

PCT



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791-00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

B.T

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION PCT

EXPEDIENTE:

11-43791

NUEVAS COMBINACIONES DE COMPUESTOS
TITULO: HETEROCÍCLICOS NITROGENADOS ANTIBACTERIANOS
CON OTROS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y SU
UTILIZACIÓN COMO MEDICAMENTOS

CLASIFICACIÓN: C07D 471/18, A61P 31/04, A61K 31/551

SOLICITANTE: NOVEXEL

DOMICILIO: ROMAINVILLE, FRANCIA.

APODERADO: MAURICIO PATIÑO BONNET

Cm
10-05-2011

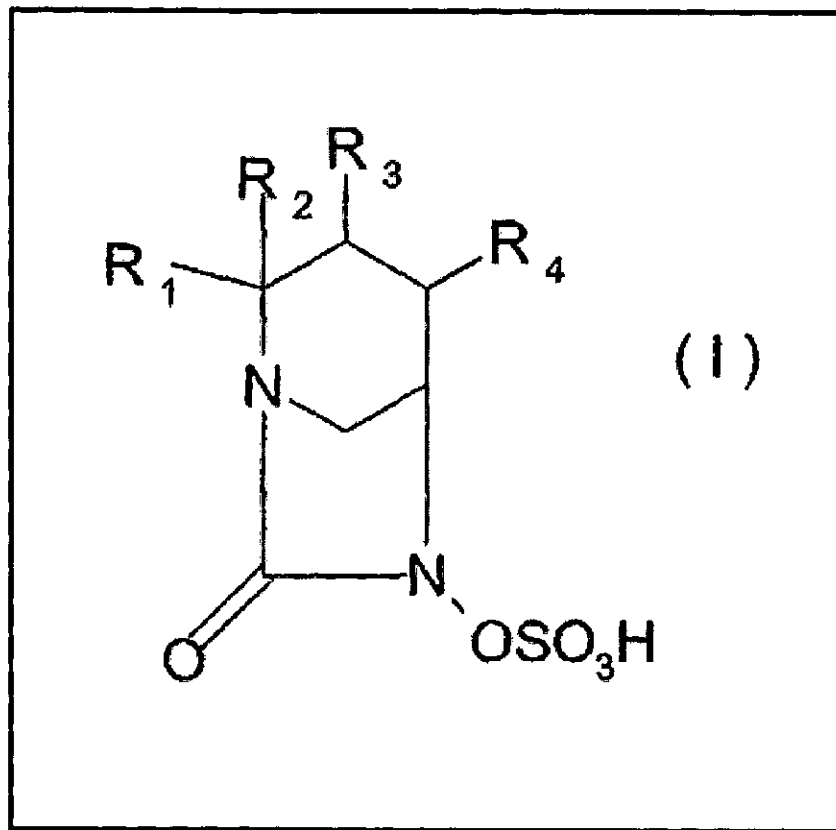
BOGOTÁ D.C., 08 de abril de 2011

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PETITORIO	
		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 11-043791- -00000-0000 Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 411 PRESENTACION Folios: 126	
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA FASE NACIONAL			
SOLICITUD DE REGISTRO DE:			
☒ Patente de Invención ☐ Patente Modelo de Utilidad			
☐ Capítulo I ☒ Capítulo II			
SOLICITANTE	Nombre: NOVEXEL Dirección: 102 Avenue Gaston Roussel Domicilio: ROMAINVILLE, FRANCIA Lugar de Constitución: FRANCIA Teléfono: Fax: E - mail:		IDENTIFICACIÓN ☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cual _____ Número: _____
REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MAURICIO PATIÑO BONNET Dirección: Carrera 9 No. 74-08, Oficina 403 Teléfono: 3268600 Fax: 3268610 E-mail: patmarks@prietocarrizosa.com.co		IDENTIFICACIÓN ☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Número: 11.342.699 TP: 73.583 En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).
INVENTORES	Nombre: Ver Hoja Anexa de Inventores. Dirección: Ver Hoja Anexa de Inventores. Nacionalidad o Domicilio: Ver Hoja Anexa de Inventores.		
PCT Solicitud Internacional No.: PCT/IB2009/006992 Fecha: 29.09.2009 Publicación Internacional No.: WO 2010/041112 Fecha: 15.04.2010			
Título: NUEVAS COMBINACIONES DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS NITROGENADOS ANTIBACTERIANOS CON OTROS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y SU UTILIZACIÓN COMO MEDICAMENTOS			
Clasificación Internacional: C07D 471/18, A61P 31/04, A61K 31/551			
Prioridad ☒ SI ☐ NO	País de Origen FR	Fecha 0805618	Número de Solicitud 10.10.2008
Comprobante de pago No: 11 – 0025307/08 Fecha: 18 de marzo de 2011 Comprobante de pago No: 11 – 0025294/95/96 Fecha: 18 de marzo de 2011			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página			

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

FIGURA CARACTERÍSTICA:



☒ Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: MAURICIO PATIÑO BONNET

FIRMA:

C.C. 11.342.699 T.P. 73.583

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025307

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A.

NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328247695	18/03/2011	48.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	289.000.00	289.000.00
				\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: CABINET HIRSCH & ASSOCIES

Solicitud de patente Ref. 71174

\$ 571.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791 - 00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 18 de 2011 - 16:48:19

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025308

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A.

NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328247695	18/03/2011	48.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	289.000.00	289.000.00
				\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: CABINET HIRSCH & ASSOCIES

Solicitud de patente Ref. 71174

\$ 571.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791 - 00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASE NACIONAL II
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 18 de 2011 - 16:48:19

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025294

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A.

NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328247695	18/03/2011	48.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: CABINET HIRSCH & ASSOCIES

reivindicacion adicional Ref. 71174

\$ 81.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791- -00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 379 EASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 18 de 2011 - 16:48:19

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025295

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A.

NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328247695	18/03/2011	48.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR UNDITARIO	VR CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
			=====	\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

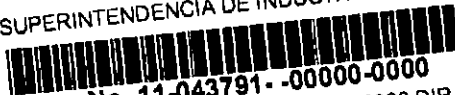
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: CABINET HIRSCH & ASSOCIES

reivindicacion adicional Ref. 71174

\$ 81.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791- -00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11
Tra. 11 PATENTE I y II
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 379 FASE NACIONAL II
Folios: 126

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025296

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2011 - 16:48:13

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A.

NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328247695	18/03/2011	48.100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: CABINET HIRSCH & ASSOCIES

reivindicacion adicional Ref. 71174

\$ 81.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043791-00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 18 de 2011 - 16:48:19

PRIETO & CARRIZOSA
INTELLECTUAL PROPERTY
POWER OF ATTORNEY

26480 CO
62396
PRIETO & CARRIZOSA
PROPIEDAD INTELECTUAL
PODER

The undersigned IAIN BUCHANAN acting on behalf of and representing NOVEXEL domiciled in ROMAINVILLE, FRANCE, appoint(s) MAURICIO PATIÑO, JORGE DI TERLIZZI and MARTÍN CARRIZOSA domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia, as our true and legal attorneys with the necessary powers:

1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs and models, commercial enshins and names, trademarks, slogans, health licenses, copyrights and domain names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: action dealing with commercial enshins and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to intellectual property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize them to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, recordals, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in ROMAINVILLE on this 14 day of SEPTEMBER of 2009.

IAIN BUCHANAN
P.E.O.

NOVEXEL, con domicilio en ROMAINVILLE FRANCIA, nombro(amos) a MAURICIO PATIÑO, JORGE DI TERLIZZI y MARTÍN CARRIZOSA con domicilio Bogotá D.C., República de Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósitos de nombres y enseñas comerciales, registros sanitarios, derechos de autor y nombres de dominio así como: trasposos, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar, registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público, autoridad en acciones judiciales, administrativas y policia, tales como acciones derivadas de nombre o enseñas comerciales; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad intelectual; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones o recursos similares relacionados con propiedad intelectual.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitud formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones, inscripción de afectaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar desistir a derechos concedidos o en curso de concesión recibir toda clase de documentos y valores dando descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado, tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en _____ el _____ de _____ de 2009.

NOVEXEL SA
102, Avenue Gaston Roussel
93230 ROMAINVILLE
477 783 989 RCS BOBIGNY

BAILLY POMME
NOTAIRES
D'UNE
* 30, rue La Bot



CERTIFICATION

COMPANIES

The undersigned Antoine BAILLY certifies: that the preceding signature(s) reading John BUCHANAN is (are) authentic; that the signer(s) at present fill(s) the position of CEO of NOVEXEL that he (they) is (are) empowered to grant this power; and that said company exists, accomplishes its social object and is organized in ROMAINVILLE in accordance with the Laws of FRANCE. All the foregoing facts are known to me, due to my having examined the respective documents to which I attest.

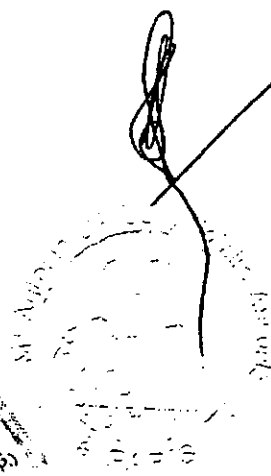
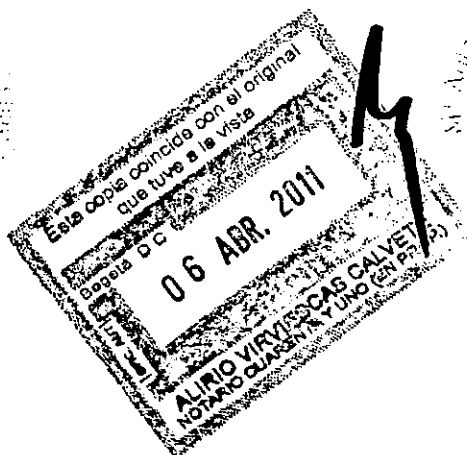
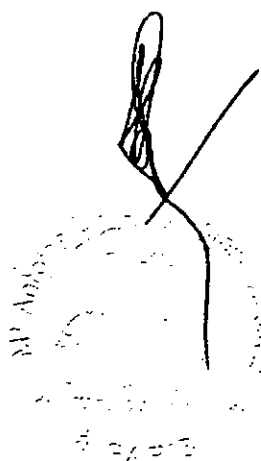
Signed in PARIS on this 12th day of JANUARY of 2010.

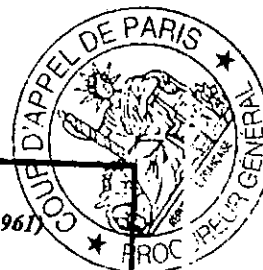
CERTIFICACIÓN

SOCIEDADES

El(la) infrascrito(a) Antoine BAILLY certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice John BUCHANAN es (son) auténtica(s); que (los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el cargo(s) CEO de NOVEXEL que tiene(n) facultad p: otorgar este poder; y que dicha compañía existe, cumple objeto social y está organizada en ROMAINVILLE conforme a las Leyes de FRANCIA. Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello fe.

Firmado en PARIS el 12 de ENERO de 2010





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par Y. BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris 14 JAN. 2010

6. le

par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

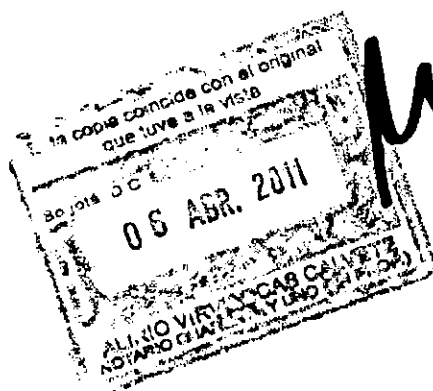
2165

Jean MARTIN

Avocat général



L'apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou du timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu



7

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1 REPUBLICA FRANCESA

EL PRESENTE ACTO PÚBLICO

2 HA SIDO FIRMADA POR YE BAILLY

3 ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO

4 LLEVA EL SELLO DE LA NOTARIA

CERTIFICADO

5 EN PARIS

6 EL 14 DE ENERO DE 2010

7 POR EL PROCURADOR GENERAL ANTE LA CORTE DE APELACIONES

8 BAJO EL NÚMERO 2165

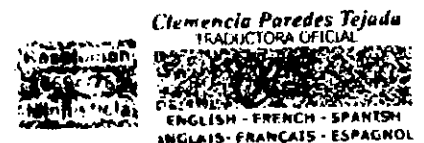
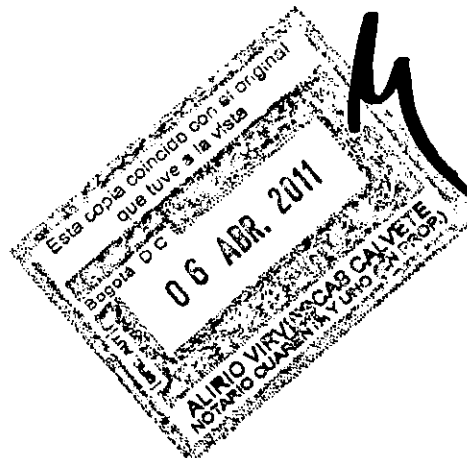
9 SELLO DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS

10. FIRMA:

JEAN MARTIN

La apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma y el sello del documento.

No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Republica francesa apruebe su contenido.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/041112 A1

(43) Date de la publication internationale
15 avril 2010 (15.04.2010)

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 471/18 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2009/006992

(22) Date de dépôt international :
29 septembre 2009 (29.09.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08 05 618 10 octobre 2008 (10.10.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
NOVEXEL [FR/FR]; 102 avenue Gaston Roussel,
F-93230 Romainville (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
LEVASSEUR, Premavathy [FR/FR]; c/o Novexel, 102

avenue Gaston Roussel, F-93230 Romainville (FR).
PACE, John, Lee [US/FR]; c/o Novexel, 102 avenue
Gaston Roussel, F-93230 Romainville (FR).
COLEMAN, Kenneth [GB/FR]; c/o Novexel, 102
avenue Gaston Roussel, F-93230 Romainville (FR).
LOWTHER, John [GB/FR]; 94 rue Albert, F-94500
Champigny-sur-Marne (FR).

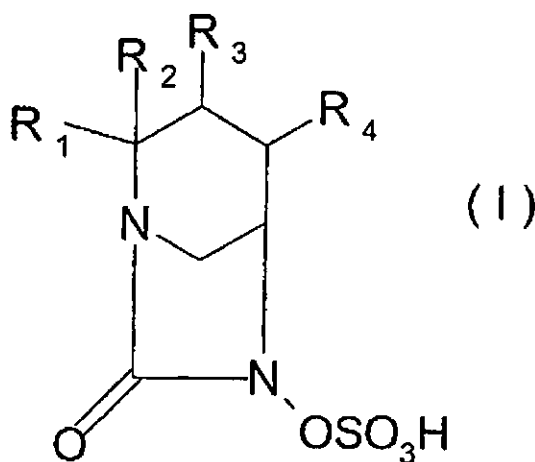
(74) Mandataires : POCHART, François et al.; Cabinet
Hirsch-Pochart & Associés, 58, Avenue Marecau,
F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,

[Suite sur la page suivante]

(54) Titre : NOVEL COMBINATIONS OF ANTIBACTERIAL NITROGENOUS HETEROCYCLIC COMPOUNDS WITH OTHER ANTIBACTERIAL COMPOUNDS, AND USE THEREOF AS DRUGS

(54) Titre : NOUVELLES COMBINAISONS DE COMPOSÉS HÉTÉROCYCLIQUES AZOTES ANTIBACTÉRIENS AVEC D'AUTRES COMPOSÉS ANTIBACTÉRIENS ET LEUR UTILISATION COMME MÉDICAMENTS



(57) Abstract : The invention relates to the combination of antibacterial nitrogenous heterocyclic compounds of the formula (I) with other antibacterial compounds, and to the use thereof as drugs. The nitrogenous heterocyclic compounds have the general formula (I) where R₁ is a {CH₂}_n-NH₂ or {CH₂}_n-NHR radical, R being a (C₁-C₆) alkyl and n being equal to 1 or 2, R₂ is a hydrogen atom, R₃ and R₄ form together a nitrogenous heterocycle of the aromatic type with 5 vertexes including 1, 2 or 3 nitrogen atoms and optionally substituted by one or more R' groups, R' being selected from the group comprising a hydrogen atom and alkyl radicals containing 1 to 6 carbon atoms, in the free form thereof, in zwitterion form, or in the form of salts with pharmaceutically acceptable mineral or organic bases and acids. The other antibacterial agents are selected from the group comprising beta-lactams, monobactams, penicillins, optionally combined with a beta-lactamase inhibitor, aminoglycosides, glycolcyclines, tetracyclines, quinolones, glycopeptides, lipopeptides, macrolides, ketolides, lincosamides, streptogramins, oxazolidinones, polymyxins, and other known compounds having a therapeutic activity on Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2010/041112 A1

WO 2010/041112 A1

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

L'invention concerne la combinaison de composés hétérocycliques azotés antibactériens de formule (I) avec d'autres composés antibactériens et leur utilisation comme médicaments. Les composés hétérocycliques azotés répondent à la formule générale (I) dans laquelle R_1 représente un radical $\{CH_2\}_n-NH_2$ ou $\{CH_2\}_n-NHR$, R étant un alkyle (C_1-C_6) et n étant égal à 1 ou 2; R_2 représente un atome d'hydrogène; R_3 et R_4 forment ensemble un hétérocycle azoté à caractère aromatique à 5 sommets renfermant 1, 2 ou 3 atomes d'azote éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements R' , R' étant choisi dans le groupe constitué par un atome d'hydrogène et les radicaux alkyle renfermant de 1 à 6 atomes de carbone, sous forme libre, de zwitterions, et sous forme de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables. Les autres agents antibactériens sont choisis dans le groupe constitué par les beta-lactames, les monobactames, les pénicillines, le cas échéant combinés à un inhibiteur de beta lactamases, les aminoglycosides, les glycyclines, les tétracyclines, les quinolones, les glycopeptides, les lipopeptides, les macrolides, les kétolides, les lincosamides, les streptogramines, les oxazolidinones, les polymyxines et les autres composés connus doués d'une activité thérapeutique sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacteriaceae*.

NOUVELLES COMBINAISONS DE COMPOSES HETEROCYCLIQUES AZOTES
ANTIBACTERIENS AVEC D'AUTRES COMPOSES ANTIBACTERIENS ET LEUR
UTILISATION COMME MEDICAMENTS

5

L'invention concerne la combinaison de composés hétérocycliques azotés antibactériens avec d'autres composés antibactériens et leur utilisation comme médicaments.

10 La demanderesse a découvert que de nouvelles combinaisons des composés de formule (I) décrits et revendiqués dans la demande française 07 02663, avec d'autres composés antibactériens, possèdent des propriétés antibactériennes d'un niveau tout à fait intéressant, manifestent par là un effet de synergie aussi remarquable qu'inattendu.

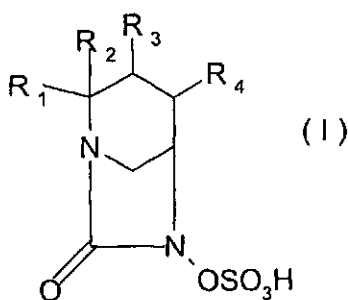
15 Le caractère unique des combinaisons synergiques de l'invention réside en particulier dans le fait qu'elles présentent une excellente activité sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacteriaceae*, qui sont des souches bactériennes fréquemment rencontrées dans les infections nosocomiales ainsi
20 que chez les patients souffrant de mucoviscidose.

Cette activité particulièrement intéressante et inattendue n'est pas présente dans les composés de l'art antérieur et notamment ceux de la demande WO 02/100860 qui décrit des composés comportant d'autres groupes R₁ que ceux des composés
25 hétérocycliques azotés répondant à la formule (I) définie ci-après.

Ces composés de formule (I) se sont montrés actifs sur des modèles d'infection animale, y compris sur des souches habituellement résistantes aux antibiotiques communément
30 utilisés. Ils sont capables de contrecarrer les principaux mécanismes de résistance des bactéries que sont les β -lactamases, les pompes à efflux et les mutations des porines.

Ces composés répondent à la formule suivante :

2



dans laquelle R₁ représente un radical (CH₂)_n-NH₂ ou (CH₂)_n-NHR, R étant un alkyle (C₁-C₆) et n étant égal à 1 ou 2;

R₂ représente un atome d'hydrogène ;

R₃ et R₄ forment ensemble un hétérocycle azoté à caractère
 5 aromatique à 5 sommets renfermant 1, 2 ou 3 atomes d'azote
 éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements R',
 R' étant choisi dans le groupe constitué par un atome
 d'hydrogène et les radicaux alkyle renfermant de 1 à 6 atomes
 de carbone,

10 sous forme libre, de zwitterions, et sous forme de sels avec
 les bases et les acides minéraux ou organiques
 pharmaceutiquement acceptables.

La demanderesse a découvert que les composés de formule
 générale (I) potentialisent l'activité de composés
 15 antibactériens existants, en particulier sur *Pseudomonas*
aeruginosa et *Enterobacteriaceae*.

L'invention a ainsi pour objet la combinaison d'un composé
 de formule générale (I) telle que définie ci-dessus, sous
 forme libre, de zwitterions, ou sous forme de sels avec les
 20 bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement
 acceptables, avec un autre composé antibactérien.

Par autre composé antibactérien, on entend notamment un
 beta lactame, un monobactame ou une pénicilline, le cas
 échéant combiné à un inhibiteur de beta lactamases, un
 25 aminoglycoside, une glycylicycline, une tétracycline, une
 quinolone, un glycopeptide, un lipopeptide, un macrolide, un
 ketolide, un lincosamide, une streptogramine, une
 oxazolidinone, une polymyxine et d'autres composés connus
 doués d'une activité thérapeutique sur *Pseudomonas aeruginosa*
 30 et *Enterobacteriaceae*.

19
A titre d'exemples d'aminoglycosides qui peuvent être mentionnés on peut citer amikacine, gentamycine et tobramycine.

A titre d'exemples de beta lactames on peut citer les
5 Carbapénèmes tels que : Imipénème, Méropénème, Ertapénème et le composé connu sous l'appellation PZ-601, les Céphalosporines telles que Céfazoline, Céfépime, Céfotaxime, Céfoxitine, Ceftaroline, Ceftazidime, Ceftibiprole, Ceftriaxone, Céfuroxime et Céphalexine, les Monobactames tels
10 que l'Aztréoname, les Pénicillines et les combinaisons avec des inhibiteurs de beta-lactamases telles que Amoxicilline, Amoxicilline/Clavulanate, Ampicilline, Ampicilline/Sulbactame, Oxacilline, Pipéracilline, Pipéracilline/Tazobactame, Ticarcilline, Ticarcillin/Clavulanate et Pénicilline.

15 A titre d'exemples de glycylicycline et tétracycline on peut citer Doxycycline, Minocycline, Tétracycline et Tigécycline.

A titre d'exemples de Quinolones on peut citer Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Grépafoxacin, Lévofoxacin, Moxifloxacin et Ofloxacin.

20 A titre d'exemples de Macrolide et Kétolide on peut citer Azithromycine, Clarithromycine, Roxythromycine et Télithromycine.

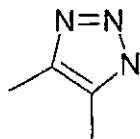
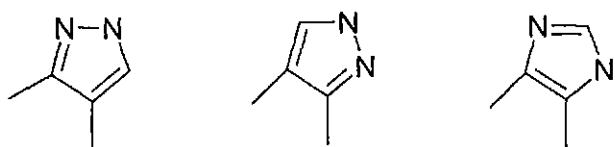
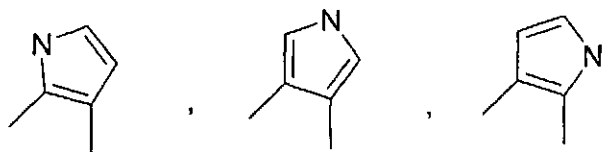
A titre d'exemples de Polymyxine on peut citer Colistine et Polymyxine B.

25 On peut encore citer d'autres composés antibactériens tels que Fosfomycine et l'association Triméthoprim/Sulfaméthoxazole.

Dans les composés de formule générale (I), par radical alkyle renfermant de 1 à 6 atomes de carbone, on entend notamment le
30 radical méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, ainsi que butyle, pentyle ou hexyle linéaire ou ramifié.

Par radical alkényle renfermant de 2 à 6 atomes de carbone, on entend notamment le radical allyle et les radicaux butényle, pentényle et hexényle linéaires ou ramifiés.

Par hétérocycle à caractère aromatique, on entend notamment ceux choisis dans la liste qui suit, les deux liaisons symbolisant la jonction avec le cycle azoté (R_3R_4) :



Parmi les sels d'acides des produits de formule (I), on peut citer entre autres, ceux formés avec les acides minéraux, tels que les acides chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique, sulfurique ou phosphorique ou avec les acides organiques comme l'acide formique, acétique, trifluoroacétique, propionique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, tartrique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcanésulfoniques, tels que les acides méthane et éthane sulfoniques, arylsulfoniques tels que les acides benzène et paratoluènesulfoniques.

Parmi les sels de bases des produits de formule (I), on peut citer, entre autres, ceux formés avec les bases minérales telles que, par exemple, l'hydroxyde de sodium, de potassium, de lithium, de calcium, de magnésium ou d'ammonium ou avec les bases organiques telles que, par exemple, la méthylamine, la propylamine, la triméthylamine, la diéthylamine, la triéthylamine, la N,N-diméthyléthanolamine, le tris (hydroxyméthyl) amino méthane, l'éthanolamine, la pyridine, la picoline, la dicyclohexylamine, la morpholine, la benzylamine, la

procaïne, la lysine, l'arginine, l'histidine, la N-méthylglucamine, ou encore les sels de phosphonium, tels que les alkyl-phosphonium, les aryl-phosphoniums, les alkyl-aryl-phosphonium, les alkényl-aryl-phosphonium ou les sels d'ammoniums quaternaires tels que le sel de tétra-n-butyl-ammonium.

Parmi les combinaisons synergiques telles que définies plus haut, l'invention a notamment pour objet celles renfermant des composés de formule (I) dans lesquels R_3 et R_4 forment ensemble un hétérocycle pyrazolyle ou triazolyle, éventuellement substitué.

Parmi ces combinaisons, l'invention a notamment pour objet celles renfermant des composés dans lesquels R_1 est choisi dans le groupe constitué par les groupements $(CH_2)_n-NH_2$ et $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini précédemment, l'hétérocycle formé par R_3 et R_4 est substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

Parmi ces combinaisons, l'invention a plus particulièrement pour objet celles renfermant des composés dans lesquels R_1 représente un radical $(CH_2)_n-NH_2$ ou $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini précédemment et R_3 et R_4 forment ensemble un cycle pyrazolyle substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

Parmi ces combinaisons, l'invention a tout particulièrement pour objet celles renfermant un composé de formule (I) choisi parmi:

- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one,
 - la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one,
 - la trans 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one,
- sous forme libre, de zwitterion et de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

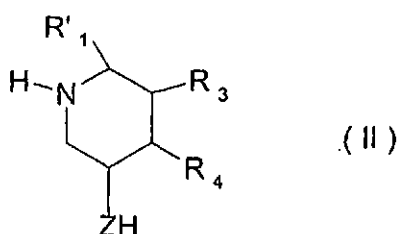
Parmi les combinaisons telles que définies plus haut, l'invention a notamment pour objet celles renfermant des composés antibactériens choisis parmi les beta-lactames ou les

pénicillines le cas échéant combinés à des inhibiteurs de beta lactamases, et les polymyxines.

