

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: see form PCT/ISA/220		PCT WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43 <i>bis</i> .1)	
		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/IB2017/055973	International filing date (day/month/year) 28.09.2017	Priority date (day/month/year) 28.09.2016	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07D519/06 A61K31/535 A61P31/04 C07D471/18			
Applicant NOVARTIS AG			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Seelmann, Marielle Telephone No. +49 89 2399-0	
--	--	---	---

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-34</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-34</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-34</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

D1 WO 2009 0 91 856

D2 A. Bonnefoy et al., J. Antimicrob. Chemother., 54, 410-417 (2004)

D3 M.E. Tranquillini et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 6(14), 1683-1688 (1996)

D1 is cited in the application

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 Method of treatment

Claims 25-27 and 33-34 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step, of claims 25-27 and 33-34 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

V.2 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Bridged bicyclo[3.2.1]diazabicyclooctanone derivatives ((5-6) bicyclic ring system) are known as beta-lactamase inhibitors, which are also useful as antimicrobial agents when used in combination with beta-lactam antibiotics (D1: aza ring connected with a carbonyl linker to bicyclic system, compounds 51-56 on pages 103-104; D2 (figure 1)). Such derivatives differ from the presently closed ones in that they do not possess a condensed tricyclic ring system (5-6-5) ring system).

4-Amino trinemis are condensed tricyclic (4-5-6) cyclohexyl-azetidin-2-one derivatives, known from D3 to have antimicrobial activity.

None of the compounds of formulae (A), (VI) and (VII), all possessing the new condensed tricyclic ring system, are disclosed in D1-D3, i.e. novel.

V.3 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The closest structural compounds are those of D1 (compounds 51-56 on pages 103-104 and table 3). They have the same pharmaceutical activity as those presently claimed. They differ structurally by the absence of a condensed tricyclic ring system, but the presence of a carbonyl linker between the N-ring and the bicyclo[3.2.1]diazabicyclooctanone.

The technical problem presently posed is to provide beta-lactamase inhibitors useful in the treatment of bacterial infections (see paragraphs 11-12 in the application).

The proposed solution are the compounds (A), (VI) or (VII) and salt thereof according to present claims 1 and 14.

Those compounds were exemplified for their Na salt form in the case of $Z = NR$ with $R = H$, cyclopropyl, C1-C4 alkyl optionally substituted with OH, NH₂; $p = 1-2$; at least one of R1 or R2 is hydrogen and the other one is hydrogen or CH₂-O-CH₃ and tested in combination of selected lactam antibiotics (see examples 1-8 and tables on pages 96-98).

The solution was accordingly shown to solved the present technical problem for a narrow scope of what is actually claimed.

The rest of the scope is not considered to be an obvious alternative in view of the cited prior art documents, wherein only bicyclic systems are given with no ring closure of the amide substituent (D1-D2) or other tricyclic ring systems are disclosed (D3). The gathered teaching of these documents would not lead the skilled person to the proposed solution.

The requirements of Article 33(3) PCT are therefore considered met.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 57369-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2017/055973	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28 September 2017 (28-09-2017)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 28 September 2016 (28-09-2016)
Applicant NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/055973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07D519/06 A61K31/535 A61P31/04 C07D471/18
 ADD.

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/091856 A2 (MERCK & CO INC [US]; BLIZZARD TIMOTHY A [US]; CHEN HELEN [US]; GUDE CA) 23 July 2009 (2009-07-23) cited in the application in particular compounds 51-56 on pages 103-104 and table 3 and claim 15; the whole document	1-34
A	TRANQUILLINI M E ET AL: "Synthesis and antimicrobial activity of 4-amino trinems", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 6, no. 14, 23 July 1996 (1996-07-23), pages 1683-1688, XP004134921, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/0960-894X(96)00292-2 the whole document	1-34
	----- -/-	



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 application or patent 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

19 January 2018

Date of mailing of the international search report

02/02/2018

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

Seelmann, Marielle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/055973

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BONNEFOY ALAIN ET AL: "In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non-.beta.-lactam .beta.-lactamase inhibitor", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 54, no. 2, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 410-417, XP002475045, ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/JAC/DKH358 [retrieved on 2004-07-14] the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/055973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009091856	A2	23-07-2009	
		AU 2009206119 A1	23-07-2009
		CA 2712783 A1	23-07-2009
		CN 101918407 A	15-12-2010
		CN 102827067 A	19-12-2012
		CO 6331438 A2	20-10-2011
		CR 11626 A	13-09-2010
		CY 1114900 T1	14-12-2016
		CY 1116243 T1	15-03-2017
		DK 2231667 T3	16-12-2013
		DK 2666774 T3	23-03-2015
		DO P2010000218 A	31-08-2010
		EC SP10010345 A	31-08-2010
		EC SP10010568 A	30-11-2010
		EP 2231667 A2	29-09-2010
		EP 2666774 A1	27-11-2013
		ES 2433744 T3	12-12-2013
		ES 2533826 T3	15-04-2015
		HK 1143809 A1	06-12-2013
		HK 1186180 A1	17-07-2015
		HN 2010001395 A	12-11-2012
		HR P20131123 T1	20-12-2013
		HR P20150269 T1	24-04-2015
		IL 206395 A	30-04-2015
		JP 5038509 B2	03-10-2012
		JP 5422020 B2	19-02-2014
		JP 5597164 B2	01-10-2014
		JP 2011207900 A	20-10-2011
		JP 2011510012 A	31-03-2011
		JP 2012214475 A	08-11-2012
		KR 20100130176 A	10-12-2010
		KR 20160099117 A	19-08-2016
		MA 32025 B1	03-01-2011
		MY 162532 A	15-06-2017
		NZ 586861 A	22-12-2011
		PT 2231667 E	13-12-2013
		PT 2666774 E	13-04-2015
		RS 53052 B	30-04-2014
		SI 2231667 T1	31-12-2013
		SI 2666774 T1	30-04-2015
		UA 101966 C2	27-05-2013
		US 2011294777 A1	01-12-2011
		US 2013274475 A1	17-10-2013
		WO 2009091856 A2	23-07-2009

INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[0001]** Esta solicitud reclama el derecho de prioridad de la solicitud provisional estadounidense No. 62/401.022 presentada el 28 de septiembre de 2016, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0002]** Esta invención se refiere a compuestos que inhiben las beta-lactamasas, métodos para fabricar estos compuestos y su uso en combinación con antibióticos beta-lactámicos para el tratamiento de infecciones bacterianas.

FUNDAMENTO

15 **[0003]** Durante las últimas décadas, la frecuencia de resistencia antimicrobiana y su asociación con enfermedades infecciosas graves han aumentado a tasas alarmantes. El aumento de la prevalencia de la resistencia entre patógenos nosocomiales es particularmente desconcertante. De los más de 2 millones de infecciones nosocomiales que ocurren cada año en los Estados Unidos, 50 a 60% son causadas por cepas de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos. La alta
20 tasa de resistencia a agentes antibacterianos de uso común aumenta la morbilidad, mortalidad y los costos asociados con infecciones nosocomiales. En los Estados Unidos, se cree que las infecciones nosocomiales contribuyen o causan más de 77.000 muertes al año y cuestan aproximadamente \$5 a \$10 mil millones anuales.

25 **[0004]** Entre los antibióticos más importantes actualmente disponibles están varias clases de compuestos que contienen un anillo de beta-lactama, incluyendo penicilinas, penems, carbapenems, cefalosporinas, monobactams y sulfactams. Estos antibióticos de beta-lactama inhiben biosíntesis de la pared celular mediante la unión a proteínas llamadas proteínas de unión a penicilina (PBPs), que son esenciales para la síntesis de peptidoglicano, el componente principal de la pared
30 celular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Mientras que los antibióticos beta-lactámicos siguen siendo extremadamente importantes en todo el mundo, su uso extensivo ha llevado a un problema grande y creciente: Las bacterias han desarrollado resistencia a beta-lactamas, al igual que a la mayoría de otros

antibióticos disponibles. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) dice que la resistencia a los antibióticos es una "grave amenaza mundial..."

[0005] Se han identificado muchos mecanismos diferentes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos: Algunas cepas resistentes poseen bombas de eflujo para excretar antibióticos y otras desarrollan PBPs mutantes que son menos sensibles al antibiótico. Una forma especialmente preocupante de resistencia es el desarrollo de enzimas bacterianas que reaccionan con estos antibióticos, destruyendo el antibiótico al abrir el anillo de beta-lactama. Estas enzimas degradantes de antibióticos se denominan beta-lactamasas y son particularmente problemáticas porque pueden transmitir resistencia a muchos antibióticos beta-lactámicos diferentes y pueden transferirse a través de plásmidos entre diferentes cepas y especies bacterianas. Entre las bacterias Gram-negativas, hay cuatro clases de beta-lactamasas, las beta-lactamasas de serina de las clases A, C y D, y las metalo beta-lactamasas (clase B).

[0006] Las causas importantes de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos incluyen beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), serina-carbapenemasas de la clase A (por ejemplo, KPC-2) y de clase D (por ejemplo OXA-48) en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Proteus mirabilis*, así como una resistencia de alto nivel contra las cefalosporinas de tercera generación mediadas por la beta-lactamasa clase C AmpC entre especies de *Enterobacter* y *Citrobacter freundii*, y cepas de resistencia a múltiples fármacos de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*. El problema de la resistencia antibacteriana se agrava por la existencia de cepas bacterianas que contienen múltiples beta-lactamasas. Por ejemplo, la neumonía *Klebsiella* que alberga la metalo- β -lactamasa NDM-1 frecuentemente lleva serina- β -lactamasas adicionales en el mismo plásmido que lleva el NDM-1.

[0007] Dado que los antibióticos beta-lactámicos están entre las pocas clases que son eficaces contra las bacterias Gram-negativas, se han hecho muchos esfuerzos para reforzar su capacidad de controlar cepas bacterianas resistentes, para evitar la pérdida de estos antibacterianos de gran valor. Por ejemplo, algunas beta-lactamasas han sido modificadas estructuralmente para hacerlas menos susceptibles a las beta-lactamasas, aunque este enfoque se complica por el hecho de que ya existen muchas beta-lactamasas diferentes, y aparecen nuevas constantemente. Otro enfoque ha sido inhibir las enzimas de beta-lactamasa que degradan estos

antibióticos usando un inhibidor de beta-lactamasa (BLI) de moléculas pequeñas en combinación con un antibiótico beta-lactámico. Estos BLIs pueden usarse en combinación con un antibiótico beta-lactámico aprobado para tratar pacientes infectados con bacterias que son resistentes al antibiótico solo debido a la actividad de beta-lactamasa. Ejemplos de BLIs aprobados incluyen ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam. Otros (relebactam, vaborbactam (RPX7009), zidebactam y nacubactam) están de forma reportada en desarrollo.

[0008] En organismos Gram-positivos, la resistencia a la penicilina mediada por las beta-lactamasas tipo penicilinas es un importante mecanismo de resistencia en *Staphylococcus aureus* (MSSA). La resistencia mediada por beta-lactamasa a las penicilinas también se encuentra en especies anaerobias, tales como bacteroides.

[0009] Los tres inhibidores de la serina beta-lactamasa más comúnmente utilizados, el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam, tienen una actividad potente sólo contra algunas beta-lactamasas de clase A, excluyendo carbapenemasas de serina.

El avibactam es un miembro de la clase de diazabicyclooctano (DBO) de inhibidores de la beta-lactamasa y tiene una amplia cobertura de clase A (incluyendo KPCs), clase C y cierta inhibición de la clase D. Junto con la inhibición de beta-lactamasa, avibactam también tiene actividad antibacteriana contra algunas cepas clínicas a través de la inhibición de la proteína 2 de unión a penicilina (PBP-2) (Asli, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, No 2, 752, 2016). Los compuestos antibacterianos con este mecanismo de acción, incluyendo DBOs, seleccionan resistencia a frecuencias muy altas in vitro (Doumith y col., *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2016, 71, 2810-2814). Debido a esto, cualquier beneficio clínico potencial de la actividad antibacteriana intrínseca de algunos inhibidores DBO de la beta-lactamasa no está claro en la actualidad. La débil actividad antibacteriana del avibactam puede no ser clínicamente relevante, ya que la dosis clínica de avibactam es bastante baja, sin embargo, puede complicar la prueba de susceptibilidad in vitro y/o promover resistencia. Las pruebas de susceptibilidad in vitro de las combinaciones de avibactam/beta-lactama contra aislados clínicos se realizan típicamente utilizando una concentración fija elevada de avibactam (4 µg/mL) que probablemente no refleje los niveles alcanzados clínicamente. La contribución directa de avibactam a la actividad antibacteriana en estas condiciones de ensayo artificiales in vitro podría afectar la precisión en la predicción de la eficacia clínica de las combinaciones de avibactam/beta-lactamasa. Un inhibidor de la beta-lactamasa

DBO carente de actividad antibacteriana significativa no tendría esta actividad de confusión adicional y los protocolos de ensayo in vitro medirían sólo la inversión de la resistencia mediada por beta-lactamasa en aislados clínicos, lo que permitiría una predicción más precisa de la eficacia clínica basada en resultados de susceptibilidad in vitro.

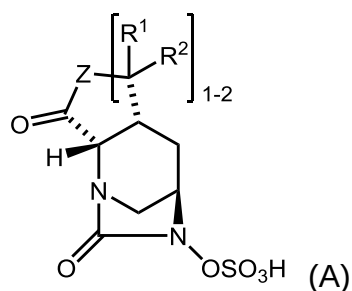
[0010] Además de BLIs actualmente disponibles para uso, se describen otros compuestos con actividad BLI en los documentos WO2002/100860, US2003/0199541, US2004/0157826, WO2008/039420, y WO2009/091856, US2010092443, WO2010/126820, WO2013/122888, WO2013/038330, US2013/0225554, WO2013/149121, WO2013/149136, WO2014/141132 y WO2014/033560.

[0011] Las propiedades farmacocinéticas y físicas de los BLIs previamente descritos pueden no ser ideales para su uso con cada antibiótico beta-lactámico. Además, se sabe que los BLIs conocidos pierden eficacia con el tiempo (K. Bush, *Int. J. Antimicrob. Agents* 46 (5), 483-93 (Nov 2015)), a medida que se desarrollan cepas bacterianas resistentes y nuevas enzimas de beta-lactamasa surgen continuamente. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de nuevos inhibidores de beta-lactamasa para ampliar la utilidad de valiosos antibióticos beta-lactámicos; de hecho, los BLIs nuevos también pueden combatir la resistencia a los BLI conocidos, así como la resistencia a antibióticos beta-lactámicos conocidos y desarrollados en el futuro. La presente invención proporciona nuevos inhibidores de beta-lactamasa que potencian la actividad de diversos antibióticos beta-lactámicos, mientras que exhiben poca actividad antibiótica intrínseca (directa) propia.

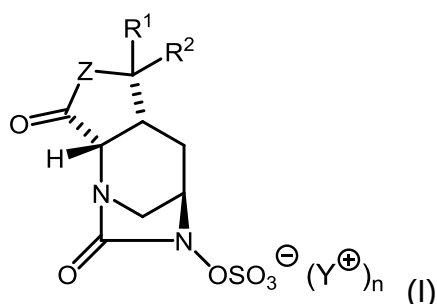
RESUMEN

[0012] La invención incluye nuevos compuestos BLI, combinaciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen estos compuestos, y métodos de uso de tales compuestos y composiciones para el tratamiento de pacientes con infecciones bacterianas. Los BLIs se usan en combinación con un antibiótico beta-lactámico, por ejemplo, un derivado de penicilina, penem, carbapenem, cefalosporina (cefem), monobactam o sulfactam, y son útiles principalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas Gram-negativas, pero también son útiles para el tratamiento de infecciones Gram-positivas y anaerobias, donde la resistencia es mediada a

través de la producción de una beta-lactamasa por la bacteria. La invención incluye compuestos de la Fórmula (A) y variantes de los mismos,



y las sales de estos compuestos, incluyendo compuestos de la Fórmula (I):



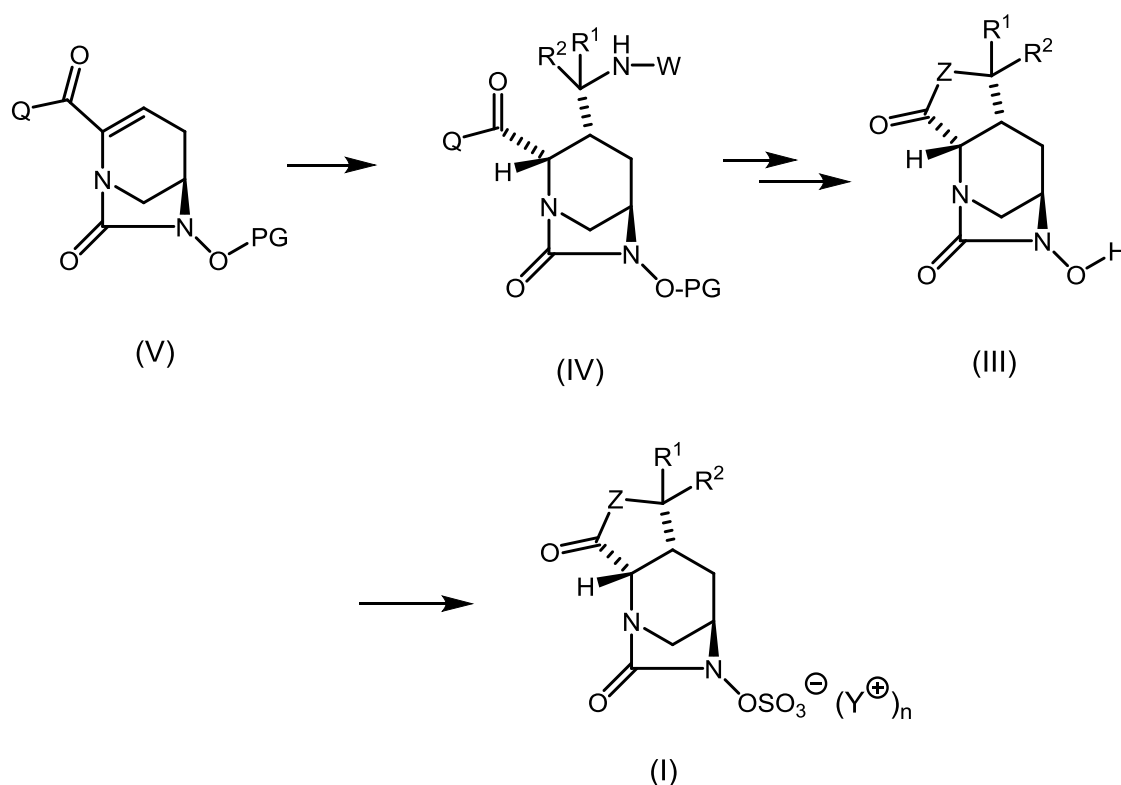
en el que los compuestos de la Fórmula (I) pueden estar en una sal o forma zwitteriónica, como se describe adicionalmente en la presente.

[0013] Los compuestos BLI de la invención se usan en combinación con un antibiótico beta-lactámico, ejemplos de los cuales se describen en la presente, para tratar infecciones bacterianas, especialmente infecciones bacterianas Gram-negativas. El BLI y el antibiótico beta-lactámico pueden administrarse juntos o por separado, y el BLI aumenta la eficacia del antibiótico beta-lactámico al menos contra las cepas bacterianas que muestran resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, donde la resistencia está mediada por una actividad de beta-lactamasa. Las combinaciones de antibiótico beta-lactámico y BLI de la Fórmula (A) pueden usarse para tratar infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, incluyendo Enterobacteriaceae, tales como *Salmonella*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, bacterias no fermentadoras, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Moraxella* y *Stenotrophomonas*, bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus* productor de beta-lactamasas, así como bacterias anaerobias, tales como *Bacteroides fragilis* o *Bacteroides thetaiotaomicron*.

[0014] En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos de la Fórmula (A) y la Fórmula (I), incluyendo su sal o formas zwitteriónicas, que son eficaces

como inhibidores de una o más beta-lactamasas bacterianas. Los compuestos son útiles para potenciar la actividad antibacteriana de un antibiótico beta-lactámico. Por lo tanto, pueden usarse en combinación con un antibiótico beta-lactámico. El BLI y el antibiótico beta-lactámico pueden administrarse juntos o por separado; en algunas modalidades, un BLI de la Fórmula (A) o la Fórmula (I) y un antibiótico beta-lactámico se combinan en una composición farmacéutica que típicamente también comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0015] En un aspecto, la invención proporciona métodos para preparar compuestos de la Fórmula (A) o la Fórmula (I) y nuevos precursores útiles para preparar compuestos de la Fórmula (A) o la Fórmula (I) como se describe en la presente. En particular, la invención proporciona un proceso para convertir un compuesto de la Fórmula (V) en un compuesto de la Fórmula (IV); y un método para convertir un compuesto de la Fórmula (III) en compuestos de la Fórmula (I).



[0016] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la Fórmula (A) y la Fórmula (I) mezclado con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición comprende dos o más de tales vehículos o excipientes. Opcionalmente, la composición farmacéutica incluye además un antibiótico beta-lactámico, aunque el compuesto BLI puede formularse y administrarse por separado

del antibiótico beta-lactámico.

[0017] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto que tiene una infección bacteriana, que comprende la administración al sujeto en necesidad del mismo una cantidad antibacterianamente eficaz de un antibiótico beta-lactámico y una cantidad efectiva de un BLI de la Fórmula (A) o la Fórmula (I), incluyendo sal y formas zwitteriónicas, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, el sujeto es un mamífero y en algunas modalidades, el sujeto es un humano. Este aspecto proporciona un compuesto de la Fórmula (A) o la Fórmula (I), incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable o formas zwitteriónicas, para uso para tratar una infección bacteriana, donde el compuesto se usa en combinación con un antibiótico beta-lactámico. También incluye el uso de un compuesto de la Fórmula (A) o la Fórmula (I), o una sal o forma zwitteriónica del mismo, en la fabricación de un medicamento. Preferiblemente, el medicamento es uno para usar en el tratamiento de una infección bacteriana Gram-negativa, especialmente una que tiene una actividad de beta-lactamasa suficiente para impartir algún nivel de resistencia al antibiótico beta-lactámico, donde el medicamento está adaptado para su uso en combinación con una beta-lactama tal como la descrita en la presente. El antibiótico beta-lactámico y el compuesto BLI de la Fórmula (A) o la Fórmula (I) se pueden administrar simultáneamente o por separado y en cualquier orden, siempre que el BLI esté presente in vivo simultáneamente con el antibiótico beta-lactama con el fin de potenciar la eficacia del antibiótico beta-lactámico.

[0018] Las bacterias Gram-negativas pueden ser de un género seleccionado entre *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Neisseria*, y *Stenotrophomonas*. En particular, una infección bacteriana causada por una especie de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, o *Acinetobacter* es tratable mediante los métodos descritos en la presente. Especies bacterianas particulares para tal tratamiento incluyen especies de *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*, así como *Bacteroides fragilis*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria*

gonorrhoeae, y *Stenotrophomonas maltophilia*. Las bacterias Gram-positivas pueden ser, por ejemplo, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*.

[0019] En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento bacteriano o la modulación de la virulencia de una infección bacteriana, en donde el método comprende administrar a un paciente en necesidad de tal inhibición, un compuesto de la fórmula (A) o Fórmula (I) y un antibiótico de beta-lactama. Se describen antibióticos beta-lactámicos adecuados para uso en estos métodos.

[0020] Se proporcionan composiciones farmacéuticas según la presente invención, que incluyen cualquiera de los compuestos descritos en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición incluye un agente terapéutico adicional tal como un antibiótico de beta lactama.

[0021] Otros aspectos de la invención se discuten en este documento.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0022] Figura 1. SEM de Compuesto Cristalino de la Fórmula (VII).

[0023] Figura 2. XRPD del Compuesto Cristalino de la Fórmula (VII).

[0024] Figura 3. Análisis Termogravimétrico y Análisis de Calorimetría de Barrido

5 Diferencial del Compuesto Cristalino de la Fórmula (VII).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] Para efectos de interpretar esta especificación, las siguientes definiciones se aplican a menos que se especifique lo contrario o se contradiga claramente por el
10 contexto. Cuando proceda, los términos utilizados en singular también incluyen el plural y viceversa.

Definiciones

[0026] Los términos utilizados en la especificación tienen los siguientes significados:

15 **[0027]** Como se utiliza en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal. En ciertos aspectos, el sujeto es un mamífero. Un sujeto también se refiere a por ejemplo, primates (ej., humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano.

20 **[0028]** Como se utiliza en la presente, el término “inhibir” o “inhibición” se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma, o trastorno, o enfermedad dada, o una disminución significativa en la actividad inicial de una actividad o proceso biológico, o disminución en la viabilidad, número o tasa de crecimiento de una población bacteriana.

25 **[0029]** Como se utiliza en la presente, el término “tratar”, o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización “tratar” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo
30 aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra

realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

[0030] Como se utiliza en la presente, el término “un,” “una,” “el”, “los” y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se utilizan para cubrir formas tanto singulares como plurales a menos que se indique lo contrario o claramente sea contradicho por el contexto.

[0031] Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.*, “tal como”) proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor el invento y no implica limitación sobre el alcance del invento de otra manera reivindicado.

[0032] El término “agente antibacteriano” se refiere a agentes sintetizados o modificados en el laboratorio que tienen ya sea actividad bactericida o bacteriostática. Un agente “activo” en este contexto inhibirá el crecimiento de *P. aeruginosa* y/o otras bacterias Gram-negativas. El término “inhibir el crecimiento” indica que la tasa de aumento en los números de una población de una bacteria en particular se reduce. Por lo tanto, el término incluye situaciones en las que la población de bacterias aumenta pero a una tasa reducida, así como situaciones donde el crecimiento de la población se detiene, así como las situaciones en que se reducen los números de las bacterias en la población o la población incluso se elimina.

[0033] El término “antibiótico beta-lactámico” se refiere a un agente antibacteriano que contiene un anillo de lactama de 4 miembros, también denominado como una beta-lactama, que posee actividad antibacteriana. Clases de antibióticos beta-lactámicos incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems, oxapenems, cefemas, carbacefemas, oxacefemas, penems, penams, sulbactams y clavams. Antibióticos beta-lactámicos particulares adecuados para su uso en los métodos y composiciones de la invención se describen en la presente, e incluyen aztreonam, piperacilina, ceftazidima, meropenem y beta-lactama 5.

[0034] El término beta-lactamasa, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una actividad enzimática poseída o exhibida por una bacteria, que cataliza la degradación o inactivación de un antibiótico beta-lactámico. Típicamente, tal

actividad cataliza la hidrólisis del anillo de beta-lactama de un antibiótico beta-lactámico monocíclico o bicíclico y se expresa en una bacteria Gram-negativa o Gram-positiva que puede causar infección en sujetos mamíferos, especialmente humanos. Las beta-lactamasas de interés incluyen la clase A (que incluyen beta-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas de serina), así como también beta-lactamasas Clase C y D.

[0035] El término "inhibidor de beta-lactamasa" o "BLI" tal como se utiliza en la presente se refiere a un compuesto que inhibe al menos una beta-lactamasa bacteriana. Esto significa que inhibe al menos un miembro de las clases de beta-lactamasas de serina, por ejemplo una beta-lactamasa de Clase A, C o D. Al reducir la actividad de beta-lactamasa, estos compuestos aumentan la actividad de un antibiótico beta-lactámico usado en combinación con el BLI; este efecto se denomina en la presente como potenciación, ya que el BLI no tiene actividad antibacteriana significativa propia, sino que refuerza o potencia la actividad antibacteriana del antibiótico en bacterias que poseen actividad de beta-lactamasa. La potenciación resulta del hecho de que el BLI permite que el antibiótico beta-lactámico persista más tiempo in vivo dentro del compartimiento periplásmico bacteriano o en las proximidades de los patógenos bacterianos, lo cual hace que el antibiótico sea más eficaz o lo haga efectivo a una dosis más baja de la requerida en ausencia del BLI de la Fórmula (A). Preferiblemente, un BLI es eficaz a una concentración inhibidora del 50% por debajo de 100 µg/mL aproximadamente (microgramos/mL), o por debajo de 50 µg/mL aproximadamente, o por debajo de 25 µg/mL aproximadamente.

[0036] Antibióticos beta-lactámicos adecuados para uso en combinación con los BLI de la invención incluyen, por ejemplo, aztreonam, imipenem, ertapenem, meropenem, doripenem, biapenem, piperacilina, ceftriaxona, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftolozano, cefepima, panipenem, ticarcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, azlocilina, mezlocilina, ticarcilina, cefoperazona, beta-lactama 5 (mostrados en la presente), y similares.

[0037] "Opcionalmente sustituido" significa el grupo citado que puede sustituirse en una o más posiciones por cualquier radical o cualquier combinación de los radicales listados a continuación. Dicha sustitución implica la sustitución de un átomo de hidrógeno del grupo no sustituido por otra fracción; así, el número de sustituyentes que pueden ser añadidos a cualquier grupo sustituido es igual al número de átomos

de hidrógeno en el grupo no sustituido. Si no se especifica lo contrario, 'opcionalmente sustituido' significa que hasta tres grupos sustituyentes que no son hidrógeno pueden estar presentes.

[0038] “Halo” o “halógeno”, como se utiliza en la presente, puede ser flúor, cloro, bromo o yodo.

[0039] “Alquilo_{C₁-C₆}”, como se utiliza en la presente, denota alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-6 átomos de carbono. Si se especifica un número diferente de átomos de carbono, tal como C₈ o C₃, entonces la definición tiene que interpretarse consecuentemente, tal que “alquilo C₁-C₄ incluirá metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo.

[0040] “Alcoxilo_{C₁-C₆}”, o “alcoxilo_{C₁₋₆}” como se utiliza en la presente, denota alcoxilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-6 átomos de carbono. Si se especifica un número diferente de átomos de carbono, tal como C₈ o C₃, entonces la definición tiene que interpretarse consecuentemente, ej., “alcoxilo C₁-C₄” representará metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, isobutoxilo, sec-butoxilo y terc-butoxilo.

[0041] “Haloalquilo C₁-C₄”, o “haloalquilo C₁₋₄” como se utiliza en la presente, denota alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono, en donde al menos un hidrógeno se ha sustituido por un halógeno. Si se especifica un número diferente de átomos de carbono, tal como C₆ o C₃, entonces la definición tiene que interpretarse consecuentemente, así “haloalquilo C₁-C₄ representará metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo con al menos un hidrógeno sustituido por halógeno, tal como cuando el halógeno es flúor. CF₃CF₂-, (CF₃)₂CH-, CH₃-CF₂-, CF₃CF₂-, CF₃, CF₂H-, CF₃CF₂CHCF₃ o CF₃CF₂CF₂CF₂-.

[0042] “Cicloalquilo C₃-C₈” o “cicloalquilo C₃₋₈” tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anillo hidrocarburo monocíclico saturado de 3 a 8 átomos de carbono. Ejemplos de tales grupos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Si se especifica un número diferente de átomos de carbono, tal como C₃-C₆, entonces la definición debe interpretarse consecuentemente.

[0043] “Heterociclilo de 4- a 8-miembros”, “heterociclilo de 5- a 6- miembros”, “heterociclilo de 3- a 10-miembros”, “heterociclilo de 3- a 14-miembros”, “heterociclilo de 4- a 14-miembros” y “heterociclilo de 5- a 14- miembros”, se refieren, respectivamente a anillos heterocíclicos de 4- a 8- miembros, de 5- a 6- miembros, de 3- a 10- miembros, de 3- a 14-miembros, de 4- a 14- miembros y de

5- a 14- miembros que contienen al menos 1 a 7, 1 a 5 o 1 a 4 heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consta de nitrógeno, oxígeno, y azufre, el cual puede ser saturado, o parcialmente saturado. "Heterocíclico" se puede usar de forma intercambiable con "heterociclilo". El grupo cicloheteroalquilo puede fijarse en un heteroátomo o un átomo de carbono. El término "heterociclilo" incluye grupos cíclicos sencillos, grupos cíclicos fusionados y grupos puenteados. Ejemplos de tal heterociclilo incluyen, pero no se limitan a pirrolidina, piperidina, piperazina, oxazolidina, pirrolidina, pirrolidinona, morfolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiopirano, tetrahidropiran, 1,4-dioxano, 1,4 oxatiano, 8-aza-biciclo [3.2. 1] octano, 3,8-diazabiciclo [3.2.1] octano, 3-oxa-8-aza-biciclo [3.2.1] octano, 8-oxa-3-aza-biciclo [3.2.1] octano, 2 - oxa-5-aza-biciclo [2.2.1] heptano, 2,5-diaza-biciclo [2.2.1] heptano, azetidina, etilendioxo, oxetano y tiazolidina. Preferiblemente, un grupo heterocíclico o heterociclilo es un grupo monocíclico saturado o parcialmente saturado a menos que se especifique lo contrario, y contiene 5-7 átomos en el anillo con hasta dos heteroátomos seleccionados de N, O y S como miembros del anillo. En algunas modalidades, un grupo heterocíclico incluye además sistemas de anillo bicíclico que contiene 1 o 2 heteroátomos tales como N, O o S como miembros del anillo y que comprende dos anillos condensados de 3-, 4-, 5-, o 6 miembros, tales como 3- azabicyclo [3.1.0] hexano, 8-aza-biciclo [3.2.1] octano, 3,8-diazabicyclo [3.2.1] octano, 3-oxa-8-aza-biciclo [3.2.1] octano, 8- oxa-3-aza-biciclo [3.2.1] octano, 2-oxa-5-aza-biciclo [2.2.1] heptano, 2,5-diaza-biciclo [2.2.1] heptano.

