta de varias horas (datos no mostrados).

10

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

15

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

^a mg/L; ^b concentración estática (mg/L) a 24 h; ^c $\Delta \log_{10}$ UFC a 24 h en comparación con el inóculo posfagocitosis

EJEMPLO. Se determinaron las CMI y las actividades extracelulares de los antibióticos en MHB a pH tanto neutro como ácido. Se determinó la actividad intracelular contra *S. aureus* (ATCC 25923) fagocitado por macrófagos THP-1 como se describió anteriormente (AAC, 2006, 50:841-851). Los resultados se expresaron como un cambio de eficacia en comparación con el tiempo 0 h.

20

Condiciones	CEM-101	AZI	CLR	TEL
CMI (mg/L)				
(i) pH 7,4	0,125	0,5	0,5	0,5
(ii) pH 5,5	1-2	256	16	8
Actividad extracelular (24 h): $\Delta \log$ UFC				
desde el tiempo 0 h				
(i) Caldo a pH 7,4				
Emáx ¹	-1,4 $\pm$ 0,1	-1,2 $\pm$ 0,6	-1,4 $\pm$ 0,2	-1,0 $\pm$ 0,4
Dosis estática ²	~ 0,06	~ 3,63	~ 1,41	~ 0,28
R ²	0,964	0,860	0,965	0,868
(ii) Caldo a pH 5,5				
Emáx ¹	-1,6 $\pm$ 0,4	+2,1 $\pm$ 0,1	-1,5 $\pm$ 0,8	-1,4 $\pm$ 0,9
Dosis estática ²	~ 1,48	/	~ 10,47	~ 9,33
R ²	0,915	/	0,911	0,879
Actividad intracelular (24 h): $\Delta \log$ UFC				
desde el tiempo 0 h				
Emáx ¹	-0,8 $\pm$ 0,2	0,10 $\pm$ 0,0	-0,1 $\pm$ 0,1	-0,4 $\pm$ 0,2

Dosis estática ²	~ 0,02	~ 7,8	~ 0,98	~ 0,23
R ²	0,906	0,980	0,974	0,935
THP-1				
Emáx ¹	-0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,1
Dosis estática ²	~ 0,02	~ 10	~ 0,98	~ 0,28
1 - Máxima reducción de UFC intracelulares en comparación con el inóculo posfagocitosis inicial (calculado a partir de regresión no lineal [sigmoidea] de la respuesta dosis-efecto) llevada a cabo en caldo (extracel.) o con macrófagos infectados (intracel.). 2 - Concentración extracelular (Ce en mg/L) que produce un efecto estático aparente. Descriptores farmacológicos comparativos (Emáx y concentraciones estáticas [Cs]) obtenidos de los estudios dosis-respuesta. Estudios dosis-respuesta en caldo de Mueller-Hinton. Contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y en caldo, a pH 7,4, CEM-101 es sistemáticamente más activo que la AZI, CLR y TEL; a pH 5,5, la AZI, CLR y TEL muestran una reducción significativa de sus potencias, mientras que CEM-101 muestra menos cambio.				

En comparación con AZI, CLR y TEL, la actividad de CEM-101 se vio menos afectada por el pH ácido del caldo y mostró mayor potencia (menor dosis estática) y mayor eficacia máxima (Emáx) contra *S. aureus* intracelular.

5 EJEMPLO. Líneas celulares. Los experimentos se realizaron con células THP-1 (ATCC TIB-202; colección de cultivos tisulares americana, Manassas, VA), una línea celular mielomonocítica humana que muestra actividad similar a los macrófagos (véase, p. ej., Barcia-Macay y col., Antimicrob. Agents Chemother. 50:841-851 (2006)). Ensayo de macrólidos asociados a las células y cálculo de las relaciones de concentración celular a extracelular aparentes. Los macrólidos se ensayaron mediante un procedimiento microbiológico, usando *S. aureus* ATCC 25923 como organismo de prueba. Las proteínas celulares se midieron en paralelo usando el procedimiento de Folin-Ciocalteu/Biuret. El contenido de macrólidos asociado a las células se expresó en función del contenido de proteína celular total y se convirtió en concentraciones aparentes usando un factor de conversión de 5 µL por mg de proteína celular, un valor promedio encontrado para muchas células cultivadas.

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

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

30 Análisis estadísticos. Se realizaron análisis estadísticos de ajuste de curvas con GraphPad Prism versión 4.03 y GraphPad Instat versión 3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA).

EJEMPLO. Susceptibilidad a *S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* EGD y *Legionella pneumophila* ATCC 33153. CEM-101 mostró CMI inferiores a la AZI contra los tres organismos seleccionados (*S. aureus*, 0,06 y 0,5 mg/litro; *L. monocytogenes*, 0,004 y 1 mg/litro y *L. pneumophila*, 0,004 y 0,016 mg/litro) en las pruebas de susceptibilidad convencionales. Las CMI de CEM-101, TEL, AZI y CLR contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* se midieron en caldos ajustados a valores de pH que variaban de 5,5 a 7,4. El intervalo se seleccionó para que cubriera los valores a los que los podían estar expuestos los antibióticos en el medio extracelular o intracelularmente para los dos organismos considerados. Como se ilustra en la FIG. 1, los cuatro fármacos mostraron una marcada reducción de potencia contra ambos organismos cuando el pH se reducía de 7,4 a 5,5, demostrando la AZI la pérdida de actividad más significativa. CEM-101 retuvo la mayor actividad, mostrando consistentemente las CMI más bajas en todo el intervalo de pH investigado, con valores (mg/litro) que variaban de 0,06 (pH 7,4) a 0,5 (pH 5,5) para *S. aureus* (ATCC 25923) y de 0,0039 (pH 7,4) a 0,25 (pH 5,5) para *L. monocytogenes* (EDG). Para *L. pneumophila* (datos no mostrados), la CMI de CEM-101 aumentó de 0,005 a 0,01 y la de AZI de aproximadamente 0,01 a 0,25 mg/litro cuando el pH del caldo se reducía de 7,4 a 6,5 (no se podía realizar determinación alguna a valores de pH inferiores por ausencia de crecimiento).

- EJEMPLO. Efectos del tiempo y la concentración contra *S. aureus* extracelular e intrafagocitario. Se obtuvieron curvas de muerte en función del tiempo a corto plazo (6 h) para CEM-101, en comparación con las de AZI, contra *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo y tras fagocitosis por macrófagos THP-1 usando dos concentraciones fijas únicas de 0,7 y 4 mg/litro. La concentración más baja se eligió para que fuera relevante a la concentración sérica de AZI y CEM-101 y la concentración más alta se seleccionó para que estuviera por encima de la CMI de AZI para los organismos de interés. Los resultados presentados en la FIG. 3 muestran que, en estas condiciones, solo CEM-101 fue capaz de reducir significativamente las UFC en el caldo, así como en los macrófagos THP-1, a la concentración de 0,7 mg/litro. A la concentración de 4 mg/litro en caldo, la AZI finalmente conseguía el mismo efecto antibacteriano que CEM-101, pero a una velocidad inferior (5 h en comparación con 1 h). En los macrófagos THP-1, se detectó actividad no consistente para la AZI, incluso a la concentración de 4 mg/litros, mientras que CEM-101 consiguió de nuevo una reducción de aproximadamente 1,5 log₁₀ UFC, similar a la magnitud vista a la concentración de 0,7 mg/litro. En todas las situaciones con CEM-101, la reducción de UFC máxima se obtuvo en 1 h y se mantuvo a partir de entonces.
- 15 A continuación, realizamos experimentos concentración-respuesta en un momento temporal fijo (24 h) para obtener los descriptores farmacológicos de actividad de CEM-101 pertinentes (potencia relativa [concentración efectiva del 50 % {CE₅₀}], concentración estática aparente [C_s] y eficacia máxima relativa [E_{máx}] en comparación con la actividad de CLR, AZI y TEL (se describen detalles adicionales en Barcia-Macay y col., Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages Antimicrob. Agents Chemother. 50:841-851 (2006)). Los datos se presentan en la FIG. 2 en función de (i) las concentraciones en peso (mg/litro) y (ii) múltiplos de las CMI (como se determinan en caldo a pH 7,4). Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos correspondientes se muestran en la tabla. Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [IC]) y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la FIG. 2.

antibiótico	E _{máx} (IC)	caldo + CE ₅₀ (IC)	C _s ⁰⁰	R ²
CEM-101	-1,37 (de -1,67 a -1,08) a; A	mg/L 0,03 (de 0,02 a 0,06) a; A	0,06	0,973
		x CMI	0,48 (de 0,26 a 0,91) a; A	0,88
TEL	-1,00 (de -1,78 a -0,22) a; A	mg/L 0,12 (de 0,03 a 0,52) b; A	0,29	0,892
		x CMI	0,46 (de 0,11 a 2,06) a; A	0,96
AZI	-1,23 (de -2,55 a 0,083) a; A	mg/L 1,78 (de 0,45 a 7,02) c; A	3,4	0,872
		x CMI	3,55 (de 0,90 a 14,0) b; A	6,87
CLR	-1,41 (de -1,95 a -0,87) a; A	mg/L 0,80 (de 0,41 a 1,56) c; A	1,32	0,956
		x CMI	1,59 (de 0,81 a 3,1) a, b; A	2,65
		Macrófagos THP-1 ⁺⁺		
antibiótico	E _{máx} (IC)	CE ₅₀ (IC)	C _s ⁰⁰	R ² (IC)
CEM-101	-0,86 (de -1,36 a -0,37) a, B	mg/L 0,0068 (de 0,0023 a 0,020) a, B	0,022	0,927
		x CMI	0,11 (de 0,037 a 0,32)	0,35

			a, B		
TEL	-0,29	mg/L	0,024	0,63	0,954
	(de -0,70 a 0,12)		(de 0,007 a 0,088)		
	b; B		b; B		
		x CMI	0,097	1,04	
			de 0,027 a 0,35		
			a, B		
AZI	0,04	mg/L	0,11	>50	0,983
	(de -0,23 a 0,32)		(de 0,05 a 0,22)		
	b; B		c; B		
		x CMI	0,22	>100	
			de 0,11 a 0,45		
			a, B		
CLR	-0,18	mg/L	0,046	0,84	0,974
	(de -0,52 a 0,16)		(de 0,018 a 0,12)		
	b; B		b, c; B		
		x CMI	0,093	1,68	
			de 0,035 a 0,25		
			a, B		
^a usando todos los puntos de datos mostrados en la FIG. 4 (datos de muestras sin antibiótico cuando la concentración extracelular de un antibiótico es inferior a 0,01 x CMI (5) ⁺ inóculo original [tiempo = 0 h]: $0,97 \pm 0,24 \times 10^5$ UFC/mL (n = 3) ⁺⁺ inóculo original (posfagocitosis) [tiempo = 0 h]: $2,74 \pm 0,55 \times 10^6$ UFC/mg de proteína (n = 3) [◆] reducción de UFC (en unidades log ₁₀) a tiempo = 24 h del inóculo original correspondiente, como se extrapola para la concentración de antibiótico = ∞; las muestras que producen menos de 5 recuentos se consideraron por debajo del nivel de detección. [◇] concentración (en mg/L o en x CMI) que provoca una reducción del inóculo intermedia entre los valores inicial (E ₀) y máximo (E _{máx}), como se obtiene a partir de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1); ^{◇◇} concentración (en mg/L o en x MIC) que deriva en crecimiento bacteriano no aparente (número de UFC idéntico al del inóculo original), como se determina mediante interpolación gráfica; Análisis estadísticos. Análisis de las diferencias entre antibióticos (por columna para las filas correspondientes; análisis ANOVA unidireccional con prueba de Tuckey para comparaciones múltiples entre cada parámetro para todos los fármacos): las cifras con letras minúsculas diferentes son significativamente entre sí (p < 0,05). Análisis de las diferencias entre caldo y macrófagos THP-1 (por fila para las columnas correspondientes; test t de Student de dos colas para muestras no apareadas): las cifras con letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05).					

- Las actividades tanto en caldo como en macrófagos THP-1 se desarrollaron de un modo dependiente de la concentración, como denota la forma sigmoidea de cada función de ajuste óptimo (ecuación de Hill). En caldo, la eficacia relativa de CEM-101 (E_{máx} de -1,37 log₁₀) fue similar a la de los otros fármacos (valores de E_{máx} de -1,00 a -1,41 log₁₀). En macrófagos THP-1, la eficacia relativa de CEM-101 se redujo significativamente en comparación con la de en caldo (E_{máx} de -0,86 log₁₀), pero no con la misma magnitud que las de los otros fármacos, que se volvieron esencialmente solo bacteriostáticos (valores de E_{máx} de 0,04 a -0,29 log₁₀). En términos ponderales, CEM-101 tuvo potencias relativas superiores (valores de E₅₀ inferiores) y concentraciones estáticas inferiores (valores de C_s inferiores) que los tres fármacos comparadores. tanto en caldo como en macrófagos THP-1. Cuando se analizaron los datos en función de la concentración equipotente (múltiplos de la CMI), estas diferencias en los valores de CE₅₀ se redujeron, lo que indica que la CMI era el parámetro motor principal en este contexto. En caldo, incluso cuando se analizaron como múltiplos de la CMI, CEM-101 y CLR todavía mostraron valores de CE₅₀ significativamente inferiores a los de TEL y AZI.
- 15 Ejemplo. Actividad contra *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* intrafagocitarios. Se usó la misma estrategia que la de *S. aureus* para evaluar las actividades de CEM-101 y AZI contra *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* fagocitados con el fin de obtener información sobre las relaciones concentración-efecto y sobre los correspondientes descriptores farmacológicos pertinentes. Como se muestra en la FIG. 4, se observó una relación compatible con la ecuación de Hill en todos los casos, aunque el crecimiento limitado de *L. pneumophila* hizo que el ajuste de funciones fuera algo más incierto. Cuando se representaron gráficamente los datos frente a la concentración en

peso, resultó que CEM-101 tenía una potencia relativa superior (EC50 inferior) a la AZI, tanto para *L. monocytogenes* como para *L. pneumophila*. Esta diferencia se redujo, pero, sin embargo, siguió siendo significativa, cuando se representaron gráficamente los datos de *L. pneumophila* frente a múltiplos de la CMI, lo que indica que la CMI era un motor importante, pero no exclusivo, de la actividad intracelular contra este organismo. Por el contrario, no se vio diferencia en las respuestas para *L. monocytogenes* cuando se expresaron los datos como múltiplos de la CMI. Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos pertinentes y el análisis estadístico de sus diferencias se muestran en la tabla.

5 Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [IC]) y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la FIG. 4.

10

<i>L. monocytogenes</i> EGD ⁺					
antibiótico	$E_{\max}^{\diamond} (IC)$		$CE_{50}^{\diamond} (IC)$	$C_s^{\diamond\diamond}$	R^2
	-0,66	mg/L	0,020	0,11	0,934
CEM-101	(de -1,28 a -0,037)		(de 0,005 a 0,073)		
	a		a		
		x CMI	5,00	0,88	
			(de 1,36 a 18,5)		
			a		
AZI	-0,81	mg/L	2,66	11,6	0,953
	(de -2,11 a 0,48)		(de 0,91 a 7,73)		
	a		b		
		x CMI	2,66	11,6	
			(de 0,81 a 3,1)		
			a		
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33153 ⁺⁺					
antibiótico	$E_{\max}^{\diamond} (IC)$		$CE_{50}^{\diamond} (IC)$	$C_s^{\diamond\diamond}$	R^2
	-1,03	mg/L	0,052	0,018	0,920
CEM-101	(de -1,34 a -0,72)		(de 0,012 a 0,23)		
	a		a		
		x CMI	13,1	4,56	
			(de 3,02 a 57,0)		
			a		
AZI	-0,83	mg/L	2,86	2,90	0,903
	(de -2,00 a 0,34)		(de 0,17 a 48,6)		
	a		b		
		x CMI	179,0	181	
			(de 10,5 a 3038)		
			b		

^a usando todos los puntos de datos mostrados en la FIG. 4 (no se usaron datos de muestras sin antibióticos por evidencia de crecimiento extracelular cuando la concentración extracelular de un antibiótico es inferior a 0,01 x CMI (5). ⁺ inóculo original (posfagocitosis) [tiempo = 0 h; UFC/mg de proteína]: *L. monocytogenes*, $1,67 \pm 0,22 \times 10^6$ (n = 3); *L. pneumophila*, $0,94 \pm 0,60 \times 10^6$. [♦] Reducción de UFC (en unidades logarítmicas) a tiempo = 24 h (*L. monocytogenes*) o 48 h (*L. pneumophila*) del inóculo original correspondiente, como se extrapola para concentración de antibiótico ∞ ; las muestras que producen menos de 5 recuentos se consideraron por debajo del nivel de detección. [◇] concentración (en mg/L o en x CMI) que provoca una reducción del inóculo intermedia entre los valores inicial (E_0) y máximo ($E_{\max}$), como se obtiene a partir de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1). ^{◇◇} concentración (en mg/L o en x CMI) que deriva en crecimiento bacteriano no aparente (número de UFC idéntico al inóculo original), como se determina mediante interpolación gráfica. Análisis estadísticos: análisis de las diferencias entre los dos antibióticos (por columna para las filas correspondientes; test t de Student de dos colas para muestras no apareadas): las cifras con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05).