Parmi ces combinaisons, l'invention a notamment pour objet celles renfermant des composés antibactériens choisis parmi la
 5 Tobramycine, le Méropénème, l'Aztréoname, le Céfépime, le Ceftazidime, la Pipéracilline le cas échéant combinée au Tazobactame, la Colistine et la Polymyxine B.

Les composés de formule (I) peuvent être préparés par un
 10 procédé comportant :

- a) une étape au cours de laquelle on fait réagir, avec un agent de carbonylation, le cas échéant en présence d'une base, un composé de formule (II) :



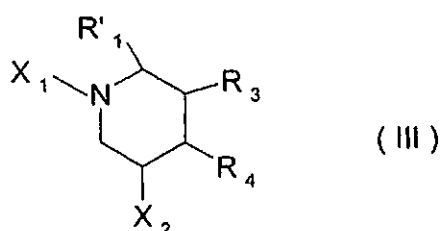
dans laquelle :

15 R'1 représente un radical CN, COOH protégé, COOR ou (CH2)_nR'5,

R'5 est un radical OH protégé, CN NH2 ou NHR protégé, CO2H protégé, CO2R

20 n, R, R3 et R4 sont tels que définis ci-dessus, le substituant aminoalkyle éventuellement présent sur l'hétérocycle formé par R3 et R4 étant alors le cas échéant protégé,

ZH représente un groupement -NHOH protégé, en vue d'obtenir un composé intermédiaire de formule (III) :



25 dans laquelle :

R'₁, R₃ et R₄ ont les mêmes significations que ci-dessus et soit X₁ est un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur et X₂ représente un groupement -Z-CO-X₃, X₃ représentant le reste de l'agent de carbonylation, soit X₂ est un groupement -ZH et X₁ représente un groupement CO-X₃, X₃ étant défini comme ci-dessus ;

- 5 b) une étape au cours de laquelle on cyclise l'intermédiaire obtenu précédemment, en présence d'une base ;
- c) le cas échéant, l'étape a) est précédée et/ou l'étape b) est suivie de l'une ou de plusieurs des réactions
- 10 suivantes, dans un ordre approprié :
- protection des fonctions réactives,
 - déprotection des fonctions réactives,
 - estérification
 - saponification,

15 - sulfatation,

 - réduction d'esters,
 - alkylation,
 - carbamoylation,
 - formation d'un groupe azido,

20 - réduction d'un azido en amine,

 - salification,
 - échange d'ions,
 - dédoublement ou séparation de diastéréoisomères.

Comme agent de carbonylation, on peut mettre en œuvre un

25 réactif tel que le phosgène, le diphosgène, le triphosgène, un chloroformiate d'aryle tel que le chloroformiate de phényle ou de p-nitrophényle, un chloroformiate d'aralkyle tel que chloroformiate de benzyle, un chloroformiate d'alkyle ou d'alkényle tel que le chloroformiate de méthyle ou d'allyle,

30 un dicarbonate d'alkyle tel que le dicarbonate de tert-butyle, le carbonyl-diimidazole et leurs mélanges, le disphosgène étant préféré.

La réaction a lieu de préférence en présence d'une base ou d'un mélange de bases qui neutralise l'acide formé. Elle peut

35 notamment être une amine telle que la triéthylamine, la diisopropyléthylamine, la pyridine, la diméthylaminopyridine.

27

Toutefois, on peut également opérer en utilisant le produit de départ de formule II comme base. On en utilise alors un excès.

Le cas échéant, le produit de formule II est mis en œuvre sous la forme d'un sel d'acide, par exemple un chlorhydrate ou un trifluoroacétate.

Comme base dans l'étape b), on peut également utiliser les amines, ou encore les hydrures, les alcoolates, les amidures ou carbonates de métaux alcalins ou alcalino-terreux.

Les amines peuvent être choisies par exemple dans la liste ci-dessus.

Comme hydrure on peut notamment utiliser l'hydrure de sodium ou de potassium.

Comme alcoolate de métal alcalin, on utilise de préférence le t-butylate de potassium.

Comme amidure de métal alcalin on peut notamment utiliser le bis(triméthylsilyl) amidure de lithium.

Comme carbonate, on peut notamment utiliser le carbonate ou bicarbonate de sodium ou de potassium.

Le cas échéant, l'intermédiaire de formule III peut être obtenu sous forme d'un sel d'acide généré lors de la réaction de carbonylation et notamment un chlorhydrate. Il est ensuite mis en œuvre dans la réaction de cyclisation sous cette forme.

De préférence, la cyclisation est effectuée sans isolement de l'intermédiaire de formule III.

Les réactions mentionnées à l'étape c) sont d'une manière générale des réactions classiques, bien connues de l'homme du métier. Des exemples de conditions utilisées sont décrits dans la demande WO 02/100860 ou encore dans la demande 04/052891.

Les fonctions réactives qu'il convient, le cas échéant, de protéger sont les fonctions acides carboxyliques, amines, amides, hydroxy et hydroxylamines.

La protection de la fonction acide est notamment effectuée sous forme d'esters d'alkyle, d'esters allyliques, de benzyle, benzhydryle ou p-nitrobenzyle.

La déprotection est effectuée par saponification, hydrolyse acide, hydrogénolyse, ou encore clivage à l'aide de complexes solubles du Palladium O.

Des exemples de ces protections et déprotections sont fournis dans la demande WO 02/100860.

La protection des amines, des azotes hétérocycliques et des amides est notamment effectuée, selon les cas, sous forme de dérivés benzylés ou tritylés, sous forme de carbamates, 5 notamment d'allyle, benzyle, phényle ou tertbutyle, ou encore sous forme de dérivés silylés tels que les dérivés tertbutyle diméthyl, triméthyl, triphényl ou encore diphényl tertbutyl-silyle, ou de dérivés phénylsulfonylalkyle ou cyanoalkyle.

10 La déprotection est effectuée, selon la nature du groupement protecteur, par le sodium ou le lithium dans l'ammoniac liquide, par hydrogénolyse ou à l'aide de complexes solubles du Palladium O, par action d'un acide, ou par action du fluorure de tétrabutylammonium ou de bases fortes telles 15 que l'hydruure de sodium ou le t.butylate de potassium.

La protection des hydroxylamines est effectuée notamment sous forme d'éthers de benzyle ou d'allyle.

Le clivage des éthers est effectué par hydrogénolyse ou à l'aide de complexes solubles du Palladium O.

20 La protection des alcools et des phénols est effectuée de manière classique, sous forme d'éthers, d'esters ou de carbonates. Les éthers peuvent être des éthers d'alkyle ou d'alkoxyalkyle, de préférence des éthers de méthyle ou de méthoxyéthoxyméthyle, des éthers d'aryle ou de préférence 25 d'aralkyle, par exemple de benzyle, ou des éthers silylés, par exemple les dérivés silylés cités plus haut. Les esters peuvent être n'importe quel ester clivable connu de l'homme du métier et de préférence l'acétate, le propionate ou le benzoate ou p-nitrobenzoate. Les carbonates peuvent être par 30 exemple des carbonates de méthyle, tertbutyle, allyle, benzyle ou p-nitrobenzyle.

La déprotection est effectuée par les moyens connus de l'homme du métier, notamment la saponification, l'hydrogénolyse, le clivage par des complexes solubles du Palladium O, 35 l'hydrolyse en milieu acide ou encore, pour les dérivés silylés, le traitement par le fluorure de tétrabutylammonium.

Des exemples sont fournis dans la partie expérimentale.

La réaction de sulfatation est effectuée par action des complexes SO_3 -amines tels que SO_3 -pyridine ou SO_3 -diméthylformamide, en opérant dans la pyridine, le sel formé, par exemple le sel de pyridine, pouvant ensuite être échangé
5 par exemple par un sel d'une autre amine, d'un ammonium quaternaire ou d'un métal alcalin. Un exemple est fourni dans la partie expérimentale.

La réaction d'alkylation est effectuée par action sur les dérivés hydroxylés, les énolates d'esters ou de cétones, les
10 amines ou les azotes hétérocycliques, selon les cas, d'un sulfate d'alkyle ou d'un halogénure d'alkyle ou d'alkyle substitué, notamment par un radical carboxy libre ou estérifié. Des réactions d'alkylation peuvent également être réalisées par amination réductrice.

La salification par les acides est le cas échéant réalisée par addition d'un acide en phase soluble au composé. La salification par les bases de la fonction sulfooxy peut être réalisée à partir du sel de pyridinium obtenu lors de l'action du complexe SO_3 -pyridine et on obtient les autres sels à partir
20 de ce sel de pyridinium. On peut encore opérer par échange d'ions sur résine.

La réaction de carbamoylation peut être réalisée par la mis en œuvre d'un chloroformiate ou d'un réactif type Boc-ON puis d'une amine ou, le cas échéant, d'ammoniac.

25 L'introduction d'un groupe azido peut être effectuée par exemple par action d'azoture de sodium sur un intermédiaire de type mésylate ou par des réactions de type Mitsunobu.

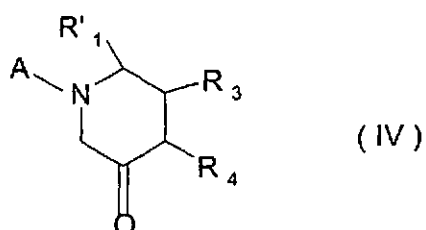
La réduction d'un groupe azide peut être effectuée par action de trialkyl ou triarylphosphine.

30 La séparation des énantiomères et diastéréoisomères peut être réalisée selon les techniques connues de l'homme du métier, notamment la chromatographie.

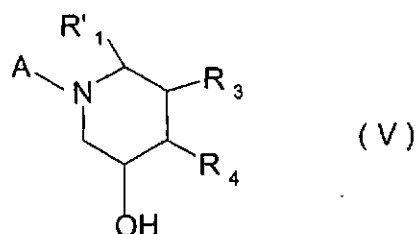
Outre via les procédés décrits précédemment, des composés de formule (I) peuvent être obtenus par des méthodes qui
35 utilisent au départ un composé de formule (II) dans laquelle R'_1 , R_3 , R_4 et HZ ont les valeurs qui conduisent directement (sans transformation) à celles des composés que l'on souhaite

préparer. Le cas échéant, celles de ces valeurs qui renfermeraient des fonctions réactives telles que mentionnées plus haut sont alors protégées, la déprotection intervenant à l'issue de l'étape de cyclisation b ou à tout autre moment
5 opportun dans la synthèse. Les protections et déprotections sont alors réalisées comme décrit ci-dessus.

Le composé de formule (II) peut être obtenu par un procédé selon lequel on traite un composé de formule (IV):



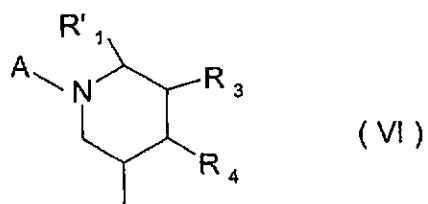
10 dans laquelle R'_1 , R_3 et R_4 sont définis comme précédemment, et A représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur de l'azote, par un agent de réduction, pour obtenir un composé de formule (V) :



15

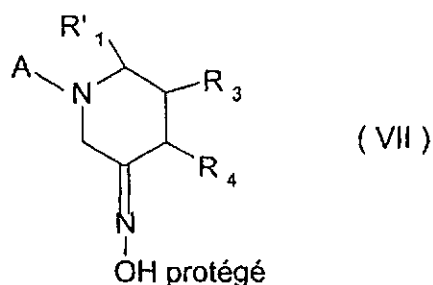
dans laquelle A, R'_1 , R_3 et R_4 conservent leur signification précitée, dans lequel, le cas échéant, l'on remplace le groupement OH par un groupe partant, pour obtenir un composé de formule (VI) :

20

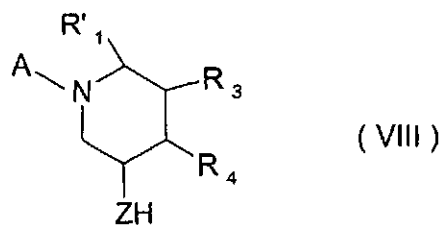


dans laquelle A, R'₁, R₃ et R₄ conservent leur signification précitée et R₉ représente un groupe partant, que l'on traite
 5 par un composé de formule Z₁H₂ dans laquelle Z₁ représente un groupement -HN-OH protégé puis, le cas échéant, par un agent de déprotection de l'atome d'azote approprié.

Le composé de formule (II) peut encore être obtenu par un
 10 procédé selon lequel on traite un composé de formule (IV) telle que définie précédemment, par l'hydroxylamine protégée au niveau de l'hydroxy, pour obtenir un composé de formule (VII) :



dans laquelle A, R'₁, R'₂, R₃, R'₄, n et R'₈ sont définis comme
 15 précédemment, que l'on fait réagir avec un agent de réduction pour obtenir un composé de formule (VIII) :



dans laquelle A, R'₁, R₃, R₄, n'' et ZH sont définis comme précédemment, que l'on traite, le cas échéant, par un agent de déprotection de l'atome d'azote approprié.

20 Le groupement protecteur de l'azote est notamment l'un de ceux qui sont cités plus haut.

L'agent de réduction est notamment un borohydrure alcalin.

Le groupe partant est notamment un sulfonate, par exemple un mésylate ou un tosylate, obtenu par action de chlorure de
 25 sulfonyle correspondant en présence d'une base, ou un

halogène, plus particulièrement un chlore, un brome ou un iode, obtenu par exemple par action du chlorure de thionyle ou de $P(C_6H_5)_3CBr_4$ ou PBr_3 ou, dans le cas d'un atome d'iode, par action d'un iodure alcalin sur un sulfonate.

5 L'agent de déprotection est notamment l'un de ceux mentionnés plus haut.

L'agent de réduction que l'on fait agir sur le composé de formule (VII) est notamment un cyano ou un acétoxyborohydrure de sodium.

10 Comme indiqué plus haut, les composés de formule générale (I) potentialisent l'activité de composés antibactériens existants, en particulier sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacteriaceae* ainsi que sur des modèles d'infection animale par des souches résistantes aux agents antibactériens
15 communément utilisés. Une telle activité antibiotique remarquable et inattendue n'avait pas été observée pour les composés de l'art antérieur.

Ces propriétés rendent aptes les combinaisons synergiques selon l'invention à être utilisées comme médicaments, en
20 particulier dans le traitement des infections sévères à *Pseudomonas* et *Enterobacteriaceae*, notamment des infections nosocomiales et, d'une manière générale, des infections majeures chez les sujets à risques. Il peut en particulier s'agir d'infections des voies respiratoires, par exemple la
25 pneumonie aiguë ou les infections chroniques des voies respiratoires inférieures, les infections du sang, par exemple les septicémies, les infections aiguës ou chroniques des voies urinaires, celles du système auditif, par exemple l'otite externe maligne, ou l'otite chronique suppurante, celles de la
30 peau et des tissus mous, par exemple les dermatites, les plaies infectées, la folliculite, la pyodermite, les formes rebelles d'acnée, les infections des yeux, par exemple l'ulcère de la cornée, celles du système nerveux, notamment les méningites et les abcès du cerveau, les infections
35 cardiaques telles que l'endocardite, les infections des os et des articulations telles que la pyoarthrose sténoarticulaire, l'ostéomyélite vertébrale, la symphysite pubienne, les

infections du tube gastro-intestinal, telles que l'entérocolite nécrosante et les infections péri-rectales.

La présente invention a donc également pour objet, à titre de médicaments et notamment de médicaments antibiotiques, les combinaisons synergiques telles que définies ci-dessus.

Parmi ces combinaisons, l'invention a notamment pour objet, à titre de médicaments, celles renfermant des composés de formule (I) dans lesquels R_3 et R_4 forment ensemble un hétérocycle pyrazolyle ou triazolyle, éventuellement substitué, et parmi ceux-ci, ceux dans lesquels R_1 est choisi dans le groupe constitué par les groupements $(CH_2)_n-NH_2$ et $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini précédemment, l'hétérocycle formé par R_3 et R_4 est substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

Parmi ces combinaisons, l'invention a plus particulièrement pour objet, à titre de médicaments, celles renfermant des composés dans lesquels R_1 représente un radical $(CH_2)_n-NH_2$ ou $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini précédemment et R_3 et R_4 forment ensemble un cycle pyrazolyle substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

Parmi ces combinaisons, l'invention a tout particulièrement pour objet, à titre de médicament, celles renfermant l'un au moins des composés dont les noms suivent:

- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one,
 - la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one, ou
 - la trans 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépin-6(5H)-one,
- sous forme libre, de zwitterion et de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

Parmi ces combinaisons, l'invention a notamment pour objet, à titre de médicaments, celles renfermant des composés antibactériens choisis parmi les aminoglycosides, les beta-

lactames, les pénicillines le cas échéant combinées à des inhibiteurs de beta lactamases, et les polymyxines.

Parmi ces combinaisons, l'invention a notamment pour objet, à titre de médicaments, celles renfermant des composés
5 antibactériens choisis parmi la Tobramycine, le Méropénème, le Céfépime, le Ceftazidime, l'Aztréoname, la Lévofoxacine, la Pipéracilline le cas échéant combinée au Tazobactame, la Colistine et la Polymyxine B.

L'invention a aussi pour objet les compositions
10 pharmaceutiques renfermant comme principes actifs, une combinaison synergique telle que définie ci-dessus.

Ces compositions peuvent être administrées par voie buccale, rectale, parentérale, notamment intramusculaire, ou par voie locale en application topique sur la peau et les
15 muqueuses.

Les compositions selon l'invention peuvent être solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine comme par exemple, les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les
20 granulés, les suppositoires, les préparations injectables, les pommades, les crèmes, les gels; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme
25 arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Ces compositions peuvent notamment se présenter sous forme d'un lyophilisat destiné à être dissout extemporanément dans un véhicule approprié, par exemple, de l'eau stérile
30 apyrogène.

Les compositions selon l'invention comprennent donc au
35 moins deux principes actifs, et ceux-ci peuvent être administrés simultanément, séparément ou d'une manière échelonnée dans le temps. Elles peuvent par exemple se

présenter sous forme d'un «kit », permettant l'administration d'un composé de formule générale (I) et celle d'un autre composé antibactérien séparément.

La dose en composé de formule (I) administrée est variable selon le niveau et la nature de l'affection traitée, le sujet en cause, la voie d'administration et l'autre produit antibactérien considéré. Elle peut être, par exemple, comprise entre 0,25 g et 10 g par jour, par voie orale chez l'homme, avec le produit décrit à l'exemple 1 ou encore comprise entre 0,25 g et 10 g par jour par voie intramusculaire ou intraveineuse.

La dose en l'autre composé antibactérien est aussi variable selon l'affection traitée, le sujet en cause, la voie d'administration et le produit considéré, mais suit, généralement les doses habituelles prescrites par les praticiens, par exemple comme décrit dans la publication de référence Vidal. Cette dose peut aller jusqu'à 10 g par jour, voire davantage. Néanmoins, par suite de la potentialisation apportée par les composés de formule générale (I) aux autres composés antibactériens, les doses de ceux-ci au sein de la combinaison peuvent être réduites par rapport aux doses standards.

Les combinaisons selon l'invention peuvent également être utilisées comme désinfectants des instruments chirurgicaux.

Les exemples suivants illustrent la préparation de composés de formule (I). Les autres composés antibactériens sont quant à eux connus et commerciaux.

EXEMPLES

Exemple 1 : sel de sodium et de trifluoroacétate de la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one

Stade A :

4,7-dihydro-1-méthyl-4-((phénylméthoxy) amino)-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-6(5H), 7-dicarboxylate de 6-(1,1-diméthyléthyle) et de 7-méthyle (B)

Le dérivé A (4,7-dihydro-4-hydroxy-1-méthyl-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-6 (5H),7-dicarboxylate de 6-(1,1-diméthyléthyle) et de 7-méthyle, décrit dans la demande WO 02100860 (10 g, 32.12 mmol) est mis en suspension dans le dichlorométhane (100 ml) à température ambiante sous azote et sous agitation. La suspension se dissout après l'ajout de triéthylamine (14.30 ml, 10.28 mmol, 3.2eq). Au milieu réactionnel refroidi à -78°C est additionné goutte à goutte une solution de chlorure de méthane sulfonyl (11.4 ml, 96.36 mmol, 3eq) dans le dichlorométhane (12 ml, 1 volume). Après 30 min de contact, l'alcool A est complètement transformé en mésylate.

Une solution de O-benzyl-hydroxylamine dans le dichlorométhane est fraîchement préparée à partir du chlorhydrate de O-benzylhydroxylamine (25.4 g, 160.6 mmol, 5eq). Le chlorhydrate de O-benzylhydroxylamine est dissout dans un mélange de dichlorométhane (100 ml) et d'eau (50 ml). Une solution de soude 2N (85 ml, 176.66 mmol) est ajoutée à 0°C. Après 10 min de contact et décantation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium durant 45 min, puis concentrée à demi volume. L'addition de cette solution au mésylate préparé ci-dessus se fait à -78°C goutte à goutte sur 1 heure. Le mélange réactionnel est agité en laissant la température remonter progressivement à l'ambiante. On traite par addition d'eau (200 ml) et dilue le milieu avec du dichlorométhane (100 ml), agite, décante puis réextrait la phase aqueuse au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (200 ml), séchée, puis concentrée à sec. On récupère une poudre amorphe blanche, qui après chromatographie délivre le dérivé B attendu (8.25 g, 66%).

MS (ES (+)) : m/z [M⁺] = 417.2

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): un diastéréoisomère (2 rotamères) δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, tBu), 3.15 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.68 / 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃), 3.98 (m, 2H, N-CH₂-CH-N), 4.6-4.8 (massif, 3H, NH-O-CH₂-Ph et N-CH₂-CH-N), 5.40 / 5.8 (s, 1H, CH-CO₂Me), 7.22-7.31 (massif, 5H, Ph), 7.40 (s, 1H, H pyrazole)

Stade B :

34

Trans 1-methyl-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,5,6,8-tétrahydro-4,7-méthano-1H-pyrazolo[3,4-e] [1,3]diazépine-8 (7H) carboxylate de méthyle (C)

Une solution 4N de HCl/ dioxane (400 ml, 15eq) est coulée sur une solution de B (21 g, 50.42 mmol) dissout dans le dioxane (50 ml) à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité pendant 30 min, puis le dioxane est évaporé. Le résidu est repris sous agitation dans un mélange d'eau (100 ml) et d'acétate d'éthyle (500 ml). Une solution d'ammoniaque concentrée à 20% (42 ml) est ajoutée à 0°C. L'agitation est poursuivie pendant 30 min. Après décantation la phase aqueuse est ré-extraite avec de l'acétate d'éthyle (2*300 ml), la dernière extraction étant réalisée après saturation de la phase aqueuse avec du NaCl. La phase organique est séchée puis concentrée. On obtient l'intermédiaire pipéridine déprotégée sous forme d'une huile jaune (m=15.7 g, 98%) qui est repris dans l'acétonitrile (400 ml). A ce mélange refroidi à 0°C, sont ajoutés la triéthylamine (21 ml, 151.2 mmol, 3eq), puis le diphosgène (3.04 ml, 25.2 mmol, 0.5eq) coulé goutte à goutte sur 30 min. Après une nuit de contact à température ambiante, le milieu est concentré puis repris avec de l'acétate d'éthyle (500 ml) et traité avec une solution d'acide tartrique 10% (200 ml). Le mélange est agité, décanté. La phase organique est lavée par une solution d'acide tartrique 10% (2*200 ml), par une solution de NaCl saturée, puis séchée et concentrée sous pression réduite. Le produit blanc obtenu (m=15.3 g, 89%) est repris dans le dichlorométhane (150 ml). Du 1-8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (7.53 ml, 50.04 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant 2h, traité avec de l'eau (200 ml), agité, décanté. La phase organique est lavée avec de l'eau (2*200 ml), puis avec une solution de NaCl saturée (1*200 ml), et séchée sur MgSO₄, puis concentrée à sec.

On récupère le dérivé C attendu (m=14.72 g, 85%), sous forme d'un solide blanc

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=343

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.25 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.45 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.88 (s, 3H, CH₃), 3.9 (s, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.7 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.22 (s; 1H, CH-CO₂Me), 7.39-7.43 (massif, 6H, H pyrazole + Ph)

Stade C :

4,8-dihydro-8-(hydroxyméthyl)-1-méthyl-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one (D)

Une solution de C (5g, 14.60 mmol) dans un mélange de tétrahydrofurane (150 ml) / méthanol (50 ml) anhydres, sous azote et sous agitation, est refroidie à -10°C. Du borohydrure de lithium (668 mg, 30.67 mmol, 1.2eq) est ajouté au milieu réactionnel. Après 2 h d'agitation à -10°C, 1.2eq supplémentaires de LiBH₄ sont ajoutés. La réaction est traitée à froid 2 h plus tard par une solution à 10% de NaH₂PO₄. Le tétrahydrofurane et le méthanol sont évaporés sous pression réduite (200 mbar, 40°C). Le mélange résiduel est repris avec de l'acétate d'éthyle (200 ml), agité et décanté. La phase aqueuse est réextraite avec de l'acétate d'éthyle (100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée à sec. La poudre jaune clair obtenue (6.6 g) est chromatographiée sur silice (éluant-acétate d'éthyle) pour donner le dérivé D (3.2 g, 10.18 mmol, 64%).

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=315

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.16 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.48 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.71 (s, 3H, CH₃), 3.81-3.91 (massif, 2H, CH₂OH), 4.44 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.48 (m, 1H, CHCH₂OH), 4.88 (m, 2H, N-O-CH₂-Ph), 5.20 (m, 1H, OH), 7.35-7.40 (massif, 6H, H pyrazole + Ph).

Stade D :

Trans 4,8-dihydro-1-méthyl-8-[(méthylsulfonyl)oxyméthyl]-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one (E)

Le dérivé D (2.76 g, 8.78 mmol) est mis en solution dans du dichlorométhane (100 ml) à température ambiante sous azote et sous agitation. Après refroidissement à 0°C, on ajoute de la triéthylamine (1.83 ml, 13.17 mmol, 1.5eq), puis goutte à

goutte une solution de chlorure de mesyle (1.61 g, 14.05 mmol) dans le dichloromethane (100 ml). Le bain de glace est retiré en fin d'addition. Au bout d'une heure de contact à température ambiante, la réaction est traitée sous agitation par une solution à 10% de NaH₂PO₄ (80 ml). Après agitation et décantation, la phase aqueuse est réextraite au dichlorométhane (50 ml). La phase organique est séchée, puis concentrée sous pression réduite pour donner le dérivé attendu (3.44 g, rendement quantitatif).