[0044] "Heteroarilo" es un anillo completamente insaturado (aromático). El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico- o tricíclico-aromático de 5-14 miembros, que tiene 1 to 8 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S. Típicamente, el heteroarilo es un sistema de anillo de 5-10 miembros (ej., monociclo de 5-6 miembros o un bicyclo de 8-10 miembros) o un sistema de anillo de 5-6 miembros. A menos que se especifique lo contrario, un heteroarilo es preferiblemente un anillo aislado de 5-6 miembros que contiene hasta 4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S como miembros del anillo. Grupos heteroarilo típicos incluyen furano, isotiazol, tiadiazol, oxadiazol, indazol, indol, quinolina, 2- o 3-tienilo, 2- o 3-furilo, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2-, 4-, ó 5-imidazolilo, 1-, 3-, 4-, o 5- pirazolilo, 2-, 4-, o 5-tiazolilo, 3-, 4-, o 5-isotiazolilo, 2-, 4-, o 5-oxazolilo, 3-, 4-, o 5-isoxazolilo, 3- o 5-(1,2,4-triazolilo), 4- o 5-(1,2, 3-triazolilo), tetrazolilo,

triazina, pirimidina, 2-, 3-, o 4-piridilo, 3- o 4-piridazinilo, 3-, 4-, o 5-pirazinilo, 2-pirazinilo, y 2-, 4-, o 5-pirimidinilo.

[0045] El término "hidroxilo" o "hidroxilo" se refiere al grupo -OH, o cuando se usa como parte de un nombre de grupo tal como hidroxialquilo, se refiere al grupo nombrado sustituido por un -OH.

[0046] Un "zwitterión" es una molécula que tiene grupos cargados tanto positivamente como negativamente, pero no tiene carga total, es decir, las cargas + y - están equilibradas dentro de la molécula. Para convertir una molécula aniónica en una molécula neutra, normalmente se reemplazarían los aniones por grupos neutros, pero para convertir una molécula aniónica en un zwitterión, luego un grupo neutro es reemplazado por un grupo catiónico.

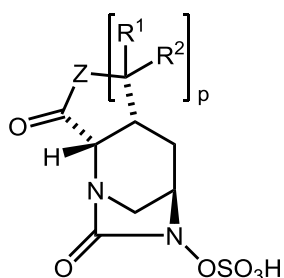
[0047] Los compuestos de la fórmula (A) existen en forma libre, como una sal o como zwitterión. En esta especificación, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que un lenguaje como "compuestos de la fórmula (A)" abarca los compuestos en cualquier forma, por ejemplo, adición alcalina o ácida libre o la forma de sal de intercambio. Sales que pueden ser inadecuadas para usos farmacéuticos pero que pueden emplearse, por ejemplo, para el aislamiento o purificación de compuestos libres de la fórmula (A), tales como picratos o percloratos, también están incluidas. Para uso terapéutico, solamente se emplean sales farmacéuticamente aceptables, zwitteriones o compuestos libres (cuando sea aplicable en la forma de preparaciones farmacéuticas), y éstas son por lo tanto preferidas. Las sales son preferiblemente sales fisiológicamente aceptables, formadas, según corresponda, por la adición de un ácido o base o por intercambio iónico.

[0048] Los compuestos de la fórmula (A) pueden existir en forma de zwitteriones diversos. Por ejemplo, los compuestos de la Fórmula (A) pueden mostrar grupos amino protonados y grupos sulfato desprotonados. En esta especificación, el dibujo del compuesto en la forma libre incluye también otros posibles zwitteriones. Los zwitteriones de los compuestos de la Fórmula (A) también se incluyen en la invención.

[0049] Los compuestos de la fórmula (A) pueden existir en forma ópticamente activa o en forma de mezclas de isómeros ópticos, por ejemplo en forma de mezclas racémicas o mezclas diastereoméricas. En particular, el átomo de carbono asimétrico puede estar presente en los compuestos de fórmula (A) y sus sales.

Todos los isómeros ópticos y sus mezclas, incluyendo las mezclas racémicas, son contemplados por la invención. Varias modalidades de la invención se describen en la presente. Se reconocerá que las características especificadas en cada modalidad pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar modalidades adicionales. Las siguientes modalidades enumeradas son representativas de aspectos adicionales de la invención.

[0050] En una modalidad, el invento proporciona compuestos de la Fórmula (A):



en donde p es 1 o 2;

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';

Z es NR^3 o N-OR³;

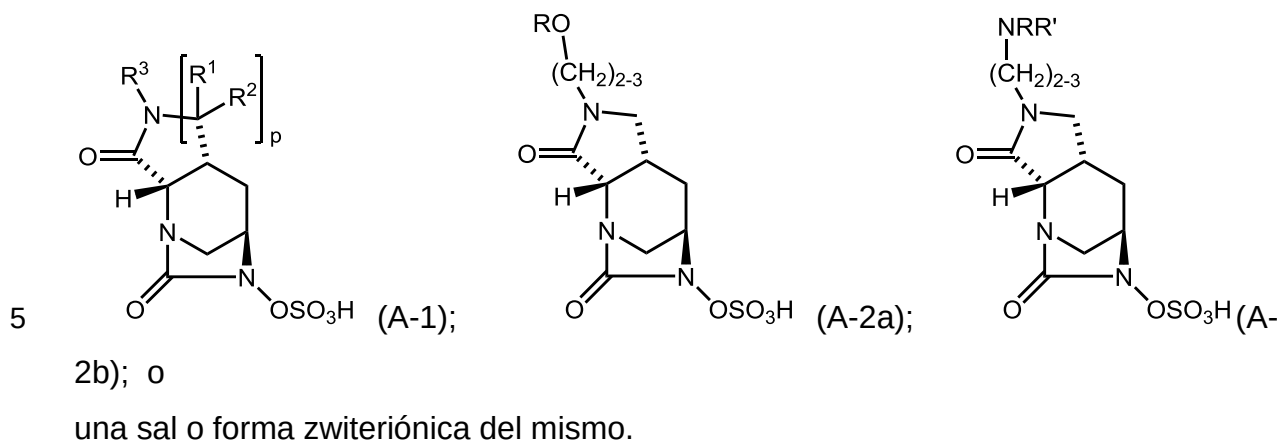
R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy, halo, CN, -OR, y -NRR'; Cy es un anillo de cicloalquilo C_3 - C_6 o anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy es opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C_1 - C_2 , CN, -OR, y -NRR'; y

R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, -OH, -CN, -O-(C_1 - C_4 alkyl), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C_1 - C_4), y -N(alquilo C_1 - C_4)₂, o

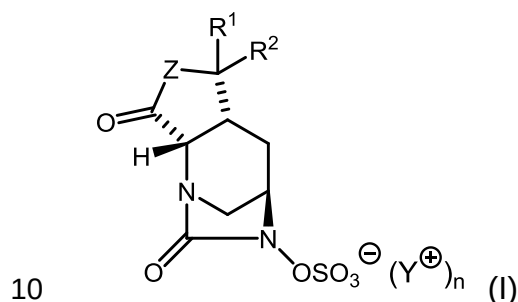
R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, pirrolidina, y azetidina, en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C_1 - C_2 , -OH, -CN, -O-(alquilo C_1 - C_4), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C_1 - C_4), y -N(alquilo C_1 - C_4)₂;

una sal o forma zwitteriónica del mismo.

[0051] Las modalidades particulares de estos compuestos incluyen compuestos de las siguientes fórmulas:



[0052] Una modalidad de interés especial es un compuesto de la Fórmula (I):



en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';

15 Z es NR^3 o $N-OR^3$;

R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy, halo, CN, -OR, y -NRR'; Cy es un anillo de cicloalquilo C_3 - C_6 o anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy es opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C_1 - C_2 , CN, -OR, y -NRR'; y

20 R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, -OH, -

CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂, o R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, pirrolidina, y azetidina, en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de

5 halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂;

Y es un grupo catiónico;

n es 0 o 1; y

cuando n es 0, el compuesto de la Fórmula I está en una forma zwitteriónica.

10 **[0053]** Cada uno de los compuestos de los Ejemplos en la presente es una modalidad específica de la invención.

[0054] El compuesto de cualquiera de las modalidades precedentes, en donde Z es NR³,

[0055] y R³ es H o alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR', o una

15 sal o forma zwitteriónica del mismo.

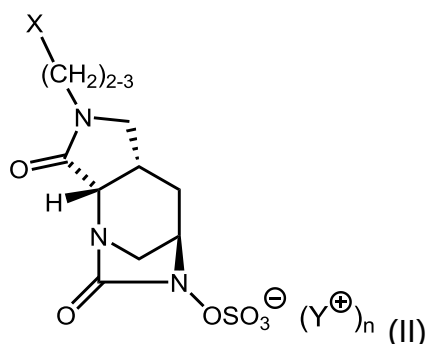
[0056] El compuesto de la modalidad 4, en donde R³ es alquilo C₁-C₂ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR', or una sal o forma zwitteriónica del mismo.

20 **[0057]** El compuesto de la modalidad 4, en donde R³ es H, o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

[0058] El compuesto de cualquiera de las modalidades 1-6, en donde R¹ y R² son ambos H, o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

25

[0059] El compuesto de la modalidad 1, que tiene esta estructura:



en donde X es $-\text{OR}$ o $-\text{NRR}'$;

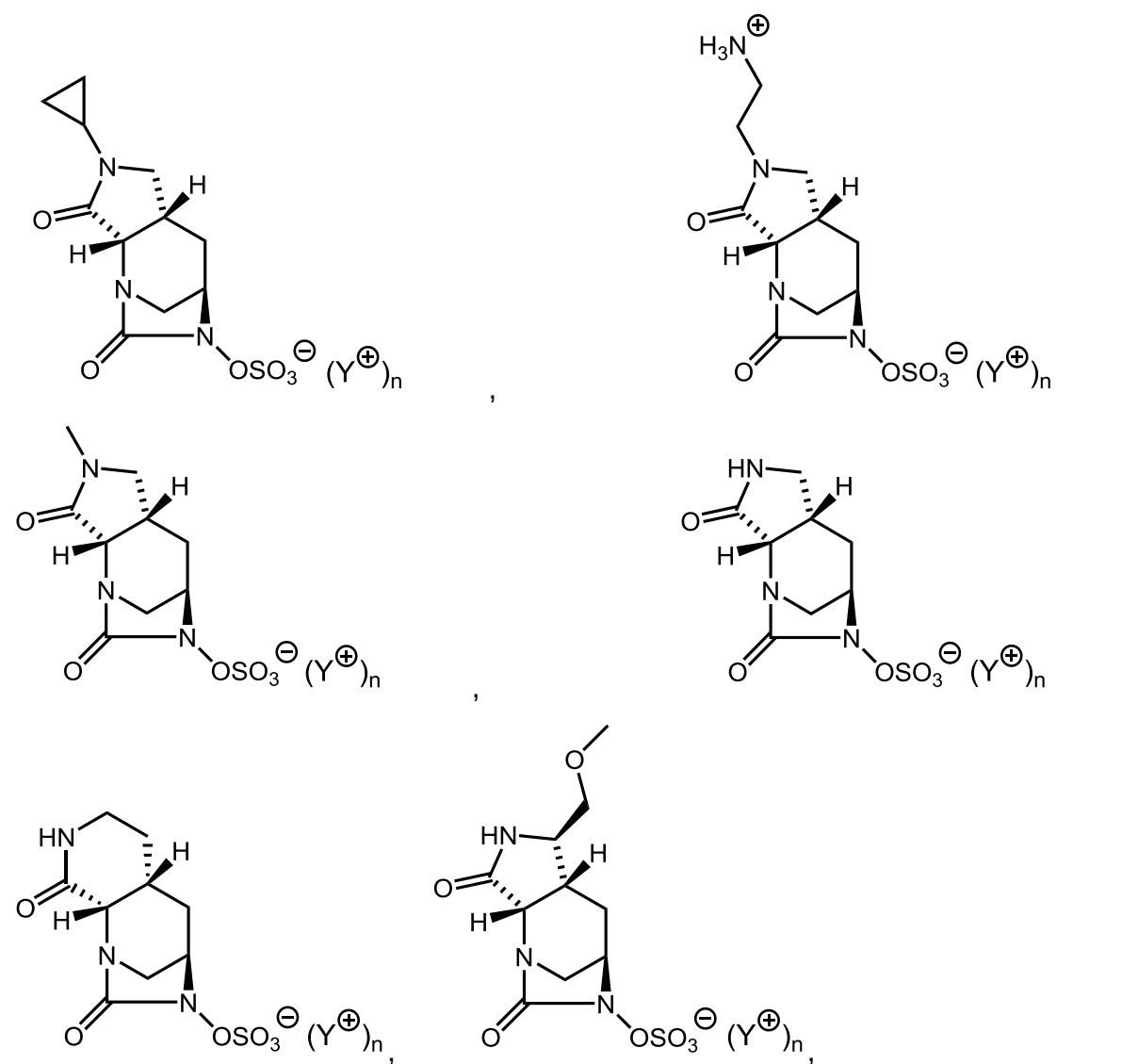
Y es un grupo catiónico;

n es 0 o 1; y

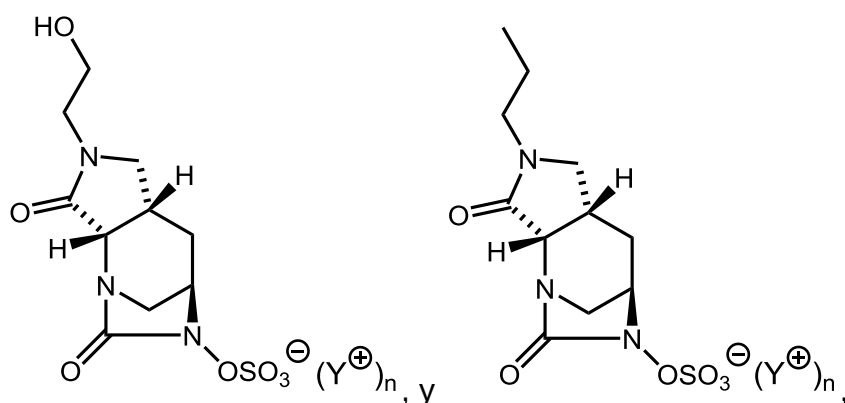
cuando n es 0 el compuesto de la Fórmula II está en una forma zwitteriónica.

5

[0060] El compuesto de la modalidad 1, el cual se selecciona a partir de:



10



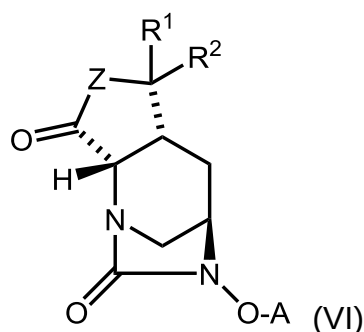
como una sal o forma zwitteriónica del mismo.

[0061] El compuesto de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde n es 1 y Y se selecciona entre sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc y cobre.

[0062] El compuesto de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Y es sodio.

[0063] El compuesto de cualquiera de las modalidades anteriores, el cual es una sal farmacéuticamente aceptable o zwitterion.

[0064] Una modalidad de interés especial es un compuesto de la Fórmula (VI):



en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';

Z es NR^3 o $N-OR^3$;

R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy,

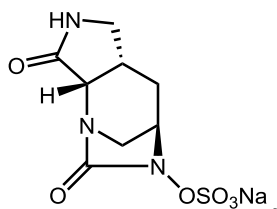
halo, CN, -OR, y -NRR'; Cy es un anillo de cicloalquilo C₃-C₆ o anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy es opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C₁-C₂, CN, -OR, y -NRR'; y

- 5 R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂, o R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que ambos están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, 10 pirrolidina, y azetidina, en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂;

A es H o -CH₂-Ph, donde Ph representa fenilo opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₄, alcoxilo C₁-C₄;

- 15 una sal o zwitterion del mismo.

[0065] Una modalidad de interés especial es un compuesto de la Fórmula (VII):



[0066] El compuesto de la modalidad 12 en forma cristalina.

20

[0067] El compuesto de la modalidad 13, que exhibe una endotermia en calorimetría de barrido diferencial entre 283 °C y 350 °C.

[0068] El compuesto de la modalidad 13, caracterizado por picos XRPD en ángulos de difracción (2Theta) de 8.3 y 16.6 grados.

25

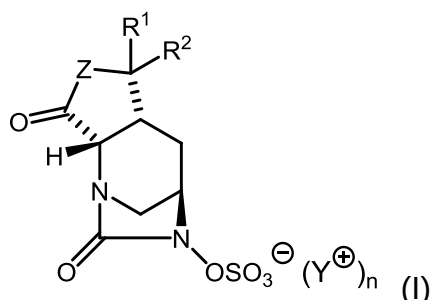
[0069] El compuesto de la modalidad 15, caracterizado adicionalmente por uno o más picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 25.1 o 31.3 grados.

30

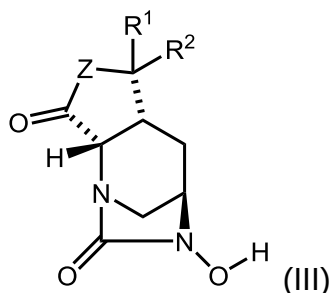
[0070] El compuesto de la modalidad 16, caracterizado adicionalmente por uno o más picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 27.4 o 28.7 grados.

- 5 **[0071]** El compuesto de la modalidad 17, caracterizado además por picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 19.5 grados y 21.7 grados.

[0072] Un proceso para hacer un compuesto de la Fórmula (I),



- 10 según la modalidad 3, como una sal o forma zwitteriónica del mismo;
en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de la Fórmula (III)

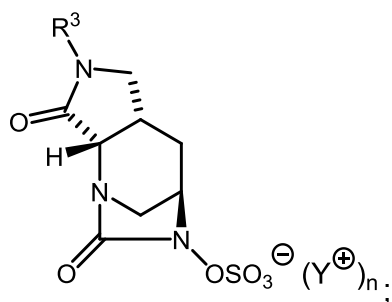


en donde Z, R¹ y R² y R³ son como se definen en la modalidad 3,
con un agente sulfonilante en presencia de una base.

15

[0073] El proceso de la modalidad 19, en donde Z es NR³, y R³ es H o alquilo C₁-C₂ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR',
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 **[0074]** El proceso de la modalidad 19 o 20, en donde el compuesto de la Fórmula (I) es de la fórmula

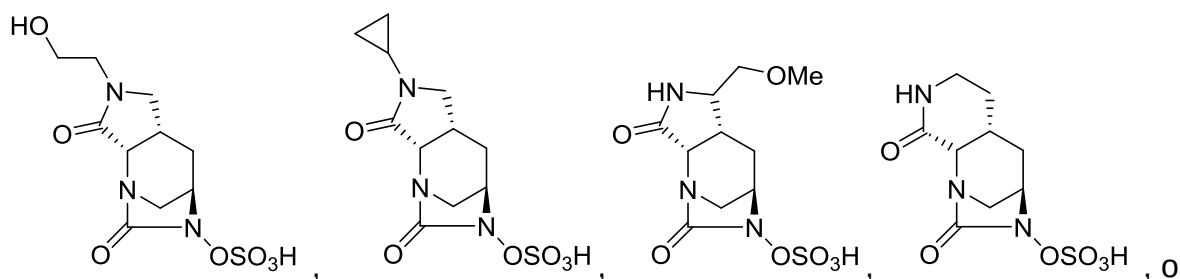
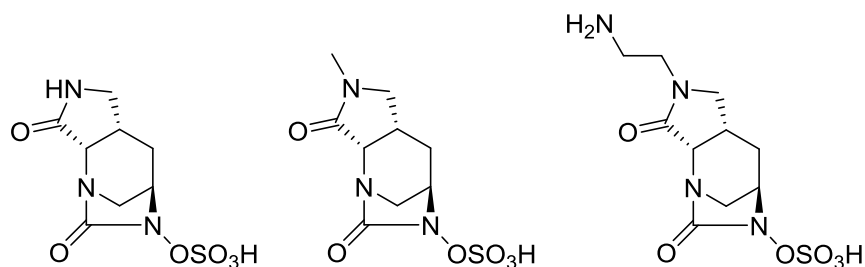


una sal o forma zwitteriónica del mismo.

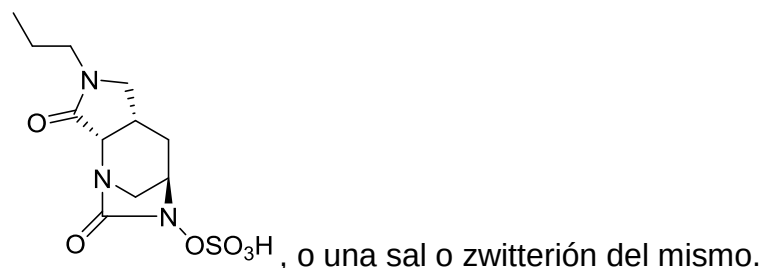
[0075] El proceso de cualquiera de las modalidades 19 a 21, en donde R^3 es H.

- 5 **[0076]** Los compuestos de la Fórmula (III) son útiles para sintetizar compuestos de la Fórmula (I) como se describe en la Modalidad 3 y otras modalidades anteriores.

[0077] Compuestos específicos de la Fórmula (A) y la Fórmula (I) incluyen:



10



[0078] En un aspecto adicional, la invención proporciona:

- 15 **[0079]** Una combinación farmacéutica que comprende (a) un primer agente terapéutico que es un compuesto de la invención, por ejemplo, un compuesto de la

Fórmula (A) o cualquier subfórmula del mismo en este documento, y (b) un segundo agente terapéutico como se describió anteriormente. El segundo agente terapéutico es típicamente un antibiótico beta-lactama.

[0080] Un método como se define anteriormente que comprende la co-administración, por ejemplo concomitantemente o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, por ejemplo, un compuesto de la Fórmula (A) o cualquiera de las subfórmulas del mismo que se describe en la presente, y un segundo agente terapéutico como se describe anteriormente.

[0081] Los términos "co-administración" o "administración combinada" o similares como se utilizan en la presente pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un paciente individual, y pretenden incluir los regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo. Las combinaciones fijas están también dentro del alcance de la presente invención. La administración de una combinación farmacéutica de la invención resulta en un efecto beneficioso, por ejemplo un efecto terapéutico sinérgico, en comparación con una monoterapia que aplica sólo uno de sus ingredientes farmacéuticamente activos.

[0082] Cada componente de una combinación de acuerdo con esta invención se puede administrar por separado, juntos, o en cualquier combinación de los mismos.

[0083] Un compuesto del invento y cualquier agente adicional pueden formularse en formas de dosificación separadas. Alternativamente, para disminuir el número de formas de dosificación administradas a un paciente, el compuesto del invento y cualquier agente adicional pueden formularse juntos en cualquier combinación. Por ejemplo, el compuesto del inhibidor del invento puede formularse en una forma de dosificación y el agente adicional pueden formularse juntos en otra forma de dosificación. Cualquiera de las formas de dosificación separadas pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes.

[0084] Alternativamente, una composición de esta invención comprende un agente adicional como se describe en la presente. Cada componente puede estar presente en composiciones individuales, composiciones de combinación, o en una única composición.

[0085] Los compuestos de la invención pueden sintetizarse mediante las rutas sintéticas generales siguientes, ejemplos específicos de las mismas se describen en detalle en los ejemplos

[0086] Los compuestos de la presente invención y los intermedios también se pueden convertir unos a otros según métodos generalmente conocidos por expertos en el estado de la técnica.

[0087] Dentro del alcance de este texto, solamente un grupo fácilmente removible que no es un constituyente del producto final deseado particular de los compuestos de la presente invención se designa un "grupo protector", a menos que el contexto indique lo contrario. La protección de grupos funcionales mediante tales protectores de grupo, los protectores de grupo mismos, y sus reacciones de escisión se describen por ejemplo en trabajos de referencia estándar, tal como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London y New York 1973, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Tercera edición, Wiley, New York 1999, en "The Peptides "; Volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, London y New York 1981, en "Methoden der organischen Chemie" (Métodos de Química Orgánica), Houben Weyl, 4a edición, Volume 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" (Aminoácidos, Péptidos, Proteínas), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, y Basel 1982, y en Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate" (Química de Carbohidratos: Monosacáridos y Derivados), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Una característica de los grupos protectores es que se pueden quitar fácilmente (es decir, sin la aparición de reacciones secundarias no deseadas) por ejemplo por solvólisis, reducción, fotólisis o, alternativamente bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, mediante escisión enzimática).

[0088] Las sales de los compuestos de la presente invención que tiene al menos un grupo formador de sal pueden prepararse de una manera conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las sales de los compuestos de la presente invención que tienen grupos ácidos pueden formarse, por ejemplo, tratando los compuestos, o una sal de los compuestos como la sal de tetrabutilamonio, con compuestos metálicos, tales como sales de metales alcalinos de ácidos carboxílicos orgánicos adecuados, ej., la sal de sodio del ácido 2-etilhexanoico en un disolvente apropiado apropiado, tal como una mezcla de isobutanol/agua, que puede facilitar la

precipitación del par de iones no deseado (por ejemplo, el 2-etilhexanoato de tetrabutyl-amonio si se usa la sal de tetrabutylamonio). Preferiblemente, una sal de un compuesto de la invención, tal como la sal de amonio, puede someterse a una resina de intercambio iónico en su forma de metal alcalino o metal alcalinotérreo para promover un intercambio de contraión. Las sales de adición ácida o intercambio de los compuestos de la presente invención son obtenidas en forma habitual, ej., al tratar los compuestos con un ácido o un reactivo de intercambio aniónico apropiado. Los zwitteriores o sales internas de compuestos de la presente invención que contienen grupos formadores de sales ácidas y básicas, ej., un grupo sulfato libre y un grupo amino libre, pueden formarse, ej., mediante la neutralización de sales, tales como sales de adición ácida, hacia el punto isoeléctrico, ej., con bases débiles, o mediante tratamiento con intercambiadores de iones.

[0089] Las sales se pueden convertir en los compuestos libres de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las sales de hidrocloruro pueden convertirse, por ejemplo, mediante tratamiento con un agente básico adecuado. Las mezclas de isómeros obtenibles según el invento pueden separarse en una forma conocida por aquellos con experiencia en el estado de la técnica en los isómeros individuales; los diastereoisómeros pueden separarse, por ejemplo, al particionar entre mezclas solventes polifásicas, recristalización y/o separación cromatográfica, por ejemplo sobre gel de sílice o por ej., cromatografía líquida de mediana presión sobre una columna de fase invertida, y los racematos pueden separarse, por ejemplo, mediante la formación de sales con reactivos formadores de sales ópticamente puras y separación de la mezcla de diastereoisómeros así obtenible, por ejemplo por medio de cristalización fraccional, o mediante cromatografía sobre materiales de columna ópticamente activa.

[0090] Intermedios y productos finales pueden purificarse según métodos estándar, ej., utilizando métodos cromatográficos, métodos de distribución, (re)- cristalización, y similares.

[0091] Lo siguiente aplica en general a todos los procesos mencionados en la presente antes y de aquí en adelante.

[0092] Todos los pasos de proceso para preparar los compuestos de la invención pueden realizarse bajo condiciones de reacción que son conocidas por los expertos en el estado de la técnica, incluyendo aquellas específicamente mencionadas, en ausencia o, comúnmente, en presencia de solventes o diluyentes, incluyendo, por

ejemplo, solventes o diluyentes que son inertes a los reactivos utilizados y disolverlos, en ausencia o presencia de catalizadores, agentes de condensación o neutralizadores, por ejemplo intercambiadores de iones, tales como intercambiadores de cationes, *ej.*, en la forma H⁺, dependiendo de la naturaleza de la reacción y/o de los reactivos a temperatura reducida, normal o elevada, por ejemplo en un rango de temperatura dentro - 100 °C y 190 °C aproximadamente, incluyendo, por ejemplo, desde - 80 °C a 150 °C aproximadamente, por ejemplo entre - 80 y - 60 °C aproximadamente, a temperatura ambiente, desde - 20 a 40 °C aproximadamente o a temperatura de reflujo, bajo presión atmosférica o en un recipiente cerrado, donde sea apropiado bajo presión, y/o en una atmósfera inerte, por ejemplo bajo una atmósfera de argón o nitrógeno.

[0093] En todas las etapas de las reacciones, las mezclas de isómeros que se forman pueden separarse en los isómeros individuales, por ejemplo diastereoisómeros o enantiómeros, o en cualquiera de las mezclas deseadas de isómeros, por ejemplo racematos o mezclas de diastereoisómeros.

[0094] Los solventes desde los cuales estos solventes que son apropiados para cualquier reacción particular pueden seleccionarse incluyen aquellos específicamente mencionados o, por ejemplo, agua, ésteres, tales como alquilo inferior-alcanoatos inferiores, por ejemplo acetato de etilo, éteres, tal como éteres alifáticos, por ejemplo éter dietílico, o éteres cíclicos, por ejemplo tetrahidrofurano o dioxano, hidrocarburos aromáticos líquidos, tales como benceno o tolueno, alcoholes, tales como metanol, etanol o 1- o 2-propanol, nitrilos, tal como acetonitrilos, hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno o cloroformo, amidas ácidas, tales como dimetilformamida o acetamida de dimetilo, bases, tales como bases de nitrógeno heterocíclico, por ejemplo piridina o *N*-metilpirrolidin- 2-ona, anhídridos de ácido carboxílicos, tales como anhídridos de ácido alcanoico inferior, por ejemplo anhídrido acético, hidrocarburos cíclicos, lineales o ramificados, tales como ciclohexano, hexano o isopentano, metilciclohexano, o mezclas de estos solventes, por ejemplo soluciones acuosas, a menos que se indique lo contrario en la descripción de los procesos. Tales mezclas solventes también pueden utilizarse en tratamientos finales, por ejemplo mediante cromatografía o particionamiento.

[0095] Los compuestos de la presente invención, incluyendo sus sales, también pueden obtenerse en la forma de sus hidratos, o sus cristales pueden, por ejemplo,

incluir el solvente utilizado para cristalización. Diferentes formas cristalinas pueden estar presentes.

[0096] Todos los materiales de inicio, precursores de síntesis, reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, solventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de la presente invención están comercialmente disponibles o pueden ser producidos por métodos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en el estado de la técnica..

[0097] El término "isómero óptico" o "un estereoisómero" como se utiliza en la presente, se refiere a cualquiera de las diferentes configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto dado de la presente invención e incluyen isómeros geométricos. Se entiende que un sustituyente puede estar unido a un centro quiral de un átomo de carbono. El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no poder ser superpuestas sobre su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a las moléculas que son superpuestas sobre su imagen especular. Por lo tanto, el invento incluye enantiómeros, diastereoisómeros o racematos del compuesto. Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares que no pueden ser superpuestas entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se utiliza para designar una mezcla racémica donde sea apropiado. Los "diaestereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero los cuales no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta es especificada según el sistema R- S de Cahn- Ingold- Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro la estereoquímica de cada carbono quiral puede especificarse por cualquiera R o S. Compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce pueden designarse (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextro- o levorotatoria) que rotan el plano de luz polarizada según la longitud de onda de la línea D del sodio. Ciertos compuestos descritos la presente contienen uno o más centros asimétricos o ejes y pueden así dar origen a enantiómeros, diastereoisómeros, y otras formas estereoisoméricas que serán definidas, en términos de la estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)- .

[0098] Dependiendo de la elección de los materiales de inicio y los procedimientos, los compuestos pueden estar presentes en la forma de uno de los posibles isómeros o como mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros ópticos puros, o como mezclas de isómeros, tales como racematos y mezclas de diastereoisómeros, en

función del número de átomos de carbono asimétricos. La presente invención se entiende incluye todos los estereoisómeros posibles, incluyendo mezclas racémicas, mezclas diastereoméricas y formas ópticamente puras. Isómeros (R)- y (S)- ópticamente activos pueden prepararse utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse utilizando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un enlace doble, el sustituyente puede ser de configuración E o Z. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente cicloalquilo puede tener una configuración cis- o - trans. Todas las formas tautoméricas también son incluidas.

[0099] Cualquier mezcla resultante de isómeros puede ser separada sobre la base de las diferencias fisicoquímicas de los constituyentes, en isómeros geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, diastereoisómeros, racematos, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccional.

[00100] Cualquiera de los racematos resultantes de los productos finales o intermediarios pueden ser resueltos en los antípodas ópticos mediante métodos conocidos, ej., mediante separación de las sales diastereoisoméricas de los mismos, obtenidas con un ácido o base ópticamente activos, y liberando el compuesto ácido o alcalino ópticamente activo. En particular, una fracción alcalina puede emplearse para separar los compuestos de la presente invención en sus antípodas ópticos, ej., mediante cristalización fraccional de una sal formada con un ácido ópticamente activo, ej., ácido tartárico, ácido dibenzoil tartárico, ácido diacetil tartárico, ácido di- O,O'- p- toluoil tartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido canfor- 10- sulfónico. Los productos racémicos también pueden separarse mediante cromatografía quiral, ej., cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un absorbente quiral.

[00101] Además, los compuestos de la presente invención, incluyendo sus sales, también pueden obtenerse en la forma de sus hidratos, o incluir otros solvatos utilizados para su cristalización. Los compuestos de la presente invención pueden inherentemente o por diseño formar solvatos con solventes farmacéuticamente aceptables (incluyendo agua); por lo tanto, se pretende que el invento incluya formas tanto solvatadas como no solvatadas.. El término "solvato" se refiere a un complejo molecular de un compuesto de la presente invención (incluyendo sales o formas zwitterionicas de los mismos) con una o más moléculas solventes. Tales moléculas solventes son las comúnmente utilizadas en la técnica farmacéutica, que

son conocidas por ser inocuas para el receptor, ej., agua, etanol, y similares. El término "hidrato" se refiere al complejo donde la molécula solvente es agua.