EJEMPLO. Estudios dosis-respuesta en macrófagos THP-1 infectados. Contra *S. aureus* ATCC 25923 intrafagocitario, CEM-101 es más potente que la AZI, CLR y TEL (C_s inferiores). Además, CEM-101 es capaz de reducir el inóculo intracelular ($E_{\max} \sim 1$ log), hecho que no se observa con AZI, CLR y TEL.

Absorción de CEM-101 en las células (ii): papel del tipo de célula

Células	THP-1 (macrófagos humanos)	J774 (macrófagos murinos)	MDCK (células epit. caninas)	MDCK que sobreexpresan transportadores de eflujo de PMR1
Cc/Ce a 5 h	~ 50-150	~ 60	~ 45	~ 30

EJEMPLO. Ejemplo de estudios dosis-respuesta de CEM-101 frente a comparadores (AZI, CLR y TEL) contra *S. aureus* ATCC 25923 intracelular (macrófagos THP-1). Véase la FIG. 7 y la tabla.

	CEM-101	AZI	CLR	TEL
Emax	-0,80 ± 0,11	0,04 ± 0,11	-0,18 ± 0,13	-0,29 ± 0,16
Cs (mg/L)	~ 0,01	>50	~ 0,86	~ 0,27

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

PROCEDIMIENTO. Se infectaron macrófagos peritoneales con *M. leprae* viable, se añadieron los fármacos y se incubaron a 33 °C durante 3 días. Después de 3 días, se lisaron los macrófagos para liberar la *M. leprae* intracelular de la que, a continuación, se ensayó su viabilidad mediante radioespirometría y tinción para determinación de viabilidad. CEM-101 muestra eficacia contra la viabilidad de *M. leprae* intracelular.

Se usó la cepa aislada Thai-53 de *M. leprae*, mantenida por pases seriados en almohadillas plantares de ratones nu/nu atímicos, para todos los experimentos. Para las pruebas axénicas, se incubó *M. leprae* viable recién cosechada en medio junto con diferentes concentraciones de los fármacos (CEM-101, CLR y rifampina) durante 7 días a 33 °C. Al final de esta incubación, la *M. leprae* tratada con fármaco se sometió a radioespirometría para evaluar su viabilidad con base en la oxidación de palmitato y la tinción con colorantes de viabilidad para evaluar la magnitud de daño a la membrana. Para las pruebas intracelulares, se infectaron macrófagos peritoneales de ratones Swiss con *M. leprae* viable recién cosechada a una MOI de 20:1 durante 12 horas. Al final de la infección, se lavaron las bacterias extracelulares, se añadieron fármacos a diferentes concentraciones y se incubaron durante 3 días a 33 °C. Al final de los 3 días, se lisaron las células para obtener la *M. leprae* intracelular para pruebas de radioespirometría y tinción para determinación de viabilidad.

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

EJEMPLO. Estreptococos β-hemolíticos (EBH) resistentes a telitromicina emergentes. Se probó CEM-101 contra una colección de 43 EBH TEL-R. Se identificaron un total de 53 (1,3 %) EBH de entre 3958 en el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY (2003-2006) que fueron TEL-R (MIC, ≥ 2 µg/mL). Para las pruebas, se disponía de 43 cepas (36 del grupo A, 1 del grupo C, 6 del grupo G) procedentes de 20 hospitales de Europa (31 cepas), Norteamérica (11) y Latinoamérica. (1). Las pruebas de susceptibilidad (S) usaron procedimientos de microdilución en caldo según el CLSI y 3 cepas fueron eritromicina (ERI)-R, CLN (CC)-S, por lo que necesitaron pruebas por difusión en disco. Se probaron nueve agentes comparativos (4 en la tabla).

Distribuciones de CMI para CEM-101 como agentes comparativos de macrólidos mLEB: Ocurrencias a CMI (µg/mL)

Antimicrobiano	$\leq 0,015$	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	>4
CEM-101	4	0	1	18	10	6	4	0	0	0
TEL	0	0	0	0	0	0	0	8	16	19
Eritromicina	0	0	0	0	0	0	0	0	-	43
CLN	-	-	-	-	2	1	0	0	-	40
Q/D	-	-	-	-	37	6	0	0	-	0

CEM-101 permaneció activo contra todos los TEL-R (CMI, ≥ 2 µg/mL) BHS con todas las CMI a ≤ 1 µg/mL (CMI50, 0,12 µg/mL). El número de ocurrencias de cepas TEL-R más alto fue en Europa (el mayor en Italia).

CEM-101 garantiza el desarrollo adicional de infecciones provocadas por EBH.

La potencia de CEM-101 contra cada serogrupo de EBH fue la misma con una CMI50 y CMI 90 generales de 0,12 y 0,5 µg/mL, respectivamente. La actividad de CEM-101 fue 32 veces superior (comparaciones de CMI50) a la de la TEL. Todas las cepas fueron resistentes a ERI, pero la quinupristina/dalfopristina (Q/D) fue 100 % S. Tres cepas CC-5 S (*S. pyogenes*) fueron (+) en la prueba de difusión en disco y 2 tuvieron inducción (+) de CEM-101. Las tasas de susceptibilidad para otros comparadores fueron: penicilina, tetraciclina, ceftriaxona, amoxicilina/clavulanato y levofloxacina (100,0 %); y tetraciclina (46,8 %).

10 EJEMPLO. Pruebas de susceptibilidad en caldo: estudios con cepas adicionales (incluyendo SARM-EH): CMI a pH 7,4

Cepas	SASM/SARM	CEM-101	AZI	CLR	TEL
ATCC 25923	SASM	0,125	0,5	0,5	0,5
NRS 192 (US)	SARM-EH	0,25	1	0,5	0,25
N4090440 (BE)	SARM-EH	0,06	0,5-1	0,5	0,5
N7112046 (BE; SARM animal)	SARM	0,06	2	1	0,25
STA 44 (Asia)	SARM-EH	0,5	256	128	8
CHU (Asia)	SARM-EH	2	256	256	32
STA 268 (Asia)	SARM-EH	0,5-1	128	128	16
MEH (Asia)	SARM-EH	0,125	1	0,5	0,25

In vivo: intraperitoneal (IP) - modelos de infección en ratón (DE₅₀)

	MAC-S	MAC-R
Compuesto	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 (CMI)	<i>S. pyogenes</i> 3029 (CMI)
CEM-101	2,5 mg/kg (<= 0,125)	2,5 mg/kg (<= 0,125)
AZI	15 mg/kg (<= 0,125)	>150 mg/kg (>64)
TEL	1 mg/kg (<= 0,125)	>150 mg/kg (16)

15

EJEMPLO. Se evaluó la actividad antimicrobiana en un modelo de infección sistémica en murinos contra varias cepas bacterianas que incluían aislados resistentes tales como SARM, SARM 300, *S. pneumoniae* mefR, un *S. pyogenes* resistente a eritromicina y un aislado de *S. pneumoniae* de serotipo 19A.

20 EJEMPLO. Se evaluó la eficacia en varios modelos de infección. Se infectaron IP ratones hembra CD-1; se administró CEM-101 o los comparadores como una única dosis oral 1 h posinfección. Se determinaron las DP50 a las 24 h posinfección. CEM-101 se evaluó adicionalmente en un modelo de rata de absceso subcutáneo contra *S. pneumoniae*. Se infectaron ratones hembra CD-1 por medio de inyección SC de bacteria mezclada con perlas de ciclodextrano. Dos horas posinfección, los ratones recibieron una única dosis oral de CEM-101 o los agentes de control. A las 48 h posinyección, se practicó la eutanasia a los ratones, se eliminaron asépticamente los abscesos y se realizó el recuento de bacterias. Se determinaron las UFC por absceso y se compararon con el control sin tratar. Se realizó una evaluación adicional de CEM-101 en ratones con neutropenia inducida por ciclofosfamida. A las 1,5 h posinfección del muslo con *S. pneumoniae*, se dosificó oralmente a los ratones con CEM-101 o los fármacos de control. 24 h postratamiento, se procesaron los muslos y se determinaron las UFC/gramo.

30

Modelo de infección sistémica en ratón (mg/kg)

	CEM-101	TEL	CLR
<i>S. aureus</i>	16,3 (11,2-21,3)	>30	22,7 (11,3-34,1)
SARM	7,5 (6,0-8,9)	SD	5,0
<i>S. pneumoniae</i> (susceptible a macrólidos)	6,0 (2,0-10,0)	19,9 (9,6-30,2)	32,1 (12,3-52,0)
<i>S. pneumoniae</i> (mef R)	23,2 (15,6-30,7)	10,6 (2,6-18,6)	>30
<i>S. pyogenes</i> (susceptible a macrólidos)	9,4 (7,3-11,5)	7,8 (5,7-9,8)	24,8 (18,1-30,4)
<i>S. pyogenes</i> (R a eritromicina)	5,1 (4,2-6,1)	4,4 (3,8-4,9)	22,8 (14,6-30,9)
SD = sin determinar			

En el absceso, una dosis de 10 mg/kg diaria de CEM-101 demostró una reducción de 4,2 log₁₀, mientras que la CLR (CL) solo consiguió una reducción de 1,5 log₁₀ de los ratones sin tratar. El CEM-101 en el muslo necesitó 8,0 mg/kg para conseguir una reducción de 3 log₁₀ de los ratones sin tratar. La TEL y CL necesitaron 15,5 y 13,5 mg/kg para conseguir las mismas reducciones de log₁₀ UFC.

EJEMPLO. Medios. Placas de agar de soja Trypticase (TSA) - BBL, Franklin Lakes, NJ; Agar de soja Trypticase con 5 % de sangre de oveja (TSA-II) - BBL, Franklin Lakes, NJ; caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) - BBL, Franklin Lakes, NJ; mucina gástrica porcina Tipo III - Sigma Aldrich, St Louis MO; perlas de ciclodextrano -Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; ciclofosfamida Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

EJEMPLO. Diseño experimental. Se aclimataron ratones hembra CD-1 (que pesaban de 18 a 22 gramos) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) durante 5 días antes de iniciar los estudios. Todos los estudios se realizaron siguiendo protocolos del Comité institucional para el cuidado y uso de animales (IAUCU, por sus siglas en inglés) homologados y de conformidad con las normas de la Oficina para el bienestar de animales de laboratorio (OLAW, por sus siglas en inglés). Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua durante todo el estudio y se les proporcionó enriquecimiento ambiental.

Estudios de infección sistémica en ratones. En este modelo se evaluaron ocho aislados bacterianos. Para cada cepa, se utilizó un cultivo durante la noche. Las bacterias se resuspendieron en medio y se diluyeron en un 5 % de BHI o un 8 % de mucina gástrica porcina hasta una concentración que derivaría en una supervivencia del 0 % en los ratones por posinfección a las 48 horas, como se determinó mediante los estudios de virulencia iniciales. Se realizaron recuentos bacterianos para determinar el tamaño del inóculo. Los ratones recibieron tratamiento por medio de sonda esofágica 1 hora posinfección. A la finalización del estudio, se calculó el porcentaje de supervivencia y se informó de la dosis que lograba una supervivencia del 50 %, la dosis protectora del 50 % (DP50), junto con intervalos de confianza del 95 %, como se calcularon mediante análisis Probit usando GraphPad Prism versión 4.03 (GraphPad Software).

EJEMPLO. Absceso subcutáneo en ratón. Las bacterias se prepararon a partir de un cultivo en placa durante la noche resuspendiendo en solución salina y ajustando la suspensión a una DO de 0,1 a 625 nm de una dilución 1:10. La suspensión bacteriana ajustada se mezcló 1:2 con perlas de ciclodextrano preparadas según las instrucciones del envase. Se afeitaron los flancos derechos de los ratones y se inyectaron subcutáneamente 0,2 mL del inóculo bacteriano. A las dos horas posinfección, se trataron los ratones por medio de sonda esofágica con el producto de prueba o el fármaco de control. A las 48 horas posinfección, se sometieron los ratones a eutanasia, se eliminaron asépticamente los abscesos, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de agar para crecimiento bacteriano. Tras la incubación durante la noche, se realizó el recuento de colonias y se determinaron las UFC/gramo de absceso.

EJEMPLO. Infección de muslo en ratón neutropénico. Los ratones se volvieron neutropénicos con inyecciones IP de ciclofosfamida en el día -4 y el día -1 de 150 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. En el día 0, se infectaron los ratones con aproximadamente 5 x 10⁵ UFC/mL de bacteria en un volumen de 0,1 mL en el muslo derecho. A las 1,5 horas posinfección, los ratones recibieron tratamiento por medio de sonda esofágica. Un grupo de ratones infectados se sometió a eutanasia y se procesaron sus muslos para que los títulos bacterianos sirvieran como controles a T = 0. A las veinticuatro horas postratamiento, se sometieron a eutanasia los ratones restantes, se eliminaron asépticamente los muslos, se pesaron, homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de medio de crecimiento bacteriano. Se calcularon las UFC por gramo tras incubación durante la noche de las placas bacterianas. Se calculó la cantidad de producto de prueba necesaria para conseguir reducciones de 1, 2 y 3 log₁₀ a partir de los muslos de control a las 24 horas. Se realizaron estudios adicionales que fraccionaron la dosis única de tratamiento (Q24) en dos (Q12), tres (Q8) y cuatro (Q6) dosis equivalentes para determinar la naturaleza farmacodinámica de este compuesto. El análisis adicional incluye la dosis estática, CE50, muerte 1 log y el efecto máximo (Emáx).

EJEMPLO. Farmacocinética. Farmacocinética de CEM-101 en ratón

Dosis [mg/kg]	Vía	Tmáx (h)	Cmáx(ng/mL)	AUC0-24, (ng*h/mL)	Semivida (h)
2,5	PO	1	359,15	1172,63	2,85
10,0	PO	0,5	1436,60	4757,93	2,85

En el presente documento, se entiende que el modelo de absceso subcutáneo y el modelo de muslo neutropénico en ratones descritos en el presente documento pueden ser más relevantes para la comprensión y/o previsibilidad de

la eficacia de los compuestos descritos en el presente documento en el tratamiento de infección humana *in vivo* que el modelo de protección en ratón, que puede ser un modelo mejor para la comprensión y/o previsibilidad de la eficacia de los compuestos descritos en el presente documento para tratar infecciones transmitidas por la sangre, tales como bacteriemia. Por ejemplo, en lo que respecta a CLR y TEL, si un compuesto que contiene triazol, tal como CEM-101, tiene una $C_{m\acute{a}x}$ inferior en el ratón a dosis iguales, las CMI se reflejan con exactitud en las pruebas de protección en ratón para las cepas susceptibles. Se observa que CEM-101 es muy activo cuando se ajusta la dosis para $C_{m\acute{a}x}$ en el ratón. Contra cepas resistentes, CEM-101 es efectivo incluso en las pruebas de protección en ratón. En cambio, en modelos más relevantes de infección humana, tales como el modelo de absceso subcutáneo o el modelo de muslo neutropénico, CEM-101 se comporta extraordinariamente bien y refleja su potencia *in vitro*.

EJEMPLO. La capacidad de CEM-101 para reducir la carga microbiana en el modelo de infección por absceso también se evaluó contra aislados de *S. pneumoniae*.

EJEMPLO. Infecciones sistémicas en ratón.