10 MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=393

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.23 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.26 (s, 3H, CH₃), 3.45 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.76 (s, 3H, CH₃), 4.52 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.58 (dd, 1H, CH-CH₂-OMs), 4.66 (dd, 1H, CH-CH₂-OMs), 4.88 (m, 3H, CHCH₂OMs et N-O-CH₂-Ph), 7.35-7.45 (massif, 6H, H pyrazole + Ph)

Stade E :

trans 8-(azidométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one (F)

De l'azidure de sodium est ajouté en une seule fois (1.71 g, 26.3 mmol) à une solution de E (3.44 g, 8.78 mmol) dans le diméthylformamide (70 ml) à température ambiante sous azote et sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 65°C toute une nuit, puis traité par une solution aqueuse à 10% de NaH₂PO₄ (50 ml). Après agitation et décantation, la phase aqueuse est réextraite au dichloromethane (2*50 ml). La phase organique est séchée, puis concentrée sous pression réduite pour donner 3.96 g de dérivé F attendu (3 g, 8.78 mmol).

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=340

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.20 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.48 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.66 (dd, 1H, CH-CH₂-N₃), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.92 (dd, 1H, CH-CH₂-N₃), 4.50 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.76 (dd, 1H, CHCH₂ON₃), 4.89 (m, 2H, N-O-CH₂-Ph), 7.35-7.45 (massif, 6H, H pyrazole + Ph)

Stade F :

trans [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl)méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyléthyle (G)

5 Une solution molaire de triméthylphosphine (3.4 ml, 3.4 mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution de F (1.15 g, 3.39 mmol) dans un mélange toluène (5 ml) et tétrahydrofurane (5 ml) à température ambiante sous azote et sous agitation. Après 3 h de contact, une solution de BOC-ON
10 (0.92 g, 3.6 mmol) dans le tétrahydrofurane (10 ml) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel refroidi à 0°C. L'agitation est poursuivie pendant 3 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est traité par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (50 ml). Après agitation et décantation, la phase
15 aqueuse est réextraite à l'acétate d'éthyle (50 ml). La phase organique est séchée, puis concentrée sous pression réduite pour donner une huile (2.2 g). Le produit brut est chromatographié sur colonne de silice (éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 5/5). On obtient le produit attendu (0.62 g,
20 1.49 mmol, 70%).

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=414

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.39 (s, 9H, tBu), 3.05 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.19 (dd, 1H, CH-CH₂-NHBOC), 3.27 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.78 (m, 1H, CH-CH₂-NHBOC), 3.88
25 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.48 (dd, 1H, CHCH₂NHBOC), 4.79 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 4.92 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.18 (m, 1H, H mobile), 7.35 (s, 1H, H pyrazole), 7.37-7.48 (massif, 5H, Ph)

Stade G :

Sel de pyridinium du *trans* [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl)méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyléthyle (H).
30

Du palladium 10% sur charbon (140 mg) est ajouté à une solution de G (0.6 g, 1.45 mmol) dans le méthanol (10 ml). Le milieu réactionnel est hydrogéné pendant 3h. Le méthanol est
35 ensuite évaporé sous pression réduite pour donner l'intermédiaire débenzylé.

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=324

L'intermédiaire débenzylé est repris dans la pyridine (3 ml) en présence du complexe pyridine / sulfure de trioxyde (462 mg, 2.9 mmol). La réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (éluant dichlorométhane 100% puis gradient avec du méthanol de 5% à 20%) pour donner le dérivé H (0.49 g, 1.25 mmol, 84%).

MS (ES (+)) : m/z [M⁺]=402

10 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) =1.41 (s, 9H, tBu), 3.30-3.80 (massif, 4H, 2 CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.42 (dd, 1H, CHCH₂ONHBOC), 4.64 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.21 (m, 1H, H mobile), 7.35 (s, 1H, H pyrazole), 8.02 (dd, 2H, pyridine), 8.54 (m, 1H, pyridine), 8.91 (m, 2H, pyridine)

15 Stade H :

Sel de sodium de la trans [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyléthyle (I)

20 Une suspension de 60 g de résine DOWEX 50WX8 dans une solution de soude 2N (300 ml) est agitée pendant une heure, puis versée sur une colonne à chromatographie. On élue à l'eau déminéralisée jusqu'à pH neutre, puis conditionne la colonne avec un mélange eau/THF 90/10. Le dérivé H (0.49 g, 1.01 mmol) est dissout dans un minimum d'eau, déposé sur la colonne, puis
25 élué avec un mélange eau/THF 90/10. Les fractions contenant le substrat sont réunies et congelées. La solution congelée est lyophilisée pour conduire au produit I attendu (0.44 g, 1.03 mmol, 100%).

MS (ES (-)) : m/z [M⁻]=402

30 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) =1.39 (s, 9H, tBu), 3.30-3.72 (m, 7H, 2 CH₂, CH₃), 4.42 (m, 1H, CHCH₂ONHBOC), 4.64 (s, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.16 (m, 1H, H mobile), 7.35 (s, 1H, H pyrazole).

Stade I :

35 Sel de sodium et de trifluoroacétate de la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one (J)

Une solution d'acide trifluoroacétique (10 ml) dans le dichloromethane (10 ml) est coulée goutte à goutte sur une solution de **I** (0.15 g, 0.35 mmol) dans le dichloromethane (5 ml) sous azote et refroidie à 0°C. La réaction est maintenue sous agitation pendant 1h à température ambiante. Le mélange est évaporé à sec et repris dans un minimum d'eau. La solution est congelée puis lyophilisée pour donner le dérivé **J** attendu (193 mg, 0.35 mmol, 100%).

MS (ES (-)) : m/z [M⁻]=301

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 3.32 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.33-3.37 (m, 2H, 2CH), 3.43 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.73 (m, 2H, CH-CH₂-NH₃⁺), 7.41 (s, 1H, H pyrazole), 8.10 (m, 3H, NH₃⁺)

Exemple 2 : Le sel de sodium et de trifluoroacétate de la trans 8-(amino-méthyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one

Stade A :

Trans 4,8-dihydro-8-(hydroxyméthyl)-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépín-6(5H)-one

L'ester *trans*-4,5,6,8-tétrahydro-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépíne-8-carboxylate de méthyle décrit dans le brevet WO 2004/052891 (Exemple 1, stade K) (5 g, 15.2 mmol) est mis en solution dans un mélange méthanol/tétrahydrofurane anhydres 1/1 (100 mL), sous azote. Du NaBH₄ (2.3 g, 60.9 mmol) est alors ajouté par portions. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est traité avec une solution aqueuse 10% de NaH₂PO₄ (100 mL). Après évaporation à sec, le mélange réactionnel est repris dans l'eau. Le précipité formé est agité une nuit dans la glace, puis filtré et séché au moins 24h sous vide en présence de P₂O₅, pour donner le composé attendu (3.30 g, 11.0 mmol, 72%) sous forme de poudre blanche.

MS (ES(+)) : m/z [M+H]⁺ = 301

¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) = 3.18-3.50 (ABX, 2H, N-CH₂-CH-N), 3.65-3.76 (ABX, 2H, N-CH-CH₂-OH), 4.34 (t, 1H, N-CH-CH₂-OH), 4.46 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.88 (s, 2H, CH₂-Ph), 7.29-7.43 (m, 5H, Ph), 7.66 (s, 1H, H pyrazole), 12.72 (broad, 1H, OH).

Stade B :

trans [[4,5,6,8-tétrahydro-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7*H*-pyrazolo[3,4-*e*] [1,3] diazépín-8-yl)méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyle

5 L'alcool obtenu au stade A de l'exemple 2 (1.73 g, 5.76 mmol) est mis en solution dans la pyridine anhydre (35 mL) sous azote, à 0°C. Puis du chlorure de méthanesulfonyle (1.78 mL, 23 mmol) est ajouté goutte à goutte. Après 2h30 d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est
10 traité avec une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (100 mL), puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont ensuite lavées 5 fois avec une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium, séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées sous vide pour
15 donner le dérivé dimésylé attendu sous forme d'huile jaune.

L'intermédiaire dimésylé est mis en solution dans du diméthylformamide anhydre (45 mL), sous azote, en présence d'azoture de sodium (1.12 g, 17.3 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 70°C pendant 24 heures. Si
20 nécessaire 1 éq. d'azoture est ajouté pour que la conversion soit complète. Lorsque la réaction est complète, le mélange est traité avec une solution aqueuse 10% de NaH₂PO₄ (100 mL) puis extrait au dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis
25 concentrées sous vide pour donner l'azoture attendu sous forme d'huile jaune.

L'intermédiaire est mis en réaction, sous azote, dans l'éthanol absolu (17.5 mL). Puis sont ajoutés successivement du di-*tert*-butyl dicarbonate (1.38 g, 6.34 mmol), du triéthylsilane
30 (1.38 mL, 8.64 mmol) et de l'hydroxyde de palladium sur charbon 10% Degussa (52 mg). Après une nuit à température ambiante, le mélange réactionnel est filtré puis concentré pour donner une huile jaune brute. Ce brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant gradient CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 95/5 par
35 1%) pour conduire au composé attendu (1.36 g, 3.40 mmol, 34%) sous forme de solide blanc.

MS (ES(+)) : m/z [M+H]⁺ = 401

¹H RMN (400MHz, MeOH-d₄) : δ(ppm) = 1.51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.21-3.59 (m, 4H, N-CH₂-CH-N et N-CH-CH₂-NHBoc), 4.36 (m, 1H, N-CH-CH₂-OH), 4.46 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.99 (AB, 2H, CH₂-Ph), 7.41-7.52 (m, 5H, Ph), 7.63 (s, 1H, H pyrazole).

5 Stade C :

trans [[4,5,6,8-tétrahydro-1-*tert*-butoxycarbamate-6-oxo-5-(phényl-méthoxy)-4,7-méthano-7*H*-pyrazolo[3,4-*e*] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyle

Le composé obtenu au stade B de l'exemple 2 (104 mg, 0.26 mmol) est mis en solution dans du dichlorométhane anhydre (2.5 mL) puis du di-*tert*-butyl dicarbonate (114 mg, 0.52 mmol) et de la diméthylaminopyridine (32 mg, 0.26 mmol) sont ajoutés au mélange. Après 1 nuit d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est traité avec de l'eau. Les phases sont
15 séparées puis la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis concentrée sous vide. Le brut ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant : CH₂Cl₂/AcOEt 90/10) pour donner le produit attendu (76 mg, 0.15 mmol, 59%).
20 MS (ES(+)) : m/z [M+H]⁺ = 500

Stade D :

sel de pyridinium du *trans* [[1-*tert*-butoxycarbamate-4,5,6,8-tétrahydro-6-oxo-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7*H*-pyrazolo[3,4-*e*] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-carbamate de 1,1-diméthyle
25

Le composé obtenu au stade C de l'exemple 2 (76 mg, 0.15 mmol) est mis en solution, sous azote, dans un mélange diméthylformamide/CH₂Cl₂ 1/3 anhydre (0.87 mL). Du palladium 10% sur charbon à 50% en eau (49 mg) est ajouté. Après trois
30 purges vide/azote, le mélange réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène jusqu'à disparition du produit de départ en HPLC. Le mélange est alors concentré sous vide puis co-évapouré trois fois avec du dichlorométhane anhydre, enfin séché sous cloche à vide en présence de P₂O₅ pendant 2h.

35 Le dérivé débenzylé est repris dans de la pyridine anhydre (0.43 mL), sous azote, en présence du complexe pyridine/sulfure de trioxyde (48 mg, 0.30 mmol). Le mélange

réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à conversion complète en HPLC, puis évaporé à sec après traitement par ajout d'eau. Le brut ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH 90/10) pour
5 donner le composé attendu (47 mg, 0.083 mmol, 55%).

MS (ES(-)) : m/z [M-2*BOC-H]⁻ = 388

¹H RMN (400MHz, MeOH-d₄) : δ(ppm) = 1.52 (s, 18H, 2x C(CH₃)₃), 3.50 (m, 4H, N-CH₂-CH-N et CH₂-NHBoc), 4.62 (m, 1H, CH-CH₂-NHBoc), 4.85 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.72 (s, 1H, H pyrazole).

10 Stade E :

sel de sodium et de trifluoroacétate de la *trans* [[8-(amino-méthyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one

Une suspension de 6g de résine DOWEX 50WX8 dans une
15 solution de soude 2N (30 mL) est agitée à température ambiante pendant 1h, puis versée sur une colonne à chromatographier. Après rinçage avec H₂O jusqu'à pH neutre, la colonne est conditionnée avec un mélange THF/H₂O 10/90. Le dérivé obtenu au stade D de l'exemple 2 (47 mg, 0.08 mmol) est dissout dans un
20 minimum de méthanol puis déposé sur la colonne. Après élution avec un mélange THF/H₂O 10/90, les fractions contenant le produit attendu sont rassemblées, congelées, puis lyophilisées pour conduire au sel de sodium attendu.

Le sel de sodium est repris dans le dichlorométhane
25 anhydre (1.04 mL) sous azote puis refroidit à 0°C. Une solution d'acide trifluoroacétique/dichlorométhane anhydre 1/1 (2.04 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 45 min. Après évaporation à sec puis co-évaporation avec du dichlorométhane
30 anhydre, le composé est repris dans l'eau (~2 mL) puis congelé et lyophilisé pour donner le sel attendu (16 mg, 0.030 mmol, 36%) sous forme de poudre jaune pâle.

MS (ES(-)) : m/z [M-H]⁻ = 288

¹H RMN (400MHz, MeOH-d₄) : δ(ppm) = 3.37-3.69 (m, 4H, N-CH₂-CH-N et CH-CH₂-NH₂), 4.81 (dd, 1H, CH-CH₂-NH₂), 4.98 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.79 (s, 1H, H pyrazole).

Exemple 3 : Sel de sodium et de trifluoroacétate de la trans
[[8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-
méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépin-6(5H)-one

Stade A :

- 5 Iodure du trans [[[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépin-8-yl]méthyl]-méthylamino]triméthylphosphonium

Une solution molaire de triméthylphosphine (1.5 mL, 1.5 mmol) est ajoutée goutte à goutte à une solution du dérivé
 10 obtenu au stade E de l'exemple 1 (0.5 g, 1.25 mmol) en solution dans le tétrahydrofurane (15 mL) à température ambiante sous azote et sous agitation. Après 2h d'agitation, l'iodure de méthane (0.21 g, 3.75 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Il se forme rapidement un précipité jaune clair.
 15 Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit brut est trituré dans dichlorométhane. Le précipité est filtré pour donner le produit (0.42 g, 1.04 mmol, 84%) attendu sous forme de sel d'iode de couleur jaunâtre.

- 20 MS (ES (+)) : m/z [M+H]⁺ = 402

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) sous forme de 2 conformères : δ (ppm) =
 2.04 (s, 3H, CH₃P), 2.32 (s, 3H, CH₃P), 2.35 (s, 3H, CH₃P),
 3.03 (s, 3H, P-NCH₃(A)-CH₂), 3.05 (s, 3H, P-NCH₃(B)-CH₂), 3.37
 (m, 1H, N-CH₂-CH-N ou CH-CH₂-N(CH₃)P), 3.44 (m, 1H, N-CH₂-CH-N ou
 25 CH-CH₂-N(CH₃)P), 3.69 (m, 1H, N-CH₂-CH-N ou CH-CH₂-N(CH₃)P),
 3.82 (s, 3H, CH₃), 3.88 (m, 1H, N-CH₂-CH-N ou CH-CH₂-N(CH₃)P),
 4.05 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.59 (d, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)P), 4.88
 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.00 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.35 (s, 1H, H
 pyrazole), 7.37-7.45 (massif, 5H, Ph)

- 30 Stade B :

trans 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépin-6(5H)-one

- A une solution aqueuse de carbonate de sodium (2.5N, 9 mL)
 35 est ajouté le dérivé obtenu au stade A de l'exemple 3 (0.42 g, 1.04 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 55°C pendant 3h30. Après refroidissement à température ambiante, le milieu

réactionnel est saturé de chlorure de sodium en présence d'acétate d'éthyle (25 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x25 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite pour délivrer une huile jaune (0.26 g). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant dichlorométhane 100% puis gradient avec du méthanol de 2% à 10%) pour donner le dérivé attendu (0.084 g, 0.256 mmol, 26%).

MS (ES (+)) : m/z [M+H]⁺ = 328

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.97-3.00 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.00 (CH-CH₂-NCH₃), 3.15 (dd, 1H, CH-CH₂-NCH₃), 3.9 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.98 (d, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)Boc), 4.72 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.90 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.03 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.30 (s, 1H, H pyrazole), 7.34-7.44 (massif, 5H, Ph)

Stade C :

trans [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(phénylméthoxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-méthyl-carbamate de 1,1-diméthyléthyle

Le dérivé obtenu au stade B de l'exemple 3 (80 mg, 0.244 mmol) est mis en solution dans le dichlorométhane (1 mL) puis à température ambiante est additionné successivement de la triéthyle amine (60 µL, 0.488 mmol) et du di-tert-butylldicarbonate (106 mg, 0.488 mmol). Après 4h d'agitation à température ambiante, une solution saturée de chlorure de sodium (5 mL) est additionnée au milieu réactionnel. La phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane (3x20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous pression réduite pour donner une poudre blanche amorphe (157 mg). Le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (éluant dichlorométhane 100% puis gradient avec de l'acétate d'éthyle de 20% à 30%) pour donner le dérivé attendu (0.068 g, 0.159 mmol, 60%).

MS (ES (+)) : m/z [M+H]⁺=428

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1.59 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.05 (s, 3H, CH₃NBoc-CH₂), 3.10 (m, 3H, N-CH₂-CH-N, CH-CH₂-NBoc), 3.75 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.85 (s, 3H, CH₃), 3.99 (s, 1H, N-

CH₂-CH-N), 4.75 (m, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)Boc), 4.90 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.37 (s, 1H, H pyrazole), 7.40-7.46 (massif, 5H, Ph)

Stade D :

- 5 Sel de pyridinium du *trans* [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-méthyl-carbamate de 1,1-diméthyléthyle

En procédant comme indiqué au stade G de l'exemple 1, le composé obtenu au stade C de l'exemple 3 (0.068 g, 0.159 mmol) dans le méthanol (5 mL), en présence de palladium 10% sur charbon (25 mg) conduisent au produit débenzylé.

MS (ES (+)) : m/z [M+H]⁺ = 337

L'intermédiaire débenzylé, la pyridine (1 mL), le complexe pyridine/sulfure de trioxyde (50 mg, 0.318 mmol) conduisent au sel attendu (0.045 g, 0.090 mmol, 100%).

MS (ES (-)) : m/z [M-H]⁻ = 416

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) sous forme de 2 conformères : δ (ppm) = 1.53 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.09 (s, 3H, CH₃(A)NHBoc), 3.10 (s, 3H, CH₃(B)NHBoc), 3.37 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.58 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.84 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.90 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 4.90 (m, 2H, N-CH-CH₂-N, N-CH₂-CH-N + signal H₂O), 7.54 (s, 1H, H pyrazole), 8.16 (dd, 2H, pyridine), 8.70 (dd, 2H, pyridine), 8.94 (d, 1H, pyridine)

25 Stade E :

Sel de sodium de la *trans* [[4,5,6,8-tétrahydro-1-méthyl-6-oxo-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-8-yl]méthyl]-méthyl-carbamate de 1,1-diméthyléthyle

En procédant comme indiqué au stade H de l'exemple 1, le sel obtenu au stade D de l'exemple 3 (0.045 g, 0.090 mmol), la résine DOWEX 50WX8 (30 g) et la soude 2N (150 mL) conduisent au sel de sodium attendu (0.039 g, 0.090 mmol, 100%).

MS (ES (-)) : m/z [M-H]⁻ = 416

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) sous forme de 2 conformères : δ (ppm) = 1.56 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.09 (s, 3H, CH₃(A)NHBoc), 3.10 (s, 3H, CH₃(B)NHBoc), 3.37 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.64 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃),

3.84 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 3.93 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH ou N-CH₂-CH-N), 4.90 (m, 2H, N-CH-CH₂-N, N-CH₂-CH-N + signal H₂O), 7.55 (s, 1H, H pyrazole).

Stade F :

- 5 Sel de sodium et de trifluoroacétate de la *trans* 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e] [1,3] diazépín-6(5H)-one

En procédant comme indiqué au stade I de l'exemple 1, le sel de sodium obtenu au stade E de l'exemple 3 (0.039 g, 0.088 mmol), le dichlorométhane (5 mL) et un mélange d'acide trifluoroacétique/dichlorométhane anhydre 1/1 (4 mL) conduisent au produit attendu (39 mg, 0.08 mmol, 100%).

MS (ES (-)) : m/z [M-H]⁻ = 315

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 2.76 (s, 3H, CH₃NH₂⁺-CH₂), 3.30-3.50 (m, 4H, N-CH₂-CH-N, NH₂⁺-CH₂-CH), 3.75 (s, 3H, CH₃), 4.74 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.82 (d, 1H, CH-CH₂-NH₂⁺CH₃), 7.43 (s, 1H, H pyrazole), 8.67 (m, 2H, NH₃⁺).

Exemple 4: Compositions pharmaceutiques

On a préparé une composition pour injection renfermant:

- 20 - Composé de l'exemple 1: 300 mg
- Tobramycine : 500 mg
- Excipient aqueux stérile: q.s.p. 5 cm³

On a préparé une composition pour injection renfermant:

- 25 - Composé de l'exemple 1: 200 mg
- Ceftazidime : 500mg
- Excipient aqueux stérile: q.s.p. 5 cm³

Détermination de l'activité bactéricide

30

But : On mesure l'activité bactéricide in vitro de l'antibiotique en mettant en évidence la plus petite concentration qui permet la survie de 0,001% de bactéries au bout d'un temps unique donné et dans le temps.

35

Produits

• On pèse les produits à tester et les solubilise puis la solution mère obtenue est diluée dans du milieu en fonction

des concentrations à tester, sachant que chaque dilution sera introduite sous 0.5ml dans un volume total de 20ml soit une dilution finale au 1/40.

5 Méthode

On détermine au préalable les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMIs) des produits à tester (produits seuls et combinaisons).

- 10 • Pour chaque concentration de produit à tester ainsi que le témoin souche, on prépare un erlen contenant 18.5ml de milieu Muller-Hinton (Ca²⁺).
- A partir d'une culture de nuit en bouillon ou d'une suspension bactérienne de DO (densité optique) = 1, on fait
- 15 une dilution au 1/100.
- On met en culture agitée pendant 2h à 37°C.
- On mesure la DO, si DO > 0,5, on dilue au 1/10.
- On ensemence chaque erlen avec 1 ml de la culture agitée ou de sa dilution, l'inoculum initial devant être 1x 10⁶ cfu/ml.
- 20 • On ajoute les différentes solutions d'antibiotiques sous un volume de 0,5ml et 0,5ml de milieu dans l'erlen témoin.
- Sur un volume de 0.1ml, on numère l'erlen témoin = TO.
- On incube sous agitation à 37°C.
- A chaque temps de prélèvement (2, 4, 6, 24, 48 heures), on
- 25 prélève un volume de 0.1ml de chaque erlen et réalise une numération.
- On incube toutes les boîtes de numération (24h - 48h) à 37°C.

30 Paramètres mesurés

- On compte les colonies.
- On trace les courbes CFU/ml en fonction du temps.
- Effet bactéricide = diminution de 3 log par rapport à l'inoculum initial.

35

Bibliographie

PETERSON L.R., SHANHOLTZER C.J.

Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents:
technical performance and clinical relevance.
Clin. Microb. Rev., 1992, 5, 420-432

- 5 COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P., GOLDSTEIN F.
Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.
Ed. Maloine, Paris, 1991.

L'activité bactéricide a été évaluée sur une souche sensible
10 de *Pseudomonas aeruginosa* (391HT2)

Les CMI sont déterminées sur microplaque:

- Ceftazidime/CAZ: 2 µg/mL
- Ciprofloxacine/CIPRO: 1 µg/mL
- Tobramycine/TOBRA: 1 µg/mL
- 15 - Produit de l'exemple 1 (NXL105): 0.25 µg/mL

Pour les essais bactéricides, les CMI sont déterminées dans un
volume de 10 mL - Conditions bactéricides (croissance
bactérienne exponentielle):

- 20 - CAZ: 8 µg/mL
- CIPRO: 2 µg/mL
- TOBRA: 1 µg/mL
- Produit de l'exemple 1: 0.25 µg/mL

25

Les activités bactéricides qui figurent sur les planches 1 à 3
en annexe sont évaluées après 48 H, soit pour le produit de
l'exemple 1 seul, soit pour une combinaison. Elles montrent
30 une absence totale de recroissance bactérienne après 48 H pour
les combinaisons.

**Mise en évidence de l'activité synergistique - Détermination
des CMI:**

35

Activité in vitro, méthode des dilutions en milieu liquide :
On prépare une série de microplaques à 96 puits dans lesquels
on répartit la même quantité de milieu nutritif stérile, on

49

distribue dans chaque puit des quantités croissantes du composé à étudier, à savoir le composé antibactérien seul et la combinaison selon l'invention avec le composé de formule (I) de l'exemple 1, dans les proportions respectives 2 :1 et 4 :1, puis chaque plaque estensemencée avec une souche bactérienne : *Pseudomonas aeruginosa* et *enterobacteriaceae*. Après incubation de 24 heures à l'étuve à 37°C, l'inhibition de la croissance est appréciée par transillumination, ce qui permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) exprimées en µg/ml.