[00102] Los compuestos de la presente invención, incluyendo sales, hidratos y solvatos de los mismos, pueden inherentemente o por diseño formar polimorfos.

5 **[00103]** Como se utiliza en la presente, los términos "sal" o "sales" se refieren a una sal de adición ácida o adición alcalina de un compuesto de la presente invención. "Sales" incluyen en particular "sales farmacéuticamente aceptables". El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la efectividad biológica y propiedades de los compuestos de esta invención y, que
10 típicamente son biológicamente o de otra manera deseables. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales ácidas y/o alcalinas en virtud de la presencia de grupos amino y/o sulfato o grupos similares de los mismos.

[00104] Sales de intercambio o de adición ácida farmacéuticamente aceptables
15 pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, ej., acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/hidrobromuro, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, cloruro/hidrocloruro, clorteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato,
20 mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y sales de trifluoroacetato.

[00105] Ácidos inorgánicos o "Grupos Aniónicos" que pueden introducirse o a
25 partir de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido hidrobrómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

[00106] Ácidos orgánicos o "Grupos Aniónicos" que pueden introducirse o de los cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maléico, ácido manólico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las sales de intercambio o adición alcalina
30 farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

[00107] Las bases inorgánicas o "Grupos Catiónicos" que pueden introducirse o de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, sales y metales de amonio de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas modalidades, las sales se derivan a partir de los grupos catiónicos de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; sales particularmente apropiadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

[00108] Las bases inorgánicas o "Grupos Catiónicos" que pueden introducirse o a partir de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de ocurrencia natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio de iones alcalinos, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen esopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

[00109] Las sales de la presente invención pueden sintetizarse a partir de una fracción alcalina o ácida, mediante métodos químicos convencionales.

Generalmente, tales sales pueden prepararse al reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tales como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K o similares), o al reaccionar formas alcalinas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Preferiblemente, una sal de un compuesto de la invención, tal como una sal de amonio, puede someterse a una resina de intercambio iónico en su forma de metal alcalino o metal alcalinotérreo para promover un intercambio de contraión. Las sales de adición ácida o intercambio de los compuestos de la presente invención son obtenidas en forma habitual, ej., al tratar los compuestos con un ácido o un reactivo de intercambio aniónico apropiado.

Los zwitteriores o sales internas de compuestos de la presente invención que contienen grupos formadores de sales ácidas y básicas, ej., un grupo sulfato libre y un grupo amino libre, pueden formarse, ej., mediante la neutralización de sales, tales como sales de adición ácida, hacia el punto isoeléctrico, ej., con bases débiles, o mediante tratamiento con intercambiadores de iones. Típicamente, tales reacciones se realizan en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, el uso de medios no acuosos tipo éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo es deseable, donde pueda realizarse. Sales apropiadas adicionales pueden encontrarse, ej., en "*Remington's Farmaceutical Sciences*", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of

Farmaceutical Salts: Properties, Selection, y Use” de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

[00110] Cualquier fórmula dada en la presente también pretende representar formas no rotuladas así como también formas rotuladas isotópicamente de los compuestos de la presente invención. Los compuestos isotópicamente rotulados tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en la presente excepto que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene un número de masa o masa atómica seleccionada. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos del invento incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I respectivamente. La invención incluye diferentes compuestos isotópicamente rotulados de la presente invención, por ejemplo aquellos en los cuales isótopos radioactivos, tales como ^3H , y ^{14}C , o aquellos en los cuales isótopos no radioactivos, tales como ^2H y ^{13}C están presentes. Tales compuestos rotulados isotópicamente son útiles en estudios metabólicos (con ^{14}C), estudios cinéticos de reacción (con, por ejemplo ^2H o ^3H), técnicas de detección o registro, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT) incluyen ensayo de distribución tisular de sustratos o fármacos, o en tratamiento radioactivo de pacientes. En particular, un compuesto ^{18}F rotulado de la presente invención puede ser particularmente deseado para estudios PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente rotulados de la presente invención generalmente pueden prepararse mediante técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en el estado de la técnica o mediante procesos análogos a aquellos descritos en las Secciones de Ejemplos y Preparaciones anexas utilizando un reactivo isotópicamente rotulado apropiado en cambio del reactivo no rotulado empleado anteriormente.

[00111] Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan a partir de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media in vivo aumentada o requerimientos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que deuterio en este contexto es considerado como un sustituyente de un compuesto de la presente invención. La concentración de tal isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse por el factor de enriquecimiento isotópico. El término "factor de enriquecimiento isotópico" como se

utiliza en la presente se refiere a la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo específico. Si un sustituyente en un compuesto de este invento se denota deuterio, tal compuesto tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de al menos 3500 (52.5% de incorporación de deuterio en cada átomo de deuterio designado), al menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), al menos 4500 (67.5% de incorporación de deuterio), al menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), al menos 5500 (82.5% de incorporación de deuterio), al menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), al menos 6333.3 (95% de incorporación de deuterio), al menos 6466.7 (97% de incorporación de deuterio), al menos 6600 (99% de incorporación de deuterio), o al menos 6633.3 (99.5% de incorporación de deuterio).

[00112] Solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en donde el solvente de cristalización puede sustituirse isotópicamente, ej. D₂O, d₆-acetona, d₆-DMSO.

[00113] Compuestos de la presente invención que contienen grupos capaces de actuar como donantes y/o aceptores para enlaces de hidrógeno pueden ser capaces de formar co-cristales con procedimientos de formación de co-cristales apropiados. Estos co-cristales pueden prepararse a partir de compuestos de la presente invención mediante procedimientos conocidos de formación de co-cristales. Tales procedimientos incluyen solubilidad diferencial, calentamiento, co-sublimación, co-fundición, o poner en contacto en solución los compuestos de la presente invención con el formador de co-cristales bajo condiciones de cristalización y aislamiento de co-cristales así formados. Los formadores de co-cristales adecuados incluyen los descritos en el documento WO 2004/078163. Por lo tanto la invención proporciona además co-cristales que comprenden un compuesto de la presente invención.

[00114] Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.*, "tal como") proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor el invento y no implica limitación sobre el alcance del invento de otra manera reivindicado.

[00115] La presente invención proporciona nuevos compuestos, formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos, y métodos de tratamiento de

infecciones bacterianas Gram-negativas. En particular, los compuestos son adecuados para su uso para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias de Burkholderia, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, meningitidis, Morganella, Pseudomonas, Proteus, Salmonella, Serratia, Acinetobacter, Bacteroides, Campylobacter, Neisseria, o Stenotrophomonas, incluyendo especies citadas en el presente documento.

[00116] La sustitución con isótopos más pesados, tal como deuterio, es decir, ^2H puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan a partir de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos, y por lo tanto puede ser preferida en algunas circunstancias. Por ejemplo, la sustitución de deuterio en enlaces de hidrocarburos no intercambiables (por ejemplo, CH) puede retardar la epimerización y/o oxidación metabólica *in vivo*.

[00117] Compuestos isotópicamente marcados de la invención, es decir compuestos de la fórmula (A), pueden generalmente prepararse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a aquellos descritos en las Secciones de Ejemplos y Preparaciones adjuntas utilizando un reactivo isotópicamente rotulado apropiado en cambio del reactivo no rotulado previamente empleado.

[00118] En aún otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto con una infección bacteriana, el método que comprende la etapa de administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad antibacteriana eficaz de un compuesto de la invención, por ejemplo, un compuesto de la Fórmula (A) o una sal del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con un antibiótico de beta-lactama. Los antibióticos beta-lactámicos adecuados para uso en estos métodos incluyen, pero no están limitados a penicilinas tal como penicilina G, penicilina V, metilicina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina, temocilina, cefalosporina tal como cephalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozil, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefinetazol, cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir, cefpiroma, cefepima, y carbapenemas tales como doripenem, imipenem, meropenem, panipenem y monobactams tales como aztreonam, y beta-lactama 5 la cual se divulga en la presente.

[00119] Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención es una cantidad que sustancialmente potencia la actividad de un antibiótico beta-lactámico usado en combinación con el compuesto de la invención, tal como una cantidad que hace que el antibiótico sea al menos cuatro veces más activo contra una bacteria diana, es decir, una cantidad que disminuye la concentración inhibitoria mínima (o "concentración inhibidora mínima", "MIC") para la bacteria diana en al menos 4 veces y preferiblemente en al menos 8 veces.

[00120] Una "cantidad eficaz" de una combinación de un BLI más antibiótico beta-lactámico como se usa en la presente se refiere a una cantidad eficaz para tratar una infección bacteriana en un sujeto, típicamente un sujeto humano. La cantidad eficaz depende de la sensibilidad de la bacteria infectante al antibiótico escogido y del grado de potenciación proporcionado por el BLI utilizado en la combinación. El experto en la materia puede determinar una cantidad eficaz de tales combinaciones basándose en los parámetros del sujeto a tratar, la bacteria infectante y la combinación a utilizar, que puede incluir la determinación de la CIM para la combinación particular sobre la bacteria diana. Típicamente, la bacteria a tratar es una que es resistente a al menos algunos antibióticos beta - lactámicos porque la bacteria expresa una actividad de beta - lactamasa.

[00121] Los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de pacientes que padecen o son susceptibles a infecciones de la piel, neumonía, sepsis, fibrosis quística, heridas, pie diabético, infecciones intra abdominales complicadas o infecciones complicadas del tracto urinario y enfermedades de transmisión sexual causadas por patógenos Gram-negativos o Gram-positivos. Los compuestos de la invención también son útiles en las condiciones que son causadas por una especie de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Neisseria*, o *Stenotrophomonas*. En particular, una infección bacteriana causada por una especie de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, o *Acinetobacter* es tratable mediante métodos en la presente. Especies bacterianas particulares para tal tratamiento incluyen *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter faecalis*, *faecium Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, especies de *Salmonella*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Acinetobacter baumannii, así como también *Bacteroides fragilis*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Stenotrophomonas maltophilia*.

[00122] Mediante el término “combinación” se quiere indicar bien sea una combinación fija en una forma unitaria de dosificación, o un kit o instrucciones para la administración combinada donde un compuesto de la presente invención y un socio de combinación de antibiótico de beta-lactama pueden administrarse independientemente o en conjunto, al mismo tiempo o de manera separada dentro de intervalos de tiempo que permiten específicamente que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo, *ej.*, sinérgico, o cualquier combinación de los mismos.

[00123] Una modalidad de la presente invención proporciona compuestos de la presente invención en una combinación farmacéutica con un antibiótico beta-lactámico y un tercer agente terapéutico. En algunas modalidades, el tercer agente terapéutico es un agente antibacteriano adicional o un inhibidor adicional de beta-lactamasa. En algunas modalidades, la combinación incluye al menos otro agente antibacteriano, que puede ser otro antibiótico beta-lactámico u otro agente antibacteriano seleccionado entre las clases descritas más adelante. Ejemplos no limitantes de agentes antibacterianos adicionales para su uso en las combinaciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse a partir de los siguientes grupos:

1. Macrólidos o cetólidos tales como eritromicina, azitromicina, claritromicina y telitromicina;

2. Los antibióticos beta-lactámicos, que incluyen penicilina tal como penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina, temocillin, cefalosporina tal como cepalotin, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozil, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefinetazol, cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir, cefpiroma, cefepima, y carbapenemas tales como doripenem, imipenem, meropenem, panipenem y monobactams tales como aztreonam, y beta-lactama 5 en la presente;

3. Glicopéptidos tales como vancomicina y teicoplanina;

4. Quinolonas tales como ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacin, pefloxacin, enoxacin, ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacina, temafloxacin, lomefloxacina, fleroxacin, grepafloxacino, esparfloxacino, trovafloxacin, clinafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina, ganefloxacina, gemifloxacina, delafloxacina y pazufloxacina;
5. Sulfonamidas antibacterianas y sulfanilamidas antibacterianas, que incluyen ácido para-aminobenzoico, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol y sulfatidina;
6. Aminoglucósidos tales como estreptomycin, neomicin, kanamicin, paromicin, gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin, espectinomycin, sisomicin, dibecalina, plazomicin e isepamicin;
7. Tetraciclinas tales como tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, tigeciclina y eravaciclina;
8. Rifamicinas tales como rifampicin (también llamada rifampina), rifapentina, rifabutin, bezoxazinorifamicin y rifaximin;
9. Lincosamidas tales como lincomycin y clindamicin;
10. Estreptograminas tales como quinupristina y dafopristina;
11. Oxazolidinonas tales como linezolid o tedizolid;
12. Polimixina, colistina y colimicin;
13. Trimetoprima y bacitracina; y
14. Inhibidores de bomba de eflujo.
15. Inhibidores de beta-lactamasa, tales como inhibidores de metalo beta-lactamasa.

[00124] La beta-lactama o segundo agente antibacteriano se puede administrar en combinación con los compuestos de las presentes invenciones en donde la beta-lactama o segundo agente antibacteriano se administra antes, simultáneamente, o después del compuesto o compuestos de la presente invención. Cuando se desea administración simultánea de un compuesto de la invención con un segundo o tercer agente y la vía de administración es la misma, entonces un compuesto de la invención puede formularse con un segundo o tercer agente en la misma forma de dosificación. Un ejemplo de una forma de dosificación que contiene un compuesto de la invención y un segundo o tercer agente es una administración intravenosa. Un ejemplo alternativo es una administración intramuscular de una solución que comprende un compuesto de la invención y un segundo o tercer agente.

[00125] Los compuestos y composiciones descritos en la presente pueden utilizarse o administrarse en combinación con una beta-lactama y uno o más agentes terapéuticos que actúan como inmunomoduladores, por ejemplo, un activador de una molécula coestimuladora, o un inhibidor de una molécula inmuno-inhibitoria, o una vacuna. La proteína de Muerte Programada 1 (PD-1) es un miembro inhibitorio de la familia CD28/CTLA4 extendida de reguladores de células T (Okazaki (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett (2003) *J. Immunol.* 170:711-8). PD-1 se expresa sobre células B activadas, células T, y monocitos. PD-1 es una proteína inmunoinhibitoria que disminuye las señales de TCR (Ishida, Y. (1992) *EMBO J.* 11: 3.887 a 3895; Blank, C. (Epub 29 de diciembre 2006) *Immunol. Immunother.* 56 (5): 739-745), y se incrementa en infecciones crónicas. La interacción entre PD-1 y PD-L1 puede actuar como un punto de comprobación inmune, que puede llevar a, por ejemplo, una disminución de infiltración de linfocitos, una disminución en la proliferación mediada por receptores de células T, y/o evasión inmune por células cancerígenas o infectadas (Dong, (2003) *J Mol Med* 81:281-7; Blank, (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi, (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmune puede revertirse mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 o PD-L1; el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 es bloqueada también (Iwai, (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66). (2002) *Proc. Acad.* 170:1257-66). La inmunomodulación puede lograrse mediante la unión a ya sea la proteína inmuno-inhibitoria (por ejemplo, PD-1) o las proteínas de unión que modulan la proteína inhibitoria (por ejemplo, PD-L1, PD-L2).

[00126] En una modalidad, las terapias de combinación de la invención incluyen un inmunomodulador que es un inhibidor o antagonista de una molécula inhibitoria de una molécula de punto de comprobación inmune. En otra modalidad, el inmunomodulador se une a una proteína que inhibe de forma natural la molécula de punto de comprobación inmuno-inhibitoria. Cuando se utiliza en combinación con compuestos antibacterianos, estos inmunomoduladores pueden mejorar la respuesta antimicrobiana, y por lo tanto mejorar la eficacia en relación al tratamiento con el compuesto antibacteriano solo.

[00127] El término "puntos de comprobación inmune" se refiere a un grupo de moléculas en la superficie celular de las células T CD4 y CD8. Estas moléculas pueden servir efectivamente como "frenos" para disminuir o inhibir una respuesta

inmune adaptiva. Moléculas de punto de comprobación inmune incluyen, pero no se limitan a, muerte programada 1 (PD-1), Antígeno 4 de linfocito t citotóxico (CTLA-4), B7H1, B7H4, OX-40, CD137, CD40, y LAG-3, que inhiben directamente las células inmunes. Agentes inmunoterapéuticos que pueden actuar como inhibidores de punto de comprobación inmune útiles en los métodos de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibitoria puede realizarse mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína. En algunas modalidades, un ácido nucleico inhibitorio (ej., un ARNds, ARNsi, o ARNsh), puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula inhibidora. En otras modalidades, el inhibidor de una señal inhibitoria es un polipéptido por ejemplo, un ligando soluble, o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la molécula inhibitoria.

[00128] Por "en combinación con", no se pretende dar a entender que la terapia o los agentes terapéuticos deben ser administrados al mismo tiempo y/o formulados para administrarse juntos, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance descrito en la presente. El inmunomodulador puede administrarse simultáneamente con, antes de, o posteriormente a, uno o más compuestos de la invención y el socio de beta-lactama, y opcionalmente una o más terapias o agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos en combinación pueden administrarse en cualquier orden. En general, cada agente será administrado a una dosis y/o en un esquema de tiempo determinado para ese agente. Además, se apreciará que los agentes terapéuticos utilizados en esta combinación pueden administrarse juntos en una única composición o pueden administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que cada uno de los agentes terapéuticos adicionales utilizados en combinación se utilice a niveles que no excedan los niveles en los que se utilizan individualmente. En algunas modalidades, los niveles utilizados en combinación serán más bajos que los utilizados individualmente.

[00129] En ciertas modalidades, el inhibidor beta descrito en la presente se administra en combinación con una beta-lactama o más inmunomoduladores que son inhibidores de PD-1, PD-L1 y/o PD-L2. Cada inhibidor puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de

fusión, o un oligopéptido. Ejemplos de tales inmunomoduladores son conocidos en la técnica.

[00130] En algunas modalidades, el inmunomodulador es un anticuerpo anti-PD-1 seleccionado a partir de MDX-1106, Merck 3475 o CT-011.

5 **[00131]** En algunas modalidades, el inmunomodulador es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de LI-PD o PD-L2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina).

10 **[00132]** En algunas modalidades, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1 tal como AMP-224.

[00133] En algunas modalidades, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1 tal como un anticuerpo anti-PD-L1.

15 **[00134]** En algunas modalidades, el inmunomodulador es un antagonista de unión a anti-PD-L1 elegido a partir de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, o MDX-1105. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-L1 descrito en WO 2010/077634.

20 **[00135]** En algunas modalidades, el inmonomodulador es nivolumab (Número de Registro CAS: 946414-94-4). Nombres alternativos para nivolumab incluyen MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, o BMS-936558. Nivolumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano IgG4 que específicamente bloquea PD-1. Nivolumab (clón 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 se divulgan en EE.UU 8,008,449, y WO2006 / 121168.

25 **[00136]** En algunas modalidades, el inmunomodulador es un Pembrolizumab de anticuerpo anti-PD-1. Pembrolizumab (también conocido como Lambrolizumab, MK-3475, MK03475, SCH-900475 o KEYTRUDA®; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1. Pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-L1 humanizados se describen en Hamid, O. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134–44, US 8,354,509, WO2009/114335, y
30 WO2013/079174.

[00137] En algunas modalidades, el inmunomodulador es Pidilizumab (CT-011; Cure Tech), un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une a PD1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados se describen en WO2009/101611.

[00138] Otros anticuerpos anti-PD1 útiles como inmunomoduladores para su uso en los métodos descritos en la presente incluyen AMP 514 (Amplimmune), y anticuerpos anti-PD1 descritos en US 8609089, US 2010028330, y/o US 20120114649. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 es

5 MSB0010718C. MSB0010718C (también conocido como A09-246-2; Merck) es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1.

[00139] En algunas modalidades, el inmunomodulador es MDPL3280A (Genentech / Roche), un anticuerpo monoclonal IgG1 optimizado de Fc humana que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos que se

10 unen a PD-L1 se describen en la patente EE.UU. No: 7,943,743 y Publicación EE.UU. No.: 20120039906. Otros agentes de unión a anti-PD-L1 útiles como inmunomoduladores para métodos de la invención incluyen YW243.55.S70 (véase WO2010 / 077634), MDX-1105 (también conocido como BMS-936559), y agentes de unión a anti-PD-L1 descritos en WO2007/005874.

[00140] En algunas modalidades, el inmunomodulador es AMP-224 (B7-DCIG; Amplimmune; por ejemplo, divulgado en WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble PD-L2 Fc de fusión que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1.

[00141] En algunas modalidades, el inmunomodulador es un anticuerpo anti-

20 LAG-3 tal como BMS-986016. BMS-986016 (también conocido como BMS986016) es un anticuerpo monoclonal que se une a LAG-3. BMS-986016 y otros anticuerpos anti-LAG-3 humanizados se describen en EE.UU 2011/0150892, WO2010/019570, y WO2014/008218.

[00142] En ciertas modalidades, las terapias de combinación divulgadas en la

25 presente incluyen un modulador de una molécula coestimuladora o una molécula inhibitoria, *ej.*, un ligando o receptor co-inhibitorio.

[00143] En una modalidad, el modulador coestimulador, por ejemplo, agonista, de la molécula coestimuladora se elige a partir de un agonista (por ejemplo, un anticuerpo agonista o fragmento de unión a antígeno del mismo, o

30 fusión soluble) de ligando OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 o CD83.

[00144] En otra modalidad, las terapias de combinación descritas en la presente incluyen un inmunomodulador que es una molécula coestimuladora, *ej.*, un

agonista asociado con una señal positiva que incluye un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS y/o GITR.

[00145] Agonistas GITR de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplo, anticuerpos anti-GITR bivalentes), tales como una proteína de fusión GITR descrita en la patente de EE.UU. No: 6,111,090, Patente Europea No.: 090505B1, Patent EE.UU. No.: 8,586,023, Publicación PCT Nos.: El documento WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No: 7,025,962, Patente Europea No.: 1947183B1, Patente EE.UU. No.: 7,812,135, Patent EE.UU. No.: 8,388,967, Patent EE.UU. No.: 8,591,886, Patente Europea No.: EP 1866339, Publicación PCT No.: WO 2011/028683, Publicación PCT No.: WO 2013/039954, Publicación No.: WO2005/007190, Publicación PCT No.: WO 2007/133822, Publicación PCT No.: WO2005/055808, Publicación PCT No.: WO 99/40196, Publicación PCT No.: WO 2001/03720, Publicación PCT No.: WO99/20758, Publicación PCT No.: WO2006/083289, Publicación PCT No.: WO 2005/115451, Patente EE.UU. No.: 7,618,632, y Publicación PCT No.: WO 2011/051726.

[00146] En una modalidad, el inmunomodulador utilizado es un ligando soluble (por ejemplo, un CTLA-4-Ig), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD-L1, PD-L2 o CTLA4. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab. Anticuerpos anti-CTLA4 de ejemplo incluyen Tremelimumab (IgG2 anticuerpo monoclonal disponible en Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675,206), y ipilimumab (anticuerpo CTLA-4, también conocido como MDX-010, CAS No. 477202-00-9);

[00147] En una modalidad, una molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra después del tratamiento con un compuesto de la invención como se describe en la presente.

[00148] En otra modalidad, una molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 se administra en combinación con un anticuerpo anti-LAG-3 o un fragmento de unión a antígeno de la misma. En otra modalidad, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 se administra en combinación con un anticuerpo anti-TIM-3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aún otras modalidades, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 se administra en combinación con un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-TIM-3, o fragmentos de unión a antígeno del mismo. La

combinación de anticuerpos citados en la presente puede administrarse por separado, *ej.*, como anticuerpos separados, o enlazados, *ej.*, como una molécula de anticuerpo biespecífico o triespecífico. En una modalidad, se administra un anticuerpo biespecífico que incluye una molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 y un anticuerpo anti-TIM-3 o anti-LAG-3, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, la combinación de anticuerpos citados en la presente se usa para tratar un cáncer, *ej.*, un cáncer como se describe en la presente (*ej.*, un tumor sólido). La eficacia de las combinaciones anteriormente mencionadas puede ser probada en modelos animales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los modelos animales para probar el efecto sinérgico de anti-PD-1 y anti-LAG-3 se describen, por ejemplo, en Woo, (2012) Cancer Res. 72 (4): 917-27). 72(4):917-27).

[00149] Inmunomoduladores de ejemplo que se pueden utilizar en las terapias de combinación incluyen, pero no se limitan a, *ej.*, afutuzumab (disponible en Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), actimid (CC4047); y citoquinas, *ej.*, IL-21 o IRX-2 (mezcla de citoquinas humanas, que incluyen interleucina 1, interleucina 2, e interferón γ , CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics).

[00150] Dosis de ejemplo de tales inmunomoduladores que se pueden utilizar en combinación con los compuestos antibacteriales de la invención incluyen una dosis de molécula de anticuerpo anti-PD-1 de 1 a 10 mg/kg aproximadamente, por ejemplo, 3 mg/kg, y una dosis de un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab de 3 mg/kg aproximadamente.

[00151] Ejemplos de modalidades de los métodos de utilización de los compuestos de la invención en combinación con un antibiótico de beta-lactama y un inmunomodulador incluyen estos:

[00152] Un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de la Fórmula (a) como se describe en la presente, y un inmunomodulador.

[00153] El método de la modalidad i, en donde el inmunomodulador es un activador de una molécula coestimuladora o un inhibidor de una molécula de punto de comprobación inmune.

[00154] El método de cualquiera de las modalidades i y ii, en donde el activador de la molécula coestimuladora es un agonista de uno o más de OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a /CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137),

GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 y ligando CD83.

[00155] El método de cualquiera de las modalidades i-iii anteriores, en donde el inhibidor de la molécula de punto de comprobación inmune se elige a partir de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta.

[00156] El método de cualquiera de las modalidades i-iii, en donde el inhibidor de la molécula de punto de comprobación inmune se selecciona a partir de un inhibidor de PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 o CTLA4, o cualquier combinación de los mismos.

[00157] El método de cualquiera de las modalidades i-v, en donde el inhibidor de la molécula de punto de comprobación inmune es un ligando soluble o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la molécula de punto de comprobación inmune.

[00158] El método de cualquiera de las modalidades i-vi, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es de IgG1 o IgG4 (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana).

[00159] El método de cualquiera de las modalidades i-vii, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es alterado, por ejemplo, mutado, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor Fc, glicosilación de anticuerpos, el número de residuos de cisteína, función de células efectoras, o función de complemento).

[00160] El método de cualquiera de las modalidades i-viii, en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífica o multiespecífica que tiene una primera especificidad de unión a PD-1 o PD-L1 y una segunda especificidad de unión a TIM-3, LAG-3, o PD-L2.

[00161] El método de cualquiera de las modalidades i-ix, en donde el inmunomodulador es un anticuerpo anti-PD-1 elegido a partir de Nivolumab, Pembrolizumab o Pidilizumab.

[00162] El método de cualquiera de las modalidades i-x, en donde el inmunomodulador es un anticuerpo anti-PD-L1 elegido a partir de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, o MDX-1105.

[00163] El método de cualquiera de las modalidades i-x, en donde el inmunomodulador es una molécula de anticuerpo anti-LAG-3.

[00164] El método de la modalidad xii, en donde la molécula de anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016,

[00165] El método de cualquiera de las modalidades i-x, en donde el inmunomodulador es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 administrada por inyección (ej., por vía subcutánea o intravenosa) a una dosis de 1 a 30 mg/kg aproximadamente, ej., 5 a 25 mg/kg aproximadamente, 10 a 20 mg/kg aproximadamente, 1 a 5 mg/kg aproximadamente, o 3 mg/kg aproximadamente, ej., una vez a la semana a una vez cada 2, 3 o 4 semanas.

[00166] El método de la modalidad xiv, en donde la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de 10 a 20 mg/kg aproximadamente cada dos semanas.

[00167] El método de la modalidad xv, en donde la molécula de anticuerpo anti-PD-1 ej., nivolumab, se administra por vía intravenosa a una dosis de 1 a 3 mg/kg aproximadamente ej., 1 mg/kg, 2 mg/kg or 3 mg/kg aproximadamente cada dos semanas.

[00168] El método de la modalidad xv, en donde la molécula de anticuerpo anti-PD-1 ej., nivolumab, se administra por vía intravenosa a una dosis de 2 mg/kg aproximadamente a intervalos de 3 semanas.

[00169] La expresión "cantidad eficaz" del compuesto es aquella cantidad necesaria o suficiente para aumentar la eficacia de un antibiótico de beta-lactama usado para tratar o prevenir una infección bacteriana y/o una enfermedad o condición descrita en la presente. En un ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto es una cantidad suficiente para tratar la infección bacteriana en un sujeto, cuando se dosifica junto con una beta-lactama. En otro ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto es una cantidad suficiente para tratar una infección bacteriana cuando se dosifica con un antibiótico de beta-lactama, causada por, pero no limitada a la especie de Enterobacteriaceae y similares en un sujeto. La cantidad efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño y peso del sujeto, el tipo de enfermedad, las características del patógeno bacteriano que causa la enfermedad (por ejemplo, el tipo y nivel de la producción de beta-lactamasa) o el compuesto particular de la invención, así como el antibiótico beta-lactama que se va a usar junto con el compuesto de la invención. Por ejemplo, la elección del compuesto de la invención puede afectar lo que constituye una "cantidad eficaz".

Un experto ordinario en la técnica sería capaz de estudiar los factores contenidos en este documento y hacer la determinación con respecto a la cantidad efectiva de los compuestos de la invención sin experimentación indebida.

[00170] El régimen de administración puede afectar o que constituye una cantidad eficaz. El compuesto de la invención puede administrarse al sujeto ya sea antes o después de la aparición de una infección bacteriana. Típicamente, el compuesto se administra a un sujeto diagnosticado con una infección bacteriana y en necesidad de tratamiento de la misma. Además, varias dosis divididas, así como las dosis escalonadas, se pueden administrar cada 6 horas, cada 8 horas, cada 12 horas o diariamente o secuencialmente, o la dosis se puede infundir continuamente, o puede ser una inyección de bolo. Además, las dosificaciones de los compuesto(s) de la invención se pueden aumentar o disminuir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica. Típicamente, el compuesto de la invención se administra durante un curso de al menos 5 días, más comúnmente al menos 7 días o al menos 10 días o al menos 14 días, a través de 3 o 4 infusiones por día (cada 6 u 8 horas)

[00171] Los compuestos de la invención pueden usarse en el tratamiento de estados, trastornos o enfermedades como se describe en el presente documento, o para la fabricación de composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de estas enfermedades. La invención proporciona métodos de uso de los compuestos de la presente invención en el tratamiento de estas enfermedades o preparaciones farmacéuticas que tienen los compuestos de la presente invención para el tratamiento de estas enfermedades.

[00172] El término "composición farmacéutica" incluye preparaciones adecuadas para la administración a mamíferos, *ej.*, seres humanos. Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos a mamíferos, *ej.*, humanos, se pueden administrar *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,1 a 99,5% (más preferiblemente, de 0.5 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[00173] La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" es reconocida en la técnica e incluye un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, adecuado para la administración de compuestos de la presente invención a mamíferos. Los vehículos incluyen relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente,

solvente o material encapsulante, implicados en llevar o transportar el presente agente desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos

5 ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras

10 para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja y aceite de maíz; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de

15 aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadas por fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En algunas modalidades, un vehículo farmacéuticamente aceptable es esterilizado antes de la combinación con el compuesto de la invención.

20 **[00174]** En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la invención comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica de la invención comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y al menos dos

25 excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

[00175] Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

[00176] Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen:

30 antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, α -tocoferol, y similares, y

agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

[00177] Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, inhalación, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Típicamente, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa, en la forma de una solución que es con frecuencia isotónica, tal como una solución salina o glucosa. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma de dosificación será generalmente la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

[00178] Métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos.

[00179] Las composiciones farmacéuticas de esta invención apropiadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de utilizar, las cuales pueden contener antioxidantes, buffers, bacteriostatos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

[00180] Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y

ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes.

5 **[00181]** Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser asegurada mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, y similares. También puede
10 ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00182] Las formas de depósito inyectables se elaboran formando matrices
15 microencapsuladas de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación del fármaco puede ser controlada. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli (anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también
20 se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

[00183] Las preparaciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, tópica, o por vía rectal. Éstas, por supuesto, se dan en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en
25 comprimidos o cápsulas, por inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópica por loción o pomada, y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración intravenosa.

[00184] Como se utilizan en la presente, las expresiones “administración
30 parenteral” y “administrada de manera parenteral” se refieren a modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular,

subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

[00185] Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se utiliza aquí significa la administración de un compuesto, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que entra en el sistema del paciente y, por lo tanto, está sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

[00186] Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo inyección intramuscular, por vía oral, por vía nasal, por inhalación, por ejemplo, por un aerosol, por vía rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, tal como mediante polvos, ungüentos o gotas, incluyendo bucalmente y sublingualmente. En algunas modalidades, el compuesto de la invención se administra por inyección o infusión, a menudo por infusión, y puede co-administrarse con un antibiótico beta-lactámico. El antibiótico beta-lactámico puede administrarse por cualquier vía apropiada; en algunas modalidades, el antibiótico beta-lactámico se administra oralmente y, en otras modalidades, el antibiótico beta-lactámico se administra por inyección o por infusión. Cuando el compuesto de la invención se coadministra con un antibiótico beta-lactámico y ambos se administran por la misma vía, se pueden mezclar opcionalmente para administración por inyección o por infusión o pueden administrarse por separado siempre y cuando el inhibidor de beta-lactamasa esté presente sistémicamente en el sujeto tratado junto con el antibiótico beta-lactámico, de manera que puede producirse potenciación.