	CEM-101		TEL		CLR	
	CMI (µg/mL)	DP50 (mg/kg; IC del 95 %)	CMI (µg/mL)	DP50 (mg/kg; IC del 95 %)	CMI (µg/mL)	DP50 (mg/kg; IC del 95 %)
<i>S. aureus</i>	0,12	16,3 (11,2-21,3)	0,06	>30	>16	22,7 (11,3-34,1)
SARM	0,12	7,5 (6,0-8,9)	0,5	SD	>16	5,0
SARM 300 (EH)	0,12	9,5 (5,0-13,9)	0,25	9,2 (6,3-12,1)	>16	19,5 (8,2-30,5)
<i>S. pneumoniae</i> (susceptible a macrólidos)	<0,03	6,0 (2,0-10,0)	<0,06	19,9 (9,6-30,2)	>16	32,1 (12,3-52,0)
<i>S. pneumoniae</i> (mefR)	<0,03	23,2 (15,6-30,7)	0,25	10,6 (2,6-18,6)	0,5	>30
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 19A	0,25	6,6 (4,4-8,9)	0,5	5,7 (4,8-6,7)	>16	5,03 (4,8-5,3)
<i>S. pyogenes</i> (susceptible a macrólidos)	0,015	9,4 (7,3-11,5)	0,015	7,8 (5,7-9,8)	0,015	24,8 (18,1-30,4)
<i>S. pyogenes</i> (R a eritromicina)	1,0	5,1 (4,2-6,1)	1,0	4,4 (3,8-4,9)	1,0	22,8 (14,6-30,9)
SD = sin determinar						

EJEMPLO. Absceso subcutáneo en ratón ~ *S. pyogenes* ATCC 8668 (Log₁₀UFC/gramo de absceso promedio). Procesamiento del absceso 48 horas posinfección.

	Dosis (mg/kg)	48 h
Control	-	8,22
CEM-101	10	5,35
	20	2,53
CLR	10	7,63
	20	7,82
TEL	10	7,06
	20	6,10

EJEMPLO. Modelo de muslo neutropénico. *S. pneumoniae* 1629 (dosis (mg/kg) al día, PO a las 2 h posinfección; reducción a partir de los controles a 24 horas) en muslo de ratón neutropénico.

Compuesto	Vía de dosificación:	Reducción de 1 log ₁₀	Reducción de 2 log ₁₀	Reducción de 3 log ₁₀	Máx. cambio en log ₁₀ UFC de los controles a 24 h
CEM-101	PO	6,0	7,0	8,0	-5,81

TEL	PO	11,0	13,2	15,5	-6,82
CLR	PO	4,5	9,0	13,5	-5,75

En el equivalente de absceso subcutáneo en ratón ~ *S. pneumoniae* 1629 (10 mg/kg PO a las 2 horas posinfección), el log₁₀UFC/gramo de absceso promedio de CEM-101 y CLR permaneció constante a las aproximadamente 3 y 5,5 horas, respectivamente, a partir de 24 horas y 48 horas; el de TEL aumentó de aproximadamente 3 a 5 aproximadamente 4,5.

EJEMPLO. *S. pneumoniae* 6303 (dosis (mg/kg) al día, PO; reducción a partir de los controles a 24 horas) en muslo de ratón neutropénico.

Compuesto	Vía de dosificación:	Reducción de 1 log10	Reducción de 2 log10	Reducción de 3 log10	Máx. cambio en log10UFC de los controles a 24 h
CEM-101	PO	1,2	3,0	5,0	-6,17
TEL	PO	4,75	6,5	8,75	-5,27
CLR	PO	5,5	9,2	14,0	-5,20

10

EJEMPLO. Estudios de dosificación fraccionada en modelo de muslo de ratón neutropénico: *S. pneumoniae* 6303 frente a CEM-101 PO

	Q24	Q12	Q8	Q6
Dosis estática (mg/kg)	8,2	19,2	12,1	20,5
CE50(mg/kg)	5,7	14,5	9,0	16,7
Muerte 1 log (mg/kg)	10,8	24,0	23,0	23,0
Emax (log10UFC/muslo)	6,38	4,95	5,01	5,83

15 EJEMPLO. Infección de pulmón en ratón. También se evaluó la capacidad de CEM-101 para reducir la carga microbiana en un modelo de infección de pulmón contra aislados de *S. pneumoniae*. Las bacterias se prepararon a partir de un cultivo en placa durante la noche resuspendiendo en solución salina y ajustando la suspensión a una DO de 0,1 a 625 nm de una dilución 1:10. Los ratones, bajo anestesia suave, fueron inoculados con 50 µl del inóculo bacteriano de *S. pneumoniae* 1629 por medio de inhalación intranasal. Los ratones recibieron tratamiento por medio de sonda esofágica a las 5, 24 y 36 horas posinfección. A las 48 horas posfinalización del tratamiento, se sometieron los ratones a eutanasia, se eliminaron asépticamente los pulmones, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de agar para crecimiento bacteriano. Tras incubación durante la noche, se realizó el recuento de colonias y se determinaron las UFC/gramo de pulmón. El log₁₀UFC/gramo de pulmón promedio aumentó más en los ratones tratados con CLR, de 3 a más de 7, en comparación con los ratones tratados con CEM-101, de 5 a 25 aproximadamente 5,5, de 24 horas a 48 horas.

EJEMPLO. Una muestra de organismos a escala mundial incluyó *S. pneumoniae* (SPN; 168, 59,3 % de eritromicina [ERI]-R y 18 cepas 19A multirresistentes [MR]), *M. catarrhalis* (MCAT; 21, 11 β-lactamasa[+]), *H. influenzae* (HI; 100, 48 β-lactamasa[+]), *H. parainfluenzae* y *H. haemolyticus* (12) y *Legionella pneumophila* (LPN; 30). Todas las pruebas S se hicieron según procedimientos del CLSI (M7-A7, M100-S18) y los valores críticos según el CLSI (2008) para agentes comparativos tales como AZI (AZ), CLR (CLR), ERI, TEL (TEL), CLN (CC), Synercid® (SYN), levofloxacin (LEV), linezolid y rifampina (RIF). Las SPN fueron muy sensibles a CEM (CMI₉₀, 0,25 µg/mL; la CMI más alta a 0,5 µg/mL) y CEM fue de 2 a 8 veces más potente que la TEL y CC, respectivamente.

35 Dieciocho cepas del serogrupo 19A presentaron niveles altos de no susceptibilidad a: macrólidos (100,0 %), CLN (83,3 %), penicilina (83,3 %), amox/clav (88,9 %), ceftriaxona (33,3 %), tetraciclinas (83,3 %) y TMP/SMX (100,0 %). Pocas opciones terapéuticas permanecieron con solo TEL (CMI₉₀, 1 µg/mL; 100,0 % susceptible), Q/D (CMI₉₀, 1 µg/mL; 100,0 % susceptible) y fluoroquinolonas (CMI₉₀, 1 µg/mL; 100,0 % susceptible) con potencias útiles (Tabla 3). CEM-101 mostró una potencia dos veces superior a la TEL. Las cepas de sustitución 19A MR también fueron 40 CEM-S (CMI₉₀, 0,5 µg/mL), en comparación con TEL (CMI₉₀, 1 µg/mL), ERI (CMI₉₀, >32 µg/mL), AZI (CMI₉₀, >16 µg/mL), CLR (CMI₉₀, >32 µg/mL) y CLN (CMI₉₀, >16 µg/mL).

LPN fue más S a CEM con todos los valores de CMI en ≤0,015 µg/mL (CMI₉₀ de TEL, 0,03 µg/mL). Los patógenos de ITR por *Haemophilus* fueron menos CEM-S (CMI₉₀, CEM/TEL): HI (2/4 µg/mL) y otros (2/4 µg/mL) sin variaciones 45 para las cepas β-lactamasa (+). Las CMI de CEM-101 para MCAT estuvieron todas en ≤0,5 µg/mL, igual que la TEL.

Las *S. pneumoniae* fueron muy susceptibles a CEM-101, con una CMI₉₀ de solo 0,25 µg/mL. Esta potencia documentada (Tabla 1) fue dos veces superior a la TEL y ocho veces superior al linezolid (CMI₉₀, 2 µg/mL). Los estreptococos β-hemolíticos también fueron susceptibles a CEM-101 (CMI₉₀, 0,03 µg/mL) mostrando este nuevo agente una ventaja cuatro veces superior (CMI₉₀, 0,12 µg/mL; susceptibilidad del 100,0 %) a la TEL. Se probaron cinco grupos de cepas β-hemolíticas y todas las cepas mostraron una distribución de CMI (0,015 µg/mL) monomodal y la CMI de CEM-101 más alta fue de tan solo 0,12 µg/mL (Tabla 1).

CEM-101, al igual que la TEL, fue activo contra todos los estreptococos del grupo viridans resistentes a macrólidos y CLN (cinco grupos de especies; 51 cepas), pero todos los valores de CMI de CEM-101 estuvieron en ≤0,12 µg/mL, cuatro veces más potente que la TEL y 64 veces más potente que la eritromicina.

Todos los resultados de CMI de CEM-101 para *Haemophilus spp.* tuvieron un estrecho intervalo de tan solo 0,5-4 µg/mL (a excepción de dos cepas de 0,12 µg/mL que no presentaron una bomba de eflujo). La CMI₉₀ global para las cepas de este género fue de 2 µg/mL, igual que la AZI y dos veces más activo que la TEL. Las diversas especies (*H. influenzae*, *H. parainfluenzae*) y la producción de β-lactamasa no alteraron significativamente la actividad de CEM-101 (CMI₉₀, 2 µg/mL; Tabla 1).

Entre los agentes mLEB, el orden jerárquico de potencia (CMI₉₀ en µg/mL) contra *M. catarrhalis* fue: AZI (0,06) >CEM-101 = CLR (0,12) >eritromicina = TEL (0,25) >Q/D (0,5) >CLN (2; véase la Tabla 1). La actividad β-lactamasa no tuvo un efecto significativo sobre los valores de CMI₉₀ (0,12 µg/mL) de CEM-101.

CEM-101 (CMI₉₀, <0,015 µg/mL) fue el agente más activo probado contra *Legionella spp.* (Tabla 1), superior a otros macrólidos, la levofloxacina y la rifampina. Cabe señalar que el contenido de carbón vegetal del medio de prueba puede interferir con las pruebas de CMI de referencia de esta especie.

	CMI de CEM (MG/ML)			CMI de TEL (MG/ML)		
ORGANISMO (N.º)	50 %	90 %	INTERVALO	50 %	90 %	INTERVALO
SPN (150)	0,015	0,25	<0,008-0,5	0,03	0,5	≤0,008-1
19A MR(18)	0,25	0,5	0,06-0,5	0,5	1	0,12-1
MCAT (21)	0,12	0,12	<0,008-0,5	0,12	0,25	<0,015-0,5
HI (100)	1	2	0,12-4	2	4	0,25-16
OTROS HAEMOPHILUS (12)	2	2	0,12-2	2	4	0,25-8
LPN (30)	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,03A	0,03A	0,03-0,06 ^A
1. Resultados de RIF, no TEL.						

Los estudios de cribado *in vitro* de los compuestos descritos en el presente documento indican una potencia comparable o superior a la TEL, ERI, AZI y CLR, así como actividad contra aislados gram-positivos con resistencias a macrólidos o lincosamidas documentadas. La actividad de CEM-101 generalmente se centra en los patógenos gram-positivos, pero también posee potencias mensurables frente a especies gram-negativas fastidiosas (*Haemophilus*, *Moraxella*), algunas enterobacterias (*Salmonella*, *Shigella*) y patógenos que provocan diversas enfermedades de transmisión sexual (ETS). La actividad de CEM-101 se midió según los procedimientos del Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI) cuando se probaron organismos asociados a ITR-EH (estreptococos, *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*), subgrupos resistentes emergentes (*S. Pneumoniae* del serotipo 19A) y diversos patrones de resistencia a cetólidos mLEB entre los estreptococos probados.

Colección de organismos: todos los organismos probados se recogieron de pacientes de centros médicos de los Estados Unidos y Europa de 2005 hasta la fecha. Las fuentes de aislados recuperadas incluyeron el torrente sanguíneo, la piel y los tejidos blandos, así como infecciones del tracto respiratorio. Las especies y fenotipos de organismos inusuales/raros necesitaron el uso de cepas aisladas antes de 2005 o de otras áreas geográficas. Organismos probados: estreptococos (319), *S. pneumoniae* (150 tipo salvaje), *S. pneumoniae* (18 serogrupo 19A, solo EE. UU.), especies β-hemolíticas (100, cinco grupos), grupo viridans (51, cinco especies), especies *Haemophilus* (111), *H. influenzae* (100, 48 productores de β-lactamasa), *H. parainfluenzae* (11), *M. catarrhalis* (21, 11 productores de β-lactamasa), *L. pneumophila* (30).

- Pruebas de susceptibilidad: los paneles de ensayo en forma congelada de noventa y seis pocillos fueron producidos por los laboratorios JMI y consistieron en tres tipos de medios: caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes, caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes y un 2,5-5 % de sangre de caballo lisada (para probar los estreptococos) y medio de prueba de *Haemophilus* (HTM, por sus siglas en inglés). Se usaron los procedimientos de microdilución en caldo y dilución en agar según la norma M7-A7 [2006] del CLSI. Los intervalos de control de calidad (CC) y los criterios interpretativos para los compuestos comparadores fueron los publicados en el documento M100-S18 [2008] del CLSI. Las cepas de CC probadas incluyeron *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619 y *H. influenzae* ATCC 49247 y 49766. Todos los resultados del CC estuvieron dentro de los límites publicados. Los procedimientos de dilución en agar se usaron para *L. pneumophila* probada sobre agar de carbón vegetal tamponado y extracto de levadura (BCYE, por sus siglas en inglés). Los agentes comparativos se probaron mediante epsilometría, también en medio BCYE. Se usaron una amplia variedad de agentes comparativos, incluyendo: amoxicilina/clavulanato (amox/clav), AZI, cefdinir, CLR, CLN, eritromicina, levofloxacina, linezolid, quinupristina/dalfopristina (Q/D), TEL y trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX), todos ellos evaluados mediante microdilución en caldo; y la ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina y rifampina se probaron adicionalmente en agar.

La tabla muestra una excelente potencia de CEM-101 contra los estreptococos (todas las CMI, $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$) y una actividad moderada contra patógenos de ITR-EH gram-negativos (CMI, $\leq 0,008$ -4 $\mu\text{g/mL}$).

- 20 Distribuciones de CMI de CEM-101 para todos los organismos ITR (398 cepas) que muestran ocurrencias a CMI ($\mu\text{g/mL}$).

ORGANISMO (N.º PROBADO)	$\leq 0,008$	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	≥ 16
<i>S. PNEUMONIAE</i> (150)	62	25	8	9	7	33	6	0	0	0	0	0
ESTREPTOCOCOS β -HEMOLÍTICOS (100)	21	65	4	8	2	0	0	0	0	0	0	0
ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS (15)	27	11	4	7	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. CATARRHALIS</i> (21)	1	1	1	5	12	0	1	0	0	0	0	0
<i>H. INFLUENZAE</i> (100)	0	0	0	0	1	0	5	48	42	4	0	0
<i>HAEMOPHILUS</i> , OTROS (12)	0	0	0	0	1	0	0	4	7	0	0	0

- CEM-101 presentó actividad potente contra los estreptococos (CMI₅₀, 0,015 $\mu\text{g/mL}$) y varios otros cocos gram-positivos, incluyendo cepas resistentes a eritromicina y CLN. CEM-101 mostró actividad completa contra neumococos del serogrupo 19A MR (16 de 18 valores de CMI a 0,25 o 0,5 $\mu\text{g/mL}$) y fue dos veces más activo que la TEL y la Q/D. CEM-101 también inhibió especies gram-negativas asociadas a ITR-EH (*H. influenzae* [CMI₉₀, 2 $\mu\text{g/mL}$], *Legionella spp.* [CMI₉₀, $\leq 0,015$ $\mu\text{g/mL}$] y *M. catarrhalis* [CMI₉₀, 0,12 $\mu\text{g/mL}$]).