Dans l'ensemble des essais ci-dessous (CMI et FIC):

- Ceftazidime = CAZ
- Méropénème = MRP
- Aztréoname = AZT
- Lévofoxacine = LVX
- Composé de l'exemple 1 = Composé A

Species	Alias	Comp A		Meropenem			Aztreonam			Ceftazidime		
		seul	seul	seul	+ Comp A		seul	+ Comp A		seul	+ Comp A	
					2:1	4:1		2:1	4:1		2:1	4:1
P. aeruginosa	391KB135	1.000	>32	>32	4.000	16.000	>32	2	2	>32	2	8
P. aeruginosa	391KB139	2.000	>32	>32	1.000	4.000	>32	2	4	>32	2	4
P. aeruginosa	391KB140	2.000	16.000	16.000	0.500	1.000	8	0.5	1	16	0.5	2
P. aeruginosa	391KB141	4.000	>32	>32	1.000	2.000	16	1	2	>32	1	2
P. aeruginosa	391KB144	16.000	>32	>32	1.000	2.000	32	1	4	>32	2	4
P. aeruginosa	391QBR2	>32	>32	>32	1.000	4.000	>32	>32	>32	>32	16	16
P. aeruginosa	391QBR3	2.000	32.000	32.000	1.000	2.000	>32	2	4	>32	1	4
P. aeruginosa	391QBR8	2.000	16.000	16.000	1.000	2.000	>32	2	4	>32	2	4
P. aeruginosa	391QBR10	4.000	4.000	4.000	0.500	0.500	>32	0.5	1	>32	0.5	1
P. aeruginosa	391KB62	4.000	>32	>32	4.000	8.000	>32	8	16	>32	4	16
P. aeruginosa	391KB90	8.000	16.000	16.000	2.000	2.000	>32	2	2	>32	4	4
P. aeruginosa	391KB38	1.000	8.000	8.000	1.000	1.000	>32	1	2	>32	2	4
P. aeruginosa	391KB68	0.500	1.000	1.000	0.250	0.500	32	1	1	>32	0.5	2
P. aeruginosa	391KB14	1.000	8.000	8.000	0.500	1.000	>32	1	2	32	1	2
P. aeruginosa	391KB106	2.000	4.000	4.000	0.500	0.500	>32	2	4	32	2	4
P. aeruginosa	391K767	1.000	2.000	2.000	0.500	0.500	8	0.5	1	2	0.5	1
P. aeruginosa	391K1523	2.000	2.000	2.000	0.250	0.250	8	0.25	0.5	16	0.25	0.5
P. aeruginosa	391K1455	2.000	4.000	4.000	0.500	0.500	32	0.5	2	32	0.5	1
P. aeruginosa	391K1536	2.000	2.000	2.000	0.500	0.500	32	0.25	1	32	0.5	0.5
P. aeruginosa	391K1525	4.000	2.000	2.000	0.500	0.500	32	0.5	2	32	0.5	1
P. aeruginosa	391K2415	2.000	2.000	2.000	0.250	0.500	32	0.5	2	32	0.5	1
P. aeruginosa	391K2376	2.000	2.000	2.000	0.500	0.500	32	0.5	2	32	0.5	1
P. aeruginosa	391K2379	4.000	4.000	4.000	0.500	0.500	16	0.5	1	32	0.5	1
P. aeruginosa	391HG38	32.000	32.000	32.000	8.000	8.000	>32	8	8	>32	16	16
P. aeruginosa	391HG39	4.000	0.060	0.060	0.060	0.060	0.5	0.5	0.25	1	0.5	1

Espèces	Alias	Mécanisme de résistance	Comp A	Ceftazidime			Aztreonam			Meropenem		
				+ Comp A		Seul	Seul	+ Comp A		Seul	+ Comp A	
				2:1	4:1			2:1	4:1		2:1	4:1
<i>E. coli</i>	2138	KPC-2 + TEM-1	Seul	>32	>32	>32	>32	0.25	0.5	8	0.125	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	YC	KPC-2	>32	>32	1	>32	>32	0.5	1	32	0.5	2
<i>E. cloacae</i>	7506	KPC-2 + TEM-1 + KLUC-2	32	>32	1	>32	>32	1	1	16	1	2
<i>K. pneumoniae</i>	VAKP	KPC-2	>32	>32	0.125	>32	>32	1	1	32	8	2
<i>K. pneumoniae</i>	CL5761	KPC-3	>32	>32	2	>32	>32	4	8	>32	2	4
<i>K. pneumoniae</i>	CL5762	KPC-3	>32	>32	1	>32	>32	0.5	1	>32	1	2
<i>K. pneumoniae</i>	CL5763	KPC-3	>32	>32	4	>32	>32	4	4	>32	4	8
<i>K. pneumoniae</i>	VA8	KPC-3	>32	>32	0.06	>32	>32	<=0.03	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC	KPC-3	>32	>32	0.25	>32	>32	0.5	1	0.06	<=0.06	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	700603	SHV-18	>32	>32	0.25	>32	>32	0.06	0.125	16	8	4
<i>K. pneumoniae</i>	Patient1B	VIM-4 + CTX-M-15 =	16	>32	<=0.03	>32	>32	0.06	0.125	16	8	4
<i>K. pneumoniae</i>	HR	CMY-4 + TEM-1	>32	>32	2	>32	>32	1	2			
<i>K. pneumoniae</i>	Patient F	VIM-1 + SHV-5	>32	>32	2	>32	>32	1	2			
<i>K. pneumoniae</i>	9701	CMY-4 + TEM-1	>32	>32	1	>32	>32	<=0.03	0.125	0.06	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	SLK54	ACC-1 + TEM-1	>32	>32	0.06	>32	>32	<=0.03	0.125	0.06	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	1734	FOX-3 + TEM-1	>32	>32	0.06	>32	>32	<=0.03	0.125	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	TN58467	DHA-1 + SHV-2a + TEM-1	>32	>32	0.5	>32	>32	<=0.03	0.06	0.25	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	KOL	MOX-2 + SHV-5 + TEM-1	>32	>32	<=0.03	>32	>32	<=0.03	0.125	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K4	CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1	16	>32	0.5	>32	>32	0.25	0.25	0.125	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K1	CTX-M-16 + OXA-1	>32	>32	1	>32	>32	2	2	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	KP04	CTX-M-14	>32	>32	0.5	>32	>32	1	1	0.125	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	157	SHV-5 + TEM-26	>32	>32	0.06	>32	>32	<=0.03	0.125	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	449	SHV-1 + TEM-2 + PER	32	>32	0.125	>32	>32	<=0.03	0.25	<=0.03	<=0.03	<=0.03

<i>K. pneumoniae</i>	444		SHV-5 + TEM-2 + PER	>32	>32	<=0.03	0.06	8	0.5	0.25	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	441		SHV-1 + TEM-2 + PER	>32	>32	0.125	0.5	16	0.125	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	60		SHV-2 + TEM-2 + PER	32	>32	0.06	0.06	16	0.125	0.125	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	427		SHV-1 + TEM-1B + CTX-M-3	>32	>32	<=0.03	0.25	4	0.06	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	465		TEM-1B + CTX-M-2	>32	>32	0.5	0.5	32	0.5	0.5	0.25	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	253		SHV-2 + TEM-12 + CTX-M-2	>32	>32	0.125	0.25	16	0.25	1	0.06	<=0.03	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	181		SHV-5 + TEM-10	>32	>32	0.5	0.5	32	0.25	0.5	4	0.25	0.5
<i>K. pneumoniae</i>	243		SHV-5 + TEM-63	>32	>32	0.25	0.5	32	0.125	0.25	0.125	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	238		SHV-2 + TEM-12 + CTX-M-2	>32	>32	0.25	0.25	32	1	1	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	236		SHV-5 + TEM-10	>32	>32	<=0.03	0.125	16	0.125	0.125	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	26		SHV-5	32	>32	0.125	0.25	16	<=0.03	1	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. oxytoca</i>	16944		OXY-2, TEM-1	>32	>32	0.5	0.5	32	0.5	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. oxytoca</i>	1431		TEM-129	32	>32	0.25	0.25	>32	0.5	0.5	0.06	0.06	0.06
<i>E. cloacae</i>			AmpC	>32	32	8	16	16	4	8	0.125	0.06	0.125
<i>E. cloacae</i>			AmpC	32	>32	0.25	0.5	16	0.125	0.125	0.5	0.125	0.25
<i>E. coli</i>			CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1	>32	>32	<=0.03	<=0.03	4	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>	IND		VEB-1 + CMY-2	16	>32	0.125	2	>32	0.25	0.25	0.06	0.06	0.06
<i>E. coli</i>	TN13		CTX-M-14 + CMY-2 + TEM-1	32	>32	4	2	16	<=0.03	0.06	0.25	<=0.03	0.06
<i>E. coli</i>	Tunisie clone E4		CTX-M-16 + TEM-1	>32	>32	2	4	32	2	2	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>			Cephalosporinase	>32	>32	2	8	16	<=0.03	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>	TN06		CTX-M-2 + TEM-1	32	16	0.25	0.25	8	0.5	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>			TEM-3	>32	>32	0.06	0.06	8	<=0.03	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>			SHV-4	>32	>32	0.06	0.125	16	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>C. freundii</i>			AmpC	16	>32	<=0.03	0.125	8	0.06	0.125	0.25	<=0.03	<=0.03
<i>C. freundii</i>			AmpC	32	>32	<=0.03	1	32	0.125	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03

Mise en évidence de l'activité synergistique -
Détermination des Concentrations Inhibitrices
Fractionnées.

5 (FIC = Fractional Inhibitory Concentrations)

Technique de l'échiquier (« checkerboard ») pour la
détermination de la synergie des antibiotiques:

- 10 Objectif: Le but de l'étude est de déterminer la
concentration d'un composé A, nécessaire pour réduire la
CMI d'un composé B d'un demi, d'un quart, d'un huitième,
d'un seizième et d'un trente deuxième contre des souches
d'espèces *enterobacteriaceae* et non-*enterobacteriaceae*
15 résistantes au composé B.

L'objectif ci-dessus est atteint par la technique dite de
l'échiquier (« checkerboard »). Cette technique est
utilisée pour évaluer les combinaisons antimicrobiennes.

- 20 Cette technique consiste à titrer le composé A, un
inhibiteur, dans une série de dilutions (2 en 2) disposées
horizontalement sur une microplaque, tout en titrant en
même temps le composé B dans une série de dilutions
25 disposées verticalement. La plaque est ensuite inoculée
avec la souche bactérienne et on laisse la bactérie
croître pendant une nuit. Chaque puit sur l'échiquier de
la microplaque contient une combinaison différente de
concentrations de l'inhibiteur et du composé
30 antibactérien, ce qui permet une totale détermination
d'une quelconque synergie entre les deux composants.

Lecture des plaques:

- 35 La croissance est évaluée pour chaque puit. Les points
terminaux (CMIs) pour lesquels il y a absence de

croissance sont déterminés pour chaque rangée et les concentrations des composés A et B pour chaque puit où il y a absence de croissance sont ensuite utilisées pour déterminer les niveaux de synergie.

5

La synergie est représentée par des "indices FIC", FIC étant la Concentration Inhibitrice Fractionnée (« Fractional Inhibitory Concentration ») de la combinaison.

10

Calculs de la "Fractional Inhibitory Concentration" (FIC)
Indice de combinaisons de deux agents antimicrobiens:

$$(A)/(CMI_A) + (B)/(CMI_B) = FIC_A + FIC_B = \text{indice FIC}$$

15

(A) est la concentration du composé A dans un puit correspondant à la plus basse concentration de ce composé inhibant la croissance dans la rangée. lorsque le puit contient également le composé B (CMI_A) est la plus basse concentration du composé A seul qui inhibe la croissance. FIC_A est la "Fractional Inhibitory Concentration" du composé A.

20

(B), (CMI_B), and FIC_B sont définis de la même façon que ci-dessus, pour le composé B.

25

Si la valeur de l'indice FIC est $\leq 0,5$ on considère qu'on est en présence d'une synergie.

Enterobacteriaceae

Souche	Mécanisme de Résistance	Combinaison	FIC Index à xCMI				
			0,25x	0,125x	0,06x	0,03x	0,015x
<i>E. coli</i> Tunisie E4	CTX-M-16 + TEM-1	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,25 0,375 0,25	0,125 0,26 0,125	0,06 0,19 0,07	0,03 0,039	0,015 0,031
<i>E. coli</i> TN06	CTX-M-2 + TEM-1	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,25 0,375 0,25	0,125 0,26 0,125	0,06 0,06	0,03 0,03	0,0175 0,016
<i>K. pneumoniae</i> 465	CTX-M-2 + TEM-1B	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,25 0,24 0,25	0,125 0,125	0,064 0,06	0,032 0,032	0,016 0,0175
<i>E. cloacae</i> 293HT96	AmpC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,25 0,25 0,25	0,125 0,37 0,125	0,064 0,06	0,032 0,03	0,016 0,016
<i>E. cloacae</i> 293GR38	AmpC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,257 0,43 0,31	0,156 0,375	0,31 	 	
<i>E. coli</i> 250SUJ1	KPC-2 + TEM-1	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,25 0,2505 0,25	0,1255 0,1255 0,125	0,061 0,061 0,06	0,032 0,03	0,02 0,0175
<i>K. pneumoniae</i> 283KB7	KPC-2	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A AZT + Comp. A	0,254 0,2505 0,25	0,129 0,127 0,125	0,064 0,062 0,066	0,038 0,034 0,033	0,023 0,019 0,0166

Pseudomonas

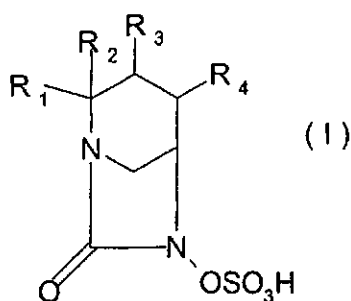
Souche	Mécanisme de Résistance	Combinaison	FIC Index à xCMI				
			0,25x	0,125x	0,06x	0,03x	0,015x
<i>P. aeruginosa</i> 391QBR2	ampC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,252 0,265 0,281	0,129 0,156 0,375	0,068 0,185 0,31	0,045 0,28 0,28	0,03 0,265 0,265
<i>P. aeruginosa</i> 391QBR6	ampC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,3125 0,5 0,5	0,25 0,375 0,275	0,31 0,31 0,31	0,28 0,28 0,28	0,265 0,265 0,265
<i>P. aeruginosa</i> QBR10	ampC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,281 0,265 0,281	0,156 0,156 0,1875	0,091 0,091 0,073	0,061 0,093 0,043	0,0775 0,0775 0,0775
<i>P. aeruginosa</i> 391KB135	ampC + IMP	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,5 0,5 0,38	0,375 0,375 0,375	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31
<i>P. aeruginosa</i> 391KB141	ampC + VIM	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,5 0,5 0,5	0,375 0,375 0,375	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31
<i>P. aeruginosa</i> 391KB144	ampC	CAZ + Comp. A MRP + Comp. A LVX + Comp. A	0,5 0,5 0,5	0,375 0,375 0,375	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31	0,31 0,31 0,31

FIC ≤0.5 = synergie

50

REVENDICATIONS

1. Une combinaison à effet synergique d'un composé antibactérien de formule générale (I) :



5

dans laquelle R₁ représente un radical (CH₂)_n-NH₂ ou (CH₂)_n-NHR, R étant un alkyle (C₁-C₆) et n étant égal à 1 ou 2 ;

10 R₂ représente un atome d'hydrogène ;

R₃ et R₄ forment ensemble un hétérocycle azoté à caractère aromatique à 5 sommets renfermant 1, 2 ou 3 atomes d'azote éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements R', R' étant choisi dans le groupe constitué par un atome d'hydrogène, les radicaux alkyle renfermant

15 de 1 à 6 atomes de carbone ;

sous forme libre, de zwitterions et sous forme de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables,

20 avec un autre composé antibactérien.

2. Une combinaison selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'autre composé antibactérien est choisi dans le groupe constitué par les aminoglycosides, les beta-lactames, les monobactames, les pénicillines le cas échéant combinées à un inhibiteur de beta lactamases, les

25 glycylicyclines, les tétracyclines, les quinolones, les glycopeptides, les lipopeptides, les macrolides, les kétolides, les lincosamides, les streptogramines, les oxazolidinones, les polymyxines et les autres composés

connus doués d'une activité thérapeutique sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacteriaceae*.

3. Une combinaison selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que dans le composé de formule générale (I), R_3 et R_4 forment ensemble un radical pyrazolyloxy ou triazolyle éventuellement substitué.

4. Une combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que dans le composé de formule générale (I), R_1 est choisi dans le groupe constitué par les groupements $(CH_2)_n-NH_2$ et $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini à la revendication 1, l'hétérocycle formé par R_3 et R_4 est substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

5. Une combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que dans le composé de formule générale (I), R_1 représente un radical $(CH_2)_n-NH_2$ ou $(CH_2)_n-NHCH_3$, n étant tel que défini à la revendication 1 et R_3 et R_4 forment ensemble un cycle pyrazolyloxy substitué par un radical alkyle (C_1-C_6).

6. Une combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé de formule générale (I) est l'un quelconque de ceux dont les noms suivent :

- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,
- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,
- la trans 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,

sous forme libre, de zwitterion et de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

7. Une combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'autre composé antibactérien est choisi dans le groupe constitué par les beta-lactames, les pénicillines, le cas échéant combinés à des inhibiteurs de beta lactamases, les aminoglycosides et les polymyxines.

8. Une combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le composé antibactérien est choisi dans le groupe constitué par la Tobramycine, le Méropénème, l'Aztréoname, le Céfépime, le Ceftazidime, la Pipéracilline le cas échéant combinée au Tazobactame, la Colistine et la Polymyxine B.

9. Une combinaison selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé de formule générale (I) est l'un quelconque de ceux dont les noms suivent :

- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-1-méthyl-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,
- la trans 8-(aminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,
- la trans 8-(méthylaminométhyl)-4,8-dihydro-5-(sulfooxy)-4,7-méthano-7H-pyrazolo[3,4-e][1,3]diazépin-6(5H)-one,

sous forme libre, de zwitterion et de sels avec les bases et les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables,

et le composé antibactérien est choisi dans le groupe constitué par la Tobramycine, le Méropénème, le Céfépime, le Ceftazidime, l'Aztréoname, la Lévofoxacine, la Pipéracilline le cas échéant combinée au Tazobactame, la Colistine et la Polymyxine B.

10. A titre de médicaments, les combinaisons telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 8.

Produit de l'exemple 1 – Activité bactéricide seul et en combinaison avec le Cefotazidime (CAZ)

Activité bactéricide de la combinaison NXL105/Cefotazidime sur *P. aeruginosa* 391HT2 (souche sensible)

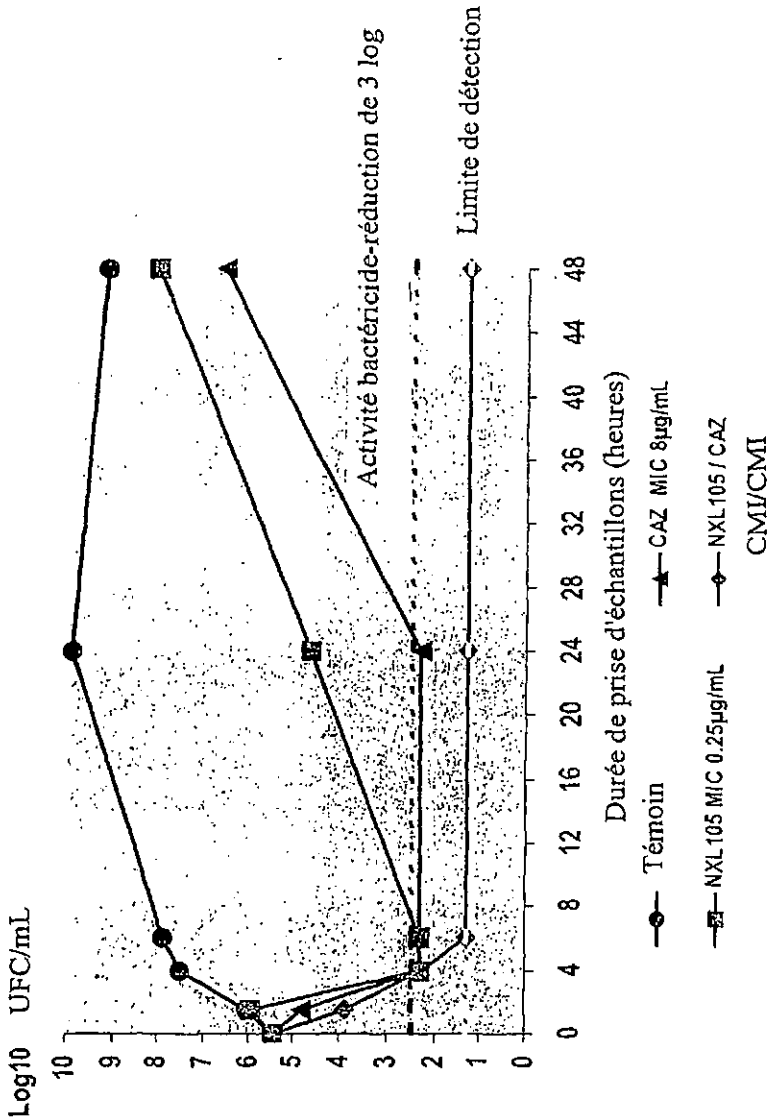


FIGURE 1

Produit de l'exemple 1 – Activité bactéricide seul et en combinaison avec la Ciprofloxacine (CIPRO)

Activité bactéricide de la combinaison NXL105/ Ciprofloxacine sur *P.aeruginosa* 391HT2 (souche sensible)

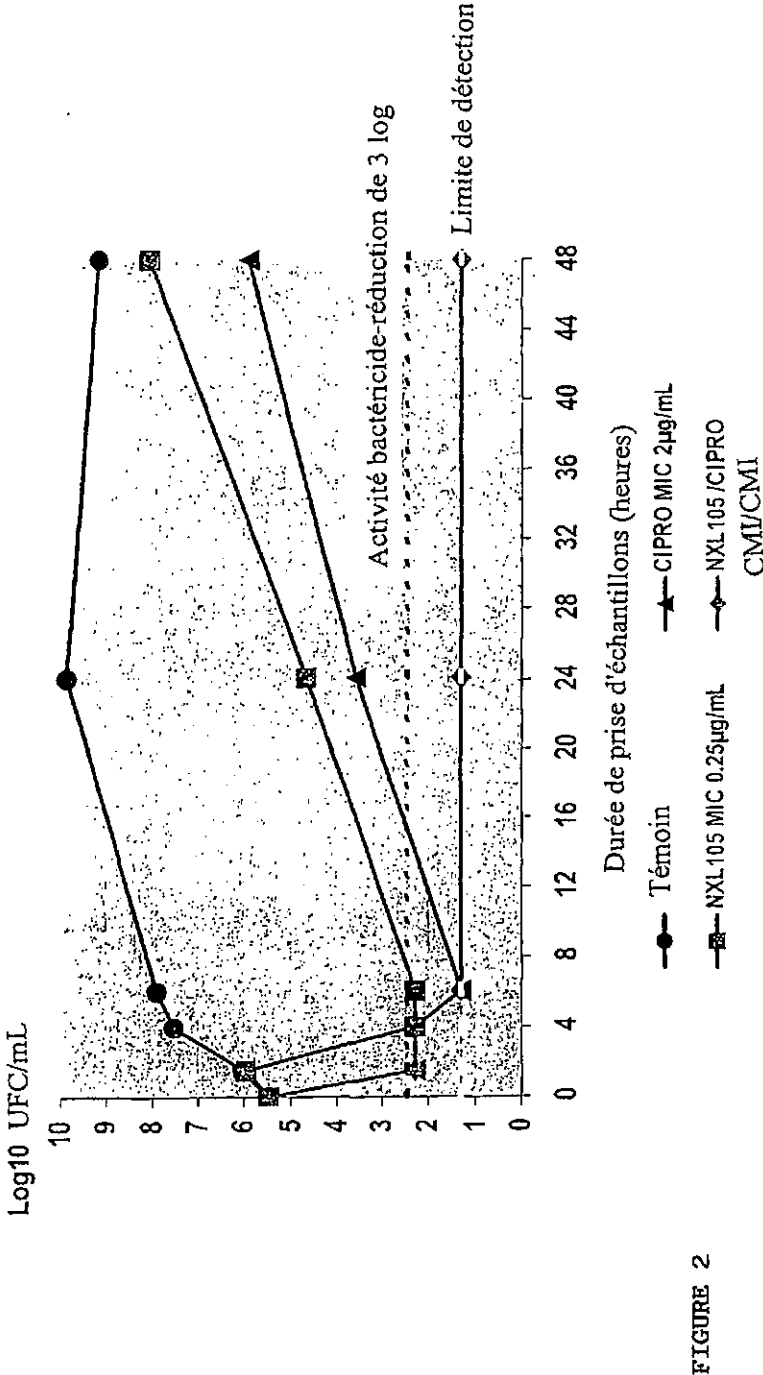


FIGURE 2

Produit de l'exemple 1 – Activité bactericide seul et en combinaison avec la Tobramycine (TOBRA)

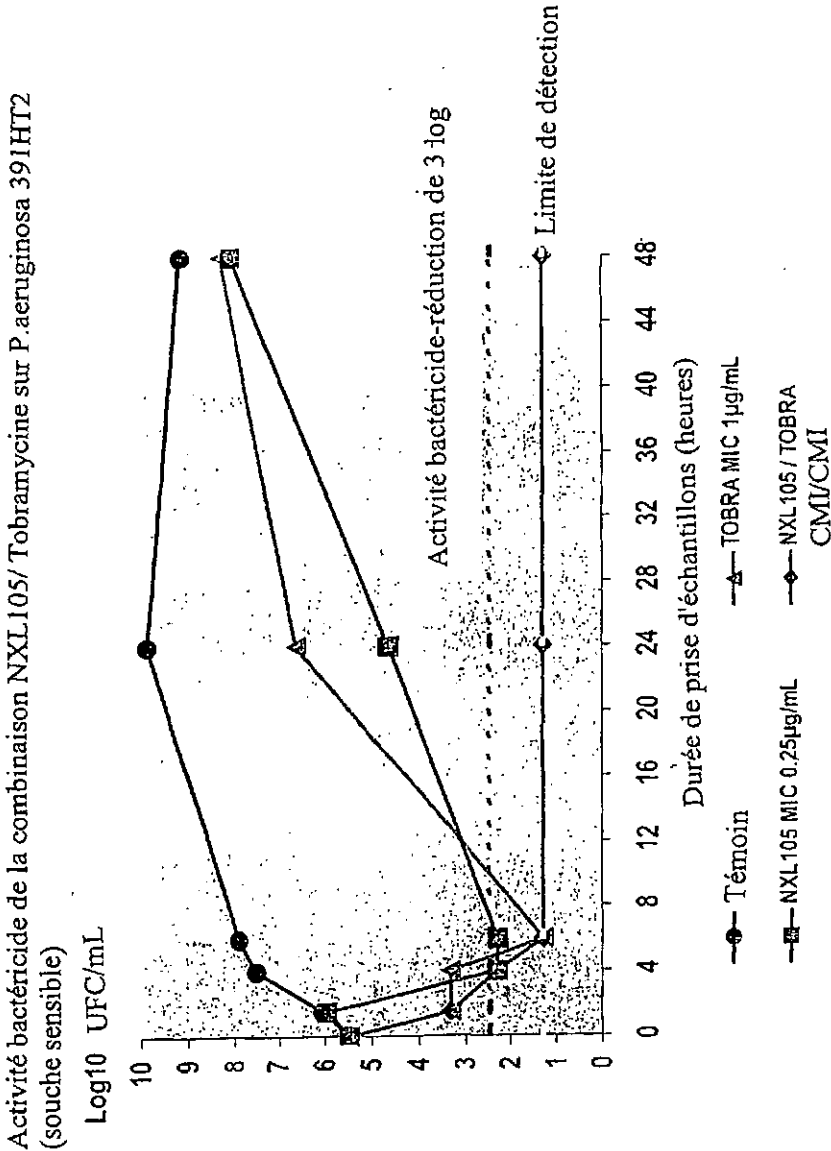


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/006992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D471/18 A61K31/551 A61P31/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/052891 A (AVENTIS PHARMA SA [FR]) 24 June 2004 (2004-06-24) page 1, lines 5-7 page 24, lines 10-16 page 134; claim 5 page 28, lines 27,34,35 -----	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2009		Date of mailing of the international search report 02/12/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jeanjean, Fabien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/006992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004052891 A	24-06-2004	AT 405567 T	15-09-2008
		AU 2003294104 A1	30-06-2004
		CA 2507607 A1	24-06-2004
		EP 1569935 A1	07-09-2005
		FR 2848210 A1	11-06-2004
		JP 2006512335 T	13-04-2006
		KR 20050088302 A	05-09-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2009/006992

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D471/18 A61K31/551 A61P31/04 Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07D A61K A61P Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
X	WO 2004/052891 A (AVENTIS PHARMA SA [FR]) 24 juin 2004 (2004-06-24) page 1, lignes 5-7 page 24, lignes 10-16 page 134; revendications 5 page 28, lignes 27, 34, 35 -----	1-13
☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents. ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe.		
* Catégories spéciales de documents cités : "A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent "E" demande ou brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais après la date de priorité revendiquée "I" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée 18 novembre 2009		Date d'expédition du rapport de recherche 02/12/2009
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, n° de télécopieur Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Jeanjean, Fabien n° de téléphone

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2009/006992

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004052891 A	24-06-2004	AT 405567 T	15-09-2008
		AU 2003294104 A1	30-06-2004
		CA 2507607 A1	24-06-2004
		EP 1569935 A1	07-09-2005
		FR 2848210 A1	11-06-2004
		JP 2006512335 T	13-04-2006
		KR 20050088302 A	05-09-2005

NUEVAS COMBINACIONES DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS
NITROGENADOS ANTIBACTERIANOS CON OTROS COMPUESTOS
ANTIBACTERIANOS Y SU UTILIZACIÓN COMO MEDICAMENTOS

5

La invención se refiere a la combinación de compuestos heterocíclicos nitrogenados antibacterianos con otros compuestos antibacterianos y su utilización como medicamentos.