[00187] Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los de expertos en la técnica.

[00188] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente.

[00189] El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de

factores farmacocinéticos que incluyen la actividad del compuesto particular empleado de la presente invención, o la sal del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales
5 utilizados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, el género, la especie y la cepa del patógeno bacteriano que causa la infección y factores de este tipo bien conocidos en las técnicas médicas.

[00190] En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis intravenosas y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se utilizan en combinación con una beta-lactama para los efectos antibacterianos indicados, variarán de 2 a
10 100 mg aproximadamente por kilogramo de peso corporal por día, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg por kg por día, y aún más preferiblemente de 10 a 50 mg por kg aproximadamente por día. Una cantidad eficaz es aquella cantidad que trata una infección bacteriana, cuando se dosifica en combinación con un antibiótico beta-lactámico.

[00191] Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas separadamente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias o como infusión continua.

[00192] Mientras que es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica.

[00193] Los compuestos tal como se definen en las realizaciones pueden sintetizarse mediante las siguientes rutas sintéticas generales, ejemplos específicos de las mismas se describen en detalle en los ejemplos.

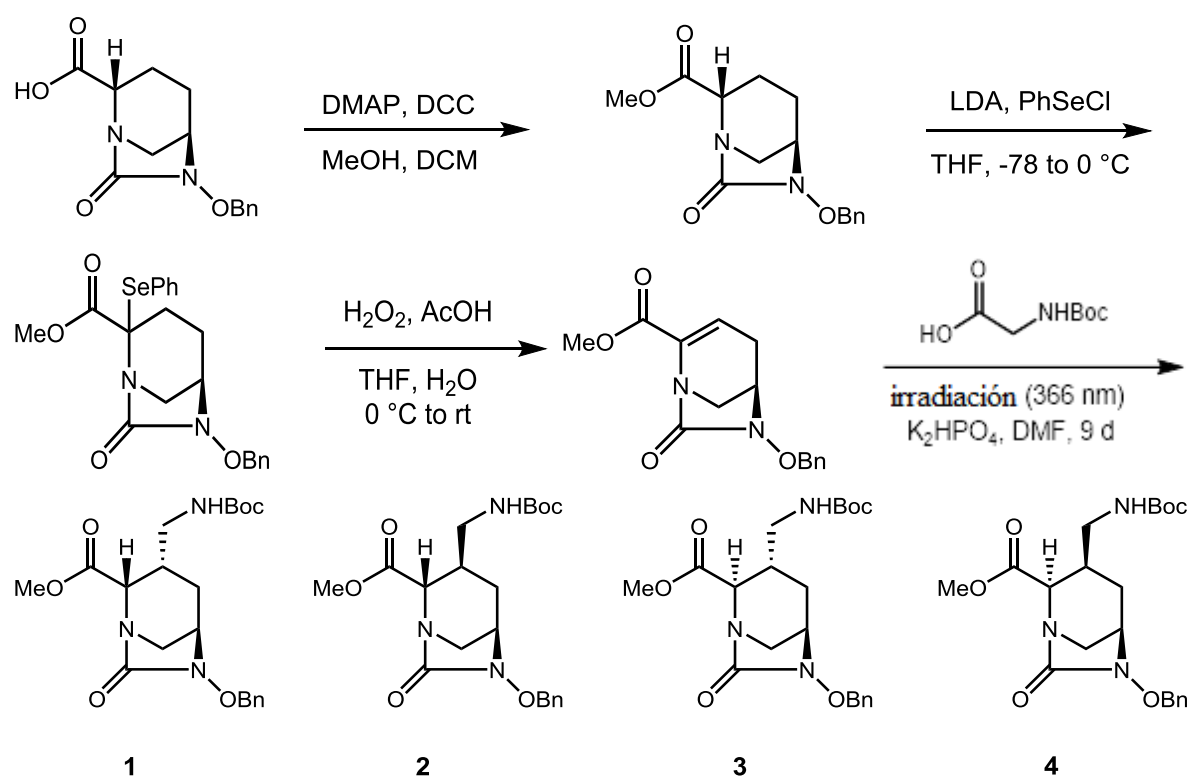
Esquemas Sintéticos Generales

[00194] Un método para sintetizar compuestos de la Fórmula (I) se representa en los siguientes esquemas de reacción. El Esquema A ilustra la funcionalización del esqueleto conocido de diazabiciclooctano en forma protegida para introducir un

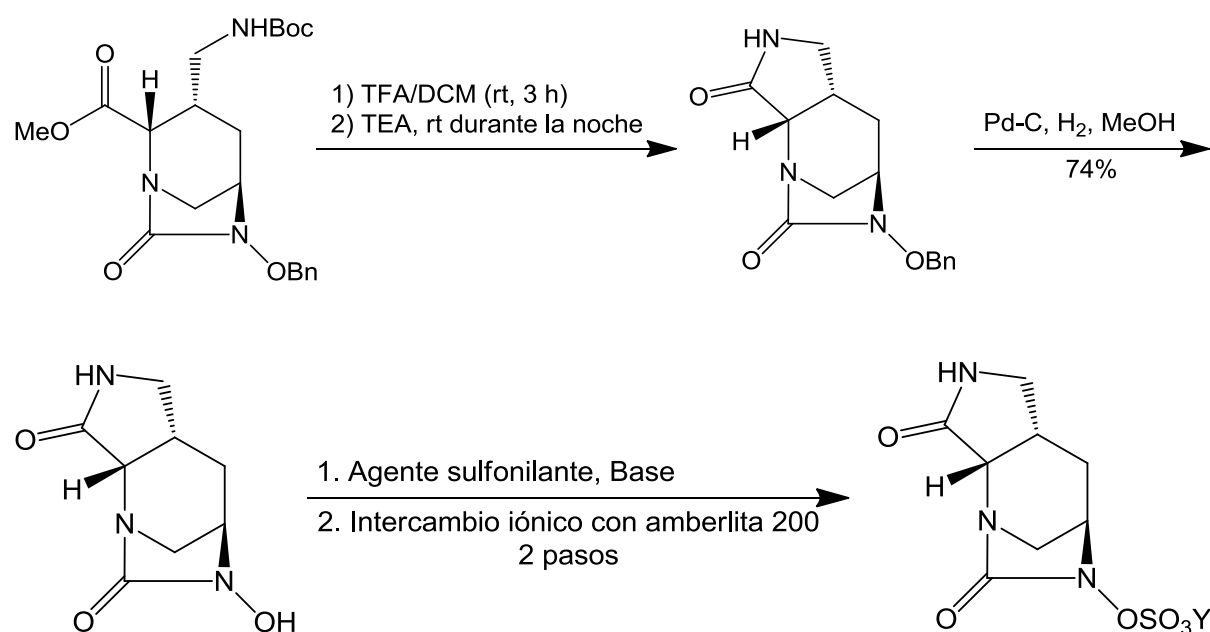
grupo aminoalquilo, como se describe en los ejemplos de trabajo. El Esquema B ilustra la formación del anillo de lactama fusionado, que también se ilustra mediante los Ejemplos. El Esquema C ilustra cómo la lactama podría ser N-alquilada fácilmente para introducir un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

5

Esquema A



10 Esquema B



[00195] Ejemplos de agentes sulfonilantes incluyen, pero no se limitan a complejos de trióxido de azufre-piridina y similares.

- 5 **[00196]** Ejemplos de las base sincluyen, pero no se limitan a piridina y similares.

EJEMPLOS

- 10 **[00197]** La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes. Se aceptan los ensayos utilizados a lo largo de los Ejemplos. La demostración de la eficacia en estos ensayos es predictiva de la eficacia en los sujetos.

15 *Condiciones Generales*

- [00198]** Los espectros de masas se adquirieron en sistemas LC-MS, SFC-EM, o GC-MS usando electro spray, métodos de ionización química y por impacto de electrones de una gama de instrumentos de las siguientes configuraciones: El sistema Waters ACQUITY UPLC y equipado con un sistema ZQ 2000 o SQD MS
20 donde (M+1) se refiere al ion molecular protonado de las especies químicas, (M+) se refiere al catión de amonio cuaternario no protonado, y (M-1) se refiere al ion molecular desprotonado de las especies químicas.

- [00199]** Los espectros de RMN corrieron sobre espectrometros Bruker BioSpin 600MHz, RMN Bruker AVANCE 500MHz o Varian 400MHz utilizando ICON-RMN,
25 bajo control de programa TopSpin. Los espectros se midieron a 298 K, a menos que se indique lo contrario, y se hizo referencia con relación a la resonancia del disolvente.

Instrumentación

Métodos MS:

- 30 Método 2m_acídico:

Columna Kinetex C18 50 x 2.1 mm, 2.6 µm

Temperatura de Columna 0° C

Eluyentes A: H₂O,

B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0.1%

Tasa de Flujo	1.2 mL/min
Gradiente	2% a 88% B en 1.30 min, 0.15 min 95% B

Método 2m_acídico_polar:

5	Columna	Kinetex C18 50 x 2.1 mm, 2.6 µm
	Temperatura de Columna	50° C
	Eluyentes	A: H ₂ O, B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0.1%
	Tasa de Flujo	1.2 mL/min
	Gradiente	1% a 30% B en 1.30 min, 0.15 min 98% B

10

Método T3_3m_polar:

	Columna	T3 C18 50 x 2.1 mm, 2.6 µm
	Temperatura de Columna	50° C
	Eluyentes	A: H ₂ O, B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0.1%
15	Tasa de Flujo	1.2 mL/min
	Gradiente	100% A durante 1.1 min, 30% B en 1.20 min, 95% B en 0.7 min

Método LCMS_2 MIN_REACTION_MONITORING:

20	Columna	Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 µm
	Temperatura de Columna	60 °C
	Eluyentes	A: H ₂ O, B: acetonitrilo, ambos conteniendo TFA al 0.05%
	Tasa de Flujo	1.0 mL/min
25	Gradiente	5% a 98% B en 1.4 min
	Detección UV	TAC (210-450 nm)

Método LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS:

	Columna	Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 µm
30	Temperatura de Columna	60 °C
	Eluyentes	A: H ₂ O (0.05% FA+3.75 mM AA, B: acetonitrilo (0.04% FA)
	Tasa de Flujo	1.0 mL/min
	Gradiente	5% a 98% B en 1.4 min

Detección UV TAC (210-450 nm)

Método LCMS_ 2_MIN_Polar:

Columna Acquity UPLC HSS T3 50 x 2.1 mm, 1.8 µm

5 Temperatura de Columna 60 °C

Eluyentes A: H₂O (0.05% FA+3.75 mM AA,
B: acetonitrilo (0.04% FA)

Tasa de Flujo 1.0 mL/min

Gradiente concavo de 1% a 98% B en 1.4 min

10 Detección UV TAC (210-450 nm)

Método HPLC_ CHIRAL:

Columna: Chiralpak IC KK025 250 x 4.6 mm, 5 µm

Temperatura de Columna: temperatura ambiente

15 Eluyentes heptano/EtOH/dietilamina 92:8:0.05

Tasa de Flujo 1.0 mL/min

Detección UV 220 nm

Abreviaturas:

20 AA acetato de amonio

ACN acetonitrilo

app aparente

ATP adenosina 5'-trifosfato

BINAP 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo racémico

25 Boc carboxilo de butilo terciario

br amplio

br s singulete amplio

BSA albúmina de suero bovino

d doblete

30 dd doblete de dobletes

DCC: diciclohexilcarbodiimida

DCE 1,2-dicloroetano

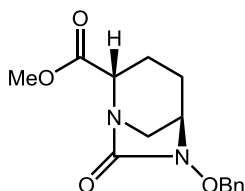
DCM diclorometano

DIAD diisopropilazodicarboxilato

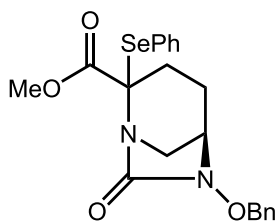
	DIPEA	diisopropiletilamina		
	DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina		
	DME	1,4-dimetoxietano		
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida		
5	DMSO	dimetilsulfoxido		
	EDTA	ácido etilendiamina tetraacético		
	ESI	ionización por electroatomización		
	EtOAc	acetato de etilo		
	FA	ácido Fórmico		
10	g	gramo		
	h	hora(s)		
	HATU	3-oxido-hexafluorofosfato	de	1-[bis
		(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinio		
	HBTU	3-óxido	de	1-[bis(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -
15	benzotriazolio-hexafluorofosfato			
	HCl	ácido hidrociorhídrico		
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol		
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento		
	LCMS	cromatografía líquida y espectrometría de masas		
20	LDA	diisopropilamida de litio		
	MeOH	metanol		
	MS	espectrometría de masas		
	m	multiplete		
	mg	miligramo		
25	MIC	concentración inhibitoria mínima		
	min	minutos		
	ml	mililitro		
	mmol	milimol		
	m/z	relación masa a carga		
30	NMR	resonancia magnética nuclear		
	o/n	durante la noche		
	p	pentaplete		
	PdCl ₂ (dppf) ·CH ₂ Cl ₂	complejo de 1,1'-bis (difenilfosfino)ferroceno-		
		diclorometano de paladio (II) dicloruro		

	ppm	partes por millón		
	PyBOP	hexafluorofosfato	de	benzotriazol-1- iloxitripirrolidinofosfonio
	q	cuarteto		
5	rac	racemico		
	rbf	matraz de fondo redondo		
	rt	tempratura ambiente		
	R _t	tiempo de retención		
	s	singulete		
10	t	triplete		
	TBME	Éter Metil terc-butílico		
	TFA	ácido trifluoroacético		
	TFAA	anhidrido de ácido trifluoroacético		
	THF	tetrahidrofurano		
15	Tris·HCl	hidrocloruro de aminotris(hidroximetil)metano		

Preparación de Intermedios

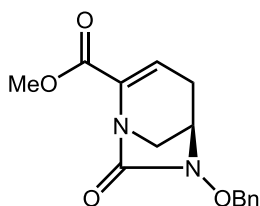


20 **[00200]** *Intermedio* A: (2*S*,5*R*)-6-(benciloxi)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo. A una solución de ácido (2*S*,5*R*)-6-(benciloxi)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxílico(5.0 g, 18.1 mmol), MeOH (880 μ L, 21.7 mmol) y DMAP (44 mg, 0.36 mmol) en DCM (50 mL) a 0 °C se
25 añadió DCC (3.92 g, 19.0 mmol). Después de 2 h a temperatura ambiente se diluyó con DCM y luego se lavó con salmuera. La capa acuosa se extrajo con DCM (2x)) y las capas organicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ se filtraron luego se concentraron al vacío. El residuo crudo se trituró con éter dietílico, se filtró y se concentró al vacío. El filtrado crudo se purificó mediante cromatografía en gel de
30 sílice para proporcionar el compuesto del título (4.3 g, 82%). LCMS R_t = 0.87 min, m/z = 291.3 (M+1), Método 2 MIN_REACTION_MONITORING.

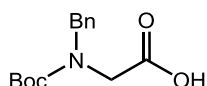


[00201] Intermedio B: (5R)-6-(bencioxi)-7-oxo-2-(fenillselanil)-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo. A una solución de diisopropilamina

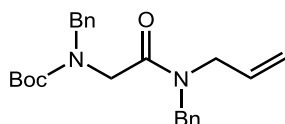
(29.6 mL, 210 mmol) en THF (800 mL) a -70 °C se añadió n-butilitio (1.6 M en hexanos, 108 mL, 172 mmol) por goteo durante 10 minutos. Después de agitar durante 50 minutos a -73 °C, se añadió una solución de (2S,5R) -6-(benciloxi)-7-oxo-1,6-diazabicyclo [3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo (43.5 g, 150 mmol) en THF (350 mL) pormgoteo durante 45 minutos. Después de agitar a -78 °C durante 1.5 horas, se añadió cloruro de fenilselenilo (57.4 g, 300 mmol) en THF (260 mL) por goteo durante 45 minutos. Después de agitar a -78 °C durante 45 min, se dejó calentar a -10 °C durante 60 minutos y se agitó durante una hora adicional, después de lo cual se enfrió a -30 °C y se inactivó con HCl (2 M, 50 mL) seguido por la adición de metanol (250 mL). La mezcla se dejó alcanzar temperatura ambiente durante 15 min, luego se diluyó con TBME (1 L) y se lavó con salmuera: agua (2:1, 2 L). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (2 L). Las capas acuosas se extrajeron con TBME (2 x 500 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (23.70 g, 36%, 3:1 mezcla de diastereómeros) como un aceite marrón. LCMS R_t = 1.12/1.16 min, m/z = 447.3 (M+1), Método 2 MIN_REACTION_MONITORING; ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, diastereoisómero mayor) δ 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.42-7.30 (m, 8H), 5.00 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.15 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.35 (s, 1H), 3.18 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.44 (ddd, J = 17.4, 11.8, 6.6 Hz, 1H), 2.07-2.01 (m, 1H), 1.91 (dd, J = 16.6, 5.8 Hz, 1H), 1.72 (td, J = 12.9, 6.0 Hz, 1H).



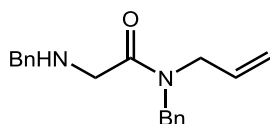
[00202] *Intermedio C: (5R)-6-(benciloxi-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carboxilato de metilo.* A una solución del Intermedio B en THF:agua (20:1, 22 mL) a 0 °C se añadió H₂O₂ (30% aq, 0.8 mL, 7.83 mmol) y AcOH (0.55 mL, 9.61 mmol). Después de agitar durante 1 hora a 0 °C esto se diluyó con EtOAc y se añadió sulfito de potasio (5% aq). Tras la destrucción de todos los peróxidos (prueba de KJ-stärke), las fases se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas se extrajeron con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ (5% aq), salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título (419 mg, 81%). LCMS: R_t = 0.88 min, m/z = 288.1 (M+1), Método 2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.45-7.41 (m, 2H), 7.40-7.33 (m, 3H), 6.88-6.86 (m, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.96 (br s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.35-3.28 (m, 1H), 2.82 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 2.58-2.52 (m, 1H), 2.38 (s, 1H), 2.34 (s, 1H).



[00203] *Intermedio D: N-bencil-N-(terc-butoxicarbonil)glicina.* A una suspensión de N-bencilglicina (24.3 g, 147 mmol) en THF:agua (1:1, 500 mL) se añadió Boc-anhídrido (33.7 g, 154 mmol). Después de 6.5 horas la mezcla se diluyó con TBME (250 mL) y se añadió ácido cítrico (33 g) hasta pH = 4. Después de 10 min de agitación, las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (250 mL). La capa acuosa se lavó con TBME (2x100 mL) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron luego se concentraron al vacío (45°C), proporcionando el compuesto del título (40.70 g) como un aceite incoloro, que empezó a cristalizarse en reposo. HPLC: 99.7% por UV, LCMS: R_t = 0.94 min, m/z = 264.3 (M-H), Método LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆)* δ 12.62 (br s, 1 H), 7.44-7.09 (m, 5 H), 4.41 (d, J = 8.1 Hz, 2 H) 1.44-1.24 (m, 9 H) 3.89-3.67 (m, 2 H). *Como una mezcla con O(Boc)₂ (ca. 9%).

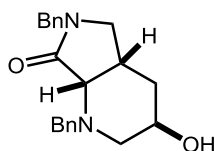


[00204] *Intermedio E: (2-(alil(bencil)amino)-2-oxoetil)(bencil)carbamato de terc-Butilo.* Un matraz de reacción de 4 cuellos 1500 mL con agitador mecánico, termómetro interno, condensador y entrada de nitrógeno se cargó con Intermedio D (31.6 g, 107 mmol) seguido de EtOAc (500 mL). La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo (4°C) seguido por la adición de *N*-alilbencilamina (16.44 g, 107 mmol) y anhídrido de propilfosfónico (T3P, 136 g, 214 mmol, 50% en acetato de etilo). A la mezcla se añadió trietilamina (90 mL, 643 mmol), por goteo durante 5 min. La solución marrón se agitó durante 20 min a temperatura ambiente luego se vertió en una mezcla agitada de agua helada (500 mL). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (0.5 N, 500 mL), NaHCO₃ saturado (500 mL) y salmuera (500 mL). La capa acuosa inicial se extrajo con EtOAc (2x250 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío a (45°C), proporcionando el compuesto del título (43.94 g) como un aceite marrón. LCMS: R_t = 1.31, min m/z = 395.5 (M+1), Método LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.53-6.99 (m, 10 H), 5.94-5.55 (m, 1 H), 5.24-4.97 (m, 2 H) 4.55-4.25 (m, 4 H), 4.16-3.68 (m, 4 H), 1.42-1.28 (m, 9 H).



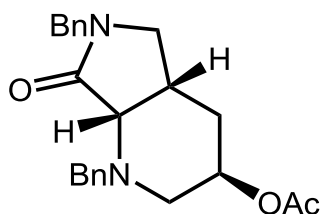
[00205] *Intermedio F: N-alil-N-bencil-2-(bencilamino)acetamida.* Un matraz de reacción de 4 cuellos de 750 mL equipado con agitador mecánico, termómetro interno, condensador y entrada de nitrógeno se cargó con el intermedio E (43.9 g, 108 mmol) en DCM (400 mL). A la solución se añadió TFA (83 mL, 1.079 mol). Después de agitar durante la noche, la solución amarilla se vertió lentamente (evolución rápida del gas) en una mezcla agitada de solución saturada de NaHCO₃ (aq, 1.5 L) e hielo (1 kg) Después 10 min de agitación las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con ½ NaHCO₃ saturado (aq, 0.5 L) luego con salmuera (0.5 L). La capa acuosa se extrajo con DCM (0.5 L) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío (45°C) para proporcionar el compuesto del título (31.30 g) como un aceite marrón. LCMS: R_t = 0.71 min m/z = 295.3 (M+1), Método LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.49-7.04 (m, 10 H), 5.90-5.55 (m, 1 H), 5.19-4.92 (m, 2

[00207] Intermedio H: *rac* (2*S**,3*aS**,6*aS**)-1,5-dibencil-2-(hidroximetil)-hexahidropirrol-*[3,4-b]*pirrol-6(1*H*)-ona. A una solución del intermedio G (1.967 kg, 5.847 moles) en THF (20 L) a 0 °C en un reactor Büchi CR30 inertizado con nitrógeno de 30L, equipado con un termostato Huber 1015W, Flexy ALR, control automático de temperatura y entrada de nitrógeno se añadió borohidruro de litio (0.238 kg, 10-39 moles) en porciones durante 10 min (exotermia leve). Después 5 días a temperatura ambiente se introdujo borohidruro de litio adicional (0.025 kg, 1.143 mol). Después 5 días a temperatura ambiente se añadió borohidruro de litio adicional (0.017 kg, 0.780 mol). Después de 6 días más la mezcla se enfrió a -10 °C, después de lo cual se añadió HCl (2 N, 8 L) por goteo a través de una bomba de dosificación durante 2 horas resultando en a pH = 3 (precaución: gas muy fuerte y formación de espuma!). Después de agitación vigorosa, se formó una suspensión amarilla que se agitó durante 30 min a 0 °C. Se añadió NaHCO₃ saturado (aq, 10 L) y la mezcla se transfirió a un recipiente de separación de 80 L y se extrajo con TBME (20 L) después de la adición de agua (8 L), lo que ayudó a la separación de fases. La fase orgánica se lavó con salmuera (2x10 L) y la capa acuosa se extrajo con TBME (2x7 L). Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío (45 °C) a un volumen de 8 L, luego se secaron Na₂SO₄, se filtraron y concentraron al vacío (50 °C). El residuo se disolvió en tolueno (3 L), se concentró al vacío y se secó durante 3 horas (50 °C, 10 mbar) para proporcionar el compuesto del título (1.630 kg) como un aceite amarillento, que fue una mezcla 10.5: 1 de diastereómeros. LCMS: R_t = 0.77 min* m/z = 337.3 (M+1), Método LCMS_2_MIN_FINAL_ANALYSIS. *diastereoisómero mayor.



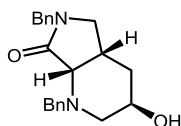
[00208] Intermedio I: *rac* (3*R**,4*aS**,7*aS**)-1,6-dibencil-3-hidroxi-octahidro-7*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-7-ona. A una suspensión de H (1.627 kg, 4.836 mol), tamices moleculares (4 Å, 2.5 kg, 2.5 kg) y THF (23 L) en un reactor Amsi Glas de 30 litros, de 30 l, inertizado con nitrógeno, equipado con control de temperatura automático, Unistat 390W, condensador de reflujo y entrada de nitrógeno a -5 °C se añadió TFAA (0.820 L, 5.81 mol), por goteo durante 35 min. Después de agitar durante 15 minutos a 0 °C, se añadió trietilamina (3.37 L, 24,18 moles) durante 10 minutos,

después de lo cual se calentó a reflujo (temperatura interna 68 °C) durante 6 días, alcanzando una relación de equilibrio de producto con el material de partida de 9:1. La mezcla se transfirió a un recipiente de separación de 80 L que contenía NaOH enfriado con hielo (1 M, 24 L) y se agitó durante 15 min. A la suspensión marrón se le añadió celite (3 kg), donde se agitó durante 15 minutos, luego se filtró sobre una almohadilla de celite, se lavó con TBME. El filtrado se extrajo con TBME (20 L). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (aq, 10 L) luego con salmuera (1x15 L). Las capas acuosas se extrajeron con TBME (2x7 L) y las capas orgánicas combinadas se concentró al vacío (45 °C) a un volumen de 8 L y se secaron sobre Na₂SO₄ (2 kg). La suspensión se filtró sobre gel de sílice (1 kg, 40-63 µm), lavando con EtOAc (4x2 L). El eluyente se concentró al vacío (45 °C) y se secó durante 3 horas (50 °C, 15 mbar) para proporcionar el compuesto del título (1.366 kg) como un aceite de color marrón oscuro. LCMS: R_t = 0.84 min, m/z = 337.3 (M+1), Método LCMS_ 2_ MIN_ FINAL_ ANALYSIS. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.40-7.15 (m, 10 H), 4.69-4.57 (m, 1 H), 4.65-4.56 (m, 1 H), 4.43 (d, J = 13.8 Hz, 1 H), 4.29-4.21 (m, 1 H), 3.62-3.49 (m, 1 H), 3.46-3.39 (m, 1 H), 3.18 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 2.86 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 2.70 (dd, J = 10.7, 2.7 Hz, 1 H), 2.66-2.56 (m, 1 H), 1.83-1.67 (m, 2 H), 1.39-1.29 (m, 1 H).



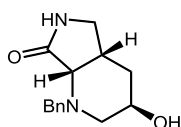
[00209] *Intermedio J: acetato de (3R,4aS,7aS)-1,6-dibencil-7-oxooctahidro-1H-pirrolo[3,4-b]-piridin-3-ilo.* Una suspensión del Intermedio I (1.364 kg, 3.04 moles), acetato de vinilo (4.20 L, 45.6 mol), Lipasa QLM (Alcaligenes sp de Meito Sangyo, actividad: 101400 U / g, 25 g, 3,04 moles) y TBME (21 l) en un reactor de 30 litros con capa triple de nitrógeno con control automático de temperatura, Unistat 390W, condensador y entrada de nitrógeno se agitó a 30 ° C (temperatura interna) durante 6 días La mezcla se enfrió a 20 °C y se filtró sobre hyflo (500 g). El filtrado se concentró al vacío (35 °C) a un volumen de 3 L, después de lo cual se añadió tolueno (1 L) luego adiconal se concentró al vacío (35 °C luego a 50 °C). El producto crudo se disolvió en TBME:heptano (2:1, 3 L) y se purificó en varias porciones mediante cromatografía en gel de sílice (heptano-EtOAc-metanol), proporcionando

el compuesto del título (626 g) como un aceite marrón. LCMS: $R_t = 1.16$ min, $m/z = 379.3$ ($M+1$), Método LCMS_ 2_MIN_FINAL_ANALYSIS. HPLC: $R_t = 33.45$ min, 98.2% ee (enantiómero menor: $R_t = 23.92$ min) Método HPLC_ CHIRAL. ^1H RMN (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 7.41-7.22 (m, 10 H), 4.74-4.65 (m, 1 H) 4.56-4.51 (m, 1 H), 4.36-4.26 (m, 2 H), 3.75 (d, $J = 14.3$ Hz, 1 H) 3.30-3.21 (m, 2 H) 3.00 (dd, $J = 9.5, 5.9$ Hz, 1 H), 2.75-2.68 (m, 1 H), 2.62 (sxt, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 2.23 (dd, $J = 11.6, 7.2$ Hz, 1 H), 1.97 (s, 3 H), 1.66 (t, $J = 6.05$ Hz, 2 H).



[00210] Intermedio K: (3R,4aS,7aS)-1,6-dibencil-3-hidroxi-octahidro-7H-

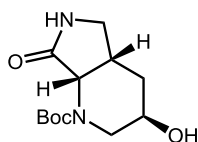
pirrolo[3,4-b]-piridin-7-ona. Una mezcla del Intermedio J (616 g, 1221 mmol), THF (4 L) y NaOH (2 N, 3.97 L, 7.94 mol) en un matraz de fondo redondo de 20 L de un Rotavapor Büchi se agitó vigorosamente durante 18 horas a 25 °C y 6 horas a 40 °C, después de lo cual se enfrió a 25 °C seguido por la adición de MeOH (2 L) y se agitó durante la noche. La mezcla se extrajo con TBME (6 L) y la fase orgánica se lavó con salmuera (4 L). La capa acuosa se extrajo con TBME (3x3 L) y las fases orgánicas combinadas se concentraron al vacío (45 °C) a un volumen de 5 L, luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (1 kg), se filtraron y se concentraron al vacío (45°C). El residuo se disolvió en tolueno (3 L) y se concentró nuevamente, luego se secó durante 2 h (60 °C, 20 mbar), proporcionando el compuesto del título (555 g) como un aceite marrón. LCMS: $R_t = 0.84$ min, $m/z = 337.3$ ($M+1$), Método LCMS_ 2_MIN_FINAL_ANALYSIS. ^1H RMN (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.58-7.04 (m, 10 H), 4.66-4.5 (m, 2 H), 4.43 (d, $J = 13.9$ Hz, 1 H), 4.25 (d, $J = 15.2$ Hz, 1 H), 3.54 (tq, $J = 9.3, 4.5$ Hz, 1 H), 3.47-3.39 (m, 1 H), 3.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 2.85 (d, $J = 5.9$ Hz, 1 H), 2.70 (dd, $J = 11.0, 2.8$ Hz, 1 H), 2.64-2.57 (m, 1 H), 1.78-1.67 (m, 2 H), 1.27 - 1.39 (m, 1 H).



[00211] Intermedio L: (3R,4aS,7aS)-1-bencil-3-hidroxi-octahidro-7H-pirrolo[3,4-

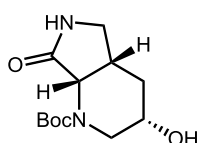
b]-piridin-7-ona. A un reactor Büchi CR30 de 30 L, equipado con termostato Huber 1015, Flexy ALR con control de temperatura automatizado, entrada de argón y amoníaco se inertizó con argón, se pre-enfrió a -80 °C, se llenó con amoníaco

líquido (10.0 kg, 587 moles) con la salida unida a un depurador de gas lleno de ácido sulfúrico (30%, 100 L), se añadió una solución del intermedio K (543 g, 1.614 mol) en THF (1.5 L) seguido de etanol (anhidro, 236 mL, 4.04 mol). A la solución resultante se añadió litio (granular, 44.8 g, 6.46 mol), por porciones durante 15 min (la temperatura se elevó de -72°C a -63°C). A la mezcla gris, después de 1 hora, se añadió litio (22.4 g, 3.23 mol) y etanol (anhidro, 94 mL, 1.616 mol) mientras se mantiene la agitación a -60 °C. Después de 1 hora, se añadió adicional litio (11.2 g, 1.615 mol) y etanol (anhidro, 47 mL, 0.808 mol). Después 45 min se añadió más litio (11.2 g, 1.615 mol). Después 15 horas se añadió etanol (anhidro, 94 mL, 1.616 mol) a la mezcla de color azul profundo. La agitación continuó hasta que quedó <5% del material de partida y se apagó por adición de cloruro de amonio (2.0 kg, 37.4 mol), por porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó durante 17 h a -28°C y ~2 h a 2°C, resultando en la evaporación completa del amoníaco. A la mezcla se añadió agua (15 L) y TBME (8 L) seguido por HCl (32%) hasta obtener un pH = 9-10. las fases se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (5 L). La capa acuosa se extrajo con DCM (3x2 L) y las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío a 45 °C a un volumen de 3 L luego se concentraron sobre Na₂SO₄ (1 kg), se filtraron y se concentraron al vacío (45 °C luego 2 h a 65 °C, 20 mbar), proporcionando el compuesto del título (373 g) como un aceite marrón. LCMS: R_t = 0.75, m/z = 247.2 (M+H), Método LCMS_2_MIN_POLAR. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.78 (s, 1 H), 7.34-7.24 (m, 4 H), 7.27-7.16 (m, 1 H), 4.65-4.60 (m, 1 H), 4.32 (d, J = 13.9 Hz, 1 H), 3.64-3.54 (m, 1 H), 3.44 (d, J = 13.9 Hz, 1 H), 3.13 (d, J = 8.1 Hz, 2 H), 2.69 (dd, J = 10.82, 2.75 Hz, 1 H), 2.66-2.62 (m, 1 H), 2.60-2.54 (m, 1 H), 1.80-1.69 (m, 2 H), 1.41-1.30 (m, 1 H).