- 30 EJEMPLO. Se seleccionaron aislados resistentes a macrólidos (29) (con base en la determinación de las CMI de CLR; 19 mLEB, 10 fenotipos M con base en disociación de resistencia a eritromicina y CLN) (para los que 6 fueron TEL-I y 7 TEL-R, con base en los valores críticos del Comité europeo de antibiogramas (EUCAST, por sus siglas en inglés) [S $\leq 0,25$ -R $> 0,5$]). Las CMI se determinaron mediante microdilución geométrica en caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes (CAMH, por sus siglas en inglés) + 2,5 % de sangre de caballo lisada según el CLSI, usando SP ATCC-49619 como control.

- EJEMPLO. Las CMI de ATCC-49619 fueron $\leq 0,008$ mg/L para TEL y CEM-101. Los datos de aislados resistentes a mL se muestran en la tabla. En esta colección belga de *S. pneumoniae* de NEH confirmadas resistentes a macrólidos, CEM-101 muestra, en general, CMI inferiores en comparación con TEL, especialmente con respecto a aislados TEL-I y TEL-R.

Fenotipo*	N.º	TEL			CEM-101		
		intervalo	media geom.	CMI ₉₀	intervalo	media geom.	CMI ₉₀
TEL-S	16	0,008-0,25	0,021	0,25	0,008-0,063	0,022	0,063
TEL-I	6	0,5-0,5	0,5	0,5	0,063-0,5	0,223	0,5

TEL-R	7	1-3	1,426	3,0	0,5-1,0	0,906	1,0
* mLE _B para 7/16 aislados de TEL-S, 5/6 de TEL-I y 7/7 de TEL-R (S/I/R se definen con base en los valores críticos del EUCAST (S ≤0,25-R >0,5))							

CEM-101 muestra, en general, CMI inferiores, en comparación con TEL, especialmente con respecto a aislados TEL-I y TEL-R probados contra esta colección belga de *S. pneumoniae* de casos confirmados de NEH que son resistentes a macrólidos. Como se describe en el presente documento, CEM-101 tiene potencial para ser útil como alternativa a la telitromicina en áreas con alta resistencia a mL y resistencia emergente a TEL.

	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i> ErmB 303	<i>S. pneumoniae</i> 163 (Mef A)	<i>S. pneumoniae</i> 3773 (Erm B)	<i>S. pneumoniae</i> 5032
AZI	≤0,125	>64	8	>64	>64
TEL	≤0,125	≤0,125	≤0,125	1	0,5
CEM-101	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,5	0,5
	<i>S. pyogenes</i> 1721	<i>S. pyogenes</i> 1850	<i>S. pyogenes</i> 3029	<i>S. pyogenes</i> 3262	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247
AZI	>64	>64	>64	>64	2
TEL	64	8	16	32	4
CEM-101	0,5	≤0,125	≤0,125	0,5	2

CMI₅₀ y CMI₉₀ [µg/mL]

		CEM-101		OP 1055		TEL	
	N.º de cepas	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>S. pneumoniae</i>	10	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
PEN-S, TEL-S; Macr-S							
<i>S. pneumoniae</i>	12	0,5	0,5	4	4	2	8
PEN-R, TEL-I/R; Macr-R							
<i>S. pneumoniae</i>	24	0,03	0,03	0,06	0,06	0,06	0,06
PEN-S, TEL-S; Macr-R							
<i>S. pyogenes</i>	10	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
TEL-S; Macr-S							
<i>S. pyogenes</i>	10	0,125	0,25	2	2	32	32
TEL-R; Macr-R							
<i>S. pyogenes</i>	30	0,03	0,03	0,125	0,25	0,125	0,5
TEL-S; Macr-R							
		2-F-TEL		AZI		PEN	
	N.º de cepas	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>S. pneumoniae</i>	10	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
PEN-S, TEL-S; Macr-S							
<i>S. pneumoniae</i>	12	1	8	>32	>32	4	8
PEN-R, TEL-I/R; Macr-R							
<i>S. pneumoniae</i>	24	0,03	0,06	>32	>32	0,03	0,03
PEN-S, TEL-S; Macr-R							
<i>S. pyogenes</i>	10	0,03	0,03	0,125	0,125	0,03	0,03
TEL-S; Macr-S							
<i>S. pyogenes</i>	10	32	32	>32	>32	0,03	0,03

TEL-R; Macr-R							
<i>S. pyogenes</i>	30	0,25	0,5	>32	>32	0,03	0,03
TEL-S; Macr-R							

EJEMPLO. Cuando se dispuso de los resultados de CMI en escala, CEM-101 (CMI₉₀, 0,015 µg/mL) fue dos y ocho veces más activo que la CLR o la TEL y AZI, respectivamente, contra estreptococos susceptibles a eritromicina. Para los estreptococos no susceptibles a eritromicina, CEM-101 tuvo una CMI elevada (CMI₉₀, 0,25 µg/mL); sin embargo, CEM-101 fue al menos dos veces más activo que la TEL o la CLN. Cuando se probó contra estreptococos no susceptibles a eritromicina y CLN, todas excepto una cepa siguieron siendo susceptibles a TEL, pero todas fueron inhibidas por CEM-101 a ≤0,5 µg/mL.

Actividad de CEM-101 y agentes comparativos seleccionados contra estreptococos con diversos patrones de resistencia a mLE_B (tres grupos, 300 cepas*).

10

Patrón de resistencia a cetólidos mLE _B (N.º probado) ^a	Agente antimicrobiano	50 %	CMI (µg/mL) 90 %	Intervalo
ERI-S (164) ^b	CEM-101	≤0,008	0,015	≤0,008-0,03
	TEL	0,03	0,03	0,008-0,06
	CLR	0,03	0,03	≤0,008-0,25
	AZI	0,06	0,12	≤0,008-0,5
	CLN	≤0,12	≤0,12	≤0,12-0,5
	Q/D	0,5	0,5	≤0,12-2
	Amox/clav	≤0,25	2	≤0,25->4
	Levofloxacin	1	1	0,25->4
ERI-NS, CLN- y TEL-S (48) ^c	Linezolid	1	2	0,25-2
	CEM-101	0,03	0,12	≤0,008-0,25
	TEL	0,12	0,5	0,03-1
	CLN	≤0,12	0,25	≤0,12-0,25
	Q/D	0,5	1	0,25-2
	Amox/clav	≤0,25	2	≤0,25->4
	Levofloxacin	1	2	0,25->4
	Linezolid	1	2	0,5-2
ERI- y CLN-NS, TEL-S (88) ^d	CEM-101	0,06	0,25	≤0,008-0,5
	TEL	0,12	1	0,03-1
	Q/D	0,5	1	0,25-2
	Amox/clav	2	>8	≤0,25->8
	Levofloxacin	1	1	0,25-2
	Linezolid	1	1	0,5-2

a. S = susceptible y NS = no susceptible, p. ej. incluye cepas intermedias y resistentes.

b. Incluye: *Streptococcus anginosus* (9 cepas), *S. constellatus* (8 cepas), *S. intermedius* (7 cepas), *S. mitis* (2 cepas), *S. oralis* (3 cepas), *S. pneumoniae* (61 cepas), estreptococos del grupo A (29 cepas), grupo B (17 cepas), grupo C (11 cepas), grupo F (6 cepas) y grupo G (11 cepas).

c. Incluye: *Streptococcus anginosus* (2 cepas), *S. constellatus* (2 cepas), *S. intermedius* (3 cepas), *S. mitis* (7 cepas), *S. oralis* (7 cepas), *S. pneumoniae* (14 cepas), estreptococos del grupo A (1 cepa), grupo B (7 cepas) y grupo G (5 cepas).

d. Incluye: *Streptococcus constellatus* (1 cepa), *S. pneumoniae* (75 cepas), estreptococos del grupo B (7 cepas), grupo C (2 cepas) y grupo F (3 cepas).

Una cepa (estreptococos del grupo C) fue NS a ER, CLN y TEL, pero tuvo una CMI de CEM-101 a 0,06 µg/mL. Este es un patrón emergente importante, especialmente en Europa.

15 EJEMPLO. Estreptococos susceptibles a macrólidos y resistentes a macrólidos. Se probó la actividad de CEM-101 en comparación con las de AZI, CLR, TEL, CLN, penicilina G, amoxicilina/clavulanato, levofloxacin y moxifloxacin

contra una gama de neumococos. También se probó la potencia de CEM-101, eritromicina, AZI, CLR, TEL, CLN, penicilina G, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina y moxifloxacina contra 124 cepas de *S. pyogenes*.

Valores de CMI50 y CMI90 neumocócica (µg/mL)

5

FÁRMACO	SUSCEPTIBLE A MACRÓLIDOS (50)			RESISTENTE A MACRÓLIDOS (171)		
	INTERVALO	CMI50	CMI90	INTERVALO	CMI50	CMI90
CEM-101	0,002-0,015	0,03	0,25	0,004-1	0,06	0,25
ERI	0,03-0,25	0,06	0,125	1->64	>64	>64
AZI	0,06-0,25	0,125	0,125	1->64	>64	>64
CLR	0,015-0,06	0,03	0,06	0,25->64	32	>64
TEL	0,015-0,03	0,03	0,03	0,03-2	0,125	0,5
CLN	0,015-0,06	0,03	0,06	0,03->64	0,125	>64
AMOX/CLAV	0,015-8	0,5	2	0,015-16	1	8
PENG	0,015-8	1	2	0,008->16	1	4
LEVO	1-32	1	16	0,06-32	1	2
MOXI	0,125-8	0,25	4	0,125-4	0,25	0,5

CMI para estreptococos del grupo A

FÁRMACO	SUSCEPTIBLE A MACRÓLIDOS (26)			RESISTENTE A MACRÓLIDOS (98)		
	INTERVALO	CMI50	CMI90	INTERVALO	CMI50	CMI90
CEM-101	0,008-0,03	0,015	0,3	0,015-1	0,06	0,5
ERI	0,03-0,25	0,06	0,125	2->64	16	>64
AZI	0,06-0,25	0,125	0,25	0,5->64	8	>64
CLR	0,015-0,06	0,03	0,06	0,25->64	4	>64
TEL	0,03-0,06	0,06	0,06	0,03-16	0,25	8
CLN	0,03-0,125	0,06	0,06	0,03->64	0,125	>64
AMOX/CLAV	0,015-0,03	0,03	0,03	<0,015-0,125	0,03	0,03
PENG	<0,008-0,125	0,015	0,015	<0,008-0,125	0,015	0,015
LEVO	0,5-1	0,5	0,5	0,5-2	0,5	1
MOXI	0,125-0,25	0,25	0,25	0,125-0,5	0,25	0,25

- 10 Todas las cepas de estreptococos del grupo A fueron susceptibles a penicilina G. Contra cepas susceptibles a macrólidos, las CMI de CEM-101 fueron de 0,008-0,03 µg/mL y contra cepas resistentes a macrólidos (todos los fenotipos) las CMI fueron de 0,008-0,5 µg/mL. Las CMI de TEL fueron hasta cuatro veces más altas que las de CEM-101. Significativamente, 11/13 cepas erm(B) fueron resistentes a TEL con CMI de 4 y 8 µg/mL (6), mientras que todas tuvieron CMI de CEM-101 bajas, similares a las de otros fenotipos resistentes (intervalo de 0,016-15 0,5 µg/mL).

EJEMPLO. Bacterias y antimicrobianos. Se determinaron las CMI para 221 cepas neumocócicas clínicas, que incluían 50 organismos susceptibles a macrólidos y 171 organismos resistentes a macrólidos. Todas las cepas resistentes a macrólidos tuvieron genotipos definidos y comprendieron cepas con erm(B) (54 cepas), mef(A) (51 cepas), erm(B) + mef(A) (31 cepas), erm(A) (4 cepas) y mutaciones en la proteína ribosómica L4 (27 cepas) y el ARNr 23S (4 cepas). Estas 221 cepas también incluyeron 27 fenotipos no susceptibles a quinolonas con regiones determinantes de resistencia a quinolonas (RDRQ) (CMI de levofloxacina de 4-32 µg/mL) y los fenotipos de resistencia a todo el espectro de penicilina G usando la última clasificación de susceptibilidad a penicilina V oral del Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI) (4). Los 124 estreptococos del grupo A probados mediante CMI incluyeron 26 cepas susceptibles a macrólidos y 98 resistentes a macrólidos. Las últimas incluyeron 19 cepas con erm(B), 38 mef(A), 40 erm(A) y 1 cepa con una mutación en L4. Puesto que las cepas de ambas especies fueron elegidas por sus fenotipos de resistencia a macrólidos, solo las cepas susceptibles fueron aisladas consistentemente recientes (2003-2008); algunas cepas resistentes se aislaron hasta cinco años antes (1998). *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 se incluyó como la cepa de control de calidad para cada especie en cada ciclo.

30 Para las pruebas de selección de resistencia, se probaron uno de cada uno de los fenotipos de resistencia neumocócica siguientes: susceptible a macrólidos, erm(B) positivo, mef(A) positivo, erm(B) + mef(A) positivo, erm(A) positivo y con mutación en las proteínas ribosómicas (L4, L22) y el ARNr 23S. Se probaron cinco cepas de

estreptococos del grupo A con uno de susceptible a macrólidos, erm(B) positivo, mef(A) positivo, erm(A) positivo y con mutación en L4.

- 5 Las CMI se determinaron mediante la técnica de dilución en agar. Se usó agar Mueller-Hinton (BD Diagnostics, Sparks, Md) + 5 % de agar sangre de ovino con 10^4 UFC/punto e incubación durante la noche a 35 °C en aire ambiental. Las cepas de control de calidad habituales se incluyeron en cada ciclo. Para las pruebas de selección de resistencia, se usó macrodilución según el CLSI para las pruebas de CMI.

- 10 Se probó la presencia de los genes erm(B), erm(A), mef(E) y mef(A) en todas las cepas parentales resistentes a macrólidos mediante amplificación por RCP. Se examinó la presencia de mutaciones en las proteínas ribosómicas L4 y L22 y el ARNr 23S (dominios II y V) en todos los aislados parentales y en clones resistentes a CEM-101 (CMI de CEM-101 >1 µg/mL) usando cebadores y condiciones convencionales. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron mediante secuenciación directa con un sistema de análisis genético CEQ8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

- 15 Se realizaron diariamente pases seriados de cada cepa en concentraciones subinhibitorias de todos los antimicrobianos. En todos los casos, el medio del caldo fue 1 mL por tubo de caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes (BD Diagnostics, Sparks, MD) + 5 % de sangre de caballo lisada. Para cada pase diario sucesivo, se tomó un inóculo (10 µl) del tubo de una a dos diluciones por debajo de la CMI que coincidía con la turbidez de un tubo de control de crecimiento. Este inóculo se usó para determinar la siguiente CMI. Se realizaron pases diarios hasta que se obtuvo un aumento significativo de la CMI (≥ 8 veces). Se realizó un mínimo de 14 pases, a menos que se obtuvieran CMI ≥ 32 µg/mL. El número máximo de pases fue de 50. La estabilidad de la resistencia adquirida se determinó mediante determinaciones de CMI tras 10 pases diarios de los mutantes sobre agar sangre sin antibióticos. Las CMI de cada clon neumocócico resistente a cada compuesto de determinaron mediante CMI por
- 20 macrodilución. La identidad de los mutantes obtenidos y sus correspondientes parentales se confirmó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) al final del estudio. La EGCP del ADN digerido con SmaI se realizó usando un equipo CHEF DR III (Bio-Rad, Hercules, CA) con los parámetros de ciclo siguientes: tiempo de cambio de 5 a 20 s y tiempo de ciclo de 16 h.