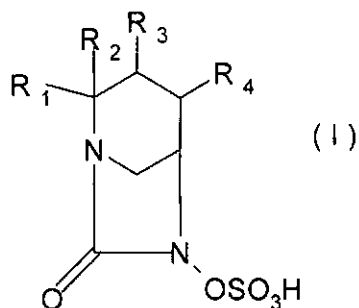
10 La solicitante ha descubierto que nuevas combinaciones de los compuestos de fórmula (I) descriptos y reivindicados en la solicitud francesa 07 02663, con otros compuestos antibacterianos, tienen propiedades antibacterianas de un nivel considerable, y manifiestan
15 por ello un efecto de sinergia tan notorio como inesperado.

El carácter único de las combinaciones sinérgicas de la invención reside particularmente en el hecho de que presentan una excelente actividad sobre *Pseudomonas*
20 *aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, que son cepas bacterianas que se encuentran a menudo en las infecciones intrahospitalarias y en pacientes que padecen mucoviscidosis.

Esta actividad particularmente interesante e
25 inesperada no está presente en los compuestos de la técnica anterior y, especialmente, en los de la solicitud WO 02/100860 que describe compuestos con grupos R_1 distintos a los de los compuestos heterocíclicos nitrogenados que responden a la fórmula (I) que se define
30 más adelante.

Estos compuestos de fórmula (I) se mostraron activos en modelos de infección animal, incluso en cepas a menudo resistentes a los antibióticos utilizados normalmente. Son capaces de contrarrestar los principales mecanismos de
35 resistencia de las bacterias que son las β -lactamasas, las bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas.

Estos compuestos responden a la siguiente fórmula:



en la que R_1 representa un radical $(CH_2)_n-NH_2$ o $(CH_2)_n-NHR$, R es un alquilo (C_1-C_6) y n es igual a 1 ó 2;

R_2 representa un átomo de hidrógeno;

R_3 y R_4 forman juntos un heterociclo nitrogenado de carácter aromático con 5 vértices que contienen 1, 2 ó 3 átomos de nitrógeno eventualmente sustituido por uno o varios agrupamientos R' , R' elegidos del grupo constituido por un átomo de hidrógeno y los radicales alquilo que contienen de 1 a 6 átomos de carbono,

en forma libre, de zwitteriones, y en forma de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

La solicitante ha descubierto que los compuestos de fórmula general (I) potencian la actividad de compuestos antibacterianos existentes, particularmente sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.

La invención tiene entonces por objeto la combinación de un compuesto de fórmula general (I) tal y como definido anteriormente, en forma libre, de zwitteriones, o en forma de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables, con otro compuesto antibacteriano.

Cuando hablamos de otro componente antibacteriano, se entiende particularmente un beta lactamo, un monobactamo o una penicilina, llegado el caso, combinada con un inhibidor de betalactamasas, un aminoglucósido, una glicilciclina, una tetraciclina, una quinolona, un glucopéptido, un lipopéptido, un macrólido, un quetólido, una lincosamida, una estreptogramina, una oxazolidinona, una polimixina y otros compuestos conocidos dotados de una

actividad terapéutica sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.

Como ejemplos de aminoglucósidos pueden mencionarse la amikacina, gentamicina y tobramicina.

- 5 Como ejemplos de betalactámicos se pueden mencionar los Carbapenemos tales como: Imipenem, Meropenem, Ertapenem y el compuesto conocido como PZ-601, las Cefalosporinas tales como la Cefazolina, Cefepima, Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftarolina, Ceftazidima, 10 Ceftobiprole, Ceftriaxona, Cefuroxima y Cefalexina, los Monobactamos tales como el Aztreonam, las Penicilinas y las combinaciones con los inhibidores de beta-lactamasas tales como la Amoxicilina, Amoxicilina/Clavulanato, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Oxacilina, Piperacilina, 15 Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina, Ticarcilina/Clavulanato y Penicilina.

Como ejemplos de glicilciclina y tetraciclina se pueden mencionar la Doxiciclina, Minociclina, Tetraciclina y Tigeciclina.

- 20 Como ejemplos de Quinolonas se pueden mencionar la Ciprofloxacina, Gatifloxacina, Grepafloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina y Ofloxacina.

- Como ejemplos de Macrólido y Quetólido se pueden mencionar la Azitromicina, Claritromicina, Roxitromicina y 25 Telitromicina.

Como ejemplos de Polimixina se pueden mencionar la Colistina y Polimixina B.

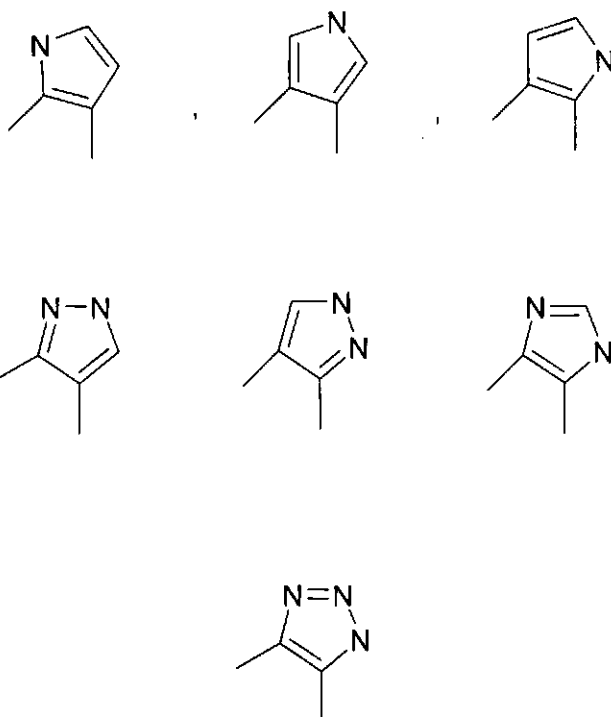
- También pueden mencionarse otros compuestos antibacterianos tales como la Fosfomicina y la asociación 30 Trimetoprima/Sulfametoxazola.

- En los compuestos de fórmula general (I), por radical alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono se entenderá, en particular, el radical metilo, etilo, propilo, isopropilo, así como butilo, pentilo o hexilo lineal o 35 ramificado.

Por radical alquenilo que contiene de 2 a 6 átomos de carbono se entenderá, en particular, el radical alilo y

los radicales butenil, pentenilo y hexenilo lineales o ramificados.

Por heterociclo de carácter aromático se entenderá, en particular, aquellos seleccionados de la lista que sigue, los dos enlaces simbolizan la unión con el ciclo nitrogenado (R_3R_4):



Entre las sales de ácidos de los productos de fórmula (I), cabe citar, entre otras, aquellas formadas con los ácidos minerales, como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, iodhídrico, sulfúrico o fosfórico o con los ácidos orgánicos como el ácido fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, oxálico, glioxílico, aspártico, alcano-sulfónicos, como los ácidos metano y etano sulfónicos, arilsulfónicos como los ácidos benceno y paratoluenosulfónicos.

Entre las sales de bases de los productos de fórmula (I), cabe mencionar, entre otras, las formadas con las bases minerales tales como, por ejemplo, el hidróxido de sodio, de potasio, de litio, de calcio, de magnesio o de amonio o con las bases orgánicas tales como, por ejemplo, la metilamina, la propilamina, la trimetilamina, la dietilamina, la

trietilamina, la N,N-dimetiletanolamina, el tris (hidroximetil) aminometano, la etanolamina, la piridina, la picolina, la diciclohexilamina, la morfolina, la benzilamina, la procaína, la lisina, la arginina, la histidina, la N-
5 metilglucamina, o también las sales de fosfonio, tales como alquilo-fosfonio, aril-fosfonios, alquilo-aril-fosfonio, alquenil-aril-fosfonio o sales de amonio cuaternario como la sal de tetrabutylamonio.

Entre las combinaciones sinérgicas tales como las
10 definidas anteriormente, la invención tiene particularmente por objeto aquellas que contienen compuestos de fórmula (I) en los que R₃ y R₄ forman en conjunto un heterociclo pirazolilo o triazolilo, eventualmente sustituido.

Entre estas combinaciones, la invención tiene
15 particularmente por objeto aquellas que contienen compuestos en los que R₁ es seleccionado en el grupo constituido por los agrupamientos (CH₂)_n-NH₂ y (CH₂)_n-NHCH₃, siendo n tal como se definió anteriormente, el heterociclo formado por R₃ y R₄ es sustituido por un radical alquilo (C₁-C₆).

Entre estas combinaciones, la invención tiene
20 particularmente por objeto aquellas que contienen compuestos en los que R₁ representa un radical (CH₂)_n-NH₂ o (CH₂)_n-NHCH₃, siendo n tal como se definió anteriormente. R₃ y R₄ forman en conjunto un ciclo pirazolilo sustituido
25 por un radical alquilo (C₁-C₆).

Entre estas combinaciones, la invención tiene más particularmente por objeto aquellas que contienen un compuesto de fórmula (I) elegido entre:

- el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-
30 4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
- el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-
4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
- el trans 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-
4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,

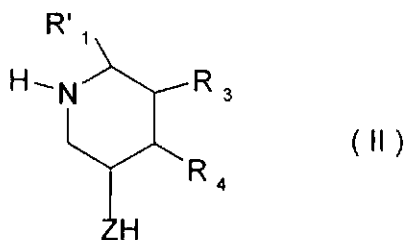
35 en forma libre, de zwitterión y de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Entre las combinaciones definidas anteriormente, la invención tiene particularmente por objeto aquellas que contienen compuestos antibacterianos elegidos entre los betalactámicos o las penicilinas, llegado el caso, combinados con inhibidores de beta lactamasas, y las polimixinas.

Entre estas combinaciones, la invención tiene particularmente por objeto aquellas que contienen compuestos antibacterianos elegidos entre la Tobramicina, el Meropenem, el Aztreonam, la Cefepima, la Ceftazidima, la Piperacilina, llegado el caso, combinada con Tazobactam, la Colistina y la Polimixina B.

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse mediante un procedimiento que implica:

- a) una etapa durante la cual se hace reaccionar, con un agente de carbonilación, llegado el caso en presencia de una base, un compuesto de fórmula (II):



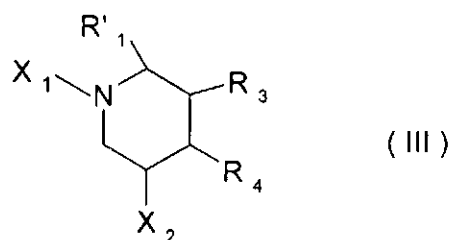
en la que:

R'1 representa un radical CN, COOH protegido, COOR o (CH2)_nR'5,

R'5 es un radical OH protegido, CN NH2 o NHR protegido, CO2H protegido, CO2R

n, R, R3 y R4 son, como se definió anteriormente, el sustituyente aminoalquilo eventualmente presente en el heterociclo formado por R3 y R4 siendo, llegado el caso, protegido,

ZH representa un agrupamiento -NHOH protegido, en vistas a obtener un compuesto intermediario de fórmula (III):



en la que:

- R'1, R3 y R4 conservan su significado anterior y X1 es un átomo de hidrógeno o un agrupamiento protector y X2 representa un agrupamiento -Z-CO-X3, X3 representa el resto del agente de carbonilación, o X2 es un agrupamiento -ZH y X1 representa un agrupamiento CO-X3, X3 definido como aparece indicado anteriormente;
- b) una etapa durante la cual se cicliza el intermediario obtenido anteriormente, en presencia de una base;
 - c) llegado el caso, la etapa a) es precedida y/o la etapa b) es seguida por una o varias de las siguientes reacciones, en un orden apropiado:
 - protección de las funciones reactivas,
 - desprotección de las funciones reactivas,
 - esterificación
 - saponificación,
 - sulfatación,
 - reducción de ésteres,
 - alquilación,
 - carbamilación,
 - formación de un grupo azida,
 - reducción de una azida en amina,
 - salificación,
 - intercambio de iones,
 - desdoblamiento o separación de diastereoisómeros.

Como agente de carbonilación, se puede implementar un reactivo tal como el fosgeno, el difosgeno, el trifosgeno, un cloroformiato de arilo tal como el cloroformiato de fenilo o de p-nitrofenilo, un cloroformiato de aralquilo tal como cloroformiato de bencilo, un cloroformiato de

alquilo o de alquenilo tal como el cloroformiato de metilo o alilo, un dicarbonato de alquilo tal como el dicarbonato de tertbutilo, el carbonildiimidazol y sus mezclas, siendo el difosgeno de preferencia.

5 La reacción tiene lugar, preferentemente, en presencia de una base o de una mezcla de bases que neutraliza el ácido formado. Puede ser especialmente una amina tal como la trietilamina, la diisopropiletilamina, la piridina, la dimetilaminopiridina. Sin embargo, también
10 se puede proceder utilizando el producto de partida de fórmula II como base. En ese caso, se utiliza un excedente.

Llegado el caso, el producto de fórmula II se implementa bajo la forma de una sal de ácido, por ejemplo,
15 un clorhidrato o un trifluoroacetato.

Como base en la etapa b), también se pueden utilizar los aminos, e incluso los hidruros, los alcoholatos, los amiduros o carbonatos de metales alcalinos o alcalino-térreos.

20 Los aminos pueden ser elegidos, por ejemplo, de la lista anterior.

Como hidruro, se puede utilizar fundamentalmente el hidruro de sodio o de potasio.

25 Como alcoholato de metal alcalino, se utiliza preferentemente el t-butilato de potasio.

Como amiduro de metal alcalino se puede utilizar especialmente el bis (trimetilsilil) amiduro de litio.

Como carbonato, se puede utilizar particularmente el carbonato o bicarbonato de sodio o de potasio.

30 Llegado el caso, el intermediario de fórmula III puede obtenerse en forma de una sal de ácido generada durante la reacción de carbonilación y especialmente un clorhidrato. A continuación se aplica en la reacción de ciclización con esta forma.

35 Preferentemente, la ciclización se realiza sin aislar el intermediario de fórmula III.

Las reacciones mencionadas en la etapa c) son, de modo general, reacciones clásicas, muy conocidas por el

experto en la materia. En la solicitud WO 02/100860 o incluso en la solicitud 04/052891 se describen ejemplos de condiciones utilizadas.

5 Las funciones reactivas que, llegado el caso, conviene proteger, son las funciones ácido carboxílicas, aminas, amidas, hidroxí e hidroxilaminas.

La protección de la función ácido se realiza fundamentalmente en forma de ésteres de alquilo, ésteres alílicos, de bencilo, benzhidrilo o p-nitrobencilo.

10 La desprotección se realiza por saponificación, ácido hidrolizado, hidrogenólisis, o incluso disociación con ayuda de complejos solubles del paladio O.

En la solicitud WO 02/100860 se dan ejemplos de estas protecciones y desprotecciones.

15 La protección de las aminas, de los nitrógenos heterocíclicos y de las amidas, se realiza especialmente, según el caso, en forma de derivados benzilados o tritilados, en forma de carbamatos, especialmente de alilo, bencilo, fenilo o tertbutilo, o incluso en forma de
20 derivados sililados tales como los derivados tertbutilo dimetil, trimetil, trifenil o incluso difenil terbutil-sililo, o de derivados fenilsulfonilalquilo o cianoalquilo.

La desprotección se realiza, según la naturaleza del
25 grupo protector, por el sodio o el litio en el amoníaco líquido, por hidrogenólisis o con ayuda de complejos solubles del paladio O, por acción de un ácido, o por acción del fluoruro de tetrabutylamonio o de bases fuertes tales como el hidruro de sodio o el t-butilato de potasio.

30 La protección de las hidroxilaminas se realiza fundamentalmente en forma de éteres de bencilo o alilo.

La disociación de los éteres se realiza por hidrogenólisis o con ayuda de complejos solubles del paladio O.

35 La protección de los alcoholes y los fenoles se realiza, de manera corriente, en forma de éteres, ésteres o carbonatos. Los éteres pueden ser éteres de alquilo o de alcoxialquilo, preferentemente éteres de metilo o de

metoxietoximetilo, éteres de arilo o preferentemente de aralquilo, por ejemplo de bencilo, o de éteres sililados, por ejemplo los derivados sililados mencionados más arriba. Los ésteres pueden ser cualquier éster

5 hidrolizable conocido por el experto en la materia y preferentemente el acetato, el propionato o el benzoato o p-nitrobenzoato. Los carbonatos pueden ser, por ejemplo, carbonatos de metilo, tertbutilo, alilo, bencilo o p-nitrobencilo.

10 La desprotección se realiza mediante los métodos conocidos por el experto en la materia, especialmente saponificación, hidrogenólisis, disociación mediante complejos solubles del paladio O, hidrólisis en medio ácido o incluso, para los derivados sililados, tratamiento por el

15 fluoruro de tetrabutylamonio.

En la parte experimental se dan ejemplos.

La reacción de sulfatación se produce por acción de los complejos SO_3 -aminas tales como SO_3 -piridina o SO_3 -dimetilformamida, operando en la piridina, la sal formada,

20 por ejemplo la sal de piridina, que luego puede intercambiarse por ejemplo por una sal de otra amina, de un amonio cuaternario o un metal alcalino. En la parte experimental se da un ejemplo.

La reacción de alquilación se produce por acción

25 sobre los derivados hidroxilados, los enolatos de ésteres o de cetonas, las aminas o los nitrógenos heterocíclicos, según el caso, de un sulfato de alquilo o de un halogenuro de alquilo o de alquilo sustituido, especialmente por un radical carboxi libre o esterificado. Pueden realizarse

30 reacciones de alquilación por aminación reductora.

Llegado el caso, la salificación por los ácidos se realiza adicionando al compuesto un ácido en fase soluble. La salificación por las bases de la función sulfoxi puede realizarse a partir de la sal de piridinio obtenida

35 durante la acción del complejo SO_3 -piridina y las demás sales se obtienen a partir de esta sal de piridinio. Incluso se puede operar por intercambio de iones en resina.

La reacción de carbamilación puede producirse por la aplicación de un cloroformiato o un reactivo tipo Boc-ON, luego de una amina o, llegado el caso, de amoníaco.

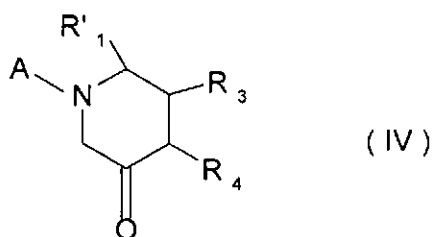
La incorporación de un grupo azida puede producirse, por ejemplo, por acción de aziduro de sodio sobre un intermediario de tipo mesilato o por reacciones de tipo Mitsunobu.

La reducción de un grupo azida puede producirse por acción del trialquilo o de la triarilfosfina.

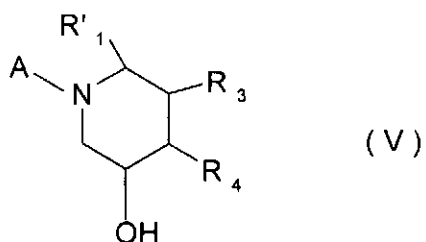
La separación de los enantiómeros y diastereoisómeros puede realizarse según las técnicas conocidas por el experto en la materia, particularmente la cromatografía.

Además, mediante los procedimientos descriptos anteriormente, pueden obtenerse los compuestos de fórmula (I) por métodos que utilizan, al inicio, un compuesto de fórmula (II) en la que R'_1 , R_3 , R_4 y HZ tienen los valores que llevan directamente (sin transformación) a las de los compuestos que se desea preparar. Llegado el caso, las de estos valores, que comprenderían funciones reactivas tales como las anteriormente mencionadas, están protegidas y la desprotección tiene lugar al final de la etapa de ciclización b o en cualquier otro momento oportuno en la síntesis. Las protecciones y desprotecciones se realizan entonces tal como se describió anteriormente.

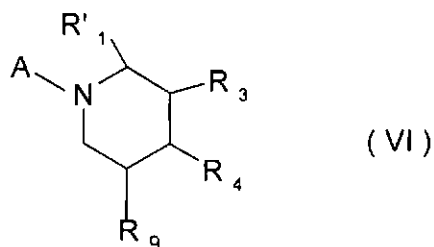
El compuesto de fórmula (II) puede obtenerse mediante un procedimiento según el cual se trata un compuesto de fórmula (IV):



en la que R'_1 , R_3 y R_4 se definen como antes, y A representa un átomo de hidrógeno o un agrupamiento protector del nitrógeno, por un agente de reducción, para obtener un compuesto de fórmula (V):



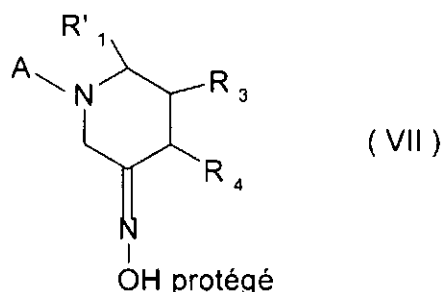
en la que A, R'₁, R₃ y R₄ conservan su significado anterior, en el que, llegado el caso, se reemplaza el
 5 grupo OH por un grupo de partida, para obtener un compuesto de fórmula (VI):



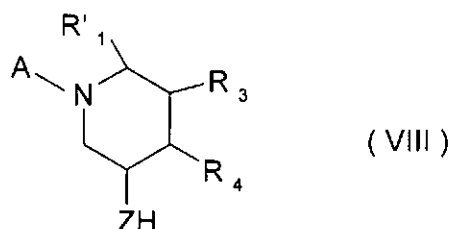
10

en la que A, R'₁, R₃ y R₄ conservan su significado anterior y R₉ representa un grupo de partida, que se trata con un compuesto de fórmula Z₁H₂ en la que Z₁ representa un grupo
 15 -HN-OH protegido, luego, llegado el caso, con un agente de desprotección del átomo de nitrógeno apropiado.

El compuesto de fórmula (II) también puede obtenerse mediante un procedimiento según el cual se trata un
 20 compuesto de fórmula (IV) tal como el definido anteriormente, mediante la hidroxilamina protegida a nivel del hidroxilo, para obtener un compuesto de fórmula (VII):



en la que A, R'₁, R'₂, R₃, R'₄, n y R'₈ se definen como antes, se hacen reaccionar con un agente de reducción para obtener un compuesto de fórmula (VIII):



en la que A, R'₁, R₃, R₄, n'' y ZH se definen como antes, se tratan, llegado el caso, mediante un agente de desprotección del átomo de nitrógeno apropiado.

El agrupamiento protector del nitrógeno es fundamentalmente uno de los citados anteriormente.

El agente de reducción es particularmente un borohidruro alcalino.

El grupo de partida es fundamentalmente un sulfonato, por ejemplo un mesilato o un tosilato, obtenido por acción de cloruro de sulfonilo correspondiente, en presencia de una base, o un halógeno, más específicamente un cloro, un bromo o un iodo, obtenido, por ejemplo, por acción del cloruro de tionilo o de P(C₆H₅)₃CBr₄ o PBr₃ o, en el caso de un átomo de iodo, por acción de un ioduro alcalino sobre un sulfonato.

El agente de desprotección es especialmente uno de los anteriormente mencionados.

El agente de reducción que se hace actuar sobre el compuesto de fórmula (VII) es especialmente un ciano o un acetoxi-borohidruro de sodio.

Tal lo indicado anteriormente, los compuestos de fórmula general (I) potencian la actividad de compuestos antibacterianos existentes, en particular sobre

Pseudomonas aeruginosa y *Enterobacteriaceae* así como sobre modelos de infección animal por cepas resistentes a los agentes antibacterianos comúnmente utilizados. Una actividad antibiótica tal, notoria e inesperada, no había sido observada en los compuestos de la técnica anterior.

Estas propiedades vuelven aptas las combinaciones sinérgicas según la invención para ser utilizadas como medicamentos, en particular, en el tratamiento de infecciones graves por *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*, especialmente infecciones intrahospitalarias y, de modo general, infecciones importantes en los pacientes de riesgo. Particularmente, puede tratarse de las vías respiratorias, por ejemplo, la neumonía aguda o las infecciones crónicas de las vías respiratorias inferiores, las infecciones de la sangre, por ejemplo, las septicemias, las infecciones agudas o crónicas de las vías urinarias, las del sistema auditivo, por ejemplo la otitis externa maligna, o la otitis crónica supurante, las de la piel y tejidos blandos, por ejemplo las dermatitis, las heridas infectadas, la foliculitis y la piodermitis, las formas rebeldes del acné, las infecciones de los ojos, por ejemplo la úlcera de la córnea, las del sistema nervioso, fundamentalmente las meningitis y los abscesos cerebrales, las infecciones cardíacas tales como la endocarditis, las infecciones de los huesos y las articulaciones tales como la pioartrosis osteoarticular, la osteomielitis vertebral, la sinfisitis púbica, las infecciones del tracto gastrointestinal, tales como la enterocolitis necrosante y las infecciones perirrectales.

La presente invención también tiene por objeto, en calidad de medicamentos y, especialmente, medicamentos antibióticos, las combinaciones sinérgicas tales como aparecen definidas anteriormente.

Entre estas combinaciones, la invención tiene particularmente por objeto, en calidad de medicamentos, aquellas que contienen compuestos de fórmula (I) en los que R₃ y R₄ forman en conjunto un heterociclo pirazolilo o triazolilo, eventualmente sustituido, y entre ellos,

aquellos en los que R_1 se elige del grupo constituido por los agrupamientos $(CH_2)_n-NH_2$ y $(CH_2)_n-NHCH_3$, siendo n tal lo definido anteriormente. O, el heterociclo formado por R_3 y R_4 se sustituye por un radical alquilo (C_1-C_6).

5 Entre estas combinaciones, la invención tiene más particularmente por objeto, en calidad de medicamentos, aquellas que contienen compuestos en los que R_1 representa un radical $(CH_2)_n-NH_2$ o $(CH_2)_n-NHCH_3$, siendo n tal lo definido anteriormente R_3 y R_4 forman en conjunto un ciclo
10 pirazolilo sustituido por un radical alquilo (C_1-C_6).