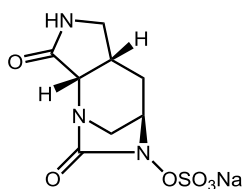
[00212] *Intermedio M: (3R,4aS,7aS)-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrol-[3,4-b]piridina-1-carboxilato de terc-Butilo.* A una solución del Intermedio L (372.0 g, 1.51 mol) y Boc-anhídrido (346 g, 1.59 mol) en THF (4.0 L) se añadió Pd-C 10% (15 g). La mezcla se agitó en un aparato de agitación a 22-25°C y 0.1 bar de presión de H₂ durante 89 h. Después de absorción de hidrógeno del 57%, se añadió otra porción de Pd-C 10% (15 g). La mezcla se filtró sobre celite, se lavó con THF y se concentró al vacío para obtener el producto crudo (545 g) como un sólido marrón pálido. El

residuo se suspendió en EtOAc (1 L) y se agitó durante 1 hora a 75 °C. A la suspensión se añadió heptano (1.5 L), lentamente a 75 °C. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, el producto se recolectó mediante filtración, el sólido se lavó con heptano luego se secó al vacío (45 °C), proporcionando el compuesto del título (278.5 g) como cristales blancos. LCMS: R_t = 0.86 min, m/z = 257.3 (M+1), Método LCMS_ 2_MIN_POLAR. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.83-7.65 (m, 1 H), 4.80-4.49 (m, 2 H), 3.93-3.67 (m, 2 H), 3.43-3.37 (m, 1 H), 2.72 (br d, J = 9.5 Hz, 1 H), 2.60 (br d, J = 12.5 Hz, 1 H), 2.48-2.39 (m, 1 H), 1.82-1.70 (m, 1 H), 1.40 (br d, J = 6.8 Hz, 9 H) 1.36-1.27 (m, 1 H).

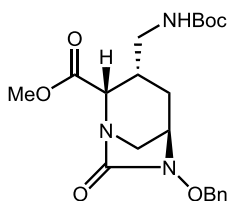


[00213] *Intermedio N: (3S,4aS,7aS)-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrol-[3,4-b]piridina-1-carboxilato de terc-Butilo.* A una solución del Intermedio M (270 g, 948 mmol) en THF (13 L) contenida en un reactor inertizado con nitrógeno de 20 L de camisa de triple revestimiento (Amsi Glas) con control automático de temperatura, Unistat 390W, condensador y entrada de nitrógeno a -5 °C (temperatura interna) se añadió ácido 4-nitrobenzoico (323 g, 1.90 mol) y trifenilfosfina (524 g, 1.90 mol). A la solución resultante se añadió una solución de DIAD (359 mL, 1.85 mol) en THF (1.3 L), por goteo durante 30 min mientras se mantenía la temperatura interna a -4 a -10 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche luego se concentró al vacío (45 °C) para proporcionar el material crudo (1.64 kg, humedo) como un aceite marrón. A una solución de residuo de aceite en MeOH (15 L) se añadió K_2CO_3 (393 g, 2.844 mol). Después de 1 h de agitación la suspensión se concentró al vacío (40 °C), proporcionando un sólido de color naranja al cual se añadió DCM (6 L). Después 30 min, la suspensión se filtró, se lavó con DCM y el filtrado se concentró al vacío (45 °C). El residuo se suspendió en DCM:MeOH (97:3, 4 L) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. la suspensión se filtró, se lavó con DCM y el filtrado se concentró al vacío (45 °C) a un volumen de 3 L y se purificó en dos porciones mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el producto (189 g) como sólido. A este material disuelto en DCM:MeOH (95:5, 5 L) a 45°C se añadió heptano (5 L), lentamente. La solución se concentró parcialmente (45 °C), eliminando algo de DCM, haciendo que el producto

se cristalice después 15 min. Después de 1 h a temperatura ambiente, el sólido se recolectó mediante filtración, se lavó con heptano y se secó al vacío (45 °C) hasta que se obtuvo un peso constante, proporcionando el compuesto del título (167.7 g) como cristales. LCMS: R_t = 0.95 min, m/z = 257.3 (M+1), Método LCMS_2_MIN_POLAR. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6)* δ 7.80 (d, J = 20.2 Hz, 1H), 4.97 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.57 (dd, J = 92.2, 7.0 Hz, 1H), 3.89 (ddd, J = 18.8, 9.3, 6.5 Hz, 1H), 3.33-3.23 (m, 1H), 2.75 (ddd, J = 9.7, 4.6, 2.0 Hz, 1H), 2.43 (ddt, J = 16.9, 11.8, 6.1 Hz, 1H), 2.08 (ddd, J = 86.6, 12.5, 10.7 Hz, 1H), 1.94 (dd, J = 12.2, 5.5 Hz, 1H), 1.39 (d, J = 22.6 Hz, 9H), 1.04 (dq, J = 15.2, 12.0 Hz, 1H). *Reportados como rotameros observados.



Ejemplo 1. (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio.

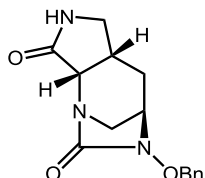


[00214] Paso 1: (2S,3S,5R)-6-(benciloxi-3-(((terc-butoxicarbonil)amino)-metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo. El Intermedio C (0.82 g, 2.84 mmol), Boc-Gly-OH (1.00 g, 5.69 mmol) y $\text{Ir}[\text{df}(\text{CF}_3)\text{ppy}_2(\text{dtbpy})]\text{PF}_6$ (32 mg, 0.028 mmol) se disolvieron en DMF (20 mL). A la solución se añadió fosfato de potasio dibásico finamente triturado (0.59 g, 3.41 mmol) y la suspensión resultante se irradió bajo argón (balón) en un embudo de goteo de 500 mL (cerrado con un matraz de fondo redondo en la parte inferior y un septo en la parte superior) durante 7 días con un tubo de fluorescencia de UVA 8W. El matraz se colocó horizontalmente en la parte superior de la lámpara (enfriada por aire) para asegurar la irradiación máxima. Después 4 de días se añadió $\text{Ir}[\text{df}(\text{CF}_3)\text{ppy}_2(\text{dtbpy})]\text{PF}_6$ (32 mg, 0.028 mmol).

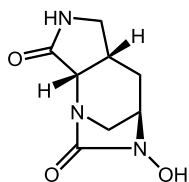
[00215] A la mezcla se añadió agua (100 mL) luego NaHCO_3 saturado (aq, 100 mL) y se extrajo con TBME (4x80 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron

secuencialmente con NaHCO₃ saturado (aq, 50 mL), agua (50 mL) luego con salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 15-100%) para proporcionar el compuesto del título (108 mg, 9%)

5 como un aceite. LCMS: R_t = 1.04 min, Método 2m_acídico.

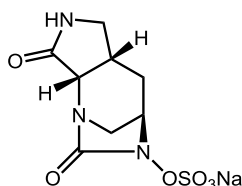


[00216] Paso 2: (4R,5aS,8aS)-3-(benzylloxihexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona. A una solución de (2S,3S,5R)-6-(benzylloxi-3-(((terc-butoxicarbonil)amino)-metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo (108 mg, 0.26 mmol) en DCM (3 mL) a temperatura ambiente se añadió TFA (1.0 mL, 13 mmol), por goteo. Se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 h, después de lo cual se concentró al vacío. El residuo crudo se disolvió en DCM (3 mL), se enfrió a 0 °C y se añadió trietilamina (0.31 mL, 2,3 mmol). Después de 1 h se añadió más trietilamina (0.11 mL, 0.75 mmol) y DCM (5 mL). El baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche (o/n), después de lo cual se lavó con ácido cítrico (10 mL, 20% aq aproximadamente). La fase acuosa se extrajo con DCM (3x8 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (5 mL), salmuera (2x10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM-MeOH, 2-7%) para proporcionar el compuesto del título (47 mg, 61%) como un sólido beige. LCMS: R_t = 0.61 min, m/z = 288 (M+1), Método 2m_acídico.



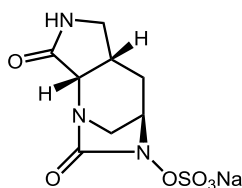
[00217] Paso 3: (4R,5aS,8aS)-3-hidroxihexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona. Una suspensión de (4R,5aS,8aS)-3-(benzylloxihexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona (80 mg, 0.278 mmol) y Pd-C (10% de Degussa tipo 101, 50% de agua, 34 mg) en MeOH (1.8 mL) se evacuó y se llenó nuevamente con H₂ (3x). Después de 2.5 horas se

filtró a través de un tapón de celite, se lavó con MeOH y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (40 mg, 74%). LCMS: $R_t = 0.13$ min, $m/z = 198.1$ ($M+1$) Método 2m_acídico.



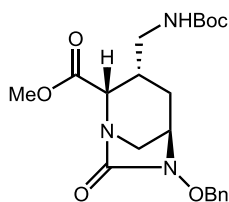
- 5 **[00218]** Paso 4: *(4R,5aS,8aS)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio*. A una suspensión de *(4R,5aS,8aS)-3-hidroxihexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona* cruda (40.7 mg, 0.206 mmol) en piridina (2 mL) a 0 °C se añadió complejo de $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (335 mg, 2.064 mmol). Después de 19 horas de agitación vigorosa, la suspensión se
- 10 filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se disolvió en THF:agua (1:1, 6 mL) y se añadió resina de intercambio sódico (Na) Amberlite 200 (1,5 g), La suspensión se agitó durante 2 horas, después de lo cual se filtró, parcialmente se concentró al vacío, congelado y liofilizado. El sólido resultante se sometió a cromatografía en gel de sílice (agua-acetonitrilo, 2-5%), proporcionando el compuesto del título (12.3 mg,
- 15 16%, en 2-pasos) como un sólido amorfo. LCMS: $R_t = 0.25$ min, $m/z = 278.0$ ($M+1$) Método T3_3m_polar; ^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 4.24-4.18 (m, 2H), 3.52 (dd, $J = 10.7, 6.2$ Hz, 1H), 3.33 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.10 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.95 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 2.81 (p, $J = 8.5$ Hz, 1H), 2.54-2.46 (m, 1H), 1.65 (dd, $J = 14.7, 9.2$ Hz, 1H).

20

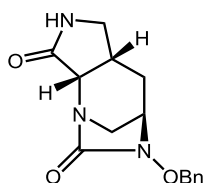


Ejemplo 1. Procedimiento alternativo. (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio.

25

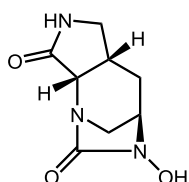


[00219] Paso 1: 6-(benciloxi-3-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2*S*,3*S*,5*R*)-metilo. Una mezcla agitada del Intermedio C (3 g, 10.41 mmol), ácido 2-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)acético (2.55 g, 14.57 mmol), Ir[df(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ (0.117 g, 0.104 mmol), y fosfato potásico dibásico (2.72 g, 15.61 mmol) en DMF (30.6 mL) se desgasificó mediante burbujeo de N₂ durante 15 min y irradiado con un LED Kessil H150-Blue (enfriamiento con ventilador), bajo N₂ durante 92 horas. Se añadió 2-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)acético (2.55 g, 14.57 mmol), fosfato potásico dibásico (2.72 g, 15.61 mmol), y Ir[df(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ (0.117 g, 0.104 mmol) y la mezcla se irradió con un LED Kessil H150-Blue (enfriamiento con ventilador), bajo N₂ durante 20 horas adicionales. La mezcla se diluyó con NaHCO₃ saturado (aq) y se extrajo EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El material crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptanos, 0-100%) para proporcionar el compuesto del título (352 mg, 8%) como una espuma amarilla. LC/MS: R_t = 0.87 min; m/z = 420.2 (M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.46-7.42 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 3H), 6.84 (br s, 1H), 4.93 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 3.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.76 (br s, 1H), 3.66-3.65 (m, 3H), 3.21 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.12-3.03 (m, 1H), 2.86-2.78 (m, 2H), 2.14 (br s, 1H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.51 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H), 1.34 (s, 9H)

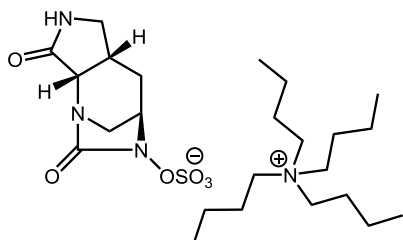


[00220] Paso 2: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-3-(benciloxihexahidro-2*H*-1,4-metanopirrol[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona. A una solución de 6-(benciloxi-3-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2*S*,3*S*,5*R*)-metilo (352 mg, 0.839 mmol) en DCM (4.19 mL) se añadió TFA (1.61 mL, 20.98 mmol), por goteo. Después de 90 min se concentró al vacío, se disolvió

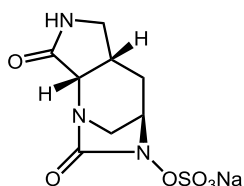
en DCM y se concentró nuevamente (3x). Al residuo, se disolvió en DCM (5 mL) a 0 °C se añadió TEA (1.17 mL, 8.39 mmol), después de lo cual se retiró el baño de enfriamiento. Después de 20 horas a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con NaHCO₃ saturado (aq) y se extrajo con EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-20%), proporcionando el compuesto del título (158 mg, 66%, 2-pasos) como una película transparente. LC/MS: R_t = 0.65 min; m/z = 288.0 (M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.99 (s, 1H), 7.48-7.33 (m, 5H), 4.99-4.88 (m, 2H), 3.81 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.32-3.22 (m, 1H), 2.89 (br d, J = 11.9 Hz, 1H), 2.75 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 2.63 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 2.26-2.17 (m, 1H), 1.38 (ddd, J = 14.3, 9.2, 1.9 Hz, 1H)



[00221] Paso 3: (4R,5aS,8aS)-3-hidroxihexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona. Una suspensión de (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxihexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona (158 mg, 0.550 mmol) y Pd-C (10 % de Degussa Tipo 101, agua al 50%, 117 mg, 0.055 mmol) en MeOH:DCM (3:1, 3.67 mL) se evacuó y se llenó nuevamente con H₂. Después de 2 horas, La mezcla se filtró a través de celite y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) para proporcionar el compuesto del título (102 mg, 94%) como un sólido blancuzco. LC/MS: R_t = 0.12 min; m/z = 198.0 (M+1) Método 2m_acídico.



[00222] Paso 4: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrol[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio. A una solución de (4*R*,5*aS*,8*aS*)-3-hidroxihexahidro-2*H*-1,4-metanopirrol[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona cruda (102 mg, 0.517 mmol) en piridina (5.17 mL) se añadió SO₃•Py (412 mg, 2.59 mmol). Después de 19 horas de agitación vigorosa, la mezcla se filtró y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C). El material resultante se disolvió en NaH₂PO₄ (1 M, 10 mL), después de lo cual se añadió hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (263 mg, 0.776 mmol). Después 30 min de agitación se extrajo con IPA:CHCl₃ (1:4, 3x). las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C). El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-30%) para proporcionar el compuesto del título (180 mg, 67%) como una espuma blanca. LC/MS: R_t = 0.13 min; m/z = 278 (M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 (s, 1H), 3.98 (br s, 1H), 3.81 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.28 (dd, J = 6.1, 9.9 Hz, 1H), 3.19 - 3.13 (m, 8H), 2.98 (br d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.78 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 2.65 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.49-2.44 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 1H), 1.63-1.51 (m, 8H), 1.40 (br dd, J = 9.3, 12.7 Hz, 1H), 1.31 (sxt, J = 7.4 Hz, 8H), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 12H)



[00223] Paso 5: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrol[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de sodio. La resina DOWEX 50Wx8 de hidrógeno que forma una malla 200-400 se acondicionó mediante agitación con NaOH (2 N) durante 3 horas. La resina se cargó en una columna de vidrio y se lavó con agua hasta que el pH fue ~6. Luego se lavó con 1: 1 agua/acetona. Se disolvió (4*R*,5*aS*,8*aS*)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrol[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (180 mg, 0.347 mmol) en 1:1 acetona/agua y se eluyó a través de la resina con 1:1 acetona/agua. La muestra se concentró parcialmente al vacío (temperatura baño < 30 °C), y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (75 mg, 68%) como un sólido blanco. LC/MS: R_t = 0.25 min; m/z = 278.0 (M+1) Método T3_3m_polar; ¹H RMN (500MHz, D₂O) δ 4.24-4.18 (m, 2H), 3.51 (dd, J = 10.7, 6.2 Hz, 1H), 3.33 (br d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.10 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.95 (d,

$J = 12.3$ Hz, 1H), 2.81 (p, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.54-2.46 (m, 1H), 1.65 (dd, $J = 14.7$, 9.2 Hz, 1H).

[00224] Procedimiento Alternativo Paso 5: Hidrógeno sulfato de (4*R*,5*aS*,8*aS*)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirroló[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo. A una solución de (4*R*,5*aS*,8*aS*)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirroló[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (6.9 g, 13.30 mmol) en isobutanol (20.8 mL) y agua (1.35 mL) a 40 °C se añadió una solución de sodio 2-etilhexanoato (4.56 g, 26.6 mmol) en isobutanol (20.8 mL) y agua (1.35 mL) vía bomba de jeringa a 8 mL/h. La mezcla se agitó durante 1 h a 40 °C luego se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche, después de lo cual se filtró con un embudo Buchner usando papel de filtro cualitativo Whatman La torta de filtro se lavó con isobutanol (3x) y luego con acetona helada (3x). Se aplicó vacío al embudo con una corriente N₂ sobre la torta de filtro durante 3 horas seguido de liofilización durante 3 días, lo cual proporcionó el compuesto del título (3.05 g, 73%) como un sólido blanco cristalino. LC/MS: $R_t = 0.25$ min; $m/z = 278.0$ (M+1) Método T3_3m_polar.

[00225] ¹H RMN (500MHz, D₂O) $\delta = 4.20 - 4.12$ (m, 2H), 3.48 (dd, $J=6.2$, 10.7 Hz, 1H), 3.33 - 3.25 (m, 1H), 3.05 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.90 (d, $J=12.2$ Hz, 1H), 2.82 - 2.71 (m, 1H), 2.46 (tdd, $J=2.8$, 8.7, 14.7 Hz, 1H), 1.66 - 1.56 (m, 1H)

[00226] El espectro de difracción de rayos X en polvo para la sal de sodio se muestra en la figura 1

Instrumento: Difractómetro de Rayos X (Bruker, modelo D8)

Fuente – Cu k α

Ancho de Paso 0.02°

Voltage 40 kV

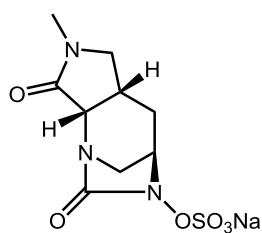
Corriente 40 mA

Tiempo por paso 120 segundos

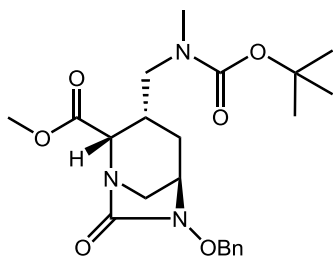
Rango de exploración de 3 a 39°

Pico 2theta

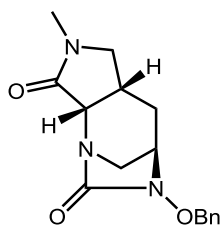
1	8.31 ($\pm$ 0.2)
2	11.66 ($\pm$ 0.2)
3	14.45 ($\pm$ 0.2)
4	16.63 ($\pm$ 0.2)
5	17.64 ($\pm$ 0.2)
6	18.12 ($\pm$ 0.2)
7	18.64 ($\pm$ 0.2)
8	19.51 ($\pm$ 0.2)
9	21.68 ($\pm$ 0.2)
10	23.54 ($\pm$ 0.2)
11	24.32 ($\pm$ 0.2)
12	25.06 ($\pm$ 0.2)
13	27.37 ($\pm$ 0.2)
14	27.86 ($\pm$ 0.2)
15	28.72 ($\pm$ 0.2)
16	31.33 ($\pm$ 0.2)
17	32.60 ($\pm$ 0.2)
18	33.58 ($\pm$ 0.2)
19	34.43 ($\pm$ 0.2)
20	35.40 ($\pm$ 0.2)
21	38.17 ($\pm$ 0.2)



5 Ejemplo 2. (4R,5aS,8aS)-7-metil-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio.

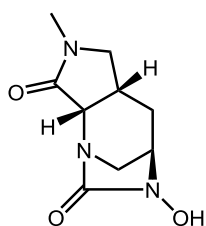


[00227] Paso 1: 6-(benciloxi-3-(((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2S,3S,5R)-metilo. Una mezcla agitada del Intermedio C (3 g, 10.41 mmol), ácido 2-(((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)acetico (2.56 g, 13.53 mmol), Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)PF₆ (0.117 g, 0.104 mmol), y fosfato potásico dibásico (2.175 g, 12.49 mmol) en DMF (30 mL) se desgasificó burbujeando N₂ a través de la suspensión durante 15 min y luego se dejó bajo una línea N₂ y se irradió con un LED Kessil H150-Blue (enfriamiento por ventilador) durante 48 h. La reacción se diluyó con NaHCO₃ saturado y se extrajo con EtOAc (3x). las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptanos, 0-100%) para proporcionar una espuma de color naranja (233 mg). Este material se repurificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptanos, 0-70%) proporcionando el compuesto del título (140 mg, 3%) como un sólido amarillo. LC/MS: R_t = 0.92 min; m/z = 434.1(M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (500MHz, DMSO-d₆) δ 7.46-7.42 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 3H), 4.98-4.91 (m, 2H), 3.88-3.81 (m, 1H), 3.78 (br s, 1H), 3.68 (br s, 3H), 3.26-3.03 (m, 2H), 2.84 (br d, J = 11.6 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 1.97-1.88 (m, 1H), 1.62 (br t, J = 12.6 Hz, 1H), 1.34 (br s, 9H)



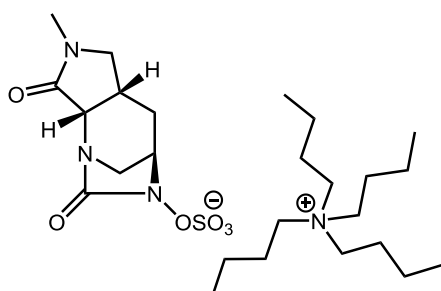
[00228] Paso 2: 6-(benciloxi-3-((metilamino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2S,3S,5R)-metilo. A una solución agitada de 6-(benciloxi-3-(((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2S,3S,5R)-metilo (140 mg, 0.323 mmol) en DCM (1.6 mL), TFA (0.622 mL, 8.07 mmol) se añadió por goteo a temperatura

ambiente bajo N₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min y luego se concentró y se coevaporo con DCM (3x). El residuo se disolvió en DCM (2 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió TEA (0.450 mL, 3.23 mmol), el baño de enfriamiento se eliminó y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. La reacción se diluyó con NaHCO₃ saturado y se extrajo con EtOAc (3x). las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-20%) para proporcionar el compuesto del título (86 mg, 88%) como una película clara. LC/MS: R_t = 0.46 min; m/z = 301.9 (M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.50-7.32 (m, 5H), 5.03-4.86 (m, 2H), 3.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.60 (br s, 1H), 3.39-3.34 (m, 1H), 2.93-2.83 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.57 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.32-2.18 (m, 1H), 1.38 (ddd, J = 14.3, 9.0, 1.9 Hz, 1H)



[00229] Paso 3: (4R,5aS,8aS)-3-hidroxi-7-metilhexahidro-2H-1,4-metanopirrolo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona. 6-(benciloxi-3-

((metilamino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2S,3S,5R)-metilo (143 mg, 0.475 mmol) se disolvió en metanol (2.4 mL) y se añadió Pd-C (10 %, Degussa Tipo 101, agua al 50%, 101 mg, 0.047 mmol). La mezcla se evacuó bajo vacío y se llenó nuevamente H₂. Después de 1 hora de agitación, la mezcla se filtró a través de celite y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) para proporcionar el compuesto del título (63 mg, 63%) como un sólido blanco. LC/MS: R_t = 0.11 min; m/z = 211.9 (M+1) Método 2m_acídico.



[00230] Paso 4: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-metil-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrololo[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio.

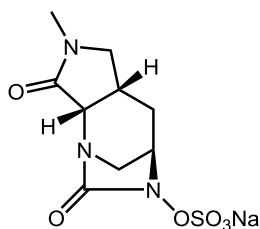
(4*R*,5*aS*,8*aS*)-3-hidroxi-7-metilhexahidro-2*H*-1,4-metanopirrololo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona (63 mg, 0.298 mmol) se disolvió en piridina (2.9 mL) y se añadió

5 SO₃•piridina (237 mg, 1.49 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La reacción se filtró a través de un filtro de plástico desechable y se concentró bajo presión reducida (temperatura baño < 30 °C). Este material se disolvió en NaH₂PO₄ (1 M, 10 mL) y se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (152 mg, 0.447 mmol). Después de agitar durante 30 min a

10 temperatura ambiente se extrajo con EtOAc (4x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con 20% IPA en CHCl₃ (2x), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C). El material orgánico combinado se purificó mediante cromatografía en gel de sílice

15 (MeOH-DCM, 0-30%) para proporcionar el compuesto del título (62 mg, 39%) como una película clara. LC/MS: R_t = 0.13 min; m/z = 291.9 (M+1) Método 2m_acídico; ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ = 4.34 (br s, 1H), 4.04 (br d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 10.0, 5.6 Hz, 1H), 3.34 (br d, J = 2.6 Hz, 1H), 3.28 (br dd, J = 10.3 Hz, 5.1 Hz, 8H), 2.97-2.91 (m, 4H), 2.80 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.75-2.61 (m, 2H), 1.74-1.60 (m, 9H),

20 1.44 (sxt, J = 7.4 Hz, 8H), 1.00 (t, J = 7.3 Hz, 12H).

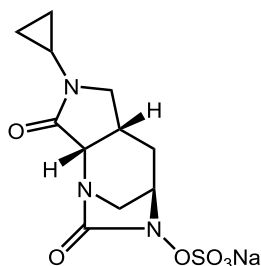


[00231] Paso 5: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-metil-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrololo[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de sodio. La matriz DOWEX

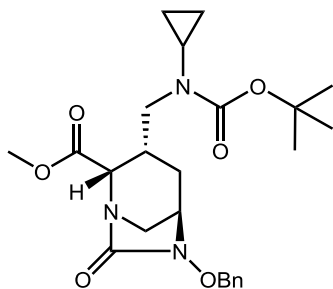
25 50Wx8 de hidrógeno de forma 200-400 se acondicionó mediante agitación con NaOH (2 N) durante 3 horas. La resina se cargó sobre una columna de vidrio y se lavó con agua hasta que el pH fue ~6. Luego se lavó con agua:acetona (1:1). (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-metil-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrololo[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (62 mg, 0.12 mmol) se disolvió en 1:1

30 acetona:agua y se pasó abajo de la columna con acetona:agua (1:1). La muestra se

concentró parcialmente al vacío (temperatura baño < 30 °C) luego se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (32 mg, 83%) como un polvo blanco. LC/MS: R_t = 0.48 min; m/z = 291.8 (M+1) Método T3_3m_polar; ^1H RMN (500MHz, D_2O) δ = 4.20-4.15 (m, 2H), 3.60 (dd, J = 10.6, 6.4 Hz, 1H), 3.30 (dddd, J = 12.3, 4.0, 2.7, 1.3 Hz, 1H), 3.13 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.86 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.77-2.69 (m, 1H), 2.49 (tdd, J = 14.8, 8.8, 3.0 Hz, 1H), 1.59 (ddd, J = 14.8, 8.9, 2.0 Hz, 1H).

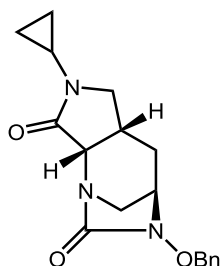


Ejemplo 3. (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-ciclopropil-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrololo[3,4-
 10 *d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de sodio.

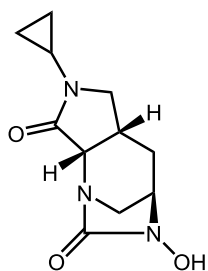


[00232] Paso 1: 6-(benciloxi-3-(((*tert*-butoxicarbonil)(ciclopropil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de (2*S*,3*S*,5*R*)-metilo. Una mezcla
 15 agitada del Intermedio C (4 g, 13.87 mmol), ácido 2-(((*tert*-butoxicarbonil)(ciclopropil)amino)acético (3.88 g, 18.04 mmol), $\text{Ir}[\text{df}(\text{CF}_3)\text{ppy}_2(\text{dtbpy})]\text{PF}_6$ (0.156 g, 0.139 mmol), y fosfato potásico dibásico (2.90 g, 16.65 mmol) en DMF (40 mL) se desgasificó burbujeando a través de N_2 durante 15 min. La mezcla se irradió bajo N_2 con un LED Kessil H150-Blue (enfriamiento por
 20 ventilador) durante 42 h, después de lo cual se diluyó con NaHCO_3 saturado, se filtraron y se extrajo con EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptanos, 0-100%). Este material se repurificó 2 veces más mediante cromatografía
 25 en gel de sílice (EtOAc-heptanos, 0-100% luego EtOAc-heptanos, 0-70%)

proporcionando el compuesto del título (190 mg, rendimiento del 3%) como una película clara. LC/MS: $R_t = 0.99\text{min}$; $m/z = 460.2$ ($M+1$) Método 2m_acídico; ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) $\delta = 7.45\text{-}7.34$ (m, 5H), 5.05 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.37-3.25 (m, 2H), 3.17-3.07 (m, 1H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.64-2.52 (m, 1H), 2.44-2.35 (m, 1H), 2.09-1.98 (m, 1H), 1.68 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.58-1.52 (m, 1H), 1.44-1.39 (m, 9H), 0.80-0.66 (m, 2H), 0.59-0.46 (m, 2H)

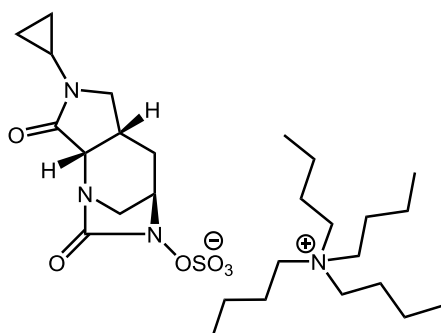


[00233] Paso 2: (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-7-ciclopropilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona. A una solución agitada de (2S,3S,5R)-metilo 6-(benciloxi-3-(((terc-butoxicarbonil)(ciclopropil)amino)metil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato (190 mg, 0.413 mmol) se disolvió en DCM (4.1 mL), se añadió TFA (0.796 mL, 10.34 mmol) por goteo a temperatura ambiente bajo N_2 . La solución se agitó a temperatura ambiente durante 90 min y luego se concentró al vacío, se diluyó con DCM y se concentró nuevamente (3x). El residuo se disolvió en DCM (2 mL) y se enfrió a 0°C . Se añadió TEA (0.576 mL, 4.13 mmol) y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución se concentró bajo presión reducida y el material crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-20%), proporcionando el compuesto del título (103 mg, 76%) como una película clara. LC/MS: $R_t = 0.69\text{min}$; $m/z = 328.0$ ($M+1$) Método 2m_acídico; ^1H RMN (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 7.46\text{-}7.42$ (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 3H), 4.97-4.89 (m, 2H), 3.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.31-3.27 (m, 1H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 2.66 (tt, $J = 7.5, 4.1$ Hz, 1H), 2.56 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 2.42 (dd, $J = 8.5, 6.1$ Hz, 1H), 2.19 (ddt, $J = 14.3, 8.5, 3.0$ Hz, 1H), 1.31 (ddd, $J = 14.3, 9.2, 1.9$ Hz, 1H), 0.78-0.68 (m, 2H), 0.66-0.55 (m, 2H).



[00234] Paso 3: (4R,5aS,8aS)-7-ciclopropil-3-hidroxihexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona. (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-7-

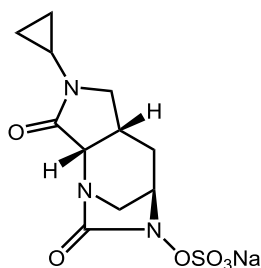
ciclopropilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona (103 mg, 0.315 mmol) se disolvió en MeOH (3.2 mL) y se añadió Pd-C (10% Degussa tipo 101, agua al 50%, 67.0 mg, 0.031 mmol). La mezcla se desgasificó al vacío y se llenó nuevamente con H₂. Después de agitar durante 40 min, se filtraron a través de Celite y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) para proporcionar el compuesto del título (75 mg, 100%) como un sólido blanco. LC/MS: R_t = 0.54 min; m/z = 238.0 (M+1) Método 2m_acídico.



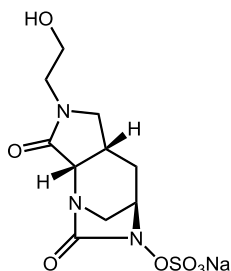
[00235] Paso 4: (4R,5aS,8aS)-7-ciclopropil-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio. A una

solución de (4R,5aS,8aS)-7-ciclopropil-3-hidroxihexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(8aH)-diona (75 mg, 0.316 mmol) en piridina (3.16 mL) se añadió SO₃•piridina (151 mg, 0.948 mmol). Después de agitar durante 20 horas, la suspensión se filtró y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C). El residuo crudo se disolvió en NaH₂PO₄ saturado (10 mL) y se lavó con EtOAc. A la capa acuosa se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (161 mg, 0.474 mmol). Después de agitar durante 45 min se extrajo con DCM (4x), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C). El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (acetona-DCM, 0-100%) para proporcionar 121 mg de una película clara. LC/MS: R_t = 0.14 min; m/z = 318.0

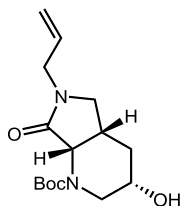
(M+1) Método 2m_acídico; ^1H RMN (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 3.93 (br s, 1H), 3.87 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.34-3.29 (m, 1H), 3.19-3.13 (m, 8H), 2.99-2.94 (m, 1H), 2.78 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 2.68 (tt, J = 7.4, 4.2 Hz, 1H), 2.57 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 2.46-2.36 (m, 1H), 2.26-2.17 (m, 1H), 1.61-1.52 (m, 8H), 1.35-1.26 (m, 9H), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 12H), 0.78-0.69 (m, 2H), 0.66-0.57 (m, 2H).