- 30 La frecuencia de mutaciones monoetapa espontáneas se determinó extendiendo suspensiones (aproximadamente 10^{10} UFC/mL) sobre agar de Mueller-Hinton (BD Diagnostics, Sparks, MD) con un 5 % de sangre de ovino a 2, 4 y 8 x CMI. Tras incubación a 35 °C en CO₂ al 5 % durante 48 h, se calculó la frecuencia de resistencia como el número de colonias con CMI aumentadas al menos 4 x CMI parental por inóculo. No se realizaron estudios monoetapa con AZI, CLR, CLN y TEL para cepas con CMI ≥ 4 µg/mL. Los resultados de las pruebas de CMI neumocócica se
- 35 presentan en las tablas siguientes.
CMI (µg/mL) de fármacos contra cepas neumocócicas

Fármaco	Intervalo de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Penicilina G (221 ^a)	0,008->16	1	4
Penicilina S (53)	0,008-0,06	,03	,06
Penicilina I (63)	0,125-1	,5	1
Penicilina R (105)	2->16	4	8
Macrólido S (50)	0,015-8	1	2
erm(B) (54)	0,03-16	1	4
mef(A) (51)	0,008-4	0,125	4
erm(A) (4)	0,03-0,03	-----	-----
erm(B) + mef(A) (31)	0,03-8	2	4
L4 (27)	1->16	4	16
ARNr 23S (4)	0,015-0,5	-----	-----
Quinolona S (195)	0,008->16	1	4
Quinolona R (27)	0,015-8	0,25	4
CEM-101	0,002-1	0,03	0,25
Penicilina S	0,002-0,25	0,03	0,125
Penicilina I	0,002-0,25	0,03	0,25
Penicilina R	0,004-1	0,06	0,25
Macrólido S	0,002-0,015	0,008	0,015
erm(B)	0,004-1	0,03	0,5
mef(A)	0,008-0,25	0,03	0,125
erm(A)	0,008-0,015	-----	-----

erm(B) + mef(A)	0,015-1	0,125	0,25
L4	0,03-0,125	0,06	0,125
ARNr 23S	0,002-0,03	-----	-----
Quinolona S	0,002-1	0,03	0,25
Quinolona R	0,004-,25	0,008	0,06
Eritromicina	0,03->64	64	>64
Penicilina S	0,03->64	4	>64
Penicilina I	0,03->64	>64	>64
Penicilina R	0,03->64	>64	>64
Macróido S	0,03-0,25	0,06	0,125
erm(B)	16->64	>64	>64
mef(A)	1->64	4	32
erm(A)	2-4	-----	-----
erm(B) + mef(A)	4->64	>64	>64
L4	4->64	>64	>64
ARNr 23S	8->64	-----	-----
Quinolona S	0,03->64	>64	>64
Quinolona R	0,03->64	0,06	>64
AZI	0,06->64	16	>64
Penicilina S	0,06->64	4	>64
Penicilina I	0,06->64	>64	>64
Penicilina R	0,06->64	>64	>64
Macróido S	0,06-0,25	0,125	,0125
erm(B)	>64 ->64	>64	>64
mef(A)	1->64	4	8
erm(A)	2-8	-----	-----
erm(B) + mef(A)	2->64	>64	>64
L4	2->64	>64	>64
ARNr 23S	32->64	-----	-----
Quinolona S	0,06->64	>64	>64
Quinolona R	0,06->64	0,125	>64
CLR	0,125->64	8	>64
Penicilina S	0,015->64	1	>64
Penicilina I	0,03->64	16	>64
Penicilina R	0,015->64	16	>64
Macróido S	0,015-0,06	0,03	0,06
erm(B)	4->64	>64	>64
mef(A)	0,5-32	2	4
erm(A)	0,25-0,5	-----	-----
erm(B) + mef(A)	1->64	>64	>64
L4	1-32	16	32
ARNr 23S	8-16	-----	-----
Quinolona S	0,015 ->64	16	>64
Quinolona R	0,015->64	0,03	>64
TEL	0,015-2	0,06	0,5
Penicilina S	0,015-1	0,06	0,25
Penicilina I	0,015-1	0,06	0,5
Penicilina R	0,015-2	0,125	0,5
Macróido S	0,015-0,03	0,03	0,03
erm(B)	0,03-2	0,06	1
mef(A)	0,03-0,5	0,125	0,25
erm(A)	0,03-0,06	-----	-----
erm(B) + mef(A)	0,03-2	0,5	1
L4	0,06-0,25	0,125	0,25
ARNr 23S	0,03-0,06	-----	-----
Quinolona S	0,015-2	0,125	0,5
Quinolona R	0,015-1	0,03	0,125

CLN	0,015->64	0,06	>64
Penicilina S	0,03->64	0,06	>64
Penicilina I	0,03->64	0,125	>64
Penicilina R	0,015->64	0,06	>64
Macrólido S	0,015-0,06	0,03	0,06
erm(B)	0,06->64	>64	>64
mef(A)	0,03-0,125	0,06	0,06
erm(A)	0,125-0,25	-----	-----
erm(B) + mef(A)	0,03->64	0,06	>64
L4	0,03-0,125	0,06	0,125
ARNr 23S	0,03-1	-----	-----
Quinolona S	0,015->64	0,06	>64
Quinolona R	0,03-64	0,03	64
Amoxicilina/Clavulanato	0,015-16	0,05	8
Penicilina S	0,015-0,125	0,03	0,06
Penicilina I	0,03-2	0,5	1
Penicilina R	0,125-16	2	8
Macrólido S	0,015-8	0,5	2
erm(B)	0,015-8	0,5	8
mef(A)	0,015-8	0,125	2
erm(A)	0,03-0,03	-----	-----
erm(B) + mef(A)	0,03-16	2	8
L4	0,125-8	4	8
ARNr 23S	0,03-0,06	-----	-----
Quinolona S	0,015-16	1	8
Quinolona R	0,015-4	0,5	2
Levofloxacin	0,06-32	1	8
Penicilina S	0,06-32	1	16
Penicilina I	1-32	1	2
Penicilina R	0,5-16	1	2
Macrólido S	1-32	1	16
erm(B)	0,5-32	1	2
mef(A)	0,5-8	1	2
erm(A)	1-1	-----	-----
erm(B) + mef(A)	1-16	1	16
L4	0,5-16	1	2
ARNr 23S	0,06-1	-----	-----
Quinolona S	0,06-2	1	2
Quinolona R	4-32	16	16
Moxifloxacin	0,125-8	0,25	2
Penicilina S	0,125-8	0,5	4
Penicilina I	0,125-4	0,25	0,5
Penicilina R	0,125-4	0,25	0,5
Macrólido S	0,125-8	0,25	4
erm(B)	0,125	0,25	0,5
mef(A)	0,125-4	0,25	0,5
erm(A)	0,25-0,5	-----	-----
erm(B) + mef(A)	0,125-2	0,25	0,5
L4	0,125-4	0,25	0,5
ARNr 23S	0,25-0,5	-----	-----
Quinolona S	0,125-1	0,25	0,5
Quinolona R	0,5-8	4	4
^a N.º de cepas probadas.			

Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ (µg/mL) de cepas neumocócicas con mecanismo de resistencia a macrólidos definido

Fármaco	erm(B) (54)		mef(A) (51)		erm(B) + mef(A) (31)		Mutaciones en L4 (27)	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
CEM-101	0,03	0,5	0,03	0,125	0,125	0,25	0,06	0,125
Eritromicina	>64	>64	4	32	>64	>64	>64	>64
AZI	>64	>64	4	8	>64	>64	>64	>64
CLR	>64	>64	2	4	>64	>64	16	32
TEL	0,06	1	0,125	0,25	0,5	1	0,125	0,25
CLN	>64	>64	0,06	0,06	0,06	>64	0,06	0,125
Amoxicilina/Clavulanato	0,5	8	0,125	2	2	8	4	8
Levofloxacin	1	2	1	2	1	16	1	2
Moxifloxacin	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Penicilina G	1	4	0,125	4	2	4	4	16

CEM-101 tuvo un intervalo de CMI contra neumococos susceptibles a macrólidos de 0,002-0,015 µg/mL y un intervalo contra neumococos resistentes a macrólidos (todos los fenotipos) de 0,004-1 µg/mL. Solo 3 cepas con erm(B) [con y sin mef(A)] tuvieron CMI de CEM-101 de 1,0 µg/mL y 218/221 cepas tuvieron CMI de CEM-101 de ≤0,5 µg/mL. En cambio, los intervalos de CMI de TEL fueron de 0,015-0,03 µg/mL para cepas susceptibles a macrólidos y 0,015-2 µg/mL para cepas resistentes a macrólidos. Las CMI de CEM-101 fueron hasta cuatro veces más bajas que las de la TEL contra cepas susceptibles a macrólidos y resistentes a macrólidos. Todas las cepas estreptocócicas del grupo A fueron susceptibles a penicilina G. Las CMI se presentan en las tablas siguientes.

10

CMI (µg/mL) de fármacos contra estreptococos del grupo A

Fármaco	Intervalo de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
CEM-101 (124 ^a)	0,008-1	0,06	0,5
Macrólido S (26)	0,008-0,03	0,015	0,03
Erm(B) (19)	0,03-1	0,5	1
Mef(A) (38)	0,06-0,25	0,125	0,25
Erm(A) (40)	0,016-0,5	0,03	0,125
L4 (1)	0,06	-----	-----
Eritromicina	0,03->64	16	>64
Macrólido S	0,03-0,25	0,06	0,125
Erm(B)	>64 ->64	>64	>64
Mef(A)	8-32	16	32
Erm(A)	2->64	4	>64
L4	2	-----	-----
AZI	0,06->64	8	>64
Macrólido S	0,06-0,25	0,125	0,25
Erm(B)	>64 ->64	>64	>64
Mef(A)	0,5-16	8	8
Erm(A)	2->64	16	>64
L4	2	-----	-----
CLR	0,015->64	4	>64
Macrólido S	0,015-0,06	0,03	0,06
Erm(B)	32->64	>64	>64
Mef(A)	0,5-8	4	8
Erm(A)	0,25->64	2	>64
L4	1	-----	-----
TEL	0,03-16	0,125	8
Macrólido S	0,03-0,06	0,06	0,06
Erm(B)	0,03-16	8	16
Mef(A)	0,125-1	0,5	1
Erm(A)	0,03-0,25	0,06	0,125
L4	0,06	-----	-----
Amoxicilina/Clavulanato	<0,015-0,125	0,03	0,03
Macrólido S	0,015-0,03	0,03	0,03

Erm(B)	<0,015-0,125	<0,015	0,03
Mef(A)	<0,015-0,125	0,015	0,06
Erm(A)	<0,015-0,03	0,03	0,03
L4	0,03	-----	-----
Levofloxacin	0,5-2	0,5	1
Macrólido S	0,5-1	0,5	0,5
Erm(B)	0,5-1	0,5	1
Mef(A)	0,5-2	0,5	1
Erm(A)	0,5-2	0,5	1
L4	0,5	-----	-----
Moxifloxacin	0,0125-0,5	0,25	0,25
Macrólido S	0,125-0,25	0,25	0,25
Erm(B)	0,125-0,25	0,25	0,25
Mef(A)	0,25-0,5	0,25	0,25
Erm(A)	0,125-0,5	0,25	0,25
L4	0,25	-----	-----
Pen G	<0,008-0,125	0,015	0,015
Macrólido S	0,008-0,015	0,015	0,015
Erm(B)	<0,008-0,125	0,015	0,015
Mef(A)	<0,008-0,125	0,015	0,03
Erm(A)	<0,008-0,015	0,015	0,015
L4	0,015	-----	-----
CLN	0,03->64	0,125	>64
Macrólido S	0,03-0,125	0,06	0,06
Erm(B)	0,06->64	>64	>64
Mef(A)	0,03-0,125	0,06	0,125
Erm(A)	0,06-0,5	0,125	0,25
L4	0,06	-----	-----
a Número de cepas probadas			

Valores de CMI50 y CMI90 (µg/mL) de cepas estreptocócicas del grupo A con mecanismos de resistencia a macrólidos definidos

	erm(B) (19)		mef(A) (38)		erm(A) (40)	
Fármaco	CMI50	CMI90	CMI50	CMI90	CMI50	CMI90
CEM-101	0,5	1	0,125	0,25	0,03	0,125
Eritromicina	>64	>64	16	32	4	>64
AZI	>64	>64	8	8	16	>64
CLR	>64	>64	4	8	2	>64
TEL	8	16	0,5	1	0,06	0,125
CLN	>64	>64	0,06	0,125	0,125	0,25
Amoxicilina/clavulanato	<0,015	0,03	0,015	0,06	0,03	0,03
Levofloxacin	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Moxifloxacin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Penicilina G	0,015	0,015	0,015	0,03	0,015	0,015

5

Contra cepas susceptibles a macrólidos, las CMI de CEM-101 fueron de 0,008-0,03 µg/mL y contra las cepas resistentes a macrólidos (todos los fenotipos) las CMI fueron de 0,015-1 µg/mL. Las CMI de TEL fueron hasta cuatro veces más altas que las de CEM-101. La mayoría (17/19) de cepas erm(B) fueron resistentes a TEL con CMI de 4 y 16 µg/mL, mientras que todas tuvieron CMI de CEM-101 bajas, similares a las de otros fenotipos de resistencia (intervalo de 0,03-1 µg/mL). Los resultados de los estudios de selección de resistencia neumocócica multietapa se presentan en la tabla siguiente.

10

Resultados de la selección multietapa de *S. pneumoniae*.

N.º de cepa Fenotipo [determinantes de		Resistencia seleccionada	Volver a probar la CMI tras 10 subcultivos antibiótico-n.º de cepa libres de fármaco
--	--	-----------------------------	---

R) Fármaco								
	CMI inicial (µg/mL)	CMI	N.º de pases	CEM	AZI	CLA	TEL	CLI
1077 Macrólido-S								
CEM-101	0,008	0,06	43	0,06	0,03	0,06	0,06a	0,03
AZI	0,03	>64	29	0,03	>64	>64	0,125	4
CLR	0,016	0,008	50	-	-	-	-	-
TEL	0,004	0,25	15	0,06	>64	>64	0,25	8
CLN	0,016	4	49	0,06	>64	>64	0,06	8
24 Macrólido-R[erm(B)]								
CEM-101	0,004	0,06	14	0,06	>64	>64	0,125	>64
AZI	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
CLR	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
TEL	0,25	32	14	0,06	>64	>64	16	>64
CLN	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
3665 Macrólido-R[mef(A)]								
CEM-101	0,03	0,5	14	0,5	16	4	0,25	0,03
AZI	8	16	50	-	-	-	-	-
CLR	2	16	26	0,06	8	8	0,06	0,03
TEL	0,125	2	14	0,03	4	2	0,25	0,03
CLN	0,016	0,03	50	-	-	-	-	-
1076 Macrólido-R[erm(B) + mef(A)]								
CEM-101	1	32	18	32	>64	>64	32	>64
AZI	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
CLR	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
TEL	0,5	>64	14	2	>64	>64	>64	>64
CLN	64	NP	NP	-	-	-	-	-
1635 Macrólido-R[erm(A)]								
CEM-101	0,008	0,06	32	0,125	4	1	0,03	0,03
AZI	2	>64	14	0,004	>64	>64	0,004	0,03
CLR	0,5	>64	49	0,008	>64	>64	0,016	0,25
TEL	0,004	0,008	50	-	-	-	-	-
CLN	0,06	>64	14	0,004	4	0,5	0,008	>64
2686 Macrólido-R[mutación en L4]								
CEM-101	0,03	0,5	22	1	>64	32	0,25	0,03
AZI	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
CLR	8	>64	14	0,03	>64	>64	0,06	0,03
TEL	0,06	0,5	25	0,016	>64	16	0,5	0,03
CLN	0,03	0,125	50	-	-	-	-	-
7127 Macrólido-S[S20N en L4, A105V en L22]								
CEM-101	0,008	0,125	16	0,06	0,06	0,125	0,06	0,03
AZI	0,06	0,5	29	0,016	1	0,5	0,016	0,06
CLR	0,03	16	15	0,008	>64	16	0,008	1
TEL	0,008	0,06	38	0,008	0,06	0,06	0,03	0,03
CLN	0,03	0,25	43	0,004	0,03	0,016	0,008	0,25
3009 Macrólido-R[mutación en 23SrRNA]								
CEM-101	0,016	0,25	20	0,25	>64	>64	0,06	1
AZI	>64	NP	NP	-	-	-	-	-

CLR	16	>64	25	0,03	>64	64	0,06	1
TEL	0,016	0,03	50	-	-	-	-	-
CLN	1	2	50	-	-	-	-	-
b Reactividad cruzada indicada en negrita.								