Entre estas combinaciones, la invención tiene muy particularmente por objeto, en calidad de medicamento, aquellas que contienen al menos uno de los compuestos que se mencionan a continuación:

- 15 - el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
 - el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona, o
 - el trans 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-
20 4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
- en forma libre, de zwitterión y de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Entre estas combinaciones, la invención tiene
25 particularmente por objeto, en calidad de medicamentos, aquellas que contienen compuestos antibacterianos elegidos entre los aminoglucósidos, los betalactámicos, las penicilinas, llegado el caso, combinadas con inhibidores de betalactamasas, y las polimixinas.

30 Entre estas combinaciones, la invención tiene particularmente por objeto, en calidad de medicamentos, aquellas que contienen compuestos antibacterianos elegidos entre la Tobramicina, el Meropenem, la Cefepima, la Cefotaxidima, el Aztreonam, la Levofloxacina, la
35 Piperacilina, llegado el caso, combinada con Tazobactam, Colistina y Polimixina B.

La invención también tiene por objeto las composiciones farmacéuticas que contienen, como principios

activos, una combinación sinérgica como aparece definida anteriormente.

Estas composiciones pueden administrarse por vía bucal, rectal, parenteral, principalmente intramuscular, o
5 por vía local como aplicación tópica en la piel y las mucosas.

Las composiciones según la invención pueden ser sólidas o líquidas y presentarse en las formas farmacéuticas habitualmente utilizadas en medicina humana,
10 como por ejemplo las de comprimidos simples o grageas, cápsulas, granulados, supositorios, preparaciones inyectables, pomadas, cremas o geles; su preparación se realiza según los métodos habituales. El principio o principios activos se pueden incorporar a excipientes
15 habitualmente empleados en dichas composiciones farmacéuticas, como el talco, la goma arábica, la lactosa, el almidón, el estearato de magnesio, la manteca de cacao, los vehículos acuosos o no, los cuerpos grasos de origen animal o vegetal, los derivados parafínicos, los glicoles,
20 los diferentes agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes y los conservantes.

Estas composiciones también pueden presentarse en forma de un liofilizado destinado a disolverse extemporáneamente en un vehículo apropiado, por ejemplo,
25 agua estéril apirógena.

Las composiciones según la invención comprenden entonces al menos dos principios activos, y estos pueden administrarse simultáneamente, por separado o de forma escalonada en el tiempo. Pueden, por ejemplo, presentarse
30 en forma de «kit», que permite la administración de un compuesto de fórmula general (I) y la de otro compuesto antibacteriano por separado.

La dosis del compuesto de fórmula (I) administrada es variable según el nivel y la naturaleza de la afección
35 tratada, el paciente en cuestión, la vía de administración y el otro producto antibacteriano considerado. Puede estar, por ejemplo, comprendida entre 0,25 g y 10 g por día, por vía oral en el hombre, con el producto descripto

en el ejemplo 1 o también comprendida entre 0,25 g y 10 g por día por vía intramuscular o intravenosa.

La dosis en el otro compuesto antibacteriano también varía según la afección tratada, el paciente en cuestión, la vía de administración y el producto considerado, pero, generalmente, es la dosis habitual prescrita por los médicos, por ejemplo, como descrito en la publicación de referencia Vidal. Esta dosis puede llegar hasta 10 g por día, o incluso más. Sin embargo, como consecuencia de la potenciación aportada por los compuestos de fórmula general (I) a los otros compuestos antibacterianos, las dosis de estos dentro de la combinación pueden reducirse respecto de las dosis estándar.

Las combinaciones según la invención también pueden utilizarse como desinfectantes de los instrumentos quirúrgicos.

Los ejemplos que siguen ilustran la preparación de compuestos de fórmula (I). Los demás compuestos antibacterianos son conocidos y comerciales.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: sal de sodio y de trifluoroacetato del trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona

25

Estadio A:

4,7-dihidro-1-metil-4-((fenilmetoxi)amino)-1H-pirazolo[3,4-c]piridina-6(5H),7-dicarboxilato de 6-(1,1-dimetiletilo) y de 7-metilo (B)

El derivado **A** (4,7-dihidro-4-hidroxi-1-metil-1H-pirazolo[3,4-c]piridina-6(5H),7-dicarboxilato de 6-(1,1-dimetiletilo) y de 7-metilo, descrito en la solicitud WO 02100860 (10 g, 32.12 mmol) se introduce en suspensión en el diclorometano (100 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y bajo agitación. La suspensión se disuelve después de añadir trietilamina (14.30 ml, 10.28 mmol, 3.2eq). En medio reactivo enfriado a -78°C se añade gota a gota una solución de cloruro de metano sulfonilo (11.4 ml, 96.36 mmol, 3eq) en el diclorometano (12 ml, 1 volumen).

Después de 30 minutos de contacto, el alcohol A queda completamente transformado en mesilato.

Una solución de O-benzil-hidroxilamina en el diclorometano se prepara en frío a partir del clorhidrato de O-benzilhidroxilamina (25.4 g, 160.6 mmol, 5eq). El clorhidrato de O-benzilhidroxilamina se disuelve en una mezcla de diclorometano (100 ml) y agua (50 ml). Se añade una solución de sosa 2N (85 ml, 176.66 mmol) a 0°C. Después de 10 minutos de contacto y decantación la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio durante 45 minutos, luego se concentra a medio volumen. La adición de esta solución al mesilato preparado anteriormente se realiza a -78°C gota a gota en 1 hora. La mezcla de reacción se agita dejando que la temperatura suba progresivamente a temperatura ambiente. Se trata mediante adición de agua (200 ml) y se diluye el medio con diclorometano (100 ml), se agita, se decanta y luego se vuelve a extraer la fase acuosa con diclorometano. La fase orgánica se lava con una solución de NaCl saturada (200 ml), se seca y luego se concentra en seco. Se recupera un polvo blanco amorfo, que después de la cromatografía libera el derivado **B** esperado (8.25 g, 66%).

MS (ES (+)): m/z [M⁺] = 417.2

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): un diastereoisómero (2 rotámeros) δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, tBu), 3.15 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.68 / 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.84(s, 3H, CH₃), 3.98 (m, 2H, N-CH₂-CH-N), 4.6-4.8 (macizo, 3H, NH-O-CH₂-Ph y N-CH₂-CH-N), 5.40 / 5.8 (s, 1H, CH-CO₂Me), 7.22-7.31(macizo, 5H, Ph), 7.40(s, 1H, H pirazolo)

Estadio B:

Trans 1-metil-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,5,6,8-tetrahidro-4,7-metano-1H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepina-8 (7H) carboxilato de metilo (C)

Una solución 4N de HCl/ dioxano (400 ml, 15eq) se vierte en una solución de **B** (21 g, 50.42 mmol) disuelto en el dioxano (50 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos, luego el dioxano se evapora. El residuo se retoma bajo agitación en una mezcla de agua (100 ml) y acetato de etilo (500 ml). Se añade una

solución de amoníaco concentrada al 20% (42 ml) a 0°C. Se sigue agitando durante 30 minutos. Después de la decantación, la fase acuosa se vuelve a extraer con el acetato de etilo (2*300 ml), realizándose la última extracción después de la saturación de la fase acuosa con NaCl. La fase orgánica se seca y luego se concentra. Se obtiene el intermediario piperidina desprotegido en forma de aceite amarillo (m=15.7 g, 98%) que se retoma en el acetonitrilo (400 ml). A esta mezcla enfriada a 0°C, se añaden trietilamina (21 ml, 151.2 mmol, 3eq), luego difosgeno (3.04 ml, 25.2 mmol, 0.5eq) vertido gota a gota durante 30 minutos. Después de una noche de contacto a temperatura ambiente, el medio se concentra y luego se retoma con acetato de etilo (500 ml) y se trata con una solución de ácido tartárico 10% (200 ml). La mezcla se agita y se decanta. La fase orgánica se lava con una solución de ácido tartárico 10% (2*200 ml), con una solución de NaCl saturada, luego se seca y se concentra a presión reducida. El producto blanco obtenido (m=15.3 g, 89%) se retoma en el diclorometano (150 ml). Se añade gota a gota 1-8-Diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (7.53 ml, 50.04 mmol). La mezcla se agita durante 2 horas, se trata con agua (200 ml), se agita y se decanta. La fase orgánica se lava con agua (2*200 ml), luego con una solución de NaCl saturada (1*200 ml), se seca con MgSO₄, y luego se concentra a sequedad.

Se recupera el derivado C esperado (m=14.72 g, 85%), en forma de un sólido blanco

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=343

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.25 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.45 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.88 (s, 3H, CH₃), 3.9 (s, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.7 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.22 (s, 1H, CH-CO₂Me), 7.39-7.43 (macizo, 6H, H pirazolo + Ph)

Estadio C:

4,8-dihidro-8-(hidroximetil)-1-metil-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona (D)

Se enfría una solución de C (5g, 14.60 mmol) a -10°C en una mezcla de tetrahidrofurano (150 ml) / metanol (50 ml) anhidros, bajo nitrógeno y bajo agitación. Se añade borohidruro de litio (668 mg, 30.67 mmol, 1.2eq) al medio reactivo. Después de 2 horas de agitación a -10°C, se añaden 1.2eq suplementarios de LiBH₄. La reacción se trata en frío 2 horas más tarde con una solución al 10% de NaH₂PO₄. El tetrahidrofurano y el metanol se evaporan a presión reducida (200 mbar, 40°C). La mezcla residual se retoma con acetato de etilo (200 ml), se agita y se decanta. La fase acuosa se vuelve a extraer con acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, luego se concentra en seco. El polvo amarillo claro obtenido (6.6 g) se cromatografía en silicio (eluyente-acetato de etilo) para obtener el derivado D (3.2 g, 10.18 mmol, 64%).

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=315

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.16 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.48 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.71 (s, 3H, CH₃), 3.81-3.91 (macizo, 2H, CH₂OH), 4.44 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.48 (m, 1H, CHCH₂OH), 4.88 (m, 2H, N-O-CH₂-Ph), 5.20 (m, 1H, OH), 7.35-7.40 (macizo, 6H, H pirazolo + Ph).

Estadio D:

Trans 4,8-dihidro-1-metil-8-[(metilsulfonil)oximetil]-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona (E)

El derivado D (2.76 g, 8.78 mmol) se disuelve en diclorometano (100 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y bajo agitación. Después de enfriar a 0°C, se añade trietilamina (1.83 ml, 13.17 mmol, 1.5eq), luego, gota a gota, una solución de cloruro de mesilo (1.61 g, 14.05 mmol) en el diclorometano (100 ml). El baño de hielo se retira al terminar el agregado. Al cabo de una hora de contacto a temperatura ambiente, la reacción se trata bajo agitación con una solución al 10% de NaH₂PO₄ (80 ml).

Después de agitar y decantar, la fase acuosa se vuelve a extraer con diclorometano (50 ml). La fase orgánica se seca, luego se concentra a presión reducida para obtener el derivado esperado (3.44 g, rendimiento cuantitativo).

5 MS (ES (+)): m/z [M⁺]=393

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.23 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.26 (s, 3H, CH₃), 3.45 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.76 (s, 3H, CH₃), 4.52 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.58 (dd, 1H, CH-CH₂-OMs), 4.66 (dd, 1H, CH-CH₂-OMs), 4.88 (m, 3H, CHCH₂OMs y
10 N-O-CH₂-Ph), 7.35-7.45 (macizo, 6H, H pirazolo + Ph)

Estadio E:

trans 8-(azidametil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona (F)

Se añade aziduro de sodio de una sola vez (1.71 g, 26.3 mmol) a una solución de E (3.44 g, 8.78 mmol) en el dimetilformamida (70 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y bajo agitación. El medio de reacción se calienta a 65°C durante toda una noche, luego se trata con una solución acuosa al 10% de NaH₂PO₄ (50 ml). Después de
15 agitar y decantar, la fase acuosa se vuelve a extraer con diclorometano (2*50 ml). La fase orgánica se seca, luego se concentra a presión reducida para obtener 3.96 g de derivado F esperado (3 g, 8.78 mmol).

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=340

25 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.20 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.48 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.66 (dd, 1H, CH-CH₂-N₃), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.92 (dd, 1H, CH-CH₂-N₃), 4.50 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.76 (dd, 1H, CHCH₂ON₃), 4.89 (m, 2H, N-O-CH₂-Ph), 7.35-7.45 (macizo, 6H, H pirazolo + Ph)

30 Estadio F:

trans [(4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-8-il]metil]-carbamato de 1,1-dimetiletilo (G)

Se añade gota a gota una solución molar de trimetilfosfina (3.4 ml, 3.4 mmol) a una solución de F (1.15 g, 3.39 mmol) en una mezcla tolueno (5 ml) y tetrahidrofurano (5 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y bajo agitación. Después de 3 horas de contacto,

se añade gota a gota una solución de BOC-ON (0.92 g, 3.6 mmol) en el tetrahidrofurano (10 ml) al medio de reacción enfriado a 0°C. Se sigue agitando durante 3 horas a temperatura ambiente. El medio de reacción se trata con una
 5 solución acuosa al 10% de NaHCO₃ (50 ml). Después de agitar y decantar, la fase acuosa se vuelve a extraer con acetato de etilo (50 ml). La fase orgánica se seca, luego se concentra bajo presión reducida para obtener un aceite (2.2 g). El producto bruto se cromatografía en columna de sílice
 10 (eluyente ciclohexano/ acetato de etilo 5/5). Se obtiene el producto esperado (0.62 g, 1.49 mmol, 70%).

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=414

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.39 (s, 9H, tBu), 3.05 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.19 (dd, 1H, CH-CH₂-NHBOC), 3.27
 15 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.78 (m, 1H, CH-CH₂-NHBOC), 3.88 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.48 (dd, 1H, CHCH₂NHBOC), 4.79 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 4.92 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.18 (m, 1H, H móvil), 7.35 (s, 1H, H pirazolo), 7.37-7.48 (macizo, 5H, Ph)

20 Estadio G:

Sal de piridinio del *trans* [[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e][1,3] diazepin-8-yl]metil]-carbamato de 1,1-dimetiletilo (H).

Se añade paladio 10% sobre carbón (140 mg) a una
 25 solución de **G** (0.6 g, 1.45 mmol) en el metanol (10 ml). El medio de reacción se hidrogena durante 3 horas. Luego, el metanol se evapora bajo presión reducida para obtener el intermediario debencilado.

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=324

30 El intermediario debencilado se retoma en la piridina (3 ml) en presencia del complejo piridina / sulfuro de trióxido (462 mg, 2.9 mmol). La reacción se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante una noche. Luego, el medio se concentra bajo presión reducida. El bruto de
 35 reacción se cromatografía en columna de sílice (eluyente diclorometano 100%, luego gradiente con metanol de 5% a 20%) para obtener el derivado **H** (0.49 g, 1.25 mmol, 84%).

MS (ES (+)): m/z [M⁺]=402

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) =1.41 (s, 9H, tBu), 3.30-3.80 (macizo, 4H, 2 CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.42 (dd, 1H, CHCH₂ONHBOC), 4.64 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.21 (m, 1H, H mobile), 7.35 (s, 1H, H pirazolo), 8.02 (dd, 2H, piridina), 8.54 (m, 1H, piridina), 8.91 (m, 2H, piridina)

Estadio H:

Sal de sodio del *trans* [[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e][1,3] diazepin-8-yl]metil]-carbamato de 1,1-dimetiletilo (I)

10 Durante una hora, se agita una suspensión de 60 g de resina DOWEX 50WX8 en una solución de sosa 2N (300 ml), luego se vierte en una columna de cromatografía. Se eluye en agua desmineralizada hasta conseguir un pH neutro, luego se acondiciona la columna con una mezcla agua/THF
15 90/10. El derivado H (0.49 g, 1.01 mmol) se disuelve en un mínimo de agua, depositada sobre la columna, eluyendo con una mezcla agua/THF 90/10. Las fracciones que contienen el sustrato se juntan y congelan. La solución congelada se liofiliza para conducir al producto I esperado (0.44 g,
20 1.03 mmol, 100%).

MS (ES (-)): m/z [M⁻]=402

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) =1.39 (s, 9H, tBu), 3.30-3.72 (m, 7H, 2 CH₂, CH₃), 4.42 (m, 1H, CHCH₂ONHBOC), 4.64 (s, 1H, N-CH₂-CH-N), 7.16 (m, 1H, H móvil), 7.35 (s, 1H, H
25 pirazolo).

Estadio I:

Sal de sodio y de trifluoroacetato del *trans* 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e][1,3] diazepin-6(5H)-ona (J)

30 Se vierte gota a gota una solución de ácido trifluoroacético (10 ml) en el diclorometano (10 ml) en una solución de I (0.15 g, 0.35 mmol) en el diclorometano (5 ml) bajo nitrógeno y enfriada a 0°C. La reacción se mantiene bajo agitación durante 1 hora a temperatura
35 ambiente. La mezcla se evapora en seco y se retoma en un mínimo de agua. La solución se congela y luego se liofiliza para obtener el derivado J esperado (193 mg, 0.35 mmol, 100%).

MS (ES (-)): m/z [M⁻]=301

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.32 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.33-3.37 (m, 2H, 2CH), 3.43 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.73 (m, 2H, CH-CH₂-NH₃⁺), 7.41 (s, 1H, H pirazolo), 8.10 (m, 3H, NH₃⁺)

Ejemplo 2: La sal de sodio y de trifluoroacetato del *trans* 8-(amino-metil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona

Estadio A:

10 *Trans* 4,8-dihidro-8-(hidroximetil)-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona

El éster *trans*-4,5,6,8-tetrahidro-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepina-8-carboxilato de metilo descrito en la patente WO 15 2004/052891 (Ejemplo 1, estadio K) (5 g, 15.2 mmol) se disuelve en una mezcla metanol/tetrahidrofurano anhidros 1/1 (100 mL), bajo nitrógeno. Se añade NaBH₄ (2.3 g, 60.9 mmol) por porciones. Después de agitar una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trata con 20 una solución acuosa al 10% de NaH₂PO₄ (100 mL). Después de evaporar en seco, la mezcla de reacción se repite en agua. El precipitado formado se agita una noche en hielo, luego se filtra y se seca al menos 24 horas al vacío en presencia de P₂O₅, para obtener el compuesto esperado (3.30 25 g, 11.0 mmol, 72%) en forma de polvo blanco.

MS (ES(+)): m/z [M+H]⁺ = 301

¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 3.18-3.50 (ABX, 2H, N-CH₂-CH-N), 3.65-3.76 (ABX, 2H, N-CH-CH₂-OH), 4.34 (t, 1H, N-CH-CH₂-OH), 4.46 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.88 (s, 2H, CH₂-Ph), 7.29-7.43 (m, 5H, Ph), 7.66 (s, 1H, H pirazolo), 12.72 (broad, 1H, OH).

Estadio B:

trans [[4,5,6,8-tetrahidro-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-8-yl]metil]- 35 carbamato de 1,1-dimetilo

El alcohol obtenido en el estadio A del ejemplo 2 (1.73 g, 5.76 mmol) se disuelve en la piridina anhidro (35 mL) bajo nitrógeno, a 0°C. Luego se añade gota a gota

cloruro de metanosulfonilo (1.78 mL, 23 mmol). Después de 2h30 de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trata con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (100 mL), luego se extrae con acetato de etilo. A continuación, las fases orgánicas combinadas se lavan 5 veces con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, se secan con sulfato de sodio, se filtran y luego se concentran al vacío para obtener el derivado dimesilado esperado en forma de aceite amarillo.

El intermediario dimesilado se pone en solution en dimetilformamida anhidra (45 mL), bajo nitrógeno, en presencia de aziduro de sodio (1.12 g, 17.3 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 70°C durante 24 horas. De ser necesario, se añade 1 eq. de aziduro para que la conversión sea completa. Cuando la reacción está completa, la mezcla se trata con una solución acuosa al 10% de NaH₂PO₄ (100 mL), luego se extrae con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y luego se concentran al vacío para obtener el aziduro esperado en forma de aceite amarillo.

El intermediario se pone en reaccion, bajo nitrógeno, en el etanol absoluto (17.5 mL). Luego se añaden sucesivamente di-*tert*-butil dicarbonato (1.38 g, 6.34 mmol), trietilsilano (1.38 mL, 8.64 mmol) e hidróxido de paladio sobre carbón 10% Degussa (52 mg). Después de una noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra, luego se concentra para obtener un aceite amarillo bruto. Este bruto se purifica por cromatografía en columna de sílice (eluyente gradiente CH₂Cl₂/MeOH 100/0 a 95/5 por 1%) para llegar al compuesto esperado (1.36 g, 3.40 mmol, 34%) en forma de sólido blanco.

MS (ES(+)): m/z [M+H]⁺ = 401

¹H RMN (400MHz, MeOH-*d*₄) : δ(ppm) = 1.51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.21-3.59 (m, 4H, N-CH₂-CH-N y N-CH-CH₂-NHBoc), 4.36 (m, 1H, N-CH-CH₂-OH), 4.46 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.99 (AB, 2H, CH₂-Ph), 7.41-7.52 (m, 5H, Ph), 7.63 (s, 1H, H pirazolo).

Estadio C:

trans [[4,5,6,8-tetrahidro-1-*tert*-butoxicarbamato-6-oxo-5-(fenil-metoxi)-4,7-metano-7*H*-pirazolo[3,4-*e*] [1,3] diazepin-8-il]metil]-carbamato de 1,1-dimetilo

- 5 El compuesto obtenido en el estadio B del ejemplo 2 (104 mg, 0.26 mmol) se pone en solución en diclorometano anhidro (2.5 mL), luego se añaden a la mezcla di-*tert*-butil dicarbonato (114 mg, 0.52 mmol) y dimetilaminopiridina (32 mg, 0.26 mmol). Después de 1 noche de agitación a
- 10 temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trata con agua. Las fases se separan, luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y luego se concentra al vacío. El bruto obtenido se purifica mediante
- 15 cromatografía sobre sílice (eluyente: CH₂Cl₂/AcOEt 90/10) para obtener el producto esperado (76 mg, 0.15 mmol, 59%). MS (ES(+)): m/z [M+H]⁺ = 500

Estadio D:

- 20 sal de piridinio del *trans* [[1-*tert*-butoxicarbamato-4,5,6,8-tetrahidro-6-oxo-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7*H*-pirazolo[3,4-*e*] [1,3] diazepin-8-yl]metil]-carbamato de 1,1-dimetilo

- El compuesto obtenido en el estadio C del ejemplo 2
- 25 (76 mg, 0.15 mmol) se pone en solución, bajo nitrógeno, en una mezcla dimetilformamida/CH₂Cl₂ 1/3 anhidro (0.87 mL). Se añade paladio 10% sobre carbón al 50% en agua (49 mg). Después de tres purgas vacío/nitrógeno, la mezcla de reacción se coloca bajo atmósfera de hidrógeno hasta que
- 30 desaparece el producto de partida en HPLC. La mezcla se concentra al vacío, luego se co-evapora tres veces con diclorometano anhidro, y finalmente se seca en campana de vacío en presencia de P₂O₅ durante 2 horas.

- El derivado debencilado se retoma en piridina anhidro
- 35 (0.43 mL), bajo nitrógeno, en presencia del complejo piridina/sulfuro de trióxido (48 mg, 0.30 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente hasta la conversión completa en HPLC, luego se evapora en seco

después de tratarse con agregado de agua. El bruto obtenido se purifica mediante cromatografía sobre sílice (eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10) para obtener el compuesto esperado (47 mg, 0.083 mmol, 55%).

5 MS (ES(-)): m/z $[\text{M}-2*\text{BOC}-\text{H}]^- = 388$

^1H RMN (400MHz, $\text{MeOH}-d_4$): $\delta(\text{ppm}) = 1.52$ (s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.50 (m, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$ y CH_2-NHBoc), 4.62 (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 4.85 (d, 1H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$), 7.72 (s, 1H, H pirazolo).

10 Estadio E:

sal de sodio y de trifluoroacetato del *trans* [[8-(amino-metil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo{3,4-e} [1,3] diazepin-6(5H)-ona

Se agita una suspensión de 6g de resina DOWEX 50WX8
15 en una solución de sosa 2N (30 mL) a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se vierte sobre una columna de cromatografía. Después de enjuagar con H_2O hasta conseguir un pH neutro, la columna se acondiciona con una mezcla THF/ H_2O 10/90. El derivado obtenido en el estadio D del
20 ejemplo 2 (47 mg, 0.08 mmol) se disuelve en un mínimo de metanol, luego se coloca en la columna. Después de eluir con una mezcla THF/ H_2O 10/90, las fracciones que contienen el producto esperado se recogen, se congelan y luego se liofilizan para llegar a la sal de sodio buscada.

25 La sal de sodio se retoma en el diclorometano anhidro (1.04 mL) bajo nitrógeno, luego se enfría a 0°C . Se añade gota a gota una solución de ácido trifluoroacético/diclorometano anhidro 1/1 (2.04 mL). A continuación, se agita la mezcla de reacción a temperatura
30 ambiente durante 45 minutos. Después de evaporar en seco, y de co-evaporar con diclorometano anhidro, el compuesto se retoma en agua (~2 mL) se congela y liofiliza para obtener la sal buscada (16 mg, 0.030 mmol, 36%) en forma de polvo amarillo pálido.

35 MS (ES(-)): m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 288$

^1H RMN (400MHz, $\text{MeOH}-d_4$): $\delta(\text{ppm}) = 3.37-3.69$ (m, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$ y $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 4.81 (dd, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 4.98 (d, 1H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$), 7.79 (s, 1H, H pirazolo).

Ejemplo 3: Sal de sodio y de trifluoroacetato del trans
[[8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-
metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona

5 Estadio A:

Ioduro del trans [[[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-8-yl]metil]-metilamino]trimetilfosfonio

Se añade gota a gota una solución molar de
 10 trimetilfosfina (1.5 mL, 1.5 mmol) a una solución del derivado obtenido en el estadio E del ejemplo 1 (0.5 g, 1.25 mmol) en solución en el tetrahidrofurano (15 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y bajo agitación. Después de agitar 2 horas, el ioduro de metano (0.21 g,
 15 3.75 mmol) se añade al medio reactivo. Rápidamente se forma un precipitado amarillo claro. Después de agitar una noche a temperatura ambiente, el medio reactivo se concentra a presión reducida. El producto bruto se tritura en diclorometano. El precipitado se filtra para obtener el
 20 producto (0.42 g, 1.04 mmol, 84%) esperado en forma de sal de iodo de color amarillento.