[00236] Paso 5: (4R,5aS,8aS)-7-ciclopropil-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio La resina DOWEX 50Wx8 de hidrógeno que forma una malla 200-400 se acondicionó mediante agitación con NaOH (2 N) durante 3 horas. La resina se cargó en una columna de vidrio y se lavó con agua (hasta pH $\approx$ 6) seguido por agua: acetona (1:1). Una solución de (4R,5aS,8aS)-7-ciclopropil-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (121 mg, 0.217 mmol) en agua:acetona (1:1) se cargó y se pasó a través de una columna, eluyendo con agua: acetona (1:1). La muestra se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) y se liofilizó, proporcionando el compuesto del título (51 mg, rendimiento del 66%) como un polvo blanco. LC/MS: R_t = 0.36 min; m/z = 318.0 (M+1) Método 2m_acídico; ^1H RMN (500MHz, D_2O) δ 4.20-4.14 (m, 2H), 3.55 (dd, J = 10.6, 6.1, Hz, 1H), 3.32-3.26 (m, 1H), 3.09 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 2.83 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 2.73-2.65 (m, 2H), 2.50-2.42 (m, 1H), 1.51 (dd, J = 14.6, 9.1 Hz, 1H), 0.90-0.74 (m, 3H), 0.71-0.63 (m, 1H).

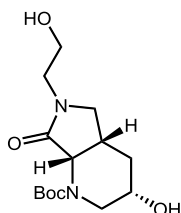


Ejemplo 4. (4R,5aS,8aS)-7-(2-hidroxietil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio.



[00237] Paso 1: (3S,4aS,7aS)-6-alil-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-

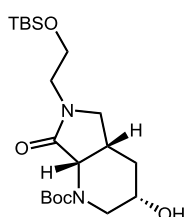
5 *b]*piridina-1-carboxilato. de *terc*-Butilo A una solución de (3S,4aS,7aS)-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-*b]*piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo (1.50 g, 5.62 mmol) en DMF (56 mL) a 0 °C se añadió *terc*-butóxido de potasio (1 M en THF, 5.6 mL, 5.6 mmol). Después de 5 min el baño frío se removió y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 min luego se enfrió a 0 °C, después de lo cual se
10 añadió alilbromuro (490 µL, 5.66 mmol) por goteo. el baño frío se removió después 5 min y después de 2 horas adicionales a temperatura ambiente, se concentró al vacío y se purificó directamente mediante cromatografía en gel de sílice (etilacetato-heptano, 0-100%) para proporcionar el compuesto del título (1.688 g, 81%) como un sólido blanco. LC/MS: R_t = 0.70 min; m/z = 297.1 (M+1) Método 2m_acídico; ^1H
15 RMN (500 MHz, DMSO- d_6)* δ = 5.72 (ddt, J = 16.4, 11.1, 5.9 Hz, 1H), 5.23-5.15 (m, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.77 (d, J = 7.1 Hz, 0.5H), 4.62 (d, J = 7.1 Hz, 0.5H), 3.97-3.85 (m, 1.5H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.71 (dd, J = 15.3, 6.3 Hz, 0.5H), 3.49-3.42 (m, 1H), 2.83 – 2.77 (m, 1H), 2.50-2.40 (m, 1H), 2.14 (t, J = 11.6 Hz, 0.5H), 2.03-1.91 (m, 1.5H), 1.42 (s, 4.5H), 1.38 (s, 4.5H) 0.96 (p, J = 12.1 Hz, 1H). *Reportado como una mezcla
20 de rotámeros.



[00238] Paso 2: (3S,4aS,7aS)-3-hidroxi-6-(2-hidroxietil)-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-*b]*piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo. Una solución de (3S,4aS,7aS)-6-
25 alil-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-*b]*piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo (2.72 g, 9.18 mmol) en DCM (92 mL) a -78 °C se burbujeo con O₃ durante 30 min. luego se purgó burbujeando O₂ durante 20 min adicionales a -78 °C. A la solución

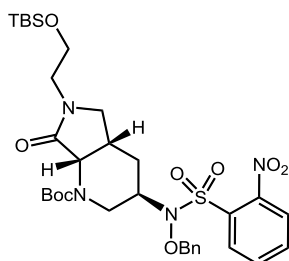
clara se añadió dimetilsulfuro (6.74 mL, 92 mmol) y se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. se enfrió a 0 °C y se añadió MeOH (18 mL) seguido por borohidruro de sodio (694 mg, 18.4 mmol) luego se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente. Después de 14 horas a temperatura ambiente se enfrió a 0 °C y se añadió NH₄Cl saturado (aq, 10 mL). Después 20 min a temperatura ambiente se concentró al vacío seguido por la adición de MeOH y se concentró nuevamente. El residuo se recogió en MeOH, se filtró luego se concentró nuevamente. Se añadió tolueno y la suspensión se sonicó luego se concentró nuevamente. LCMS: R_t = 0.40 min; m/z = 301.4 (M+1) Método 2m_acídico.

10



[00239] Paso 3: (3S,4aS,7aS)-6-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrol[3,4-b]piridina-1-carboxilato de terc-Butilo. A la solución de (3S,4aS,7aS)-3-hidroxi-6-(2-hidroxietil)-7-oxooctahidro-1H-pirrol[3,4-b]piridina-1-carboxilato de terc-Butilo (9.18 mmol) en piridina (18 mL) se añadió TBS-Cl (1.384 g, 9.18 mmol). Después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente se concentró al vacío y se recogió en EtOAc y se lavó con agua. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (2.433 g, 64% 3-pasos) como un sólido blanco. LCMS: R_t = 0.89 min; m/z = 415.4 (M+1) Método 2m_acídico.

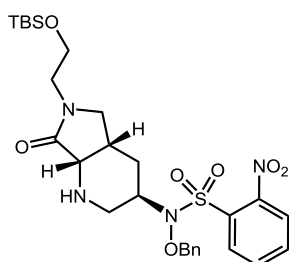
20



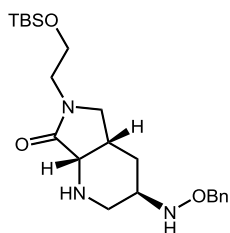
[00240] Paso 4: (3R,4aS,7aS)-3-((N-(benciloxi-2-nitrofenil)sulfonamido)-6-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-7-oxooctahidro-1H-pirrol[3,4-b]piridina-1-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de (3S,4aS,7aS)-6-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-3-

25

hidroxi-7-oxooctahidro-1*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridina-1-carboxilato de *tert*-Butilo (2.411 g, 5.82 mmol), *N*-(benciloxi-2-nitrobenzenosulfonamida (2.160 g, 7.01 mmol) y trifenilfosfina (1.830 g, 6.98 mmol) en THF (65 mL) a -17 °C se añadió DIAD (1.40 mL, 6.98 mmol) como una solución en THF (10 mL), por goteo. Se dejó calentar
5 lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas, después se concentró al vacío y se purificó directamente mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (1.785 g, rendimiento del 44%) como un sólido blanco. LCMS: R_t = 1.15 min; m/z = 705.4 ($M+1$) Método 2m_acídico.

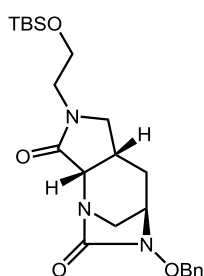


[00241] Paso 4: *N*-(benciloxi-*N*-((3*R*,4*aS*,7*aS*)-6-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-7-oxooctahidro-1*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-3-il)-2-nitrobenzenosulfonamida. A un matraz cargado con bromuro de zinc(II) (1.21 g, 5.37 mmol, secado a 200 °C durante 3 horas, se añadió una solución de
15 (3*R*,4*aS*,7*aS*)-3-((*N*-(benciloxi-2-nitrofenil)sulfonamido)-6-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-7-oxooctahidro-1*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridina-1-carboxilato de *tert*-Butilo (1.79 g, 2.53 mmol) en DCM (8.5 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, se diluyó con DCM y se apagó NaHCO_3 saturado. Al cesar el burbujeo, las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x).
20 las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentró al vacío, resultando en una espuma blanca. LCMS: R_t = 0.94 min; m/z = 605.3 ($M+1$) Método 2m_acídico.

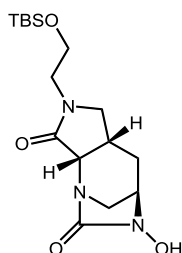


[00242] Paso 5: (3*R*,4*aS*,7*aS*)-3-((benciloxiamino)-6-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)octahidro-7*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-7-ona. A una suspensión de

N-(benciloxi-*N*-((3*R*,4*aS*,7*aS*)-6-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-7-oxooctahidro-1*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-3-il)-2-nitrobencenosulfonamida (1.53 g, 2.53 mmol) y K₂CO₃ (1.753 g, 12.68 mmol) en ACN (25 mL) se añadió tiofenol (1.343 mL, 12.65 mmol). Después de 22 horas se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (919 mg, 87%, 2-pasos) como una espuma blancuzca. LCMS: R_t = 0.82 min; m/z = 420.4 (M+1) Método 2m_acídico.



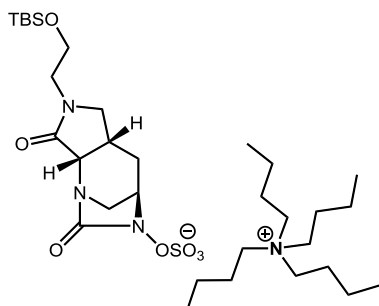
- 10 **[00243]** Paso 6: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-3-(benciloxi-7-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-hexahidro-2*H*-1,4-metanopirrolo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(3*H*)-diona. A una solución de (3*R*,4*aS*,7*aS*)-3-((benciloxiamino)-6-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)octahidro-7*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-7-ona (919 mg, 2.19 mmol) y DIPEA (1.2 mL, 6.87 mmol) en acetonitrilo (68.4 mL) a 0 °C se añadió fosgeno (15-20% en, 1.60 mL, 2.24 mmol) como una solución en acetonitrilo (10 mL) a una tasa de 8 mL/h. Se dejó elevar lentamente a temperatura ambiente. Después 20 horas se concentró al vacío, se particionó entre EtOAc/HCl (aq, 0.2 M) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, NaHCO₃ saturado, se secaron sobre Na₂SO₄/MgSO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, proporcionando el compuesto del título (549 mg, 56%) como una espuma blanca. LCMS: R_t = 0.95 min; m/z = 446.4 (M+1) Método 2m_acídico.



[00244] Paso 7: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-3-hidroxihexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(3*H*)-diona. Una

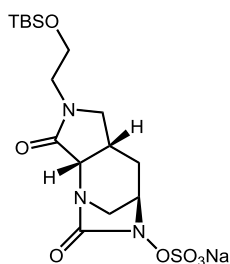
suspensión de (4*R*,5*aS*,8*aS*)-3-(benciloxi-7-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)hexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(3*H*)-

5 diona (110 mg, 0.247 mmol) y Pd-C (10% Degussa Tipo 101, agua al 50%, 25 mg, 0.012 mmol) en MeOH (2.5 mL) se desgaseó y se llenó nuevamente con H₂ (3x). Después de 3 horas de agitación vigorosa, la suspensión se purgó con N₂, se filtraron a través de Celite y se concentró al vacío. Se añadió tolueno y se sonicó luego se concentró nuevamente. Rendimiento cuantitativo asumido. LCMS: R_t =
10 0.71 min; m/z = 356.4 (M+1) Método 2m_acídico.



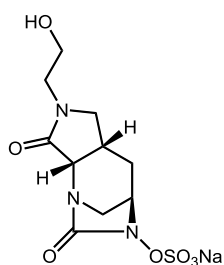
[00245] Paso 8: (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de

15 tetrabutilamonio. A una solución de (4*R*,5*aS*,8*aS*)-7-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etil)-3-hidroxihexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(3*H*)-diona (0.247 mmol) en piridina (1.6 mL) se añadió SO₃•Py (197 mg, 1.24 mmol). Después de agitar durante 17 horas a temperatura ambiente la mezcla se concentró al vacío y suspendió en DCM luego se filtró y se concentró nuevamente al vacío. El sólido
20 resultante se disolvió en NaH₂PO₄ (1 M aq, 20 mL), después de lo cual se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (131 mg, 0.386 mmol). Después de agitar durante 45 min se extrajo con DCM (4x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-20%) para
25 proporcionar el compuesto del título (56 mg, 34%, 3-pasos) como una espuma blancuzca. LCMS: R_t = 0.81 min; m/z = 436.3 (M+1) Método 2m_acídico.



[00246] Paso 9: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de Sodio.

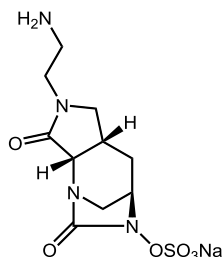
La matriz DOWEX 50Wx8 de hidrógeno de forma 200-400 se acondicionó mediante
 5 agitación con NaOH (2 N) durante 3 horas. La resina se cargó sobre una columna
 de vidrio y se lavó con agua (hasta pH $\approx$ 6) seguido por agua:acetona (1: 1). una
 solución de (4R,5aS,8aS)-7-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-2,8-dioxohexahidro-2H-
 1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (56 mg,
 0.083 mmol) en agua:acetona (1:1) se cargó y se pasó abajo de la columna,
 10 eluyendo con agua: acetona (1:1). La muestra se concentró al vacío (temperatura
 baño < 30 °C) y se liofilizó, proporcionando el compuesto del título (36 mg,
 rendimiento del 95%) como un polvo blanco. LCMS: R_t = 0.84 min; m/z = 436.3
 (M+1) Método 2m_acídico.



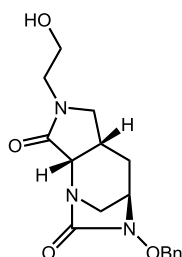
[00247] Paso 10: (4R,5aS,8aS)-7-(2-hidroxietil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio. A una suspensión de

Sodio (4R,5aS,8aS)-7-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-
 metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato (36 mg, 0.079 mmol) en
 20 acetonitrilo (790 μ L) se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (13.07 μ L, 0.079 mmol),
 por goteo y la solución resultante se calentó a 45 °C durante 3 horas. Se añadió
 trihidrofluoruro de trietilamina adicional (13.07 μ L, 0.079 mmol) y se calentó a 45 °C
 durante 2 horas luego se concentró al vacío. El residuo crudo se recogió en buffer
 de fosfato (pH = 6) y purificado mediante HPLC preparativa de fase inversa (T3,
 25 Columna Atlantis, 30 x 100 mm, 5 μ m, columna C18; ACN-agua con buffer de

NH₄OAc 3.75 mmol, 20-60 mL/min), proporcionando el compuesto del título (13.9 mg) como un polvo blanco. LCMS: R_t = 0.34 min; m/z = 322.2 (M+1) Método T3_3m_polar. ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.8 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.69 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.61 (dd, J = 10.7, 6.3 Hz, 1H), 3.49-3.37 (m, 2H), 3.29-3.22 (m, 1H), 3.17-3.14 (m, 1H), 2.84 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 2.75 – 2.67 (m, 1H), 2.45 (ddt, J = 14.7, 8.7, 3.0 Hz, 1H), 1.54 (ddd, J = 14.8, 9.0, 2.0 Hz, 1H).

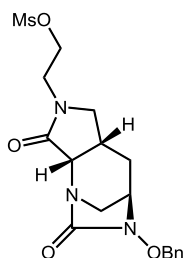


Ejemplo 5. Sulfato de hidrógeno de (4R,5aS,8aS)-7-(2-aminoetil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo.



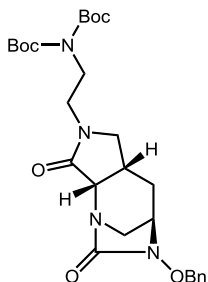
[00248] Paso 1: (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-7-(2-hidroxiethyl)hexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona. A una solución de (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-7-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etil)hexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona (530 mg, 1.19 mmol) en THF (12 mL) a 0 °C se añadió TBAF (1.2 mL, 1.20 mmol). Después de 1 hora a 0 °C se concentró al vacío, particionó entre EtOAc/agua y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄/MgSO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-7%) para proporcionar el compuesto del título (268 mg, 68%) como un sólido blanco. LCMS: R_t = 0.55 min; m/z = 332.3 (M+1) Método 2m_acídico. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃-d) δ 7.48-7.36 (m, 5H), 5.09 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.93 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.18 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.87-3.75 (m, 2H), 3.66-3.54 (m, 2H), 3.42-3.35 (m, 1H), 3.30 (s, 1H),

3.10 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 3.03 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 2.81-2.72 (m, 2H), 2.48-2.39 (m, 2H), 1.38 (dd, $J = 14.2, 9.2$ Hz, 1H).



[00249] Paso 2: Metanosulfonato de 2-((4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-2,8-

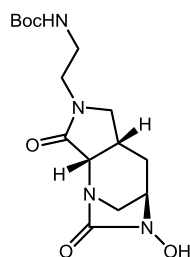
5 dioxooctahidro-7H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etilo. A una solución de (4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-7-(2-hidroxietil)hexahidro-2H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona (265.4 mg, 0.801 mmol) y TEA (140 μ L, 1.00 mmol) en DCM (4.0 mL) se añadió MsCl (65.5 μ L, 0.841 mmol). Después de 45 min se lavó con agua. La capa acuosa se extrajo con DCM (2x) y las capas orgánicas
10 combinadas se secaron sobre $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$, se filtraron y se concentraron al vacío, proporcionando el compuesto del título (332 mg) como un sólido blanco. LCMS: $R_t = 0.55$ min; $m/z = 410.3$ (M+1) Método 2m_acídico.



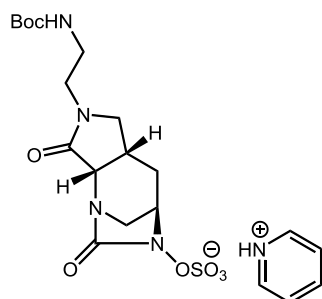
[00250] Paso 3: (2-((4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-2,8-dioxooctahidro-7H-1,4-

15 metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etil)iminodicarboxilato de Di-terc-Butilo. A una solución de di-terc-butil-iminodicarboxilato (153 mg, 0.704 mmol) en DMF (3.2 mL) se añadió terc-butoxido de potasio (1 M en THF, 700 μ L, 0.700 mmol). Después 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de metanosulfonato de 2-((4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-2,8-dioxooctahidro-7H-1,4-metanopirrololo[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etilo (262 mg, 0.640 mmol) en DMF (2 mL, lavados 2x500 μ L). Se
20 agitó a temperatura ambiente durante 10 min, se calentó a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 100 min luego se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, después de lo cual esto se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera ($\frac{1}{2}$ saturado). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre
25 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó

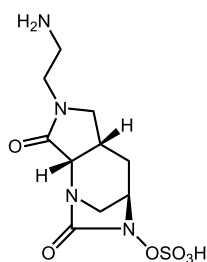
mediante cromatografía de gel de sílice (EtOAc-heptano, 0-90%), proporcionando el compuesto del título (293 mg, 86%) como un sólido blanco. LCMS: $R_t = 0.87$ min; $m/z = 431.4$ ($M - \text{Boc} + 1$) Método 2m_acídico.



- 5 **[00251]** Paso 4: (2-((4R,5aS,8aS)-3-hidroxi-2,8-dioxooctahidro-7H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etil)carbamato de terc-Butilo. Una suspensión de (2-((4R,5aS,8aS)-3-(benciloxi-2,8-dioxooctahidro-7H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etil)iminodicarboxilato de di-terc-Butilo (226.8 mg, 0.427 mmol) y Pd-C (10% Degussa tipo 101, agua al 50%, 45.3 mg, 0.021 mmol) en MeOH (4.2 mL) se desgasificó y se llenó nuevamente con H_2 (3x). Después de 3 horas de agitación vigorosa, la suspensión se purgó con N_2 , se filtraron a través de Celite y se concentró al vacío. Se añadió tolueno y se sonicó luego se concentró nuevamente. Rendimiento cuantitativo asumido. LCMS: $R_t = 0.65$ min; $m/z = 341.4$ ($M+1$) Método 2m_acídico.



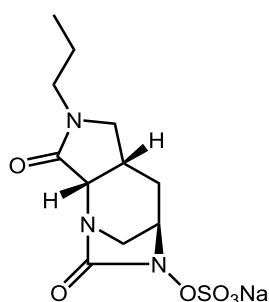
- 15 **[00252]** Paso 5: (4R,5aS,8aS)-7-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de piridin-1-io. A una solución de (2-((4R,5aS,8aS)-3-hidroxi-2,8-dioxooctahidro-7H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-7-il)etil)carbamato de terc-Butilo en piridina (3 mL) se añadió $SO_3 \cdot \text{piridina}$ (335 mg, 2.10 mmol). Después de 15 h a temperatura ambiente se concentró al vacío, se suspendió en DCM y se filtró, proporcionando el compuesto del título como un sólido blancuzco. Rendimiento cuantitativo asumido. LCMS: $R_t = 0.59$ min; $m/z = 321.4$ ($M - \text{Boc} + 1$) Método 2m_acídico.
- 20



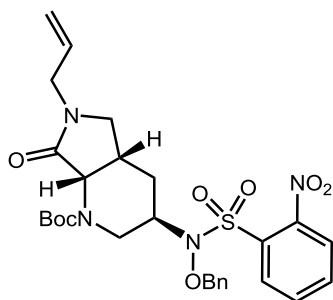
[00253] Paso 6: Sulfato de hidrógeno de (4R,5aS,8aS)-7-(2-aminoetil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo. A una

suspensión de (4R,5aS,8aS)-7-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,8-

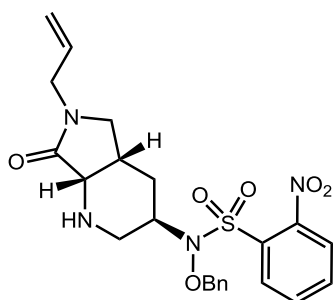
5 dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de piridin-1-io (210 mg, 0.421 mmol) en DCM (4.2 mL) a 0 °C se añadió TFA (973 µl, 12.63 mmol). Después 2.5 horas a 0 °C se concentró al vacío, se suspendió en DCM y se concentró nuevamente. El residuo crudo se recogió en bufferfosfato (pH = 6), se filtró y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (T3, Columna Atlantis, 10 30 x 100 mm, 5 µm, columna C18; agua con buffer de NH₄OAC 3.75 mmol, 20-60 mL/min), proporcionando el compuesto del título (155 mg) como un polvo blanco. LCMS: R_t = 0.22 min; m/z = 321.4 (M+1) Método T3_3m_polar. ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.94 (s, 1H), 3.61 (dt, J = 14.3, 6.9 Hz, 1H), 3.45 (dd, J = 10.5, 6.4 Hz, 1H), 3.28 (dt, J = 14.8, 5.6 Hz, 1H), 3.06 (br d, J = 12.4 Hz, 1H), 2.96 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.92 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 2.68 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 15 2.55 (p, J = 8.3 Hz, 1H), 2.31-2.21 (m, 1H), 1.38 (dd, J = 14.9, 9.1 Hz, 1H).



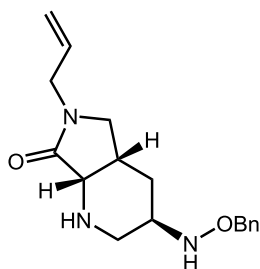
Ejemplo 6. (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxo-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio. 20



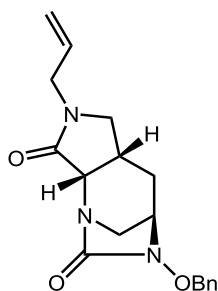
[00254] Paso 1: (3R,4aS,7aS)-6-allyl-3-((N-(benziloxi-2-nitrofenil)sulfonamido)-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-b]piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo. A una solución de (3S,4aS,7aS)-6-allyl-3-hidroxi-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-b]piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo (786.4 mg, 2.65 mmol), *N*-(benziloxi-2-nitrobenzenosulfonamida (900 mg, 2.92 mmol) y trifenilfosfina (835 mg, 3.18 mmol) en THF (29 mL) a -17 °C se añadió DIAD (0.640 mL, 3.18 mmol) como una solución en THF (4.1 mL) por goteo a 6:30 pm. Se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 22 horas luego se concentró al vacío y se purificó directamente mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 0-40%), proporcionando el compuesto del título (846 mg, 54%) como un sólido blancuzco. LCMS: $R_t = 0.95$ min; $m/z = 587.3$ (M+1) Método 2m_acídico.



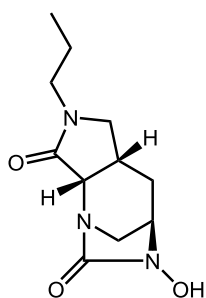
[00255] Paso 2: *N*-((3R,4aS,7aS)-6-allyl-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-b]piridin-3-il)-*N*-(benziloxi-2-nitrobenzenosulfonamida. A un matraz cargado con bromuro de cinc(II) (681 mg, 3.02 mmol, secado a 200 °C durante 4 h) y (3R,4aS,7aS)-6-allyl-3-((N-(benziloxi-2-nitrofenil)sulfonamido)-7-oxooctahidro-1H-pirrollo[3,4-b]piridina-1-carboxilato de *terc*-Butilo (845 mg, 1.44 mmol), bajo N₂, se añadió DCM (4.8 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 horas, se diluyó con DCM y se apagó NaHCO₃ saturado. Al cesar el burbujeo, las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío, resultando en una espuma blanca. Rendimiento cuantitativo asumido. LCMS: $R_t = 0.70$ min; $m/z = 487.2$ (M+1) Método 2m_acídico.



[00256] Paso 3: (3R,4aS,7aS)-6-allyl-3-((benciloxiamino)octahidro-7H-pirrolo[3,4-b]piridin-7-ona. A una suspensión de N-((3R,4aS,7aS)-6-allyl-7-oxooctahidro-1H-pirrolo[3,4-b]piridin-3-il)-N-(benciloxi-2-nitrobenzenosulfonamida (1.44 mmol) y K₂CO₃ (995 mg, 7.20 mmol) en ACN (14.4 mL) se añadió tiofenol (764 μL, 7.20 mmol). Después de 21 horas se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-8%), proporcionando el compuesto del título (385 mg, 89%, 2-pasos) como una espuma blancuzca. LCMS: Rt = 0.49 min; m/z = 302.4 (M+1) Método 2m_acídico.



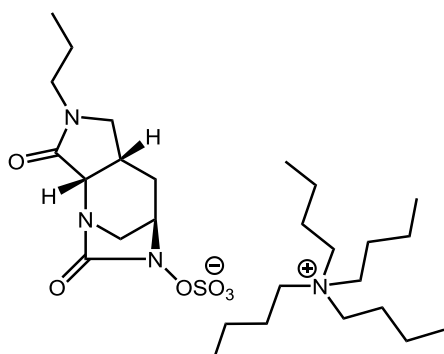
[00257] Paso 4: (4R,5aS,8aS)-7-allyl-3-((benciloxihexahidro-2H-1,4-metanopirrolo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona. A una solución de (3R,4aS,7aS)-6-allyl-3-((benciloxiamino)octahidro-7H-pirrolo[3,4-b]piridin-7-ona (385 mg, 1.28 mmol) y DIPEA (670 μL, 3.83 mmol) en ACN (40 mL) a 0 °C se añadió fosgeno (1.20 mL, 1.66 mmol) como una solución en ACN (5.7 mL) a una tasa de 6.5 mL/h. Se dejó elevar lentamente a temperatura ambiente. Después de 20 horas se concentró al vacío, se particionó entre EtOAc/HCl (0.2 N) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y NaHCO₃ saturado. El lavado de salmuera se combinó con el lavado de NaHCO₃ saturado y la solución se extrajo con 10% MeOH/DCM (2x). La capa acuosa ácida se extrajo nuevamente con 10% MeOH/DCM (2x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-10%), proporcionando el compuesto del título (369.2 mg, 88%) como una espuma blanca. LCMS: Rt = 0.60 min; m/z = 328.4 (M+1) Método 2m_acídico.



[00258] Paso 5: (4R,5aS,8aS)-3-hidroxi-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona. Una suspensión de (4R,5aS,8aS)-7-alil-3-(benciloxihexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona

5 (209 mg, 0.638 mmol) y Pd-C (10% Degussa tipo 101, agua al 50%, 41 mg, 0.019 mmol) en MeOH (6.4 mL) se desgasificó y se llenó nuevamente con H₂ (3x). Después de 5 horas de agitación vigorosa, la suspensión se purgó con N₂, se añadió más Pd-C (10% Degussa tipo 101, agua al 50%, 41 mg, 0.019 mmol) y se desgasificó y se llenó nuevamente con H₂ (3x). Después de 2 horas de agitación

10 vigorosa se purgó con N₂ luego se filtró a través de Celite y se concentró al vacío. Se añadió tolueno y se sonicó luego se concentró nuevamente. Rendimiento cuantitativo asumido. LCMS: R_t = 0.27 min; m/z = 240.3 (M+1) Método 2m₋ácido.

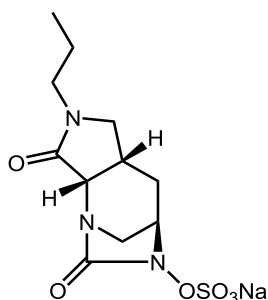


[00259] Paso 6: (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxo-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio. A una solución de (4R,5aS,8aS)-3-hidroxi-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona (0.638 mmol) en piridina (6.4 mL) se añadió SO₃•Py (508 mg, 3.19 mmol). Después de agitar durante 13 horas a temperatura ambiente la mezcla se filtro y se concentró al vacío. El sólido resultante se disolvió en

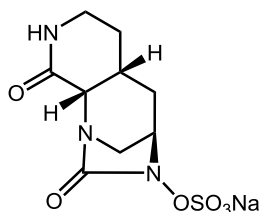
15 NaH₂PO₄ (1 M aq, 40 mL), después de lo cual se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (325 mg, 0.957 mmol). Después de agitar durante 1.5 horas se extrajo con DCM (4x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante

20

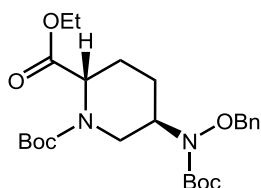
cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-15%) para proporcionar el compuesto del título (229 mg, 64%, 3-pasos) como un sólido blanco. LCMS: $R_t = 0.81$ min; $m/z = 436.3$ (M+1) Método 2m_acídico.



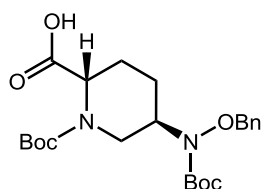
- 5 **[00260]** Paso 7: (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxo-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de sodio. La matriz DOWEX 50Wx8 de hidrógeno de forma 200-400 se acondicionó mediante agitación con NaOH (2 N) durante 2 horas. La resina se cargó sobre una columna de vidrio y se lavó con agua (hasta pH ≈ 6) seguido por agua:acetona (1:1). una solución de
- 10 (4R,5aS,8aS)-2,8-dioxo-7-propilhexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (228 mg, 0.408 mmol) en agua:acetona (1:1) se cargó y pasó a través de la columna, eluyendo con agua:acetona (1:1). La muestra se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) y se liofilizó, proporcionando el compuesto del título (120 mg, 85%) como un polvo blanco. LCMS: $R_t = 0.30$ min;
- 15 $m/z = 320.3$ (M+1) Método 2m_acídico. ^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 4.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.54 (dd, $J = 10.9, 6.3$ Hz, 1H), 3.32-3.17 (m, 3H), 3.10 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 2.69 (p, $J = 8.2$ Hz, 1H), 2.50-2.41 (m, 1H), 1.57-1.47 (m, 3H), 0.81 (t, $J = 7.4$, 3H).



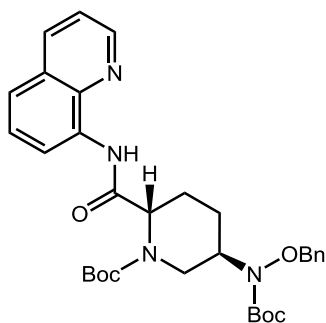
- 20 **Ejemplo 7.** Sulfato de hidrógeno(4R,5aR,9aS)-2,9-dioxooctahidro-1,4-metanopyrido[3,4-d][1,3]diazepin-3(2H)-ilo de sodio.