Para neumococos, las CMI parentales ($\mu\text{g/mL}$) fueron: CEM-101, 0,004-1; AZI, 0,03-8; CLR, 0,016-16; TEL, 0,004-0,5; CLN, 0,016-1. Cuatro cepas con CMI de AZI, dos con CLR y dos con CLN $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ no se probaron. Las CMI de CEM-101 aumentaron tras 14-43 días en las 8 cepas probadas. Para 7 cepas, las CMI subieron de 0,004-0,03 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,06-0,5 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes) en 14-43 días. Para la octava cepa, que contenía erm(B) + mef(A), las CMI subieron de 1 $\mu\text{g/mL}$ (parental) a 32 $\mu\text{g/mL}$ (clon resistente) en 18 días. Este clon resistente a CEM-101 se sometió a análisis de secuenciación, que reveló ausencia de alteraciones en las proteínas L4 y L22 y en los dominios II y V del ARNr 23S en comparación con las secuencias parentales. La AZI tenía clones resistentes tras 14-29 días en 3/4 cepas, con CMI que subían de 0,03-2 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,5->64 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). La CLR tenía clones resistentes tras 14-49 días en 5/6 cepas, con CMI que subían de 0,03-16 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 16->64 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). La TEL tenía clones resistentes estables tras 14-38 días en 5/8 probadas, con CMI que subían de 0,004-0,5 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,06->64 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). La CLR tenía clones resistentes tras 14-43 días en 2/5 cepas, con CMI que subían de 0,03-0,06 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,25->64 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes).

Los resultados para *S. pyogenes* se muestran en la tabla siguiente.

Resultados de la selección multietapa de *S. pyogenes*

N.º de cepa Fenotipo [determinantes de R]	CMI inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Resistencia seleccionada		Volver a probar CMI tras 10 subcultivos libres de antibiótico				
Antibiótico								
2132 Macrólido-S								
CEM-101	0,008	0,016	50	CEM	AZI	CLA	TEL	CLI
AZI	0,06	1	28	0,016	1	0.25b	0,03	0,03
CLR	0,03	0,016	50	-	-	-	-	-
TEL	0,008	0,03	50	-	-	-	-	-
CLN	0,06	0,06	50	-	-	-	-	-
2368 Macrólido-R [erm(B)]								
CEM-101	1	8	18	8	>64	>64	>64	>64
AZI	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
CLR	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
TEL	8	>64	6	0,5	>64	>64	>64	>64
CLN	>64	NP	NP	-	-	-	-	-
2094 Macrólido-R [erm(A)]								
CEM-101	0,03	0,25	43	0,25	4	8	0,5	0,06
AZI	4	>64	5	0,016	>64	1	0,03	0,06
CLR	0,5	>64	6	0,016	>64	>64	0,03	0,06
TEL	0,03	0,25	22	0,03	>64	8	0,125	>64
CLN	0,06	>64	34	0,03	16	1	0,03	>64
2011 Macrólido-R [mef(A)]								
CEM-101	0,125	0,125	50	-	-	-	-	-
AZI	4	32	35	0,06	16	4	0,25	0,06
CLR	4	8	50	-	-	-	-	-
TEL	0,5	1	50	-	-	-	-	-
CLN	0,06	0,06	50	-	-	-	-	-
237 Macrólido-R [mutación en L4]								
CEM-101	0,03	0,25	20	0,5	4	1	1	0,03
AZI	4	8	50	-	-	-	-	-
CLR	0,25	1	50	-	-	-	-	-

TEL	0,06	0,125	50	-	-	-	-	-
CLN	0,06	0,5	43	0,03	8	0,5	0,06	1
b Reactividad cruzada indicada en negrita.								

Las CMI parentales ($\mu\text{g/mL}$) fueron: CEM-101, 0,008-1; AZI, 0,06-4; CLR, 0,03-4; TEL, 0,008-8; CLN, 0,06. Las CMI de una cepa con AZI, CLR y CLN $>64 \mu\text{g/mL}$ no se probaron. Las CMI de CEM-101 aumentaron tras 18-43 días en 3/5 cepas, subiendo de 0,03-1 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,25-8 $\mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). El clon resistente con CMI de 5 CEM-101 de 8 $\mu\text{g/mL}$ se sometió a análisis de secuenciación, que no mostró cambios en ninguno de los genes (L4, L22 y los dominios II y V del ARNr 23S) probados. Las CMI de CEM-101 para los 2 clones restantes no subieron por encima de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ cuando se continuaron los pases durante el plazo máximo de 50 días. La AZI tenía clones resistentes tras 5-35 días en 3/4 cepas probadas, con CMI que subían de 0,06-4 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 1- $>64 \mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). La CLR tenía clones resistentes tras 6 días en 1/4 cepas probadas, con CMI que subían de 10 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a $>64 \mu\text{g/mL}$ (clon resistente). La TEL tenía clones resistentes tras 6-22 días en 2/5 cepas probadas, con CMI que subían de 0,03-8 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,25- $>64 \mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). La CLN tenía clones resistentes tras 34-43 días en 2/4 cepas probadas, con CMI que subían de 0,06 $\mu\text{g/mL}$ (parentales) a 0,5- $>64 \mu\text{g/mL}$ (clones resistentes). Resultados de los estudios de selección de resistencia monoetapa para neumococos se presentan en la tabla siguiente.

15 Frecuencias de mutación monoetapa de *S. pneumoniae*

Número de cepa	Fenotipo [determinantes de R]	Fármaco seleccionado	2x CMI	4x CMI	8x CMI
1077	Macrólido-S ^a	CEM-101	$<9,1 \times 10^{-9}$	$<9,1 \times 10^{-9}$	$<9,1 \times 10^{-9}$
		Azitromicina	$7,2 \times 10^{-9}$	$<1,9 \times 10^{-10}$	$<1,9 \times 10^{-10}$
		Claritromicina	$1,1 \times 10^{-9}$	$<1,2 \times 10^{-10}$	$<1,2 \times 10^{-10}$
		Telitromicina	$1,1 \times 10^{-9}$	$<5,5 \times 10^{-10}$	$<5,5 \times 10^{-10}$
		Clindamicina	$<3,8 \times 10^{-10}$	$<3,8 \times 10^{-10}$	$<3,8 \times 10^{-10}$
24	Macrólido-R ^a [erm(B)]	CEM-101	$1,8 \times 10^{-7}$	$<5,0 \times 10^{-9}$	$<5,0 \times 10^{-9}$
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-6}$
		Clindamicina	NP	NP	NP
3665	Macrólido-R [mef(A)]	CEM-101	$6,8 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	$<4,5 \times 10^{-10}$
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	$5,0 \times 10^{-7}$	$<5,0 \times 10^{-10}$	$<5,0 \times 10^{-10}$
		Telitromicina	$7,5 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$<2,5 \times 10^{-10}$
		Clindamicina	$<2,4 \times 10^{-10}$	$<2,4 \times 10^{-10}$	$<2,4 \times 10^{-10}$
1076	Macrólido-R [erm(B) + mef(A)]	CEM-101	$<2,5 \times 10^{-8}$	$7,5 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-9}$
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	$6,5 \times 10^{-6}$	$9,7 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-6}$
		Clindamicina	NP	NP	NP
1635	Macrólido-R [erm(A)]	CEM-101	$1,6 \times 10^{-8}$	$<2,0 \times 10^{-10}$	$<2,0 \times 10^{-10}$
		Azitromicina	$<2,0 \times 10^{-10}$	$<2,0 \times 10^{-10}$	$<2,0 \times 10^{-10}$

		Claritromicina	$<3,1 \times 10^{-9}$	$<3,1 \times 10^{-9}$	$<3,1 \times 10^{-9}$
		Telitromicina	$<2,7 \times 10^{-9}$	$<2,7 \times 10^{-9}$	$<2,7 \times 10^{-9}$
		Clindamicina	$7,3 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$5,6 \times 10^{-7}$

Frecuencias de mutación monoetapa de *S. pneumoniae* (continuación)

2686	Macrólido-R [mutación en L4]	CEM-101	<2,5 10 ⁻⁹ x	<2,5 10 ⁻⁹ x	<2,5 10 ⁻⁹ x
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	2,2 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁹	<1,1 10 ⁻⁹ x
		Clindamicina	<1,2 10 ⁻⁹ x	<1,2 10 ⁻⁹ x	<1,2 10 ⁻⁹ x
7127	Macrólido-S [S20N en L4, A105V en L22]	CEM-101	<2,0 10 ⁻¹⁰ x	<2,0 10 ⁻¹⁰ x	<2,0 10 ⁻¹⁰ x
		Azitromicina	<2,0 10 ⁻¹⁰ x	<2,0 10 ⁻¹⁰ x	<2,0 10 ⁻¹⁰ x
		Claritromicina	<1,0 10 ⁻⁹ x	<1,0 10 ⁻⁹ x	<1,0 10 ⁻⁹ x
		Telitromicina	<5,0 10 ⁻⁹ x	<5,0 10 ⁻⁹ x	<5,0 10 ⁻⁹ x
		Clindamicina	<2,9 10 ⁻⁸ x	<2,9 10 ⁻⁸ x	<2,9 10 ⁻⁸ x
3009	Macrólidos-R [mutación en ARNr 23S]	CEM-101	<5,9 10 ⁻⁹ x	<5,9 10 ⁻⁹ x	<5,9 10 ⁻⁹ x
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	3,8 x 10 ⁻⁷	<1,5 10 ⁻¹⁰ x	<1,5 10 ⁻¹⁰ x
		Clindamicina	1,7 x 10 ⁻⁴	7,3 x 10 ⁻⁹	<1,2 10 ⁻¹⁰ x
a S = Susceptible; R = Resistente					

- 5 De los mismos 4 comparadores usados en la selección multietapa, se probó su propensión a producir mutaciones espontáneas. Las frecuencias de selección de mutantes para CEM-101 variaron de $<2,0 \times 10^{-10}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ a 2x CMI a $<2,0 \times 10^{-10}$ - $9,1 \times 10^{-9}$ a 8x CMI. Estos comparadores tuvieron frecuencias de resistencia más altas: TEL, $1,1 \times 10^{-9}$ - $1,3 \times 10^{-4}$ a 2x CMI a $<1,5 \times 10^{-10}$ - $4,8 \times 10^{-6}$ a 8x CMI; CLN, $<2,4 \times 10^{-10}$ - $1,7 \times 10^{-4}$ a 2x CMI a $<1,2 \times 10^{-10}$ - $5,6 \times 10^{-7}$ a 8x CMI; y CLR, $<1,0 \times 10^{-9}$ - $5,0 \times 10^{-7}$ a 2x CMI a $<1,2 \times 10^{-10}$ - $<3,1 \times 10^{-9}$ a 8x CMI. Se ensayó un número pequeño, 10 3 cepas, con AZI; las frecuencias de selección de mutantes fueron $<2,0 \times 10^{-10}$ - $7,2 \times 10^{-9}$ a 2xCMI a $<1,9 \times 10^{-10}$ - $<2,0 \times 10^{-10}$ a 8x CMI. Los resultados de los estudios de selección de resistencia monoetapa para *S. pyogenes* se presentan en la tabla siguiente.

Frecuencias de mutación monoetapa de *S. pyogenes*

15

Número de cepa	Fenotipo [determinantes de R] ^a	Fármaco seleccionado	2x CMI	4x CMI	8x CMI
2132	Macrólido-S ^a	CEM-101	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$
		Azitromicina	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$
		Claritromicina	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$	$<1,0 \times 10^{-10}$
		Telitromicina	$<8,3 \times 10^{-11}$	$<8,3 \times 10^{-11}$	$<8,3 \times 10^{-11}$
		Clindamicina	$<7,7 \times 10^{-11}$	$<7,7 \times 10^{-11}$	$<7,7 \times 10^{-11}$

			10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹
2368	Macrólido-R ^a [erm(B)]	CEM-101	<5,9 x 10 ⁻¹¹	<5,9 x 10 ⁻¹¹	<5,9 x 10 ⁻¹¹
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	NP	NP	NP
		Clindamicina	NP	NP	NP
2094	Macrólido-R [erm(A)]	CEM-101	5,3 x 10 ⁻⁸	2,1 x 10 ⁻⁹	<5,3 x 10 ⁻¹⁰
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	1,7 x 10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁻⁷	5,0 x 10 ⁻⁹
		Telitromicina	7,7 x 10 ⁻⁸	<1,5 x 10 ⁻¹⁰	<1,5 x 10 ⁻¹⁰
		Clindamicina	2,1 x 10 ⁻⁷	1,3 x 10 ⁻⁷	1,1 x 10 ⁻⁷
2011	Macrólido-R [mef(A)]	CEM-101	3,9 x 10 ⁻⁸	<1,1 x 10 ⁻¹⁰	<1,1 x 10 ⁻¹⁰
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	NP	NP	NP
		Telitromicina	3,8 x 10 ⁻⁸	<6,3 x 10 ⁻¹⁰	<6,3 x 10 ⁻¹⁰
		Clindamicina	<1,0 x 10 ⁻¹⁰	<1,0 x 10 ⁻¹⁰	<1,0 x 10 ⁻¹⁰
237	Macrólido-R [mutación en L4]	CEM-101	<1,3 x 10 ⁻¹⁰	<1,3 x 10 ⁻¹⁰	<1,3 x 10 ⁻¹⁰
		Azitromicina	NP	NP	NP
		Claritromicina	<3,3 x 10 ⁻¹⁰	<3,3 x 10 ⁻¹⁰	<3,3 x 10 ⁻¹⁰
		Telitromicina	<2,0 x 10 ⁻¹⁰	<7,0 x 10 ⁻¹⁰	<2,0 x 10 ⁻¹⁰
		Clindamicina	<1,0 x 10 ⁻¹⁰	<1,0 x 10 ⁻¹⁰	<1,0 x 10 ⁻¹⁰
a S = Susceptible; R = Resistente					

Al igual que con los neumococos, de los 4 comparadores usados en la selección multietapa se probó su propensión a producir mutaciones espontáneas. Las frecuencias de selección de mutantes para CEM-101 variaron de <5,9 x 10^{-11} -5,3 x 10^{-8} a 2x CMI a <5,9 x 10^{-11} -<5,3 x 10^{-10} a 8x CMI. Los siguientes comparadores tuvieron frecuencias de resistencia más altas que CEM-101: CLN, <7,7 x 10^{-11} -2,1 x 10^{-7} a 2x CMI a <7,7 x 10^{-11} -1,1 x 10^{-7} a 8x CMI; y CLR, <1,0 x 10^{-10} -1,7 x 10^{-7} a 2x CMI a <1,0 x 10^{-10} -5,0 x 10^{-9} a 8x CMI. Las frecuencias de TEL fueron similares a las de CEM-101: <8,3 x 10^{-11} -7,7 x 10^{-8} a 2x CMI a <8,3 x 10^{-11} -<6,3 x 10^{-10} a 8x CMI. La frecuencia de mutación para la única cepa sensible a macrólidos probada con AZI fue <1,0 x 10^{-10} a 2x y 8x CMI.

- 10 Los compuestos descritos en el presente documento demuestran potencia mejorada en comparación con la TEL, con actividad contra organismos TEL-intermedios y TEL-resistentes. Los compuestos descritos en el presente documento muestran una potencia significativamente superior contra *S. aureus* fagocitados, en comparación con TEL, AZI y CLR. Los compuestos descritos en el presente documento también son 50 y 100 veces más potentes que la AZI contra *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* fagocitados. Los compuestos descritos en el presente documento
- 15 presentan el espectro de actividad más amplio contra patógenos del tracto respiratorio, incluyendo los neumococos multirresistentes de tipo 19A, en comparación con AZI, CLR, eritromicina, TEL, CLN y quinupristina/dalfopristina. Los compuestos descritos en el presente documento también son potentes contra *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, micoplasmas y ureaplasmas humanos, y las CMI también señalan utilidad clínica contra la mayoría de enterococos, gonococos y anaerobios gram-positivos. Los compuestos descritos en el presente documento son activos contra
- 20 organismos comunes que provocan gastroenteritis, tales como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*, y también son activos contra *Helicobacter pylori*. Los compuestos descritos en el presente documento demuestran ser más bactericidas contra varias especies gram-positivas que la TEL, con efectos posantibióticos de 2,3-6,1 y 3,7-5,3 contra cepas gram-positivas y gram-negativas, respectivamente. Los compuestos descritos en el presente documento demuestran actividad *in vivo* significativa en una variedad de modelos de infección en murinos. Los
- 25 estudios multietapa preliminares muestran que los compuestos descritos en el presente documento tienen una

variación nula o baja de las CMI en una cepa de cada una de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* y 2 *S. pneumoniae*; se encuentran bajas tasas de mutantes espontáneos en los experimentos monoetapa.