MS (ES (+)): m/z [M+H]⁺ = 402

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) en forma de 2 confórmeros: δ (ppm) =
 2.04 (s, 3H, CH₃P), 2.32 (s, 3H, CH₃P), 2.35 (s, 3H, CH₃P),
 25 3.03 (s, 3H, P-NCH₃(A)-CH₂), 3.05 (s, 3H, P-NCH₃(B)-CH₂),
 3.37 (m, 1H, N-CH₂-CH-N o CH-CH₂-N(CH₃)P), 3.44 (m, 1H, N-CH₂-CH-N o CH-CH₂-N(CH₃)P), 3.69 (m, 1H, N-CH₂-CH-N o CH-CH₂-N(CH₃)P), 3.82 (s, 3H, CH₃), 3.88 (m, 1H, N-CH₂-CH-N o CH-CH₂-N(CH₃)P), 4.05 (d, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.59 (d, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)P), 4.88 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.00 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.35 (s, 1H, H pirazolo), 7.37-7.45 (macizo, 5H, Ph)

Estadio B:

trans 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona
 35

A una solución acuosa de carbonato de sodio (2.5N, 9 mL) se añade el derivado obtenido en el estadio A del

ejemplo 3 (0.42 g, 1.04 mmol). El medio reactivo se agita a 55°C durante 3h30. Después de enfriar a temperatura ambiente, el medio reactivo se satura de cloruro de sodio en presencia de acetato de etilo (25 mL). La fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3x25 mL). La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio, luego se concentra a presión reducida para liberar un aceite amarillo (0.26 g). El bruto de reacción se purifica por cromatografía en columna de sílice (eluyente diclorometano 100%, luego gradiente con metanol de 2% a 10%) para obtener el derivado esperado (0.084 g, 0.256 mmol, 26%).

MS (ES (+)): m/z [M+H]⁺ = 328

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.97-3.00 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.00 (CH-CH₂-NCH₃), 3.15 (dd, 1H, CH-CH₂-NCH₃), 3.9 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.98 (d, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)Boc), 4.72 (dd, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.90 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.03 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.30 (s, 1H, H pirazolo), 7.34-7.44 (macizo, 5H, Ph)

Estadio C:

trans [[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(fenilmetoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-8-yl]metil]-metil-carbamato de 1,1-dimetiletilo

El derivado obtenido en el estadio B del ejemplo 3 (80 mg, 0.244 mmol) se disuelve en el diclorometano (1 mL), luego, a temperatura ambiente, se añade, en forma sucesiva, trietiloamina (60 µL, 0.488 mmol) y di-tert-butildicarbonato (106 mg, 0.488 mmol). Después de agitar 4 horas a temperatura ambiente, se añade una solución saturada de cloruro de sodio (5 mL) al medio reactivo. La fase acuosa se extrae sobre diclorometano (3x20 mL). La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio, luego se concentra a presión reducida para obtener un polvo blanco amorfo (157 mg). El bruto de reacción se cromatografía en columna de sílice (eluyente diclorometano 100%, luego gradiente con acetato de etilo de 20% a 30%) para obtener el derivado esperado (0.068 g, 0.159 mmol, 60%).

MS (ES (+)): m/z [M+H]⁺=428

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.59 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.05 (s, 3H, CH₃NBoc-CH₂), 3.10 (m, 3H, N-CH₂-CH-N, CH-CH₂-NBoc), 3.75 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 3.85 (s, 3H, CH₃), 3.99 (s, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.75 (m, 1H, CH-CH₂-N(CH₃)Boc), 4.90 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, N-O-CH₂-Ph), 7.37 (s, 1H, H pirazolo), 7.40-7.46 (macizo, 5H, Ph)

Estadio D:

Sal de piridinio del trans [[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]

10 diazepin-8-yl]metil]-metil-carbamato de 1,1-dimetiletilo

Procediendo como se indica en el estadio G del ejemplo 1, el compuesto obtenido en el estadio C del ejemplo 3 (0.068 g, 0.159 mmol) en el metanol (5 mL), en presencia de paladio 10% sobre carbón (25 mg) conducen al

15 producto debencilado.

MS (ES (+)): m/z [M+H]⁺ = 337

El intermediario debencilado, la piridina (1 mL), el complejo piridina/sulfuro de trióxido (50 mg, 0.318 mmol) conducen a la sal buscada (0.045 g, 0.090 mmol, 100%).

20 MS (ES (-)): m/z [M-H]⁻ = 416

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) en forma de 2 conformeros: δ (ppm) = 1.53 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.09 (s, 3H, CH₃(A)NHBoc), 3.10 (s, 3H, CH₃(B)NHBoc), 3.37 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.58 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.84 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.90 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 4.90 (m, 2H, N-CH-CH₂-N, N-CH₂-CH-N + señal H₂O), 7.54 (s, 1H, H pirazolo), 8.16 (dd, 2H, piridina), 8.70 (dd, 2H, piridina), 8.94 (d, 1H, piridina)

30 Estadio E:

Sal de sodio del trans [[4,5,6,8-tetrahidro-1-metil-6-oxo-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-8-yl]metil]-metil-carbamato de 1,1-dimetiletilo

Procediendo como se indica en el estadio H del ejemplo 1, la sal obtenida en el estadio D del ejemplo 3 (0.045 g, 0.090 mmol), la resina DOWEX 50WX8 (30 g) y la sosa 2N (150 mL) conducen a la sal de sodio esperada (0.039 g, 0.090 mmol, 100%).

MS (ES (-)): m/z [M-H]⁻ = 416

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) en forma de 2 confórmers: δ (ppm) = 1.56 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.09 (s, 3H, CH₃(A)NHBoc), 3.10 (s, 3H, CH₃(B)NHBoc), 3.37 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.64 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.84 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 3.93 (m, 1H, BocN(CH₃)-CH₂-CH o N-CH₂-CH-N), 4.90 (m, 2H, N-CH-CH₂-N, N-CH₂-CH-N + señal H₂O), 7.55 (s, 1H, H pirazolo).

10 Estadio F:

Sal de sodio y de trifluoroacetato del *trans* 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3] diazepin-6(5H)-ona

Procediendo como se indica en el estadio I del ejemplo 1, la sal de sodio obtenida en el estadio E del ejemplo 3 (0.039 g, 0.088 mmol), el diclorometano (5 mL) y una mezcla de ácido trifluoroacético/diclorometano anhidro 1/1 (4 mL) conducen al producto esperado (39 mg, 0.08 mmol, 100%).

20 MS (ES (-)): m/z [M-H]⁻ = 315

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2.76 (s, 3H, CH₃NH₂⁺-CH₂), 3.30-3.50 (m, 4H, N-CH₂-CH-N, NH₂⁺-CH₂-CH), 3.75 (s, 3H, CH₃), 4.74 (m, 1H, N-CH₂-CH-N), 4.82 (d, 1H, CH-CH₂-NH₂⁺CH₃), 7.43 (s, 1H, H pirazolo), 8.67 (m, 2H, NH₃⁺)

25 Ejemplo 4: Composiciones farmacéuticas

Se ha preparado una composición para inyección que contiene:

- Compuesto del ejemplo 1: 300 mg
- Tobramicina: 500 mg
- 30 - Excipiente acuoso estéril: q.s.p. 5 cm³

Se ha preparado una composición para inyección que contiene:

- Compuesto del ejemplo 1: 200 mg
- Ceftazidima: 500mg
- 35 - Excipiente acuoso estéril: q.s.p. 5 cm³

Determinación de la actividad bactericida

Objetivo: Se mide la actividad bactericida in vitro del antibiótico poniendo de manifiesto la concentración más
 5 pequeña que permite la sobrevivencia del 0,001% de las bacterias al cabo de un tiempo único dado y en el tiempo.

Productos

• Se pesan los productos a evaluar y se los solubiliza,
 10 luego la solución madre obtenida se diluye en medio en función de las concentraciones a evaluar, sabiendo que cada dilución se introducirá bajo 0.5ml en un volumen total de 20ml, es decir, una dilución final a 1/40.

15 Método

Previamente, se determinan las Concentraciones Mínimas Inhibidoras (CMIs) de los productos a evaluar (productos solos y combinaciones).

- 20 • Para cada concentración de producto a evaluar, así como para el testigo cepa, se prepara un erlen con 18.5ml de medio Muller-Hinton (Ca²⁺).
- A partir de un cultivo de noche en caldo o de una suspensión bacteriana de DO (densidad óptica) = 1, se hace
 25 una dilución al 1/100.
- Se coloca en cultivo agitado durante 2h a 37°C.
- Se mide la DO, si DO > 0,5, se diluye al 1/10.
- Se siembra cada erlen con 1 ml del cultivo agitado o de su dilución, el inóculo inicial debe ser 1×10^6 cfu/ml.
- 30 • Se añaden las diferentes soluciones de antibióticos bajo un volumen de 0,5ml y 0,5ml de medio en el erlen testigo.
- En un volumen de 0.1ml, se numera el erlen testigo = T0.
- Se incuba bajo agitación a 37°C.
- Cada vez que se realiza una extracción (2, 4, 6, 24, 48
 35 horas), se extrae un volumen de 0.1ml de cada erlen y se realiza una numeración.
- Se incuban todas las cajas de numeración (24h - 48h) a 37°C.

Parámetros medidos

- Se cuentan las colonias.
 - Se trazan las curvas CFU/ml en función del tiempo.
 - Efecto bactericida = disminución de 3 log respecto del
- 5 inóculo inicial.

Bibliografía

- PETERSON L.R., SHANHOLTZER C.J.
 Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents:
 10 technical performance and clinical relevance.
 Clin. Microb. Rev., 1992, 5, 420-432

- COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P., GOLDSTEIN F.
 Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.
 15 Ed. Maloine, Paris, 1991.

La actividad bactericida ha sido evaluada en una cepa sensible de *Pseudomonas aeruginosa* (391HT2)

Las CMI se determinan en microplaca:

- 20 - Ceftazidima/CAZ: 2 µg/mL
 - Ciprofloxacina/CIPRO: 1 µg/mL
 - Tobramicina/TOBRA: 1 µg/mL
 - Producto del ejemplo 1 (NXL105): 0.25 µg/mL

- 25 Para las pruebas bactericidas, las CMI se determinan en un volumen de 10 mL - Condiciones bactericidas (crecimiento bacteriano exponencial):

- CAZ: 8 µg/mL
 - CIPRO: 2 µg/mL
 30 - TOBRA: 1 µg/mL
 - Producto del ejemplo 1: 0.25 µg/mL

- 35 Las actividades bactericidas que figuran en las planchas 1 a 3 como anexo se evalúan después de 48 horas, tanto para el producto del ejemplo 1 solo, como para una combinación. En las combinaciones, se evidencia una ausencia total de desarrollo bacteriano después de las 48 horas.

Manifestación de la actividad sinérgica - Determinación de las CMI:

Actividad in vitro, método de diluciones en medio líquido:

- 5 Se preparan una serie de microplacas de 96 pocillos en las que se distribuye la misma cantidad de medio nutritivo estéril, en cada pocillo se distribuyen cantidades crecientes del compuesto a estudiar, a saber, el compuesto antibacteriano solo y la combinación según la invención
- 10 con el compuesto de fórmula (I) del ejemplo 1, en las proporciones respectivas 2:1 y 4:1, luego cada placa se siembra con una cepa bacteriana: *Pseudomonas aeruginosa* y *enterobacteriaceae*. Después de 24 horas de incubación en una estufa, a 37°C, se aprecia la inhibición del
- 15 crecimiento por transiluminación, lo que permite determinar las concentraciones mínimas inhibidoras (C.M.I.) expresadas en µg/ml.

En todas las pruebas que siguen (CMI y FIC):

- Ceftazidima = CAZ
- 20 - Meropenem = MRP
- Aztreonam = AZT
- Levofloxacina = LVX
- Compuesto del ejemplo 1 = Compuesto A

25

		Cpd A	Meropenem				Aztreonam				Ceftazidime			
			solo	+ Cpd A		solo	+ Cpd A		solo	+ Cpd A		solo	+ Cpd A	
				2:1	4:1		2:1	4:1		2:1	4:1		2:1	4:1
species	Alias	solo	>32	4.000	16.000	>32	>32	2	2	>32	>32	2	8	
P. aeruginosa	391KB135	1.000	>32	1.000	4.000	>32	>32	2	4	>32	>32	2	4	
P. aeruginosa	391KB139	2.000	16.000	0.500	1.000	>32	16	0.5	1	>32	16	0.5	2	
P. aeruginosa	391KB140	4.000	>32	1.000	2.000	>32	32	1	2	>32	>32	1	2	
P. aeruginosa	391KB141	16.000	>32	1.000	2.000	>32	>32	2	4	>32	>32	2	4	
P. aeruginosa	391QBR2	>32	>32	1.000	4.000	>32	>32	>32	>32	>32	>32	16	16	
P. aeruginosa	391QBR3	2.000	32.000	1.000	2.000	>32	>32	2	4	>32	>32	1	4	
P. aeruginosa	391QBR8	2.000	16.000	1.000	2.000	>32	>32	2	4	>32	>32	2	4	
P. aeruginosa	391QBR10	4.000	4.000	0.500	0.500	>32	>32	0.5	1	>32	>32	0.5	1	
P. aeruginosa	391KB62	4.000	>32	4.000	8.000	>32	>32	8	16	>32	>32	4	16	
P. aeruginosa	391KB90	8.000	16.000	2.000	2.000	>32	>32	2	2	>32	>32	4	4	
P. aeruginosa	391KB38	1.000	8.000	1.000	1.000	>32	>32	1	2	>32	>32	2	4	
P. aeruginosa	391KB68	0.500	1.000	0.250	0.500	>32	32	1	1	>32	>32	0.5	2	
P. aeruginosa	391KB14	1.000	8.000	0.500	1.000	>32	>32	1	2	32	32	1	2	
P. aeruginosa	391KB106	2.000	4.000	0.500	0.500	>32	>32	2	4	32	32	2	4	
P. aeruginosa	391K767	1.000	2.000	0.500	0.500	>32	8	0.5	1	2	2	0.5	1	
P. aeruginosa	391K1523	2.000	2.000	0.250	0.250	>32	8	0.25	0.5	16	16	0.25	0.5	
P. aeruginosa	391K1455	2.000	4.000	0.500	0.500	>32	32	0.5	2	32	32	0.5	1	
P. aeruginosa	391K1536	2.000	2.000	0.500	0.500	>32	32	0.25	1	32	32	0.5	0.5	
P. aeruginosa	391K1525	4.000	2.000	0.500	0.500	>32	32	0.5	2	32	32	0.5	1	
P. aeruginosa	391K2415	2.000	2.000	0.250	0.500	>32	32	0.5	2	32	32	0.5	1	
P. aeruginosa	391K2376	2.000	2.000	0.500	0.500	>32	32	0.5	2	32	32	0.5	1	
P. aeruginosa	391K2379	4.000	4.000	0.500	0.500	>32	16	0.5	1	32	32	0.5	1	
P. aeruginosa	391HG38	32.000	32.000	8.000	8.000	>32	>32	8	8	>32	>32	16	16	
P. aeruginosa	391HG39	4.000	0.060	0.060	0.060	>32	0.5	0.5	0.25	1	1	0.5	1	
P. aeruginosa	391HG123	>32	32.000	4.000	4.000	>32	>32	4	4	32	32	1	4	

Especies	Alias	Mecanismo de resistencia	Ceftazidima				Aztreonam				Meropenem			
			Cpd A				+ Cpd A				+ Cpd A			
			Solo	Solo	2:1	4:1	Solo	2:1	4:1	Solo	Solo	2:1	4:1	
<i>E. coli</i>	2138	KPC-2 + TEM-1	>32	>32	0.25	0.25	32	0.25	0.5	8	0.125	0.125		
<i>K. pneumoniae</i>	YC	KPC-2	>32	>32	1	2	>32	0.5	1	32	0.5	2		
<i>E. cloacae</i>	7506	KPC-2 + TEM-1 + KLUC-2	32	>32	1	1	>32	1	1	16	1	2		
<i>K. pneumoniae</i>	VAKP	KPC-2	>32	>32	0.125	1	16	2	1	32	8	2		
<i>K. pneumoniae</i>	CL5761	KPC-3	>32	>32	2	4	>32	4	8	>32	2	4		
<i>K. pneumoniae</i>	CL5762	KPC-3	>32	>32	1	2	>32	0.5	1	>32	1	2		
<i>K. pneumoniae</i>	CL5763	KPC-3	>32	>32	4	8	>32	4	4	>32	4	8		
<i>K. pneumoniae</i>	VA8	KPC-3	>32	>32	0.06	0.25	32	<=0.03	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	SHV-18	>32	>32	0.25	0.5	8	0.5	1	0.06	<=0.06	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	Patient1B HR	VIM-4 + CTX-M-15 = CMY-4 + TEM-1	16	>32	<=0.03	0.25	16	0.06	0.125	16	8	4		
<i>K. pneumoniae</i>	Patient F	VIM-1 + SHV-5	>32				>32	1	2					
<i>K. pneumoniae</i>	9701	CMY-4 + TEM-1	>32	>32	2	2	16	1	2	0.125	0.06	0.06		
<i>K. pneumoniae</i>	SLK54	ACC-1 + TEM-1	>32	>32	1	1	2	<=0.03	0.125	0.06	0.06	0.06		
<i>K. pneumoniae</i>	1734	FOX-3 + TEM-1	>32	>32	0.06	0.06	8	<=0.03	0.125	0.125	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	TN58467	DHA-1 + SHV-2a + TEM-1	>32	>32	0.5	1	16	<=0.03	0.06	0.25	0.06	0.06		
<i>K. pneumoniae</i>	KOL	MOX-2 + SHV-5 + TEM-1	>32	>32	<=0.03	<=0.03	32	<=0.03	0.125	0.06	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K4	CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1	16	>32	0.5	1	>32	0.25	0.25	0.125	0.06	0.06		
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K1	CTX-M-16 + OXA-1	>32	>32	1	1	>32	2	2	0.125	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	KP04	CTX-M-14	>32	32	0.5	1	16	1	1	0.125	0.06	0.06		
<i>K. pneumoniae</i>	157	SHV-5 + TEM-26	>32	>32	0.06	0.125	16	<=0.03	0.125	<=0.03	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	449	SHV-1 + TEM-2 + PER	32	>32	0.125	0.25	32	<=0.03	0.25	<=0.03	<=0.03	<=0.03		
<i>K. pneumoniae</i>	444	SHV-5 + TEM-2 + PER	>32	>32	<=0.03	0.06	8	0.5	0.25	0.125	<=0.03	<=0.03		

<i>K. pneumoniae</i>	441	SHV-1 + TEM-2 + PER	>32	>32	0.125	0.5	16	0.125	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	60	SHV-2 + TEM-2 + PER	32	>32	0.06	0.06	16	0.125	0.125	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	427	SHV-1 + TEM-1B + CTX-M-3	>32	>32	<=0.03	0.25	4	0.06	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	465	TEM-1B + CTX-M-2	>32	>32	0.5	0.5	32	0.5	0.5	0.25	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	253	SHV-2 + TEM-12 + CTX-M-2	>32	>32	0.125	0.25	16	0.25	1	0.06	<=0.03	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	181	SHV-5 + TEM-10	>32	>32	0.5	0.5	32	0.25	0.5	4	0.25	0.5
<i>K. pneumoniae</i>	243	SHV-5 + TEM-63	>32	>32	0.25	0.5	32	0.125	0.25	0.125	0.06	0.06
<i>K. pneumoniae</i>	238	SHV-2 + TEM-12 + CTX-M-2	>32	>32	0.25	0.25	32	1	1	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	236	SHV-5 + TEM-10	>32	>32	<=0.03	0.125	16	0.125	0.125	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>K. pneumoniae</i>	26	SHV-5	32	>32	0.125	0.25	16	<=0.03	1	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>K. oxitoca</i>	16944	OXA-2, TEM-1	>32	>32	0.5	0.5	32	0.5	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>K. oxitoca</i>	1431	TEM-129	32	>32	0.25	0.25	>32	0.5	0.5	0.06	0.06	0.06
<i>E. cloacae</i>		AmpC	>32	32	8	16	16	4	8	0.125	0.06	0.125
<i>E. cloacae</i>		AmpC	32	>32	0.25	0.5	16	0.125	0.125	0.5	0.125	0.25
<i>E. coli</i>		CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1	>32	>32	<=0.03	<=0.03	4	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>	IND	VEB-1 + CMY-2	16	>32	0.125	2	>32	0.25	0.25	0.06	0.06	0.06
<i>E. coli</i>	TN13	CTX-M-14 + CMY-2 + TEM-1	32	>32	4	2	16	<=0.03	0.06	0.25	<=0.03	0.06
<i>E. coli</i>	Tunisie clone E4	CTX-M-16 + TEM-1	>32	>32	2	4	32	2	2	0.125	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>		Cephalosporinase	>32	>32	2	8	16	<=0.03	0.06	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>	TN06	CTX-M-2 + TEM-1	32	16	0.25	0.25	8	0.5	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>		TEM-3	>32	32	0.06	0.06	8	<=0.03	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>E. coli</i>		SHV-4	>32	>32	0.06	0.125	16	0.06	<=0.03	<=0.03	<=0.03	<=0.03
<i>C. freundii</i>		AmpC	16	>32	<=0.03	0.125	8	0.06	0.125	0.25	<=0.03	<=0.03
<i>C. freundii</i>		AmpC	32	>32	<=0.03	1	32	0.125	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03
<i>C. freundii</i>		AmpC	>32	>32	2	8	16	4	8	0.125	0.06	<=0.03
<i>C. freundii</i>		AmpC + TEM-1	16	>32	1	2	16	0.5	0.5	0.06	<=0.03	<=0.03

Manifestación de la actividad sinérgica - Determinación de las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas.
(FIC = Fractional Inhibitory Concentrations)

5

Técnica del tablero (« checkerboard ») para la determinación de la sinergia de los antibióticos:

Objetivo: El objetivo del estudio es determinar la
10 concentración de un compuesto A, necesario para reducir la CMI de un compuesto B de medio, de un cuarto, de un octavo, de un dieciseisavo y de un treintaidosavo contra cepas de especies *enterobacteriaceae* y no-
15 *enterobacteriaceae* resistentes al compuesto B.

15

El objetivo mencionado se logra mediante la técnica llamada del tablero (« checkerboard »). Esta técnica se utiliza para evaluar las combinaciones antimicrobianas.

20 Esta técnica consiste en titular el compuesto A, un inhibidor, en una serie de diluciones (2 en 2) dispuestas horizontalmente sobre una microplaca, titulando al mismo tiempo el compuesto B en una serie de diluciones dispuestas verticalmente. Luego se inocula la placa con la
25 cepa bacteriana y se deja crecer la bacteria durante una noche. Cada pocillo del tablero de la microplaca contiene una combinación diferente de concentraciones del inhibidor y del compuesto antibacteriano, lo que permite una total determinación de cualquier sinergia entre los dos
30 componentes.

Lectura de las placas:

35 El crecimiento se evalúa pocillo por pocillo. En cada hilera se determinan los puntos terminales (CMIs) en los que hay ausencia de crecimiento y las concentraciones de los compuestos A y B correspondientes a cada pocillo en

que hay ausencia de crecimiento se utilizan luego para determinar los niveles de sinergia.

La sinergia se representa mediante "índices FIC", siendo
5 FIC la Concentración Inhibidora Fraccionada (« Fractional Inhibitory Concentration ») de la combinación.

Cálculos de la "Fractional Inhibitory Concentration" (FIC)
Índice de combinaciones de dos agentes antimicrobianos:

10

$$(A)/(CMI_A) + (B)/(CMI_B) = FIC_A + FIC_B = \text{índice FIC}$$

15

(A) es la concentración del compuesto A en un pocillo correspondiente a la concentración más baja de este compuesto que inhibe el crecimiento en la hilera. Cuando el pocillo también contiene el compuesto B (CMI_A) es la concentración más baja del compuesto A solo que inhibe el crecimiento. FIC_A es la "Fractional Inhibitory Concentration" del compuesto A.

20

(B), (CMI_B), y FIC_B se definen del mismo modo que antes, para el compuesto B.

Si el valor del índice FIC es $\leq 0,5$ se considera que estamos en presencia de una sinergia.

25

Enterobacteriaceae

Cepa	Mecanismo de Resistencia	Combinación	FIC Index en xCMI					
			0.25x	0.125x	0.06x	0.03x	0.015x	
<i>E.coli</i> Tunisie E4	CTX-M-16 + TEM-1	CAZ + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	
		MRP + Comp. A	0,375	0,26	0,19			
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,07	0,039	0,031	
<i>E.coli</i> TN06	CTX-M-2 + TEM-1	CAZ + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,03	0,0175	
		MRP + Comp. A	0,375	0,26				
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	
<i>K. pneumoniae</i> 465	CTX-M-2 + TEM-1B	CAZ + Comp. A	0,25	0,125	0,064	0,032	0,016	
		MRP + Comp. A	0,24					
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,032	0,0175	
<i>E.cloacae</i> 293HT96	AmpC	CAZ + Comp. A	0,25	0,125	0,064	0,032	0,016	
		MRP + Comp. A	0,25	0,37				
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	
<i>E.cloacae</i> 293GR38	AmpC	CAZ + Comp. A	0,257	0,156	0,31			
		MRP + Comp. A	0,43					
		AZT + Comp. A	0,31	0,375				
<i>E.coli</i> 250SUJ1	KPC-2 + TEM-1	CAZ + Comp. A	0,25	0,1255	0,061	0,032	0,02	
		MRP + Comp. A	0,2505	0,1255	0,061			
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,06	0,03	0,0175	
<i>K. pneumoniae</i> 283KB7	KPC-2	CAZ + Comp. A	0,254	0,129	0,064	0,038	0,023	
		MRP + Comp. A	0,2505	0,127	0,062	0,034	0,019	
		AZT + Comp. A	0,25	0,125	0,066	0,033	0,0166	

Pseudomonas

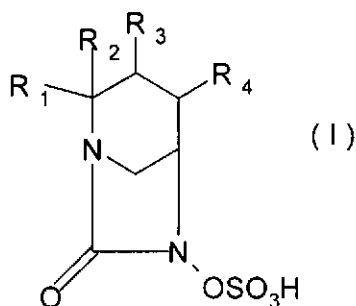
Cepa	Mecanismo de Resistencia	Combinación	FIC Index en xCMI					
			0.25x	0.125x	0.06x	0.03x	0.015x	
<i>P. aeruginosa</i> 391QBR2	ampC	CAZ + Comp. A	0,252	0,129	0,068	0,045	0,03	
		MRP + Comp. A	0,265	0,156	0,185	0,28	0,265	
		LVX + Comp. A	0,281	0,375				
<i>P. aeruginosa</i> 391QBR6	ampC	CAZ + Comp. A	0,3125	0,25	0,31	0,28	0,265	
		MRP + Comp. A	0,5	0,375				
		LVX + Comp. A	0,5	0,275	0,31			
<i>P. aeruginosa</i> QBR10	ampC	CAZ + Comp. A	0,281	0,156	0,091	0,061	0,0775	
		MRP + Comp. A	0,265	0,156	0,091	0,093	0,0775	
		LVX + Comp. A	0,281	0,1875	0,073	0,043		
<i>P. aeruginosa</i> 391KB135	ampC + IMP	CAZ + Comp. A	0,5	0,375	0,31			
		MRP + Comp. A	0,5	0,375				
		LVX + Comp. A	0,38	0,375				
<i>P. aeruginosa</i> 391KB141	ampC + VIM	CAZ + Comp. A	0,5					
		MRP + Comp. A	0,5	0,375	0,31			
		LVX + Comp. A						
<i>P. aeruginosa</i> 391KB144	ampC	CAZ + Comp. A	0,5	0,375	0,31	0,253		
		MRP + Comp. A	0,5					
		LVX + Comp. A						

FIC ≤0.5 = sinergia

112

REIVINDICACIONES

1. Una combinación con efecto sinérgico de un compuesto antibacteriano de fórmula general (I):



5

en la que R_1 representa un radical $(CH_2)_n-NH_2$ o $(CH_2)_n-NHR$, siendo R un alquilo (C_1-C_6) y siendo n igual a 1 ó 2;

R_2 representa un átomo de hidrógeno;

10 R_3 y R_4 forman juntos un heterociclo nitrogenado con carácter aromático de 5 vértices que contienen 1, 2 ó 3 átomos de nitrógeno eventualmente sustituido por uno o varios agrupamientos R' , siendo R' elegida del grupo constituido por un átomo de hidrógeno, los radicales
15 alquilo contienen de 1 a 6 átomos de carbono;

en forma libre, zwitteriones y en forma de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables, con otro compuesto antibacteriano.