[00261] Paso 1: (2*S*,5*R*)-5-((benciloxi(*tert*-butoxicarbonil)amino)piperidina-1,2-dicarboxilato de 1-(*tert*-butil)-2-etilo. A una suspensión de oxalato de (2*S*,5*R*)-etil-5-((benciloxiamino)piperidina-2-carboxilato (13.25 g, 36.0 mmol) en EtOAc (200 mL) se añadió Na₂CO₃ (2.0 M, 80 mL, 160 mmol) y hidróxido de sodio (1.0 M, 40 mL, 40 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El precipitado formado se filtró y las dos capas del filtrado se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando un aceite viscoso (10.0 g). A una solución de este aceite (10.0 g, 35.9 mmol) en THF (100 mL) se añadió Boc-anhídrido (23.5 g, 108 mmol), trietilamina (15.0 mL, 108 mmol) y DMAP (4.38 g, 35.9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 horas y luego se calentó a 50 °C durante 2 días. El solvente se eliminó al vacío y se recogió en EtOAc/heptano (300 mL, 1/1), se lavó con agua (100 mL), HCl (0.1 N, 50 mL), salmuera (50 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 0-40%) para proporcionar el compuesto del título (9.6 g, 55%) como un aceite. LCMS: R_t = 1.19 min, m/z = 479.2 (M+1), Método 2m_acídico.

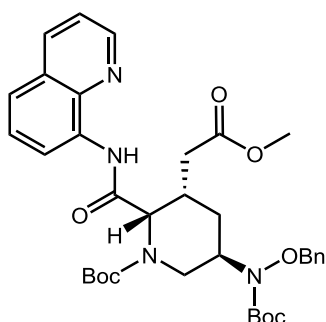


[00262] Paso 2: Ácido (2*S*,5*R*)-5-((benciloxi(*tert*-butoxicarbonil)amino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)piperidina-2-carboxílico. A una solución de (2*S*,5*R*)-5-((benciloxi(*tert*-butoxicarbonil)amino)piperidina-1,2-dicarboxilato de 1-(*tert*-butil)-2-etilo (9.60 mg, 20.06 mmol) en THF:MeOH (3:1, 80 mL) a 0 °C se añadió lentamente una solución de hidróxido de sodio (1 N, 40 mL). Después de 5 horas a temperatura ambiente, se añadió lentamente HCl (1 N, 41 mL) luego se extrajo con EtOAc (300 mL). La capa orgánica se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título (8.78 g, 97%) como un sólido blando. LCMS: R_t = 1.05 min, m/z = 451.2 (M+1) Método 2m_acídico.



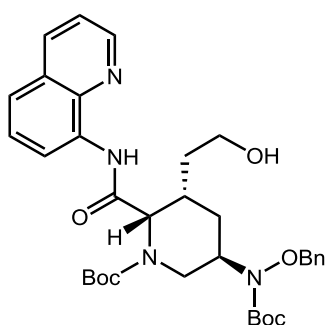
[00263] Paso 3: (2S,5R)-5-((benziloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de ácido (2S,5R)-5-((benziloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-1-(terc-butoxicarbonil)piperidina-2-

5 carboxílico (6.010 g, 13.34 mmol) en DCM (100 mL) a 0 °C se añadió quinolin-8-amina (2116 mg, 14.67 mmol) seguido por DIPEA (4.66 mL, 26.7 mmol) y HATU (6.087 g, 16.01 mmol). Después agitar bajo argón a temperatura ambiente durante 2.5 horas, la mezcla se vertió en agua (150 mL) y se extrajo con DCM (100 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo
10 crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 10-40%), proporcionando el compuesto del título (6.60 g, 86%) como un sólido blando. LCMS: R_t = 1.22 min, m/z = 577,3 (M+1), Método 2m_acídico.

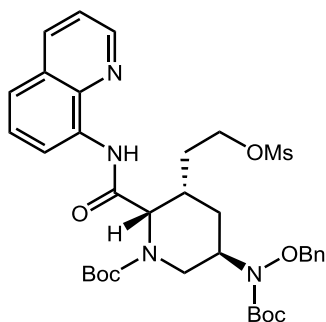


15 **[00264]** Paso 4: (2S,3S,5R)-5-((benziloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de (2S,5R)-5-((benziloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo (5.580 g, 9.68 mmol) en 2-metil-2-butanol (95 mL) se añadió hidrogenofosfato de dibencilo (538 mg, 1.94 mmol),
20 carbonato de plata (5.336 mg, 19.35 mmol), Pd(II)acetato (434 mg, 1.94 mmol) y 2-bromoacetato de metilo (2.83 mL, 29.0 mmol). La mezcla se purgó con argón, se selló y se calentó a 110 °C durante 20 horas. Se añadió adicional Pd(II) acetato (217 mg, 0.97 mmol) y 2-bromoacetato de metilo (1.88 mL, 19.36 mmol) y la mezcla de

reacción se agitó a 110 °C durante otras 20 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con DCM (100 mL), se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 0-35%) para proporcionar el compuesto del título (2.170 g, 35%) como un aceite viscoso. LCMS: R_t = 1.26 min, m/z = 649,3 (M+1), Método 2m_acídico.

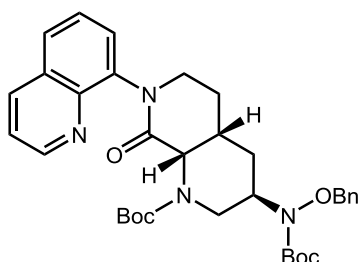


[00265] Paso 5: (2S,3S,5R)-5-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-hidroxi)etil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de (2S,3S,5R)-5-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo (2.40 g, 3.70 mmol) en THF (60 mL) a 0 °C se añadió super-hidruro (1.0 M en THF, 18.50 mL, 18.5 mmol). Después agitar a 0 °C durante 5 h, AcOH (50% aq, 10 mL) se añadió seguido por NH₄Cl saturado (30 mL) y EtOAc (150 mL). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 10-60%) para proporcionar el compuesto del título (680 mg, 30%). LCMS: R_t = 1.16 min, m/z = 621,1 (M+1), Método 2m_acídico.

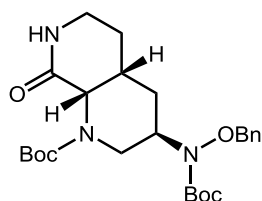


[00266] Paso 6: (2S,3S,5R)-5-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-((metilsulfonil)oxi)etil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de (2S,3S,5R)-5-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-hidroxi)etil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo (680 mg,

1.10 mmol) en diclorometano (20 mL) a 0 °C se añadió trietilamina (0.30 mL, 2.19 mmol) y cloruro de metilsulfonilo (0.17 mL, 2.19 mmol). Después de agitar durante 20 horas a temperatura ambiente la mezcla se diluyó con agua (20 mL) y EtOAc (100 mL) y se agitó durante 15 min adicionales, después de lo cual las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con NaH₂PO₄ (1.0 M, 2x40 mL), salmuera (30 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título (rendimiento cuantitativo) como un sólido blando. LCMS: R_t = 1.22 min, m/z = 699,4 (M+1), Método 2m_acídico.

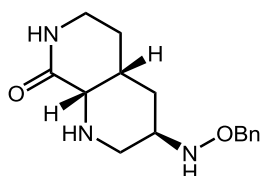


[00267] Paso 7: (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-8-oxo-7-(quinolin-8-il)octahidro-1,7-naftiridina-1(2H)-carboxilato de terc-Butilo. A una solución de (2S,3S,5R)-5-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-((metilsulfonil)oxi)etil)-2-(quinolin-8-ilcarbamoil)piperidina-1-carboxilato de terc-Butilo (690 mg, 0.99 mmol) en THF (16 mL) a 0 °C se añadió LDA (1.0 M en THF/hexano, 1.97 mL). Después agitar a 0 °C durante 2.5 horas, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se añadió una solución saturada de NH₄Cl saturada (20 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (80 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (20 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 30-80%) para proporcionar el compuesto del título (680 mg, 45%) como un sólido blando. LCMS: R_t = 1.03 min, m/z = 603,4 (M+1), Método 2m_acídico.

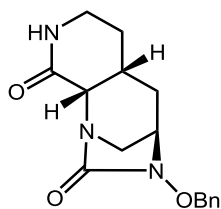


[00268] Paso 8: (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-8-oxooctahidro-1,7-naftiridina-1(2H)-carboxilato de terc-Butilo. una solución de (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxi(terc-butoxicarbonil)amino)-8-oxo-7-(quinolin-8-

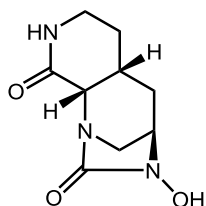
il)octahidro-1,7-naftiridina-1(2H)-carboxilato de *tert*-Butilo (270 mg, 0.448 mmol) en DCM seco (15 mL) a -78°C se burbujeó con O_3 hasta que persistió un color azul, después de lo cual se retiró la línea de burbujeo. Después de agitar a -78°C durante 45 min, el color azul desapareció y se volvió a burbujear con O_3 hasta que el color azul persistió. Después 15 min de agitación, el sistema se burbujeo con O_2 hasta que permaneció incoloro. A la solución se añadió sulfuro de dimetilo (100 μL , 1.36 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla se concentró al vacío. El residuo se volvió a disolver en THF (5 mL) y se añadió NH_4OH (25% aq, 5 mL). Después de agitar durante 16 horas, la mezcla se diluyó con EtOAc (50 mL) y la capa orgánica se lavó con agua (20 mL), salmuera (20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc-heptano, 70-100%) para proporcionar el compuesto del título (96 mg, 45%) como un sólido. LCMS: $R_t = 1.00$ min, $m/z = 476,2$ ($M+1$), Método 2m_acídico.



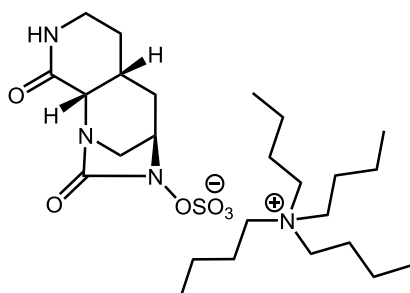
[00269] Paso 9: (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxiamino)octahidro-1,7-naftiridina-8(2H)-ona. A una solución de (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxi(*tert*-butoxicarbonil)amino)-8-oxooctahidro-1,7-naftiridina-1(2H)-carboxilato de *tert*-Butilo (120 mg, 0.252mmol) en DCM (3 mL) a 0°C se añadió lentamente TFA (1.5 mL). Después de 3 horas a 0°C luego a temperatura ambiente durante 1 hora, se concentró al vacío (temperatura baño $<30^{\circ}\text{C}$). El residuo se recogió en DCM:EtOH (5:1, 30 mL) y se añadió Na_2CO_3 (2 M, 10 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM:EtOH (5:1, 2x30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 10-25%) para proporcionar el compuesto del título (60 mg, 86%) como un sólido. LCMS: $R_t = 0.58$ min, $m/z = 276,1$ ($M+1$), Método 2m_acídico.



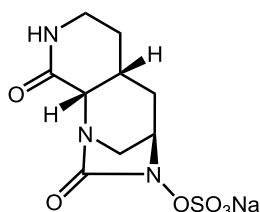
[00270] Paso 10: (4R,5aR,9aS)-3-(benciloxihexahidro-1,4-metanopyrido[3,4-d][1,3]diazepina-2,9(3H,6H)-diona. A una solución de (3R,4aR,8aS)-3-((benciloxiamino)octahidro-1,7-naftiridina-8(2H)-ona (56 mg, 0.20 mmol) en ACN (21 mL) a 0 °C bajo N₂ se añadió DIPEA (140 µL, 0.81 mmol). Una solución de trifosgeno (24 mg, 0.08 mmol) en ACN (3 mL) se añadió vía bomba de jeringa (0.1 mL/min). Después de agitar a 0 °C durante 6 horas se concentró parcialmente (~10 mL) al vacío, se diluyó con DCM (40 mL), se lavó con agua (20 mL), salmuera (20 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-5%) para proporcionar el compuesto del título (50 mg, 82%) como un sólido blancuzco. LCMS: R_t = 0.65 min, m/z = 302,0 (M+1), Método 2m_acídico.



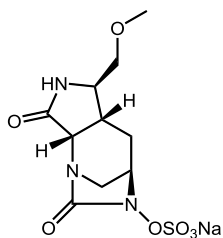
[00271] Paso 11: (4R,5aR,9aS)-3-hidroxihexahidro-1,4-metanopyrido[3,4-d][1,3]diazepina-2,9(3H,6H)-diona. Una suspensión de (4R,5aR,9aS)-3-(benciloxihexahidro-1,4-metanopyrido[3,4-d][1,3]diazepina-2,9(3H,6H)-diona (50 mg, 0.17 mmol) y Pd-C (10% Degussa tipo 101, agua al 50%, 27 mg) en MeOH:DCM (3:1, 4 mL) se evacuó y se llenó nuevamente con H₂. Después de 2 horas de agitación vigorosa, se filtró a través de un tapón de celite, se lavó con MeOH, y se concentró al vacío. LCMS: R_t = 0.20 min, m/z = 212.0 (M+1) Método 2m_acídico.



[00272] Paso 12: (4*R*,5*aR*,9*aS*)-2,9-dioxooctahidro-1,4-metanopyrido[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(2*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio. A una suspensión de (4*R*,5*aR*,9*aS*)-3-hidroxihexahidro-1,4-metanopyrido[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,9(3*H*,6*H*)-diona cruda (35 mg, 0.17 mmol) en piridina (3 mL) a 0 °C se añadió SO₃•Py (132 mg, 0.83 mmol). Después de agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 20 horas, la suspensión se filtró y el sólido se lavó con DCM frío (5 mL). el filtrado se concentró al vacío (temperatura baño < 30 °C) y el residuo crudo se disolvió en NaH₂PO₄ (1 M, 10 mL), después de lo cual se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (84 mg, 0.25 mmol) . Después de 30 minutos se extrajo con CHCl₃:IPA (4:1, 3x30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 5-20%) para proporcionar el compuesto del título como una espuma blanca. LCMS: R_t = 0.15 min, m/z = 292,0 (M+1), Método 2m_acídico.

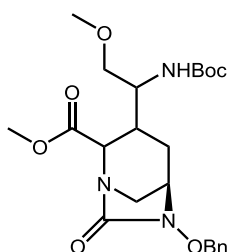


[00273] Paso 13: Sulfato de hidrógeno(4*R*,5*aR*,9*aS*)-2,9-dioxooctahidro-1,4-metanopyrido[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(2*H*)-ilo de sodio. La matriz DOWEX 50Wx8 de hidrógeno de forma 200-400 se acondicionó mediante agitación con NaOH (2 N) durante 2 horas. La resina se cargó sobre una columna de vidrio y se lavó con agua (hasta pH ≈ 6) seguido por agua:acetona (1:1). Se cargó (4*R*,5*aR*,9*aS*)-2,9-dioxooctahidro-1,4-metanopyrido[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(2*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (228 mg, 0.408 mmol) en acetona:agua (1:1) y se pasó a través de la columna, eluyendo con agua (20 mL) luego acetona:agua (1:4, 30 mL). La muestra se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (28 mg, 52%) como un sólido blanco. LCMS: R_t = 0.29 min, m/z = 291.8 (M+1) Método T3_3m_polar; ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 4.31(m, 1H), 4.09 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.55 (td, J = 12.8, 4.3 Hz, 1H), 3.26-3.34 (m, 2H), 2.87 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 2.55-2.64 (m, 1H), 2.21-2.30 (m, 1H), 1.99-2.09 (m, 1H), 1.80-1.88 (m, 1 H) 1.72-1.79 (m, 1H).



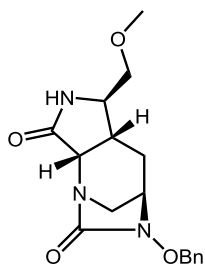
Ejemplo 8. Hidrogeno sulfato de (4R,5aS,6R,8aS)-6-(metoximetil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sodio.

[00274] Paso 1: (5R)-6-(benciloxi-3-(1-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metoxietil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo (mezcla de diastereómeros).



[00275] El Intermedio C (1.10 g, 3.82 mmol), Boc-L-Ser(OMe)-OH (1.04 g, 4.58 mmol) y Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆ (43 mg, 0.04 mmol) se disolvieron en DMF (16 mL). A la solución se añadió fosfato de potasio dibásico finamente triturado (0.62 g, 4.58 mmol) y la suspensión resultante se agitó y se irradió durante 12 días con una lámpara Kessil H150-Blue a una distancia de ≤2 cm. Después 3 y después 9 días Ir[df(CF₃)ppy₂(dtbpy)]PF₆ (43 mg, 0.04 mmol) se añadió (total de 3 mol% catalizador). A la mezcla de reacción se añadió agua (15 mL) seguido por NaHCO₃ saturado (aq, 15 mL), el cual luego se extrajo con TBME (3x60 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío, resultando el compuesto del título (1.85 g) como aceite amarillo que consiste en 4 diastereoisómeros (relación 39:16:11:34). LCMS: R_t = 1.02 min, 1.05 min, 1.08 min, 1.12 min all with m/z = 464 (M+1), LCMS_2 MIN_REACTION_MONITORING.

[00276] Paso 2: (4R,5aS,6R,8aS)-3-(benciloxi-6-(metoximetil)hexahidro-2H-1,4-metanopirrollo[3,4-d][1,3]diazepina-2,8(3H)-diona.



[00277] A una solución de (5*R*)-6-(benciloxi-3-(1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-metoxietil)-7-oxo-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo (1.85 g, 4.0 mmol) en DCM (60 mL) a 0 °C se añadió TFA (15.4 mL, 200 mmol), por goteo. La

5 mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h, luego se concentró al vacío. El residuo crudo se disolvió en DCM (60 mL) luego se añadió trietilamina (11.1 mL, 80 mmol) por goteo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual se concentró para proporcionar un aceite rojizo (6.8 g). Se añadió agua (20 mL) y la mezcla se extrajo

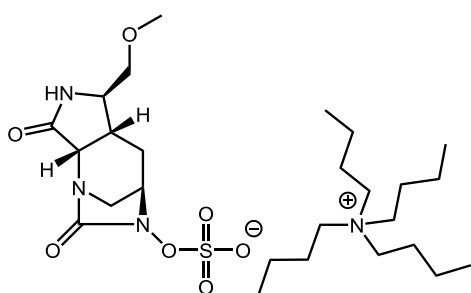
10 con TBME (3x80 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar un aceite amarillo (1.13 g). La fase acuosa se saturó con NaCl (s) y se extrajo adicionalmente con DCM (3x80 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío para proporcionar el producto crudo adicional (0.95 g). El producto crudo combinado se

15 purificó mediante cromatografía de HPLC (Sunfire-C18, 5µm, 50x250mm, agua/ACN +0.1% TFA, 100 ml/min, 18-38% durante 21min, total 35min) donde el pH de las fracciones se ajustó a 6.9 mediante adición de NaHCO₃ saturado (aq) y se liofilizó para proporcionar un residuo marrón claro (0.59 g). Este residuo se disolvió en ACN/agua y se purificó sobre un cartucho C18 (ACN-agua), después de lo cual el

20 material liofilizado proporcionó el compuesto del título (62 mg, 4.1% de 3-pasos). LCMS: R_t = 0.70 min, m/z = 332 (M+1), LCMS_2 MIN_REACTION_MONITORING.

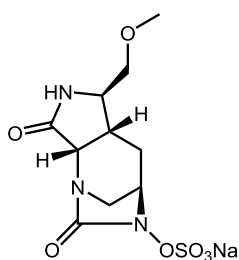
[00278] Paso 3: (4*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*)-3-hidroxi-6-(metoximetil)hexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona. (4*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*)-3-(benciloxi-6-(metoximetil)hexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona (59 mg, 0.178 mmol) se disolvió en MeOH:DCM (1:1, 1.78 mL). La mezcla se purgó con nitrógeno, se añadió Pd-C (10 % Degussa tipo, 101, agua al 50%, 37.9 mg, 0.018 mmol), luego se dejó bajo una atmósfera de H₂ durante 90 minutos. La mezcla se filtró a través de Celite, eluyendo con DCM:MeOH (1:1) y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título (49 mg, cuantitativo) como un sólido incoloro. LC/MS: R_t = 0.12 min; m/z = 242.0 (M+1) Método 2m_{acídico}.

10



[00279] Paso 4: (4*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*)-6-(metoximetil)-2,8-dioxohexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepin-3(4*H*)-ilo sulfato de tetrabutilamonio. A una solución de (4*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*)-3-hidroxi-6-(metoximetil)hexahidro-2*H*-1,4-metanopirrollo[3,4-*d*][1,3]diazepina-2,8(8*aH*)-diona (42 mg, 0.174 mmol) en piridina (1.85 mL) se añadió SO₃•piridina (139 mg, 0.870 mmol). La mezcla se agitó durante 18 h, luego se filtró a través de un filtro de membrana y se concentró al vacío (temperatura baño < 30°C). El residuo crudo se disolvió en NaH₂PO₄ saturado y se lavó con EtOAc. Las capas se separaron y a la fase acuosa se añadió sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio (89 mg, 0.261 mmol). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego se extrajo con DCM, se secó sobre sulfato de sodio, y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH-DCM, 0-30%) proporcionando el compuesto del título (57 mg, 58%) como una película incolora. LC/MS: R_t = 0.12min; m/z = 322.0 (M+1) Método 2m_{acídico}.

25



[00280] Paso 5: Hidrogeno sulfato de (4R,5aS,6R,8aS)-6-(metoximetil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sodio. La matriz DOWEX 50Wx8 de hidrógeno de forma 200-400 se agitó con NaOH (2 N) durante 3 horas luego se cargó en una columna y se lavó con agua hasta que el pH del eluyente fue ~ 6, seguido por el lavado con agua-acetona (1:1). Se disolvió (4R,5aS,6R,8aS)-6-(metoximetil)-2,8-dioxohexahidro-2H-1,4-metanopirrol[3,4-d][1,3]diazepin-3(4H)-ilo sulfato de tetrabutilamonio (57 mg, 0.101 mmol) en acetona-agua (1:1) y se pasó abajo de la columna, eluyendo con 1:1 acetona/agua. Las fracciones se concentraron al vacío y se liofilizó para proporcionar el producto deseado (27 mg, 70%) como un polvo incoloro. LC/MS: $R_t = 0.41$ min; $m/z = 321.9$ (M+1) Método T3_3m_polar; ^1H RMN (500MHz, D_2O) $\delta = 4.30$ (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.24 (br s, 1H), 3.60-3.56 (m, 1H), 3.56-3.45 (m, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.97 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 2.67 (q, $J=8.4$ Hz, 1H), 2.64-2.56 (m, 1H), 1.72 (dd, $J = 14.8, 8.4$ Hz, 1H).

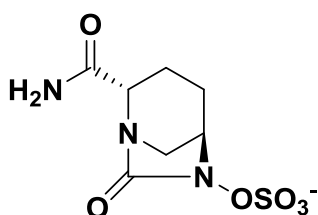
Pruebas de Susceptibilidad

[00281] Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) se determinaron por el método de microdilución en caldo de conformidad con las directrices de la Clínica y Laboratorios Institute (CLSI). En breve, los cultivos bacterianos frescos durante la noche se suspendieron en solución salina estéril, y se ajustan a un patrón de turbidez McFarland 0,5. Las suspensiones bacterianas a continuación se diluyeron en cationes ajustados Mueller-Hinton Broth (MHB II; BBL) para dar un inóculo final de unidades formadoras de colonias de aproximadamente 5×10^5 (UFC) / mL. Se preparó una placa maestra de antibióticos a una concentración equivalente a cien veces la concentración final deseada más alta en 100% de sulfóxido de dimetilo (DMSO). La placa maestro de antibiótico se diluyó mediante diluciones dobles en serie con una pipeta multicanal. La serie de dilución resultante de compuestos se diluyó 1:10 con agua estéril o una solución de inhibidor de beta-lactamasa preparada a una concentración equivalente a once veces la concentración final deseada en agua desionizada lo cual condujo a una concentración final de DMSO al 10%. Un volumen de 10 μ l de la serie de dilución de fármaco se transfirió a placas de ensayo de 96 pozos. Las placas de ensayo se inocularon con 90 μ l de suspensiones bacterianas y se incubaron a 35°C durante 20 horas. Las placas de ensayo se leyeron usando un lector de placa de microtitulación (Molecular Devices)

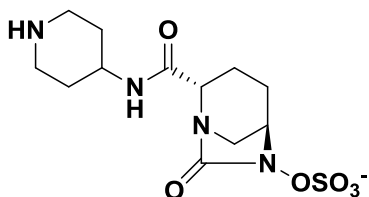
a 600 nm así como mediante observación visual con un espejo de lectura. La concentración más baja del compuesto que impidió el crecimiento visible se registró como la CIM. El rendimiento del ensayo fue supervisado para probar aztreonam contra las cepas de control de calidad de laboratorio de acuerdo con las pautas del CLSI.

[00282] Los siguientes inhibidores de beta-lactamasa y antibióticos beta-lactámicos se mencionan en las siguientes tablas:

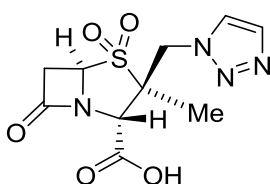
Inhibidor de beta-lactamasa 1: Avibactam



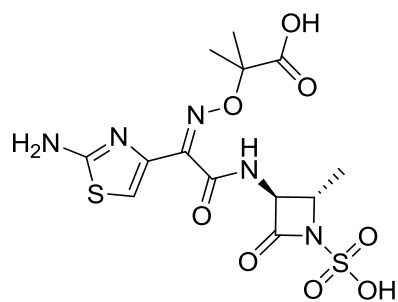
Inhibidor de beta-lactamasa 2: Relebactam



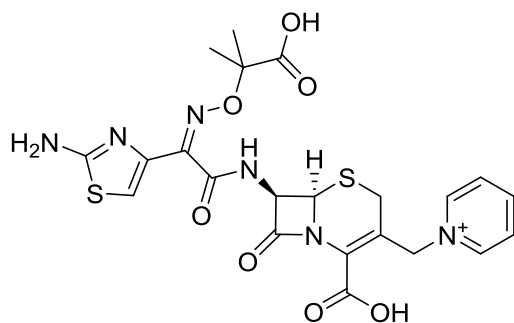
Inhibidor de beta-lactamasa 3: Tazobactam



Beta-Lactama 1: Aztreonam

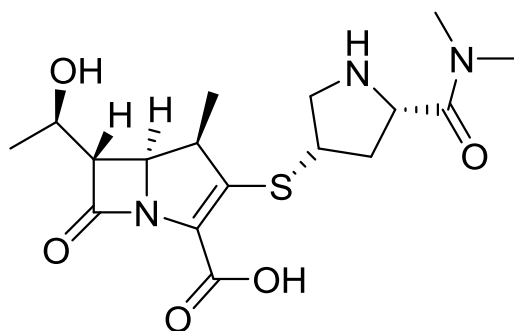


Beta-Lactama 2: Ceftazidima

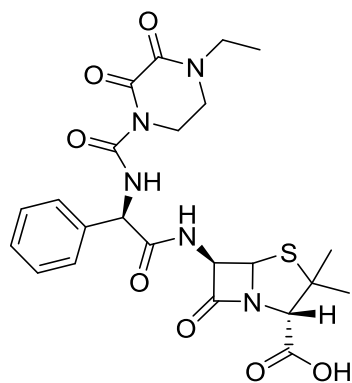


5

Beta-Lactama 3: Meropenem

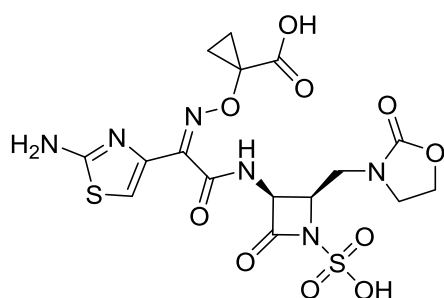


Beta-Lactama 4: Piperacilina



10

Beta-Lactama 5 (LYS228):



5 *Sinergia con Beta -lactamas a través de la inhibición de Beta -lactamasas*

[00283] La sinergia o potenciación de antibióticos *beta*- lactámicos mediante la inhibición de β -lactamasas se evaluó frente a un panel isogénico de cepas de *E. coli* , cada uno expresando una única beta-lactamasa, y frente a cepas clínicas.

[00284] Construcción de cepas isogénicas de *E. coli* NB27273-CDY0026 (precursoras), NB27273-CDY0033 (KPC-2), NB27273-CDY0030 (SHV-12), NB27273-CDY0034 (CTX-M-15) y NB27273-CDY0036 (AmpC).

[00285] La cepa NB27273 (BW25113 PSPB:: Kmr) se obtuvo de la colección de inserción del transposón Keio. La cepa tiene el gen PSPB reemplazado por un marcador de resistencia a la kanamicina (BW25113 PSPB :: Km^r). Esta cepa se curó del transposón en el PSPB a través de recombinasa FLP utilizando metodología publicada. La cepa resultante, BW25113 *pspB*, se utilizó como un hospedero para los vectores multicopia que expresan β -lactamasas clave. Los plásmidos de múltiples copias que dirigen la expresión constitutiva de β -lactamasas se establecieron como sigue: Genes sintéticos optimizados de codón que codifican *E. coli* KPC2 y SHV12 y CTX-M-15-lactamasas fueron hechos por DNA2.0 (Palo Alto, CA). Cada uno de los fragmentos sintéticos fueron diseñados para contener NotI y sitios de restricción NcoI en sus extremos, lo que permite la unión en un NotI / NcoI digerido pET28a (+) derivado de la expresión de proteínas. Los insertos en estos vectores sirven como moldes de ADN para la amplificación por PCR de los genes que codifican KPC2 y SHV12 y CTX-M-15 utilizando pares de cebadores:

E225 (tcgcCTCGAGgcgactgctgacgaatttgg) (SEQ ID NO: 1) y

E202 (aatcGAATTCTtactgaccattaacgccaagc) (SEQ ID NO: 2) y

E227 (tcgcCTCGAGgcgagcccgcaaccgctgga) (SEQ ID NO: 3) y

E204 (aatcGAATTCTtaacgctgccagtgtcaatc) (SEQ ID NO: 4) y

E226 (cgctCTCGAGagcggtcccgtgtacgcacaaacg) (SEQ ID NO:5)

y E203, (aatcGAATTCttacagaccgtcggtgacaatc) (SEQ ID NO:6), respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos de codón optimizadas y la información de reconocimiento del cebador se muestra a continuación:

5

KPC-2

ATGGGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGG
10 GCCCGCGACTGCGCTGA
CGAATTTGGTGGCCGAGCCGTTGCGCAAATTGGAGCAAGATTTTGGTGGTTCG
ATCGGTGTCTACGCGAT
GGACACCGGTAGCGGTGCCACCGTGAGCTACCGTGCCGAAGAGCGTTTTCCG
CTGTGTAGCTCTTTCAAG
15 GGTTTTCTGGCCGCAGCCGTGCTGGCACGCAGCCAACAGCAAGCGGGCCTGC
TGGACACCCCGATCCGTT
ACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGAGCCCGATTAGCGAAAAGTACCTGACC
ACCGGCATGACGGTGGC
GGAGTTGAGCGCTGCGGCGGTTTCAGTATTCCGATAACGCTGCGGCAAATCTGC
20 TGCTGAAAGAACTGGGC
GGTCCAGCGGGTCTGACGGCTTTCATGCGTTCTATTGGCGACACCACCTTTCG
CTTGGACCGCTGGGAGC
TGGAGCTGAACAGCGCGATTCCGGGCGACGCACGTGATACGAGCAGCCCGCG
TGCAGTGACCGAGAGCCT
25 GCAGAAGCTGACCCTGGGCAGCGCACTGGCCGCACCGCAGCGCCAACAGTTC
GTCGATTGGCTGAAGGGT
AACACCACCGGTAACCATCGTATTCGCGCAGCGGTCCCGGCTGATTGGGCAGT
TGGTGACAAGACTGGTA
CGTGCGGCGTTTATGGTACGGCGAATGACTACGCGGTTGTTTGGCCTACGGGT
30 CGTGCGCCGATCGTCCT
GGCGGTGTATACCGTGCTCCGAACAAAGACGATAAACACTCCGAAGCGGTCA
TCGCCGCAGCAGCGCGT
CTGGCCCTGGAAGGCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAACGCCGGCG (SEQ ID
NO:7)

35

E225 TCGCCTCGAGGCGACTGCGCTGACGAATTTGG (SEQ ID NO:8)

E202 AATCGAATTCTTACTGACCATTAAACGCCCAAGC (SEQ ID NO:9)

REV. COMP. E202 GCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAAGAATTCGATT (SEQ ID NO:10)

5

SUBRAYADO = DNA QUE CODIFICA BL

SHV-12

10 ATGGGGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGG
GCCCCGCGAGCCCGCAACCGCTGGAGCAGATCAAGCAGTCTGAGAGCCAGCTG
AGCGGCCGTGTGGGTATGATCGAGATGGATCTGGCTTCCGGCCGTACGCTGAC
GGCATGGCGTGCCGACGAACGTTTCCCGATGATGTCGACCTTTAAAGTTGTTCT
GTGTGGTGCGGTCTTGGCACGTGTAGACGCGGGTGACGAACAACCTGGAGCGC
15 AAGATCCATTACCGCCAACAGGACTTGGTCTGACTACAGCCCGGTTAGCGAAAA
GCACCTGGCGGATGGCATGACCGTGGGTGAATTGTGCGCCGCTGCGATTACCA
TGAGCGACAATAGCGCGGCTAATCTGCTGTTGGCGACCGTTGGTGGCCCAGCG
GGCTTGACCGCATTTCTGCGTCAAATCGGCGATAATGTTACGCGTCTGGATCGC
TGGGAAACGGAGCTGAACGAGGCACTGCCGGGTGATGCCCCGTGATACCACGA
20 CTCCTGCTAGCATGGCAGCGACCCTGCGTAAACTGCTGACCAGCCAGCGTCTG
AGCGCACGTAGCCAACGCCAGCTGCTGCAATGGATGGTGGATGACCGCGTGG
CGGGTCCGCTGATCCGCTCCGTCCTGCCAGCAGGCTGGTTCATTGCGGACAAA
ACTGGTGCCCTCTAAGCGTGGTGCGCGTGGTATCGTCGCGCTGCTGGGTCCGAA
CAACAAAGCCGAACGTATTGTGGTTATCTATCTGCGCGACACCCCGGCAAGCA
25 TGGCCGAGCGCAACCAGCAAATTGCGGGCATTGGTGCGGCACTGATTGAGCA
CTGGCAGCGTTAACGCCGGCG (SEQ ID NO:11)

E227 TCGCCTCGAGGCGAGCCCGCAACCGCTGGA (SEQ ID NO:12)

E204 AATCGAATTCTTAACGCTGCCAGTGCTCAATC (SEQ ID NO:13)

30 REV. COMP. E204 GATTGAGCACTGGCAGCGTTAAGAATTCGATT (SEQ ID NO:14)

35

CTX-M-15

ATGGGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGG
GCCCAGCGTCCCGCTGTACGCACAAACGGCCGACGTGCAACAGAACTGGCG
GAGTTGGAACGTCAGAGCGGTGGCCGTTTGGGTGTAGCCCTGATCAATACCGC
5 GGACAATAGCCAAATTCTGTATCGTGCGGACGAACGCTTCGCGATGTGCAGCA
CGAGCAAGGTGATGGCCGCTGCGGCCGTTCTGAAGAAATCCGAGAGCGAGCC
GAACTTGCTGAATCAGCGCGTTGAGATCAAGAAGTCGGATCTGGTGAACATAA
CCCTATCGCGGAAAAACATGTCAACGGCACCATGTCCCTGGCAGAGCTGAGCG
CGGCTGCGTTGCAGTACTCTGATAACGTCGCAATGAATAAACTGATCGCACACG
10 TCGGTGGCCCAGCAAGCGTGACCGCCTTTGCGCGTCAACTGGGCGATGAACT
TTTCGTCTGGATCGTACCGAACCGACCCTGAATACGGCAATTCCGGGTGATCC
GCGCGACACGACGAGCCCGCGTGCAATGGCACAGACCCTGCGCAACCTGACC
CTGGGTAAAGCGCTGGGCGATAGCCAACGTGCGCAGCTGGTTACGTGGATGA
AGGGTAACACCACCGGTGCGGCCAGCATTCAAGCGGGCCTGCCGGCCAGCTG
15 GGTTGTTGGTGATAAACTGGCTCCGGTGGTTATGGTACCACGAATGACATCGC
GGTTATTTGGCCGAAGGACCGTGCGCCGTTGATCCTGGTGACCTACTTCACCC
AGCCGCAGCCGAAAGCTGAGTCTCGCCGTGACGTGCTGGCGAGCGCAGCTAA
GATTGTCACCGACGGTCTGTAAACGCCGGCG

20 E226 cgctCTCGAGagcggtcccgtgtacgcacaaacg (SEQ ID NO:15)

E203, aatcGAATTCTtacagaccgtcggtgacaatc (SEQ ID NO:16)

[00286] El gen que codifica AmpC se amplificó por PCR a partir del genoma de la cepa P. aeruginosa PAO1 (NB52019) (GenBank ID U5R279) utilizando el par de
25 cebadores E252 (gccCTCGAGggcgaggccccggcgatcgc) (SEQ ID NO: 17) y E253 (tgaGAATTCTcagcgcttcagcgggcacct) (SEQ ID NO: 18).