Los compuestos descritos en el presente documento tienen CMI que son generalmente de al menos 1 o 2 diluciones inferiores a las de TEL contra todos los fenotipos de resistencia de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* probados, incluyendo los neumococos tipo 19A resistentes a fármacos y los *S. pyogenes* erm(B) positivos. CEM-101 produjo clones con CMI superiores en las 8 cepas neumocócicas, pero 7 de las 8 cepas tuvieron clones con CMI de CEM-101 $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ y en únicamente 1 cepa erm(B) + mef(A) con una CMI parental de 1 $\mu\text{g/mL}$ se encontró un clon resistente con una CMI de 32 $\mu\text{g/mL}$. En 2 de los 3 clones de *S. pyogenes* resistentes a CEM-101 [parentales erm(A), L4], las CMI fueron de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ y únicamente en la 1 cepa con erm(B) las CMI de CEM-101 subieron de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Los estudios monoetapa también mostraron baja producción de mutaciones espontáneas en comparación con otros agentes probados.

Con base en las farmacocinéticas de los informes de ensayos clínicos fase 1, las recomendaciones para los valores críticos de susceptibilidad de CEM-101 provisionales se han fijado en ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ como susceptible y ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ como resistente a estreptococos.

EJEMPLO. Estafilococos, estreptococos β -hemolíticos y del grupo viridans. Se realizaron pruebas S a una colección de aislados clínicos de 2006-2007 mediante los procedimientos del CLSI (M7-A7) con criterios interpretativos asociados (M100-S18) y suplementos (2-5 % de sangre lisada de caballo, LHB, por sus siglas en inglés) para pruebas estreptocócicas. Se usaron CEM-101, TEL (TEL) y 10 comparadores frente a 201 *S. aureus* (75 SARM-TS, 75 SASM-TS, 30 SARM-EH, 17 SAIV o SAIVh, 7 SARV), 100 estafilococos coagulasa-negativos (ECoN; 10 especies), 100 estreptococos β -hemolíticos (EBH; 30 del grupo A, 31 del grupo B, 14 del grupo C, 9 del grupo F, 16 del grupo G) y 51 estreptococos del grupo viridans (EGV; 5 especies), véase la tabla.

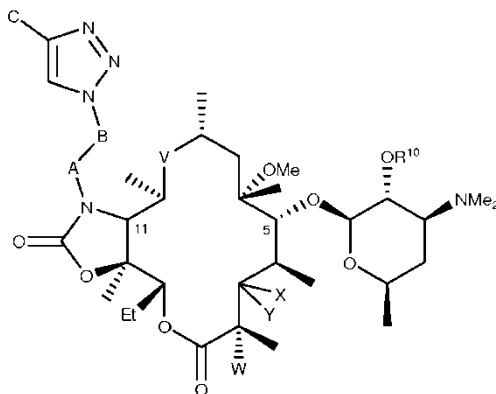
Las cepas de SASM fueron ligeramente más CEM-101-S (CMI50, 0,06 $\mu\text{g/mL}$) que las cepas SARM o SARM-EH (CMI50, 0,12 $\mu\text{g/mL}$). Las SAIV, SAIVh y SARV fueron generalmente más refractarias a CEM-101 y TEL. CEM-101 fue 2 veces más potente que la TEL contra todos los estafilococos. Los estreptococos fueron muy S a CEM-101 (CMI90, 0,03-0,06 $\mu\text{g/mL}$) y TEL fue 4 veces menos activa que los aislados no S de EBH observados. Los estafilococos ERI-R permanecieron CEM-101-S excepto para aislados TEL- y CLN (CC)-R, pero todos los EBH y EGV fueron S a CEM-101.

Organismos (n.º)	CMI de CEM-101 ($\mu\text{g/mL}$)			CMI de TEL ($\mu\text{g/mL}$)		
	50 %	90 %	Intervalo	50 %	90 %	Intervalo
SASM (75)	0,06	0,12	0,03->16	0,12	0,25	0,06->16
SARM (75)	0,12	>16	0,03->16	0,25	>16	0,06->16
SARM-EH (30)	0,12	0,12	0,06-0,12	0,25	0,25	0,12-0,5
SAIV, SAIVh (14)	>16	>16	0,06->16	>16	>16	0,25->16
SARV (7)	>16	-	0,12->16	>16	-	0,12->16
ECoN (100)	0,06	>16	0,03->16	0,12	>16	0,03->16
EBH (100)	0,015	0,03	<0,008-0,12	0,03	0,12	<0,008-2
EGV (51)	$\leq 0,008$	0,06	$\leq 0,008$ -0,12	0,015	0,25	$\leq 0,008$ -0,5

CEM-101 fue potente contra todos los estafilococos (CMI50, 0,06 $\mu\text{g/mL}$), excepto las cepas CC-R, e inhibió a todos los estreptococos a $\leq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$. La actividad fue de 2 a 4 veces superior a la de la TEL.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R^{10} es hidrógeno o acilo;

X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar carbonilo;

10 V es C(O);

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

A es CH_2 , C(O), C(O)O, C(O)NH, S(O)₂, S(O)₂NH, C(O)NHS(O)₂;

B es $(CH_2)_n$ en el que n es un número entero que varía de 0-10, o B es una cadena carbonada insaturada de 2-10 carbonos; y

15 C es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilario, alcoxi, heteroalquilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, aminoarilo, alquilaminoarilo, acilo, aciloxi, sulfonilo, ureido o carbamoilo; para uso en el tratamiento de una enfermedad provocada, al menos en parte, por un organismo que es resistente a una o más penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas.

20 2. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que A es CH_2 , B es $(CH_2)_n$ y n es un número entero de 2-4.

3. Un compuesto para uso según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que C es arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.

25

4. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que C es 3-aminofenilo o 3-piridinilo; preferiblemente C es 3-aminofenilo.

5. Un compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R^{10} es

30 hidrógeno.

6. Un compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno; preferiblemente A y B se toman juntos para formar butileno.

35 7. Un compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que W es H o F; preferiblemente W es F.

8. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que C es fenilo opcionalmente sustituido; preferiblemente C es fenilo, halofenilo, haloalquilfenilo o aminofenilo; más preferiblemente C es aminofenilo.

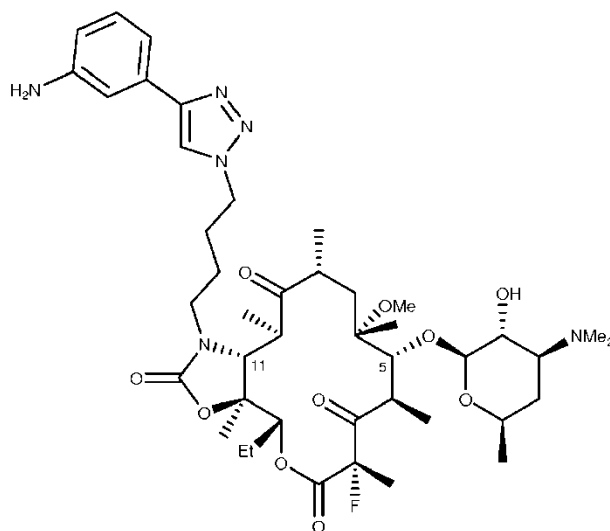
40

9. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que C es piridinilo opcionalmente sustituido; preferiblemente C es 2-piridinilo y 3-piridinilo; más preferiblemente C es 3-piridinilo.

10. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que C es benzotriazol opcionalmente

45 sustituido.

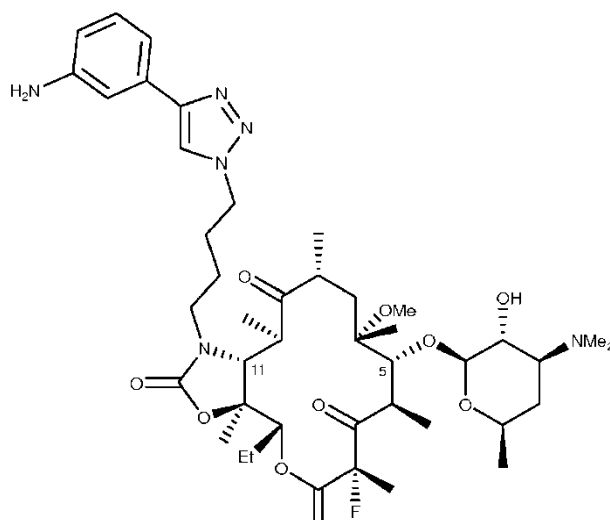
11. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

12. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de la fórmula



10 13. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el organismo es un SARM, neumococo MR o *S. pneumoniae* serotipo 19A.

14. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el organismo es un *Neisseria gonorrhoeae*, micoplasma, ureaplasma, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*,
15 *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* o clamidia.

15. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva es bactericida para al menos uno de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. mitis*.

20

16. Un compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el organismo es resistente a claritromicina.

17. Un compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el organismo es

resistente a azitromicina.

18. Una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad provocada, al menos en parte, por un organismo que es resistente a una o más penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, azitromicina, claritromicina o una combinación de las mismas,

comprendiendo la composición uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes de los mismos farmacéuticamente aceptables, o una combinación de los mismos.