20 2. Una combinación según la reivindicación 1, caracterizada en que el otro compuesto antibacteriano se elige del grupo constituido por los aminoglucósidos, los betalactámicos, los monobactams, las penicilinas, llegado el caso combinadas con un inhibidor de betalactamasas, las
25 glicilciclinas, las tetraciclinas, las quinolonas, los glucopéptidos, los lipopéptidos, los macrólidos, los quetólidos, las lincosamidas, las estreptograminas, las oxazolidinonas, las polimixinas y los demás compuestos conocidos dotados de una actividad terapéutica sobre
30 *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.

3. Una combinación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada en que en el compuesto de fórmula general (I), R_3 y R_4 forman juntos un radical pirazolilo o triazolilo eventualmente sustituido.

5

4. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada en que en el compuesto de fórmula general (I), R_1 se elige del grupo constituido por los agrupamientos $(CH_2)_n-NH_2$ y $(CH_2)_n-NHCH_3$,
10 siendo n tal como se definió en la reivindicación 1, el heterociclo formado por R_3 y R_4 se sustituye por un radical alquilo (C_1-C_6).

5. Una combinación según cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 4, caracterizada en que en el compuesto de fórmula general (I), R_1 representa un radical $(CH_2)_n-NH_2$ o $(CH_2)_n-NHCH_3$, siendo n tal como se definió en la reivindicación 1 y R_3 y R_4 forman juntos un ciclo pirazolilo sustituido por un radical alquilo (C_1-C_6).

20

6. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada en que el compuesto de fórmula general (I) es cualquiera de estos que se detallan a continuación:

- 25
- el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
 - el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
 - el trans 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-
- 30

4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona, en forma libre, de zwitterión y de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

7. Una combinación según cualquiera de las
35 reivindicaciones 1 a 6, caracterizada en que el otro compuesto antibacteriano se elige del grupo constituido por los betalactámicos, las penicilinas, llegado el caso

combinados con inhibidores de betalactamasas, los aminoglucósidos y las polimixinas.

8. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada en que el compuesto antibacteriano se elige del grupo constituido por la Tobramicina, el Meropenem, el Aztreonam, la Cefepima, la Ceftazidima, la Piperacilina, llegado el caso, combinada con Tazobactam, Colistina y Polimixina B.

9. Una combinación según la reivindicación 1, caracterizada en que el compuesto de fórmula general (I) es cualquiera de los que se detallan a continuación:

- el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-1-metil-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
- el trans 8-(aminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,
- el trans 8-(metilaminometil)-4,8-dihidro-5-(sulfoxi)-4,7-metano-7H-pirazolo[3,4-e] [1,3]diazepin-6(5H)-ona,

en forma libre, de zwitterión y de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables,

y el compuesto antibacteriano se elige del grupo constituido por la Tobramicina, el Meropenem, la Cefepima, la Ceftazidima, el Aztreonam, la Levofloxacina, la Piperacilina, llegado el caso, combinada con Tazobactam, Colistina y Polimixina B.

10. En calidad de medicamentos, las combinaciones tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. En calidad de medicamentos, las combinaciones tal como se definen en la reivindicación 9.

12. Composiciones farmacéuticas que contienen, en calidad de principio activo, al menos un medicamento según la reivindicación 11.

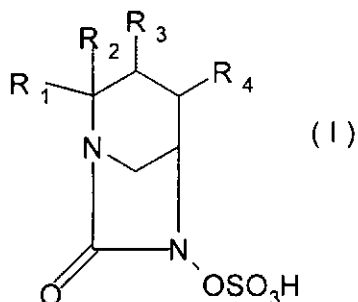
13. Composiciones farmacéuticas que contienen, en calidad de principio activo, al menos un medicamento según la reivindicación 12.

RESUMEN

NUEVAS COMBINACIONES DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS
NITRÓGENOS ANTIBACTERIANOS CON OTROS COMPUESTOS
5 ANTIBACTERIANOS Y SU UTILIZACIÓN COMO MEDICAMENTOS

La invención se refiere a la combinación de
compuestos heterocíclicos nitrogenados antibacterianos de
fórmula (I) con otros compuestos antibacterianos y su
10 utilización como medicamentos.

Los compuestos heterocíclicos nitrogenados responden
a la fórmula general (I)



en la que R₁ representa un radical (CH₂)_n-NH₂ o (CH₂)_n-
NHR, siendo R un alquilo (C₁-C₆) y siendo n igual a 1 ó 2;

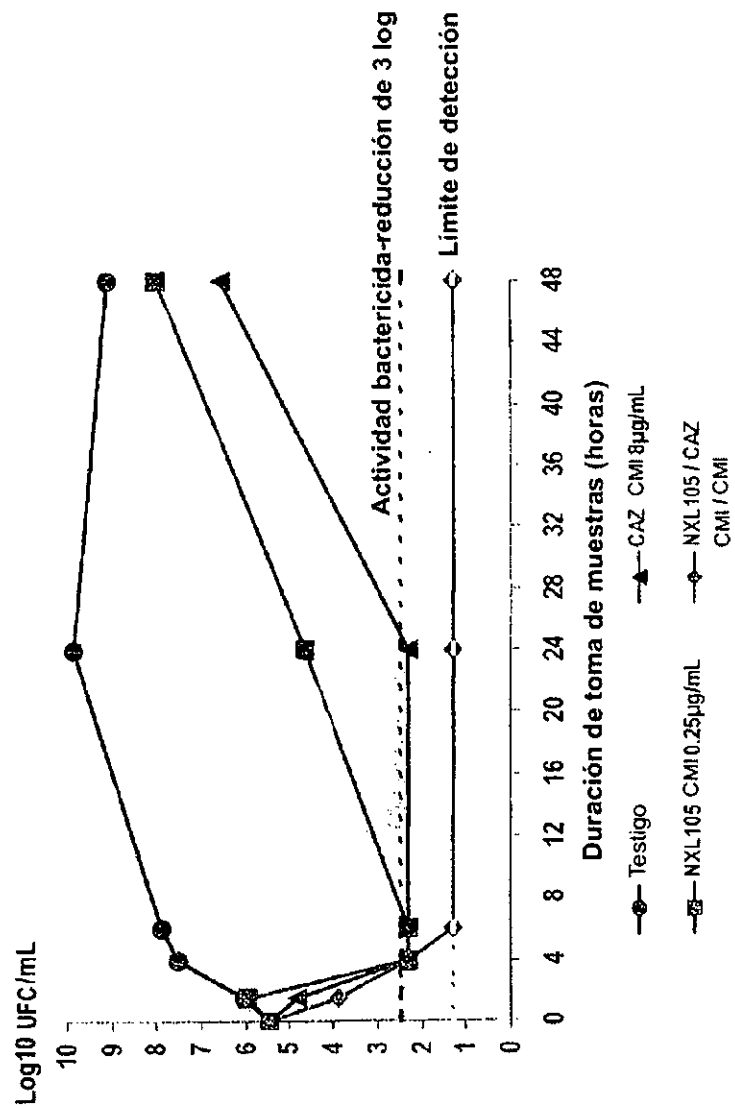
15 R₂ representa un átomo de hidrógeno;

R₃ y R₄ forman juntos un heterociclo nitrogenado de
carácter aromático con 5 vértices que contienen 1, 2 ó 3
átomos de nitrógeno eventualmente sustituido por uno o
varios agrupamientos R', siendo R' elegido del grupo
20 constituido por un átomo de hidrógeno y los radicales
alquilo contienen de 1 a 6 átomos de carbono, en forma
libre, de zwitteriones, y en forma de sales con las bases
y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente
aceptables.

25 Los demás agentes antibacterianos se eligen del grupo
constituido por los betalactámicos, los monobactamos, las
penicilinas, llegado el caso combinados con un inhibidor
de betalactamasas, los aminoglucósidos, las
glicilciclinas, las tetraciclinas, las quinolonas, los
30 glucopéptidos, los lipopéptidos, los macrólidos, les

Produit de l'exemple 1 – Activité bactéricide seul et en combinaison avec le Ceftazidime (CAZ)

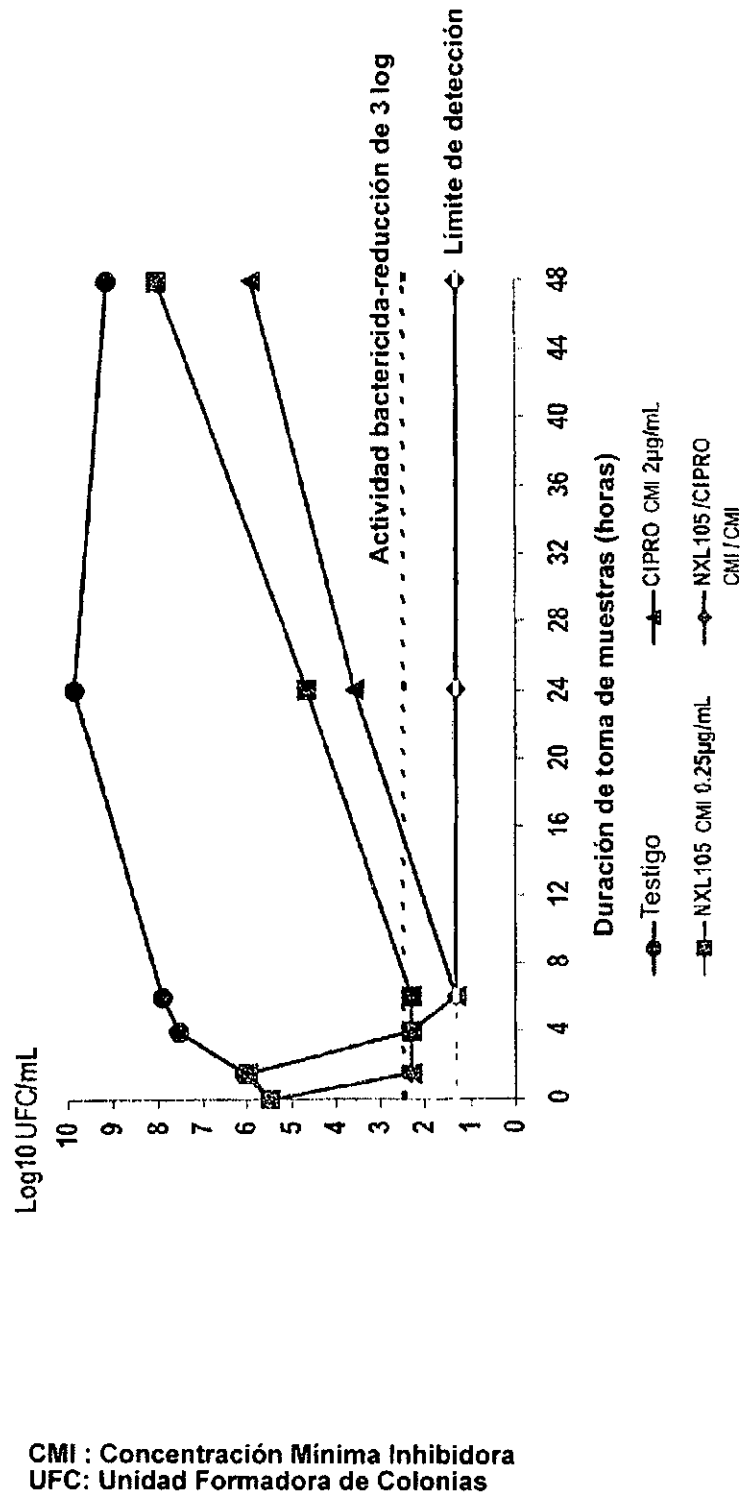
Actividad bactericida de la combinación NXL105/Ceftazidima sobre *P. aeruginosa* 391HT2 (cepa sensible)



CMI : Concentración Mínima Inhibidora
UFC: Unidad Formadora de Colonias

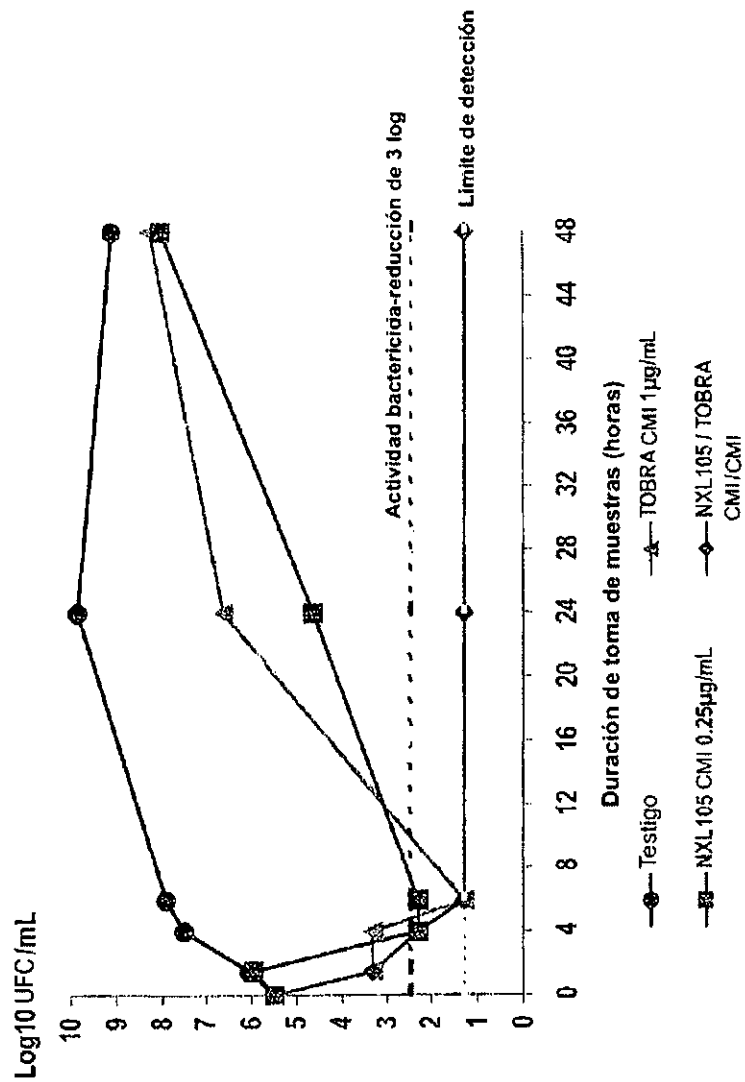
Produit de l'exemple 1 – Activité bactericide seul et en combinaison avec la Ciprofloxacine (CIPRO)

Actividad bactericida de la combinación NXL105/Ciprofloxacina sobre *P. Aeruginosa* 391HT2 (cepa sensible)



Produit de l'exemple 1 – Activité bactericide seul et en combinaison avec la Tobramycine (TOBRA)

Actividad bactericida de la combinación NXL 105/Tobramicina sobre *P. aeruginosa* 391HT2 (cepa sensible)



CMI : Concentración Mínima Inhibidora
UFC: Unidad Formadora de Colonias

121

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL SUR LA BREVETABILITÉ

(chapitre II du Traité de coopération en matière de brevets)

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE À DONNER voir le formulaire PCT/PEA/416	
Demande internationale No. PCT/B2009/006992	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29.09.2009	Date de priorité (jour/mois/année) 10.10.2008
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB INV. C07D471/18		
Déposant NOVEXEL		
1. Le présent rapport est le rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international en vertu de l'article 35 et transmis au déposant conformément à l'article 36. 2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture. 3. Ce rapport est accompagné d'ANNEXES, qui comprennent : a. ☐ un total de (envoyées au déposant et au Bureau international) feuilles, définies comme suit : ☐ les feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou des feuilles contenant des rectifications autorisées par la présente administration (voir la règle 70.16 et l'instruction administrative 607). ☐ des feuilles qui remplacent des feuilles précédentes, mais dont la présente administration considère qu'elles contiennent une modification qui va au-delà de l'exposé de l'invention qui figure dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée, comme il est indiqué au point 4 du cadre n° I et dans le cadre supplémentaire. b. ☐ (envoyées au Bureau international seulement) un total de (préciser le type et le nombre de support(s) électronique(s)) , qui contiennent un listage de la ou des séquences déposé sous forme électronique seulement, comme il est indiqué dans le cadre supplémentaire relatif au listage de la ou des séquences (voir le paragraphe 3bis de l'annexe C des instructions administratives).		
4. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants : ☒ Cadre n° I Base du rapport ☐ Cadre n° II Priorité ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention ☒ Cadre n° V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration ☐ Cadre n° VI Certains documents cités ☐ Cadre n° VII Certaines irrégularités dans la demande internationale ☐ Cadre n° VIII Certaines observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international 2010-08-10	Date d'achèvement du présent rapport 14.01.2011	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Jeanjean, Fabien N° de téléphone +49 89 2399-2920 	

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ**

Demande internationale n°
PCT/IB2009/006992

Case No. I Base du rapport

1. En ce qui concerne la **langue**, le présent rapport est établi sur la base

- ☒ de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée
- ☐ d'une traduction de la demande internationale dans la langue suivante ,
qui est la langue d'une traduction remise aux fins de :
 - ☐ la recherche internationale (selon les règles 12.3.a) et 23.1.b))
 - ☐ la publication de la demande internationale (selon la règle 12.4.a))
 - ☐ l'examen préliminaire international (selon la règle 55.2.a) ou 55.3.a))

2. En ce qui concerne les **éléments*** de la demande internationale, le présent rapport est établi sur la base des éléments suivants (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport.*) :

Description, Pages

1-42 telles qu'initialement déposée

Revendications, No.

1-13 telles qu'initialement déposée

Dessins, Feuilles

1/3-3/3 telles qu'initialement déposée

☐ En ce qui concerne un listage de la ou des séquences, voir le cadre supplémentaire relatif au listage de la ou des séquences.

3. ☐ Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages
- ☐ des revendications, nos
- ☐ des dessins, feuilles/fig.
- ☐ du listage de la ou des séquences (*préciser*) :
- ☐ d'un ou de tous les tableaux relatifs au listage de la ou des séquences (*préciser*) :

4. ☐ Le présent rapport a été établi abstraction faite (de certaines) des modifications suivantes, soit parce qu'elles ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé ou qu'elles n'étaient pas accompagnées de la lettre indiquant la base des modifications dans la demande telle qu'elle a été déposée, comme il est indiqué dans le cadre supplémentaire (règles 70.2.c) et 70.2.c-bis))

- ☐ de la description, pages
- ☐ des revendications, nos
- ☐ des dessins, feuilles/fig.
- ☐ du listage de la ou des séquences (*préciser*) :

5. ☐ La présente opinion a été établie en prenant en considération la **rectification d'une erreur évidente** autorisée par ou notifiée à la présente administration en vertu de la règle 91 (règle 70.2 e)).

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ**

Demande internationale n°
PCT/IB2009/006992

6. ☐ Le (les) rapport(s) de recherche internationale supplémentaire établi(s) par la (les) administration(s) suivante(s) a (ont) été pris en considération lors de l'établissement du présent rapport (règle 45bis.8.b) et c)).

Cadre n° V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui:	Revendications	<u>1-13</u>
	Non:	Revendications	
Activité inventive	Oui:	Revendications	
	Non:	Revendications	<u>1-13</u>
Possibilité d'application industrielle	Oui:	Revendications	<u>1-13</u>
	Non:	Revendications	

2. Citations et explications (règle 70.7) :
voir feuille séparée

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL
SUR LA BREVETABILITÉ
(FEUILLE SÉPARÉE)**

Demande internationale n°

PCT/IB2009/006992

Il est fait référence au document suivant :

D1 WO 2004/052891 A (AVENTIS PHARMA SA [FR]) 24 juin 2004
 (2004-06-24)

Il est fait référence au document suivant :

D1 = WO 2004052891

1 Nouveauté

1.1 L'objet des revendications 1 à 13 semble conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

1.2 Le document D1 décrit un composé de formule (I) dans laquelle X représente -C(O)-B, B pouvant représenter un groupement -NR₈-(CH₂)_n-, n^o pouvant être nul, R₈ pouvant être un radical OY₁ et Y₁ pouvant être un groupe SO₃H, R₁ peut représenter (CH₂)_nR₅ avec R₅ pouvant représenter un radical NH₂, et R₃ et R₄ peuvent former un groupement pyrazolyle substitué (p. 134, revendication 5).

Le composé de la revendication 1 de la présente demande diffère en ce que le substituant R' est un hydrogène ou bien un radical alkyle.

La nouveauté est reconnue pour l'objet des revendications 1 à 13.

2 Activité inventive

2.1 L'objet des revendications 1 à 13 ne semble pas impliquer une activité inventive telle que définie par l'article 33(3) PCT.

2.2 Le document D1, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication, décrit un composé de formule (I), utile comme anti-bactérien (p. 1, l. 5 à 7). D1 mentionne par ailleurs que ce composé est doué de propriétés inhibitrices de bêta-lactames, et présentant par là de l'intérêt dans la lutte contre les maladies infectieuses ou la prévention de celles-ci, sous forme d'association avec divers composés antibiotiques de type β-lactamines, afin de renforcer leur efficacité dans la lutte contre les bactéries pathogènes productrices de β-lactamases (p. 24, l. 10 à 16).

Il est par ailleurs précisé dans la description de la présente demande (p. 13, l. 10 à 15), que les composés de formule générale (I) potentialisent l'activité de composés antibactériens existants, en particulier sur *pseudomonas aeruginosa* et *enterobacteriaceae* ainsi que sur des modèles d'infection animal par des souches résistantes aux agents antibactériens communément utilisés.

Le problème que se propose de résoudre la présente demande semble donc être la mise à disposition de combinaisons comprenant le composé de formule (I) et un agent antibactérien communément utilisé, ayant un effet synergique c'est à dire une meilleure activité antibactérienne que l'agent antibactérien communément utilisé.

La description fait état de combinaisons comprenant l'exemple 1 avec trois antibiotiques différents (p. 34 à 38) : le Ceftazidime, l'aztreonam et le meropenem. Un effet synergique est démontré sur différentes souches bactériennes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. aerogenes*). Le problème est donc résolu.

Cependant, les trois antibiotiques combinés sont tous des antibiotiques de type β -lactamines et sont entre autre cités dans D1 (p. 28, l. 27, l. 34 et 35) dans le cadre d'associations avec le composé de D1.

D1 mentionne que le composé de formule (I) est doué de propriétés inhibitrices de β -lactames et qu'il peut être associé avec divers composés antibiotiques de type β -lactamines, afin de **renforcer** leur efficacité dans la lutte contre les bactéries pathogènes productrices de β -lactamases c'est à dire des bactéries résistantes à ces antibiotiques communément utilisés. Certes le composé de D1 a une activité inhibitrice et non pas une activité antibactérienne propre mais renforce l'action d'antibiotiques existants. Mais, il n'est par ailleurs ni démontré ni revendiqué que le composé de la présente demande possède une activité antibactérienne propre.

Etant donné que les composés de la présente demande sont structurellement extrêmement proches de ceux de D5, l'homme du métier aurait réalisé, sans l'aide d'aucune activité inventive, des modifications structurales mineures afin d'obtenir les compositions revendiquées.

Une activité inventive ne peut donc être reconnue pour l'objet des revendications 1 à 13.

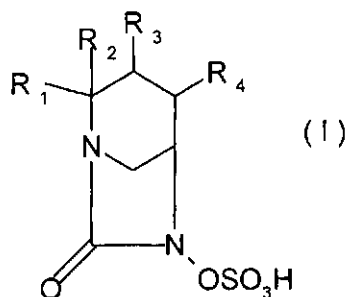
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad
☒ PCT

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: C07D 471/18, A61P 31/04, A61K 31/551
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) NOVEXEL
(30) Prioridad	(72) Interventor (es) Premavathy LEVASSEUR John Lee PACE Kenneth COLEMAN John LOWTHER
(31) No. Prioridad 0805618	(74) Apoderado (s) MAURICIO PATIÑO BONNET
(32) Fecha 10.10.2008	
(33) País FR	
(54) Título: NUEVAS COMBINACIONES DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS NITROGENADOS ANTIBACTERIANOS CON OTROS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y SU UTILIZACIÓN COMO MEDICAMENTOS	
<i>Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT</i>	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional 10.05.11	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 29.09.2009	Fecha <i>Fecha (dd/mm/aa)</i> 15.04.2010
<i>No. de solicitud PCT/IB2009/006992</i>	No. Publicación WO2010/041112

Resumen reivindicación (es):

1. Una combinación con efecto sinérgico de un compuesto antibacteriano de fórmula general (I):



en la que R_1 representa un radical $(CH_2)_n-NH_2$ o $(CH_2)_n-NHR$, siendo R un alquilo (C_1-C_6) y siendo n igual a 1 ó 2; R_3 y R_4 forman juntos un heterociclo nitrogenado con carácter aromático de 5 vértices que contienen 1, 2 ó 3 átomos de nitrógeno eventualmente sustituido por uno o varios agrupamientos R' , siendo R' elegida del grupo constituido por un átomo de hidrógeno, los radicales alquilo contienen de 1 a 6 átomos de carbono; en forma libre, zwitteriones y en forma de sales con las bases y los ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables, con otro compuesto antibacteriano.

2. Una combinación según la reivindicación 1, caracterizada en que el otro compuesto antibacteriano se elige del grupo constituido por los aminoglucósidos, los betalactámicos, los monobactams, las penicilinas, llegado el caso combinadas con un inhibidor de betalactamasas, las glicilicilinas, las tetraciclinas, las quinolonas, los glucopéptidos, los lipopéptidos, los macrólidos, los quetólidos, las lincosamidas, las estreptograminas, las oxazolidinonas, las polimixinas y los demás compuestos conocidos dotados de una actividad terapéutica sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.

3. Una combinación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada en que en el compuesto de fórmula general (I), R_3 y R_4 forman juntos un radical pirazolilo o triazolilo eventualmente sustituido.

4. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada en que en el compuesto de fórmula general (I), R_1 se elige del grupo constituido por los agrupamientos $(CH_2)_n-NH_2$ y $(CH_2)_n-NHCH_3$, siendo n tal como se definió en la reivindicación 1, el heterociclo formado por R_3 y R_4 se sustituye por un radical alquilo (C_1-C_6). [...]



No. 11-043791-00000-0000

Fecha: 2011-04-08 16:05:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
PATIÑO BONNET MAURICIO
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVEXEL

REFERENCIA	Radicación No.	11 043791
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/6992
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	08251

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

20 MAYO 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11