10

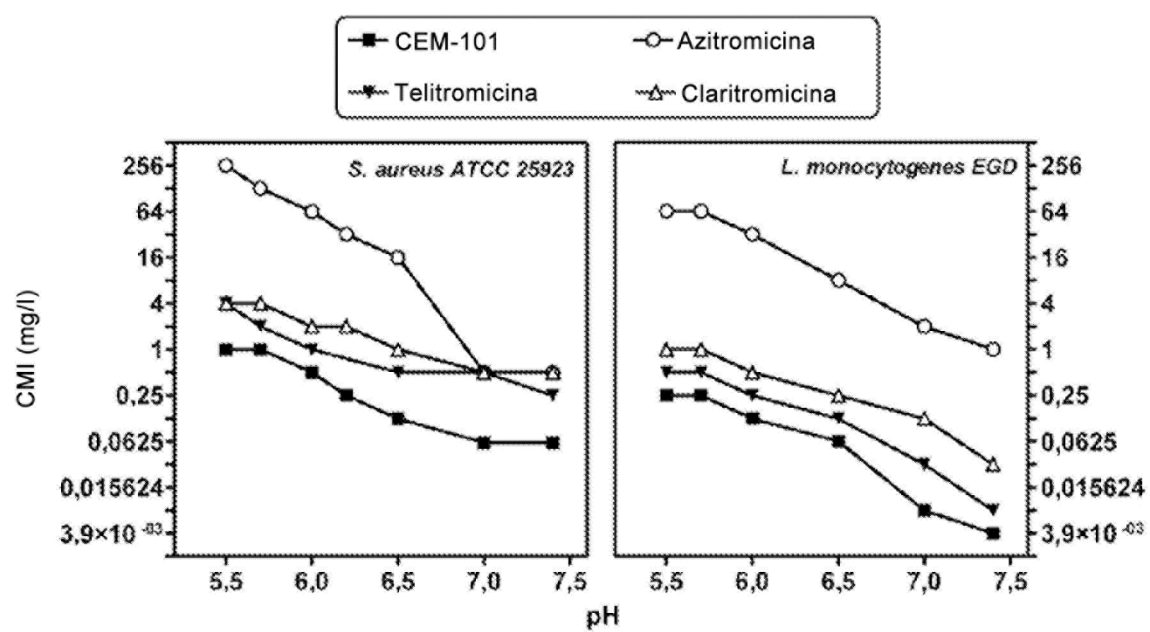


FIG. 1

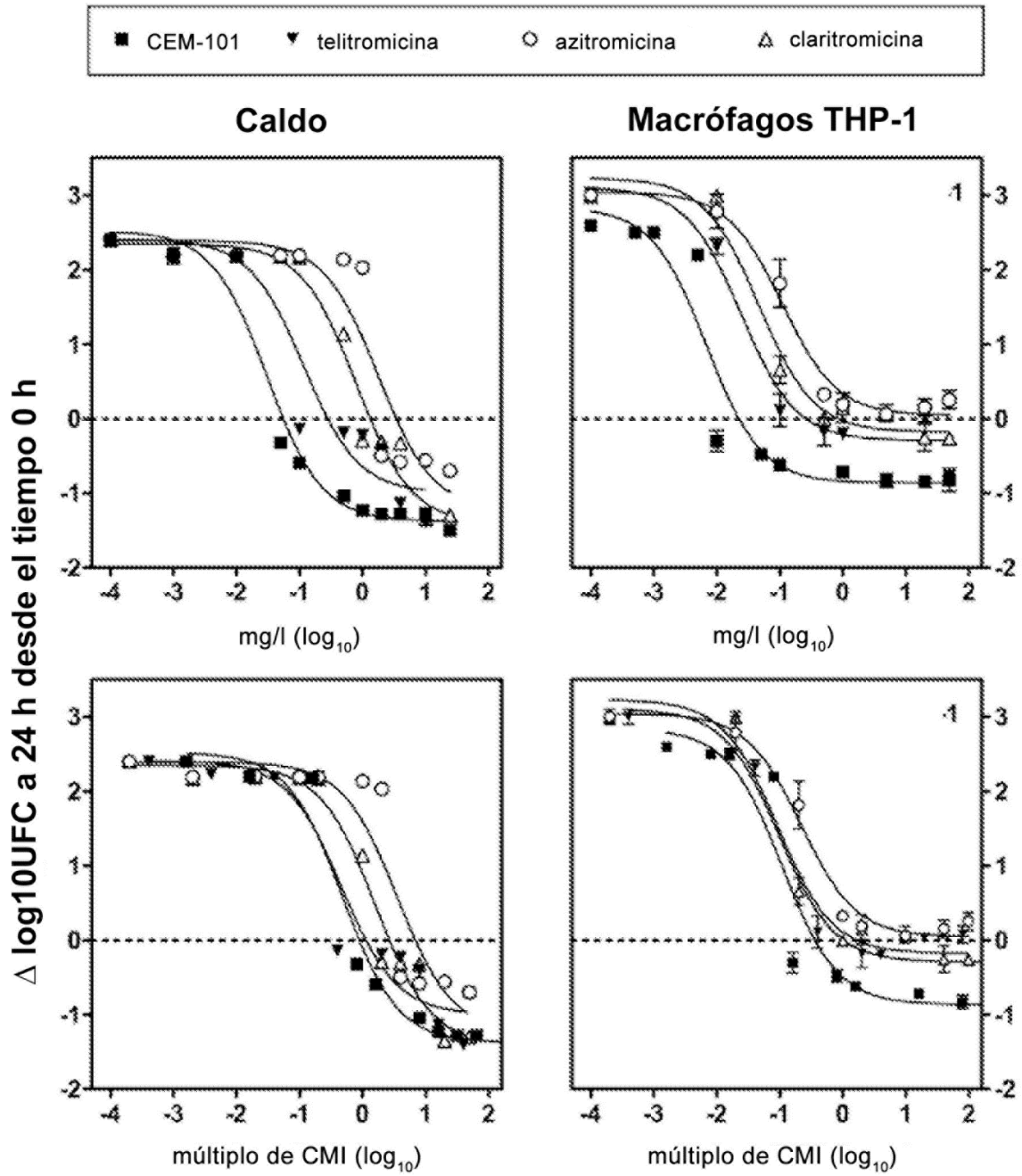


FIG. 2

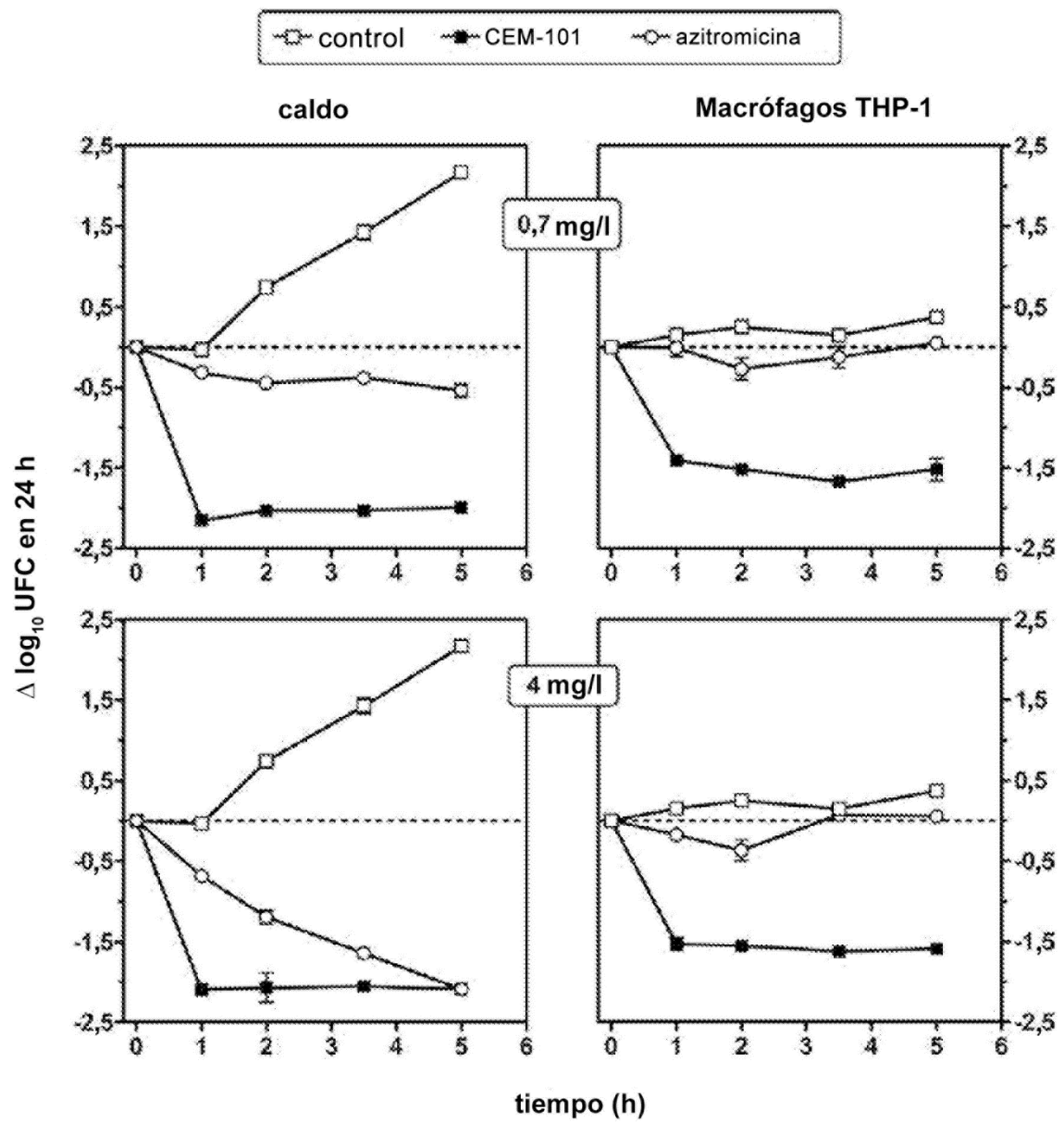


FIG. 3

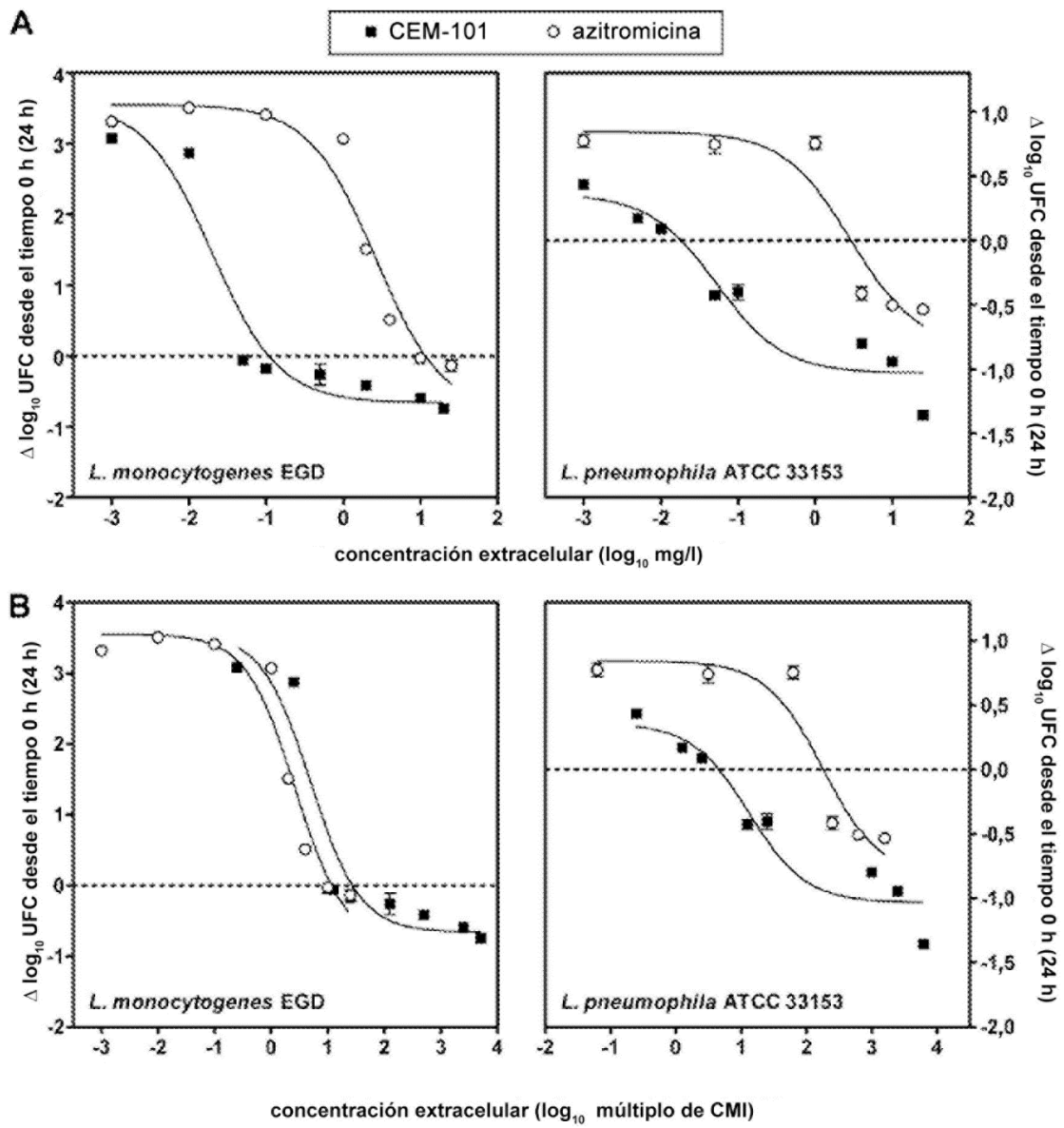
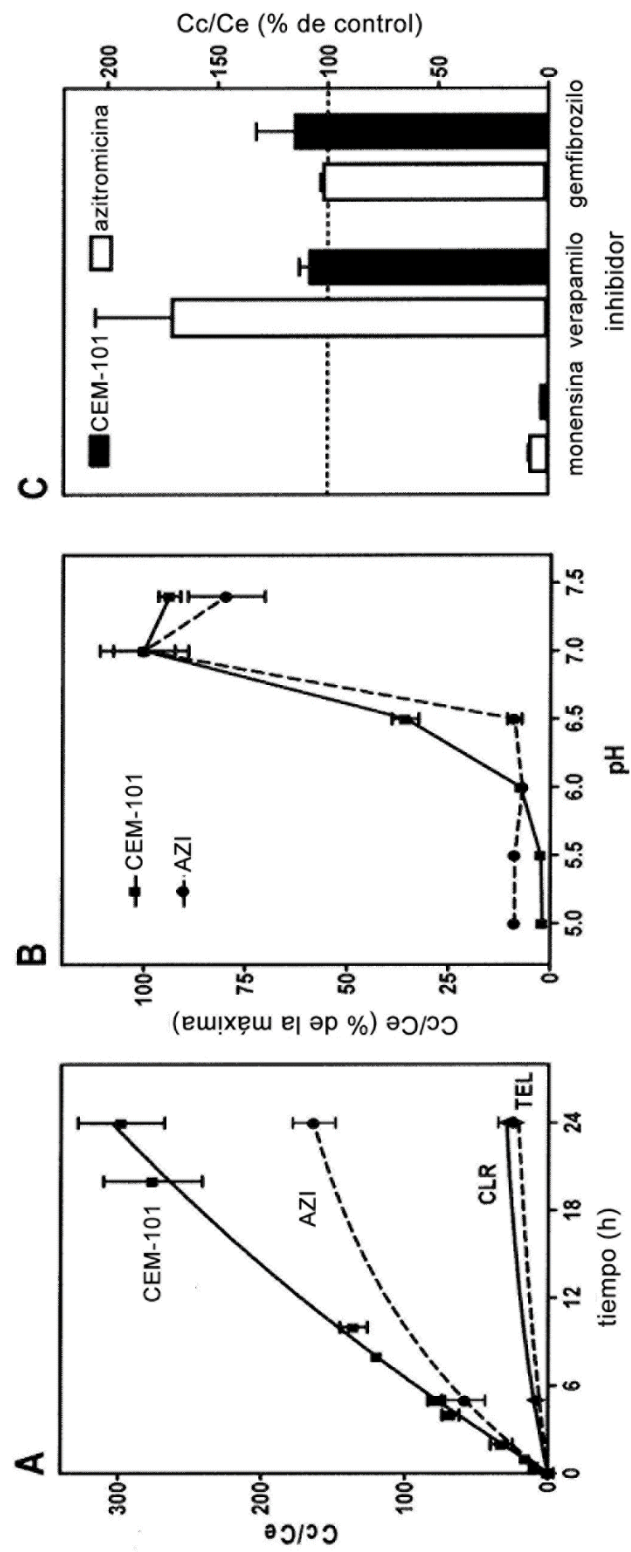


FIG. 4

FIG. 5



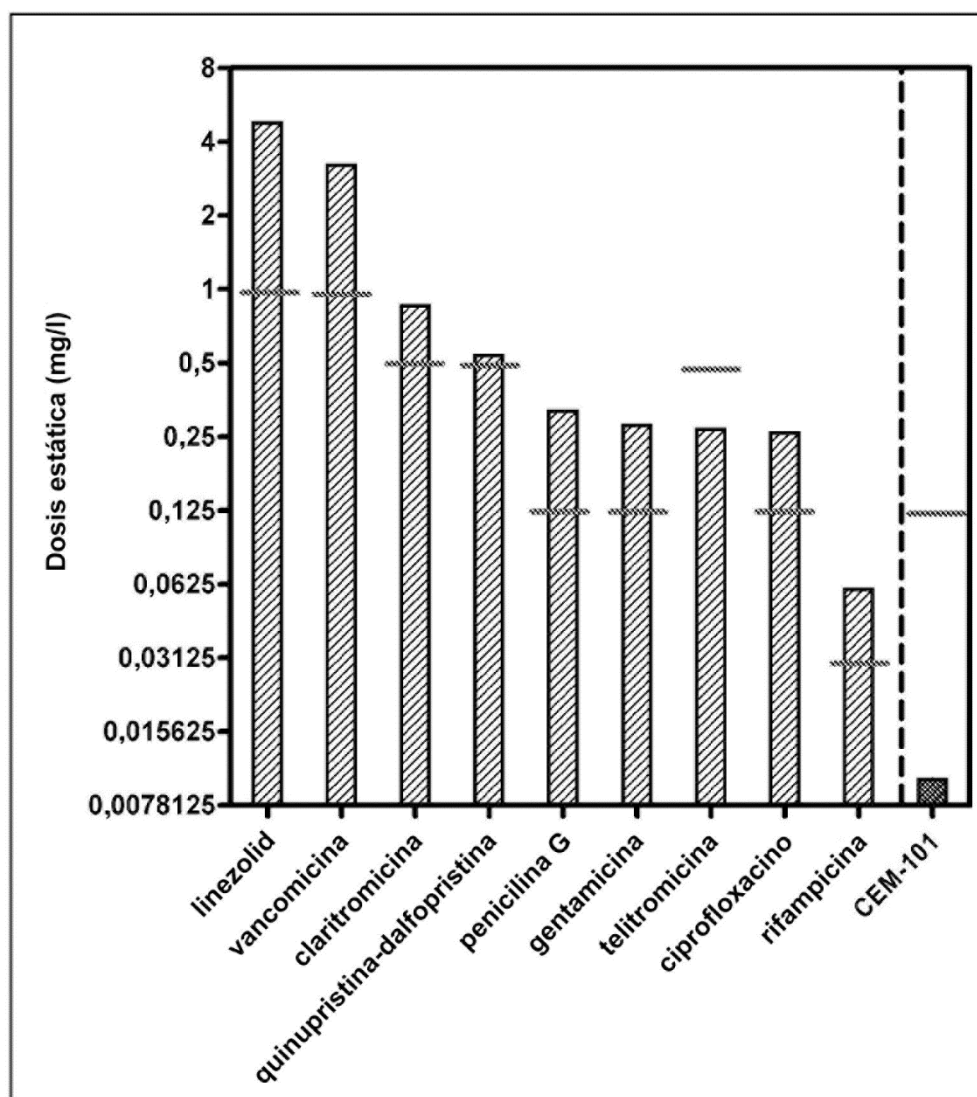


FIG. 6

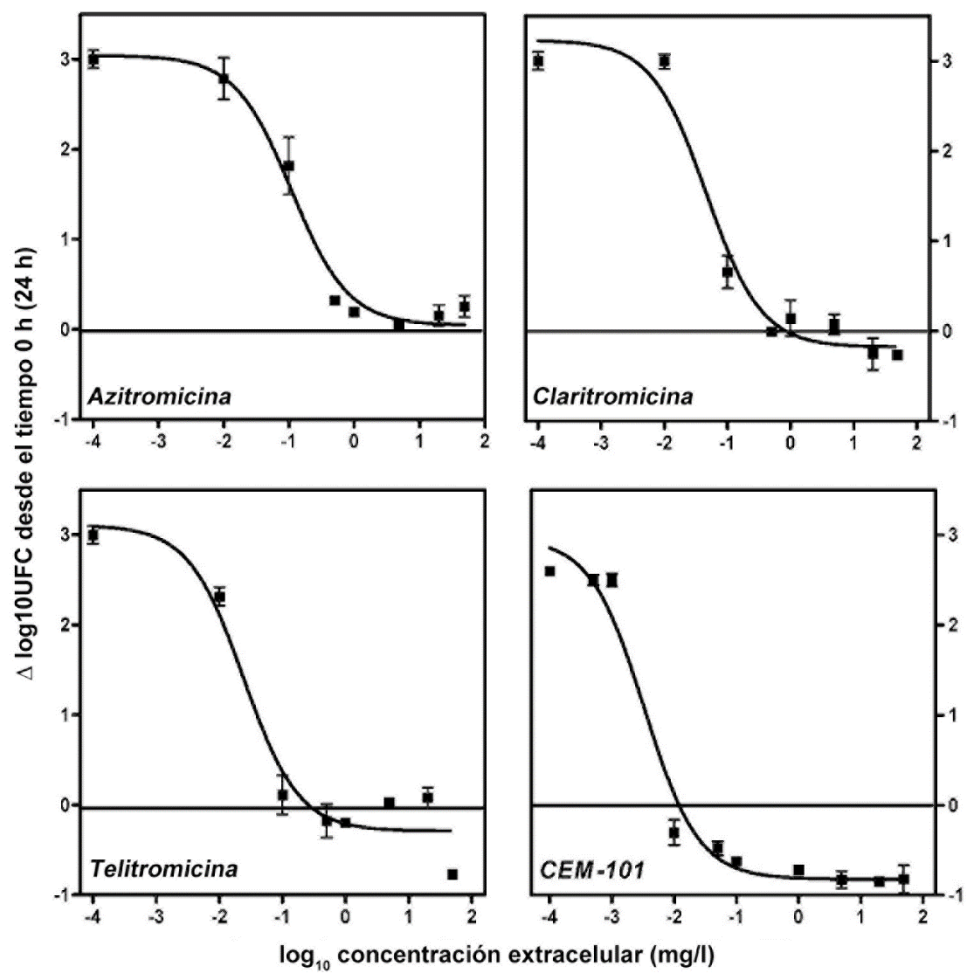


FIG. 7