[00287] Los productos de PCR fueron digeridos con XhoI y EcoRI y se ligaron en el plásmido digerido de manera similar pAH63-pstS (BLAP). El plásmido pAH63-
30 pstS (BLAP) es un derivado del plásmido pAH63 (J Bacteriol: 183 (21): 6.384 a 6.393) hecho por clonación del promotor TEM-1 (bla) y la región de codificación del péptido señal a partir del plásmido pBAD (J Bacteriol. 1995 Jul 177 (14): 4121-30) En el plásmido pAH63. Este fragmento fue amplificado de PCR pBAD utilizando el par de cebadores E192 (ttcaCTGCAGtgaacgttgccaagcaacggC)(SEQ ID NO: 19)y

E194 (TCGAggatcctcgagagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg)(SEQ ID NO: 20), se digirió con PstI y BamHI y se insertó en el plásmido digerido de forma similar pAH63. Por lo tanto, la expresión de los constructos de β -lactamasas basados de pAH63-pstS (BLAP) es constitutiva y la secuencia de señal se proporciona para dirigir estas proteínas al periplasma. Los vectores basados en el plásmido pAH63 se utilizan para la inserción en el genoma en una sola copia, sin embargo, para proporcionar mayores niveles de expresión y permitir la detección más sensible de la susceptibilidad de los compuestos a las β -lactamasas, los insertos de expresión contenidos en estos vectores se trasladaron al vector multicopia replicativo pBAD-Kan (J Bacteriol 1995 Jul 177 (14):... 4121-30). Para lograr esto, los insertos que abarcan los genes de las β -lactamasas, con los promotores TEM asociados y las secuencias señal, se amplificaron por PCR a partir de sus correspondientes vectores usando el cebador E268 (ccgTCTAGAcggatggccttttgcgttc) (SEQ ID NO:21) y E202 (aatcGAATTCttactgaccattaacgcccaagc) (SEQ ID NO:22) para el constructo KPC2, E204 (aatcGAATTCttaacgctgccagtgtcaatc) (SEQ ID NO:23) para el constructo SHV-12 y E203 (aatcGAATTCttacagaccgtcggtgacaatc) (SEQ ID NO:24) para el constructo CTX-M-15. Estos fragmentos fueron digeridos con XbaI y EcoRI, y cada uno se insertó en pBAD18-kan que había sido digerido con las mismas enzimas para generar vectores multicopia que expresan KPC2 y SHV12 y CTX-M-15, respectivamente. Estos vectores se transformaron en BW25113 PSPB para generar cepas NB27273-CDY0033 (que expresa KPC2) y NB27273-CDY0030 (que expresa SHV12), NB27273-CDY0034 (que expresa CTX-M-15) y NB27273-CDY0036 (que expresa AmpC). El vector pBAD18-kan también contiene la secuencia de región promotora y la señal de TEM, (pero carece de genes β -lactamasa intactos) y se transformó en BW25113 PSPB utilizando protocolos estándar para generar la cepa de control NB27273-CDY0026. La expresión de las β -lactamasas se confirmó mediante la verificación de la disminución de la susceptibilidad a los antibióticos ejemplo de prueba que son sustratos de KPC2, SHV12, CTX-M15 o AmpC.

[00288] Construcción de cepas isogénicas de *E. coli*, NB27273-CDY0105 (OXA-18) y NB27273-CDY0048 (TEM-10). El vector plasmídico para la expresión de OXA-18, se construyó como sigue: Los genes que codifican GIM-1 (GenBank ID

Q704V1) y (OXA-18 (GenBank ID O07293) fueron sintetizados por Life Technologies con secuencias de flaqueo 5'-tgccttcctgttttgctctcgag y gaattcgctagcccaaaaaaacgg-3 '(SEQ ID NO: 25). El fragmento que codifica GIM-1 se digirió con XhoI y EcoRI y se insertó en el constructo de expresión de KPC-2 descrito anteriormente, del que se eliminó el gen que codifica KPC-2 por digestión con XhoI y EcoRI. La secuenciación de nucleótidos confirmatoria reveló un sitio XhoI en el esqueleto del vector que después se eliminó por mutagénesis dirigida a sitio utilizando el par de cebadores E396 (cgtcttgctccaggccgcgattaaattcc) (SEQ ID NO: 26) y E397 (tcgcggcctggagcaagacgtttc) (SEQ ID NO: 27). El gen que codifica OXA-18 se digirió luego con XhoI y EcoRI y se insertó en este vector, del cual se había eliminado el gen para GIM-1 con XhoI y EcoRI.

[00289] Para generar un vector que expresa TEM-10, se utilizó plásmido pBAD18 (J Bacteriol. 1995 Jul. 177 (14): 4121 - 30), que contiene el gen que codifica TEM - 1, como molde para la mutagénesis dirigida a sitios basada en PCR para convertir el gen que codifica TEM - 1 en uno que codifica TEM - 10. A partir de este molde de ADN, se generaron tres fragmentos mediante PCR utilizando los siguientes pares de cebadores;

B124 (tcacgtagcgaatagcggag) (SEQ ID NO: 28) y E387 (tggagccggttaagcgtgggtctcgcggt) (SEQ ID NO: 28) para generar el fragmento A que codifica una sustitución de E237K

E389 (cgcgagacccacgcttaccggctccaga) (SEQ ID NO: 29) y E391 (ctcgccttgatagttggaaccgga) (SEQ ID NO: 30) para generar el fragmento B que codifica las sustituciones E237K y R162S

E393 (cggttcccaactatcaaggcgagt) (SEQ ID NO: 31) y E289 (gacattgccgtcactgcgtct) (SEQ ID NO: 32) para generar el fragmento C, que también introduce una sustitución de R162.

[00290] Los fragmentos A, B y C se utilizaron luego como molde para generar un gen completo que codifica TEM-10 como sigue:

Los fragmentos A y B se utilizaron como molde para PCR que utiliza cebadores B124 (tcacgtagcgtatagcggag) (SEQ ID NO: 33) y E390 (gtaactcgccttgatagttgggaaccggagctgaatgaagc) (SEQ ID NO: 34) para combinar fragmentos A y B en el fragmento D

5

Los fragmentos B y C se usaron como molde para la PCR utilizando cebadores E290 (gcgggaccaaagccatgaca) y E388 (accgcgagacccacgcttaccggctccagattatcagcaataaacc) (SEQ ID NO: 36) para combinar fragmentos B y C en el fragmento E

10

[00291] Finalmente, los fragmentos D y E se utilizaron como molde para la PCR usando los cebadores E395 (gtaa GAATTC ttaccaatgcttaatcagtgaggc) (SEQ ID NO: 37) E268 (ccg TCTAGA cggatggccttttgcgttc) (SEQ ID NO: 38) para combinar los fragmentos D y E en el producto de codificación de TEM-10 intacto. Este fragmento se digirió luego con XbaI y EcoRI y se insertó en pBAD-kan que también se cortó con las mismas enzimas.

15

[00292] Estos vectores finales para la expresión de OXA-18 y TEM-10 se transformaron en BW25113 *pspB* para generar cepas NB27273-CDY0105 (que expresan OXA-18) y NB27273-CDY0048 (que expresan TEM-10). Se confirmó la expresión de Beta-lactamasa verificando una susceptibilidad disminuida a antibióticos de prueba de ejemplo que son sustratos conocidos de OXA-18 o TEM-10.

20

Tabla A: Concentraciones Inhibidoras Mínimas (MIC), en µg/ mL de BLIs seleccionadas

25

BLI	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Avibactam	16	32	>64
Relebactam	>64	>64	>64
Ejemplo 1	>64	>64	>64
Ejemplo 2	>64	>64	>64
Ejemplo 3	>64	>64	>64
Ejemplo 4	>64	>64	>64

Ejemplo 5	>64	>64	>64
Ejemplo 6	>64	>64	>64
Ejemplo 7	>64	>64	>64
Ejemplo 8	>64	>64	>64

[00293] La Tabla 1 anterior demuestra que aunque algunos inhibidores de beta-lactamasa tales como avibactam exhiben actividad antibacteriana directa, los compuestos de la Fórmula (A) muestran poca actividad directa.

- 5 **[00294]** Los siguientes datos demuestran el efecto potenciador o la actividad sinérgica de los compuestos de la invención, como se ilustra por el compuesto del Ejemplo 1, cuando se usan en combinación con diversos antibióticos beta - lactámicos. Dado que el compuesto del Ejemplo 1 no exhibe mucha actividad antibiótica directa (véase la Tabla 1), la sinergia o potenciación se define aquí como
- 10 una reducción de cuatro veces o más en la CIM del antibiótico beta-lactámico causada por la presencia del compuesto de la fórmula (A), en comparación con el antibiótico beta-lactámico solo. Preferiblemente, las combinaciones de la invención presentan al menos una reducción de 8 veces en la CIM cuando se compara con el antibiótico beta-lactámico solo.

15

Potenciación de la actividad (CIM en µg/mL) de aztreonam por inhibidores de beta-lactamasa en cepas isogénicas de E. coli que expresan beta-lactamasas individuales.

AZTREONAM (AZ)	<i>E. coli</i> (KPC-2)	<i>E. coli</i> (TEM-10)	<i>E. coli</i> (SHV-12)	<i>E. coli</i> (CTX-M-15)	<i>E. coli</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (OXA-18)
AZ solo	64	64	>64	64	4	>64
AZ + Ex. 1 (2 µg/mL)	0.125	0.125	0.25	0,06	0.125	1
AZ + Avibactam (2 µg/mL)	0.125	0.25	1	0.125	0,06	1
AZ+Relebactam (2 µg/mL)	1	2	32	0.5	0.125	>64

5

Potenciación de la actividad (CIM en µg/mL) de ceftazidima por inhibidores de beta-lactamasa en cepas isogénicas de E. coli que expresan beta-lactamasas individuales.

CEFTAZIDIME (Ceft)	<i>E. coli</i> (KPC-2)	<i>E. coli</i> (TEM-10)	<i>E. coli</i> (SHV-12)	<i>E. coli</i> (CTX-M-15)	<i>E. coli</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (OXA-18)
Ceftazidime solo	4	>64	>64	16	4	>64
Ceft + Ex. 1 (2 µg/mL)	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
Ceft + Avibactam (2 µg/mL)	0.25	1	0.5	0.25	0.125	0.5
Ceft + Relebactam (2 µg/mL)	0.25	8	8	0.5	0.125	>64

10

Potenciación de la actividad (CIM en µg/mL) de meropenem por inhibidores de beta-lactamasa en cepas isogénicas de E. coli que expresan beta-lactamasas individuales.

MEROPENEM (Mero)	<i>E. coli</i> (KPC-2)	<i>E. coli</i> (TEM-10)	<i>E. coli</i> (SHV-12)	<i>E. coli</i> (CTX-M-15)	<i>E. coli</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (OXA-18)
Mero solo	1	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06
Mero + Ex. 1 (2 µg/mL)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06

Mero + Avibactam (2 µg/mL)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06
Mero + Relebactam (2 µg/mL)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06

5 *Potenciación de la actividad (CIM en µg/mL) de piperacilina por inhibidores de beta-lactamasa en cepas isogénicas de E. coli que expresan beta-lactamasas individuales.*

Piperacilina (Pip)	<i>E. coli</i> (KPC-2)	<i>E. coli</i> (TEM-10)	<i>E. coli</i> (SHV-12)	<i>E. coli</i> (CTX-M-15)	<i>E. coli</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (OXA-18)
Pip solo	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Pip + Tazobactam (4 µg/mL)	>32	4	32	4	8	8
Pip + Avibactam (2 µg/mL)	4	2	4	4	4	2
Pip + Relebactam (2 µg/mL)	4	>32	>32	16	4	>32
Pip + Ex. 1 (2 µg/mL)	4	2	2	2	8	2
Pip + Ex. 2 (2 µg/mL)	2	4	4	4	8	4
Pip + Ex. 3 (2 µg/mL)	2	4	2	4	8	4
Pip + Ex. 4 (4 µg/mL)	2	4	4	2	4	ND
Pip + Ex. 5 (4 µg/mL)	1	2	2	2	16	ND
Pip + Ex. 6 (4 µg/mL)	2	4	4	4	4	ND
Pip + Ex. 7 (2 µg/mL)	2	2	4	4	8	8
Pip + Ex. 8 (4 µg/mL)	4	4	4	2	4	ND

10 *Potenciación de la actividad (µg/mL) de Beta-Lactama 5 por inhibidores de beta-lactamasa en cepas isogénicas de E. coli que expresan beta-lactamasas individuales.*

Beta-Lactama 5 (5)	<i>E. coli</i> (KPC-2)	<i>E. coli</i> (TEM-10)	<i>E. coli</i> (SHV-12)	<i>E. coli</i> (CTX-M-15)	<i>E. coli</i> (AmpC)	<i>E. coli</i> (OXA-18)
Beta-Lactama 5 sola	0.25	2	0.5	0.125	0.25	0.5
5 + Ex. 1 (2 µg/mL)	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25
5 + Avibactam (2 µg/mL)	0.125	0.125	0.125	0.25	0.125	0.125
5 + Relebactam (2 µg/mL)	0.125	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25

15 *Potenciación de la actividad (µg/mL) de aztreonam por inhibidores de beta-lactamasa en aislamientos clínicos resistentes a beta-lactama.*

AZTREONAM	<i>K. pneumoniae</i> NB29323 (CTX-M-15, OXA-48, VEB-1)	<i>Enterobacter cloacae</i> NB25044 (CTX-M-12, ACT, KPC-2)
Aztreonam Solo	>64	>64

AZ +Ex. 1 (2 µg/mL)	0.25	4
AZ + Avibactam (2 µg/mL)	2	8
AZ + Relebactam (2 µg/mL)	8	>64

Potenciación de la actividad (µg/mL) de piperacilina por los inhibidores de beta-lactamasa en aislamientos clínicos resistentes a beta-lactama.

PIPERACILINA	<i>K. pneumoniae</i> NB29082 (KPC-2)	<i>Enterobacter cloacae</i> NB25055 (CMY-2)	<i>S. aureus</i> NB01437(BLA +)
Piperacilina	>64	>64	64
Pip + Tazobactam (4 µg/mL)	>64	64	1
Pip + Ex. 1 (2 µg/mL)	8	4	1

5

[00295] Estos datos demuestran que la potenciación por los compuestos de la invención es similar o superior a la de algunos inhibidores de beta-lactamasa utilizados en la clínica cuando se usan en combinación con antibióticos beta-lactámicos comerciales para tratar infecciones causadas por bacterias que son resistentes a algunos antibióticos beta-lactámicos conocidos.

10

[00296] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las modalidades y métodos específicos descritos en este documento. Tales equivalentes tienen el propósito de ser incluidos por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

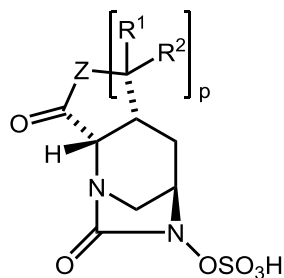
15

INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASA

REIVINDICACIONES

5

1. Un compuesto de la Fórmula (A):



en donde p es 1 o 2;

10 R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';

Z es NR^3 o $N-OR^3$;

15 R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy, halo, CN, -OR, y -NRR';

Cy es un anillo de cicloalquilo C_3-C_6 o anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy está opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C_1-C_2 , CN, -OR, y -NRR'; y

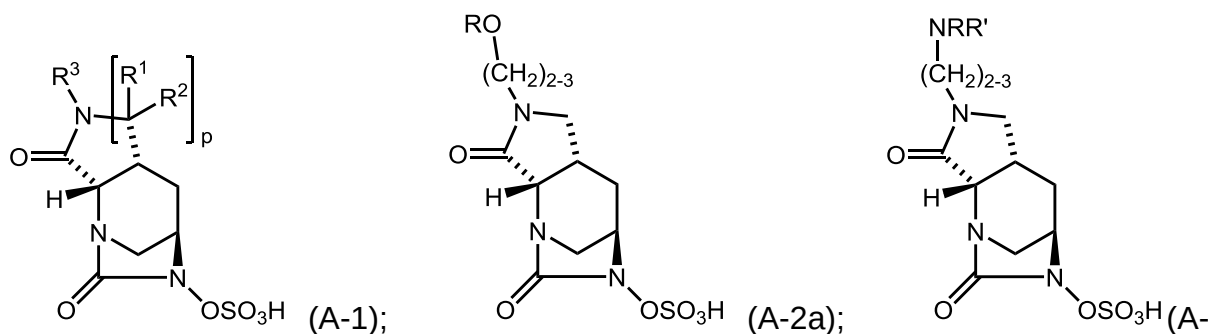
20 R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, -OH, -CN, -O-(alquilo C_1-C_4), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C_1-C_4), y -N(alquilo C_1-C_4)₂,

o R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, pirrolidina, y azetidina,

25 en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C_1-C_2 , -OH, -CN, -O-(alquilo C_1-C_4), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C_1-C_4), y -N(alquilo C_1-C_4)₂;

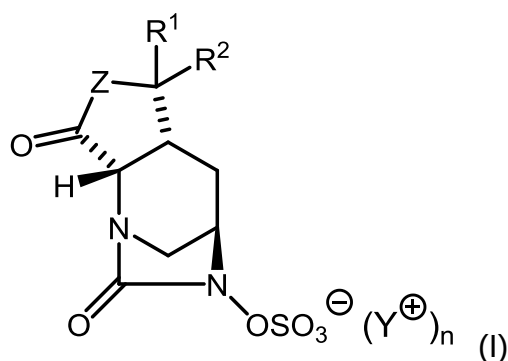
o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que es un compuesto de una de las siguientes fórmulas:



5 o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

3. Un compuesto de la reivindicación 1, el cual es un compuesto de la Fórmula (I):



10 en donde:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';

Z es NR^3 o $N-OR^3$;

15 R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy, halo, CN, -OR, y -NRR';

20 Cy es un anillo de cicloalquilo C_3 - C_6 o anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy es opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C_1 - C_2 , CN, -OR, y -NRR'; y

R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂,

o R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, pirrolidina, y azetidina, en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂;

Y es un grupo catiónico;

n es 0 o 1; y

cuando n es 0, el compuesto de la Fórmula I está en una forma zwitteriónica.

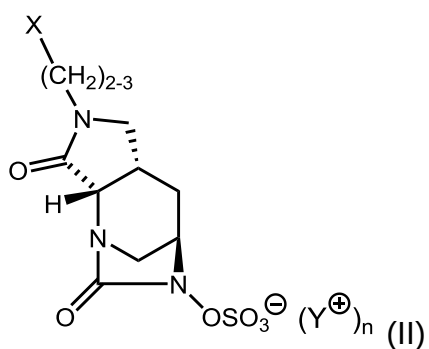
4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que Z es NR³, y R³ es H o alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR', o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde R³ es alquilo C₁-C₂ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR', o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde R³ es H, o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

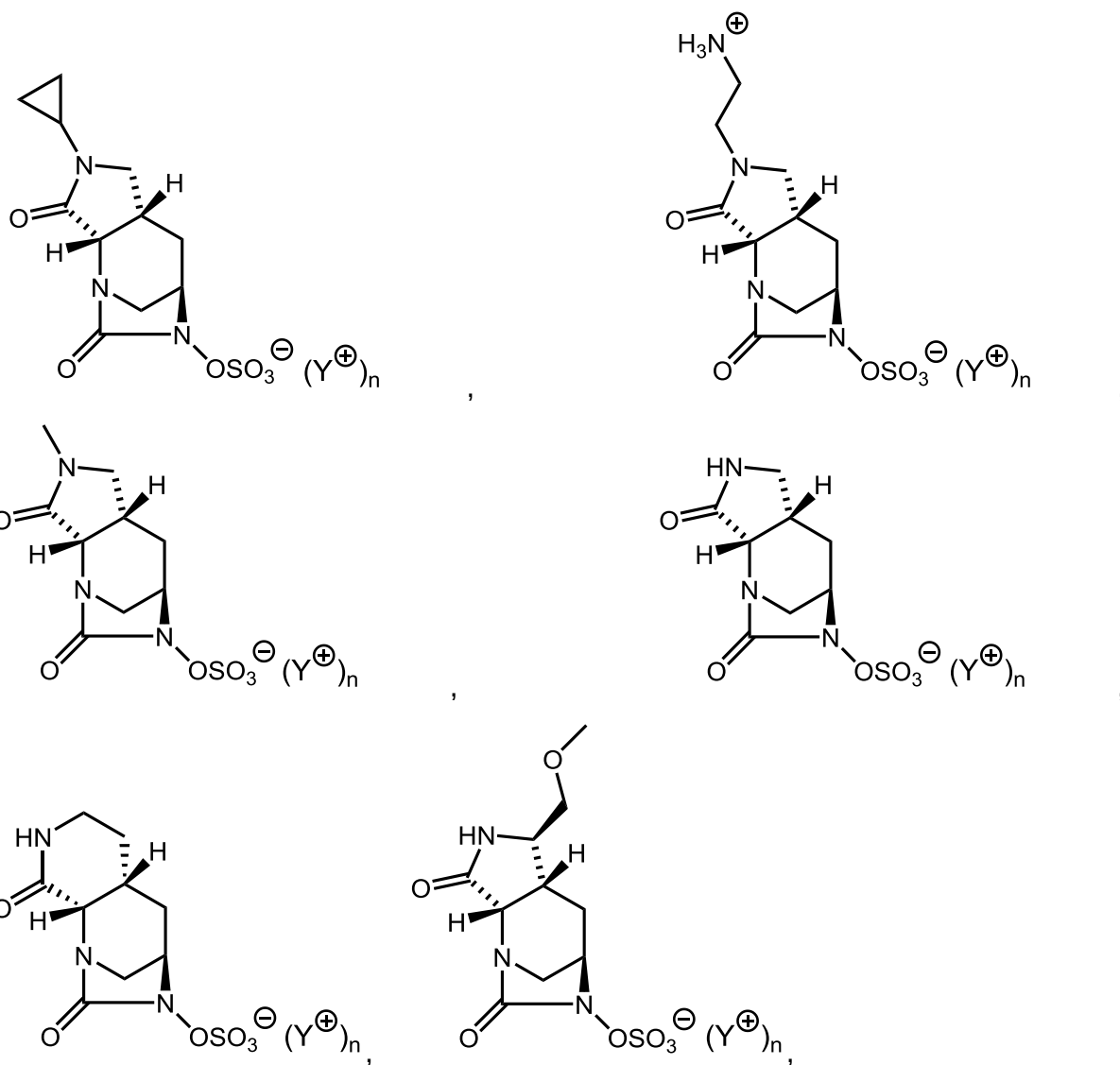
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde R¹ y R² son ambos H, o una sal o forma zwitteriónica del mismo.

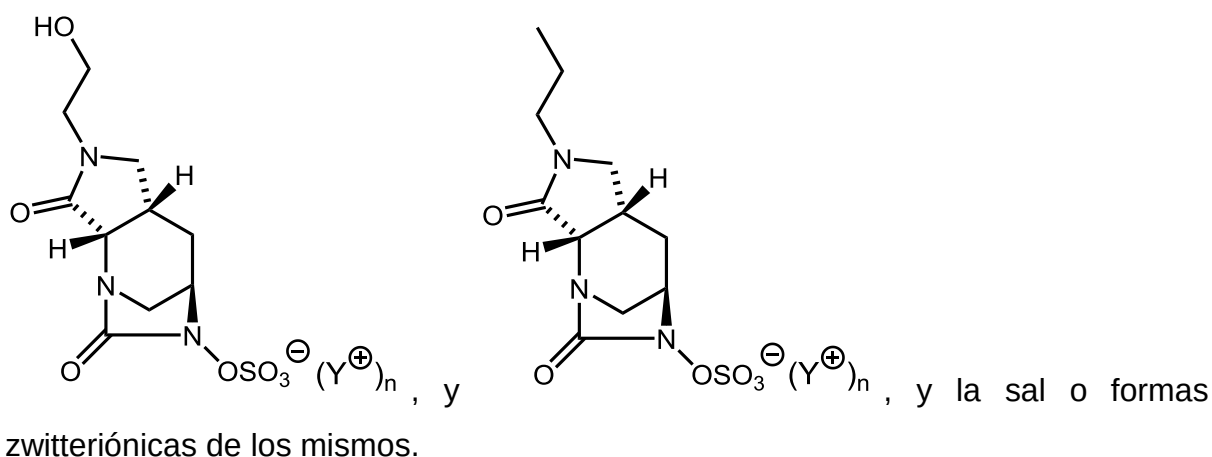
8. El compuesto de la reivindicación 1 ó 3, que tiene la estructura:



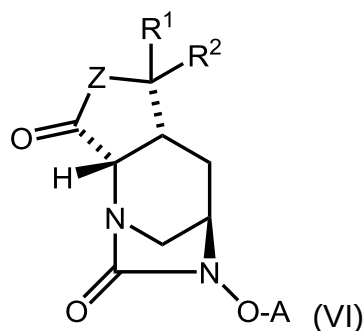
en donde X es -OR o -NRR';
como una sal o forma zwitteriónica del mismo.

5 9. El compuesto de la reivindicación 1 o 3 que se selecciona a partir de:





10. El compuesto de una de las reivindicaciones 1-3, en donde n es 1 y Y se selecciona entre sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc y cobre.
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde Y es sodio.
12. El compuesto de cualquiera de las anteriores 1-3, que está en una sal farmacéuticamente aceptable o forma zwitteriónica.
13. Un compuesto de la Fórmula (VI):



en donde:

- 15 R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de halo, CN, -OR, oxo, y -NRR';
- Z es NR^3 o $N-OR^3$;
- R^3 se selecciona independientemente en cada ocurrencia a partir de H, Cy, y alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituidos por hasta tres grupos seleccionados a partir de Cy, halo, CN, -OR, y -NRR';

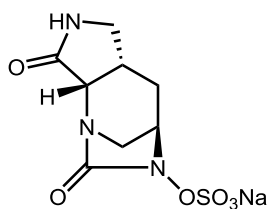
Cy es un anillo de cicloalquilo C₃-C₆ o un anillo heterocíclico de 4-6 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S como miembros de anillo, y Cy es opcionalmente sustituido por hasta tres grupos seleccionados a partir de oxo, halo, alquilo C₁-C₂, CN, -OR, y -NRR'; y

5 R y R' se seleccionan independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂,

10 o R y R' tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un anillo seleccionado a partir de piperidina, morfolina, pirrolidina, y azetidina, en donde el anillo es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₂, -OH, -CN, -O-(alquilo C₁-C₄), oxo, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₄), y -N(alquilo C₁-C₄)₂;

15 A es H o -CH₂-Ph, donde Ph representa fenilo opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados a partir de halo, alquilo C₁-C₄, alcoxilo C₁-C₄; o una sal del mismo.

14. El compuesto de la fórmula (VII):



20 15. El compuesto de la reivindicación 14 en forma cristalina.

16. El compuesto de la reivindicación 13, que exhibe una endoterma en calorimetría diferencial de barrido entre 283 °C y 350 °C.

25 17. El compuesto de la reivindicación 15, caracterizado por picos XRPD en ángulos de difracción (2Theta) de 8.3 y 16.6 grados.

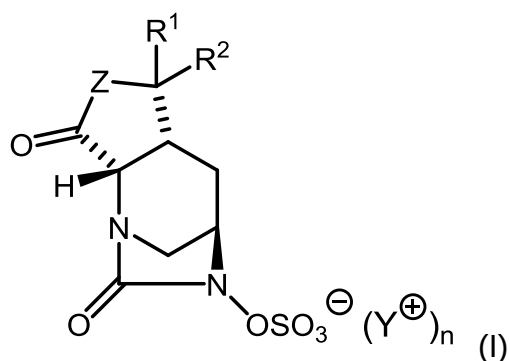
18. El compuesto de la reivindicación 17, caracterizado adicionalmente por uno o más picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 25.1 o 31.3
30 grados.

19. El compuesto de la reivindicación 18, caracterizado adicionalmente por uno o más picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 27.4 o 28.7 grados.

5

20. El compuesto de la reivindicación 19, caracterizado además por picos XRPD adicionales en ángulos de difracción (2Theta) de 19.5 grados y 21.7 grados.

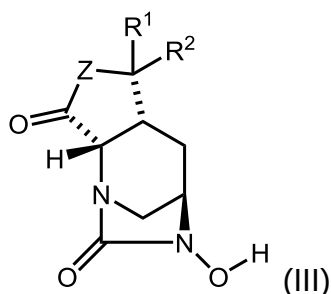
21. Un proceso para hacer un compuesto de la Fórmula (I),



10

De acuerdo con la reivindicación 3;

en donde el proceso comprende poner en contacto un compuesto de la Fórmula (III)

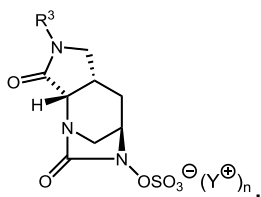


en donde Z, R¹ y R² y R³ son como se definen en la reivindicación 3,

15 con un agente sulfonilante en presencia de una base.

22. El proceso de la reivindicación 21, en donde Z es NR³, y R³ es H o alquilo C₁-C₂ opcionalmente sustituido por -OR o -NRR'.

20 23. El proceso de la reivindicación 21 o 22, en donde el compuesto de la Fórmula (I) es de la fórmula



24. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23, en donde R³ es H.
- 5 25. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
26. Un método para tratar una infección bacteriana gram-negativa, que
10 comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y un antibiótico beta-lactámico.
27. El método de la reivindicación 26, en el que la infección bacteriana es causada por una especie de bacteria de *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*,
15 *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Moraxella*, *Providencia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus* o *Stenotrophomonas*.
- 20 28. El método de la reivindicación 26 o 27, en donde la infección bacteriana es neumonía nosocomial, una infección intraabdominal, o una infección del tracto urinario causada por una especie de *Enterobacteriaceae Pseudomonas*.
29. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para utilizar
25 en terapia.
30. El compuesto de la reivindicación 29, en el que el uso en terapia es el tratamiento de una infección bacteriana.
- 30 31. El compuesto de la reivindicación 29, en el que la terapia es el tratamiento de una infección bacteriana Gram-negativa causada por una especie de *Citrobacter*,

Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Morganella, Moraxella, Providencia, Clostridium, Pseudomonas, Proteus, Salmonella, Serratia, Acinetobacter, Bacteroides, Prevotella, Campylobacter, Neisseria, Enterococcus o *Stenotrophomonas*.

5

32. Una combinación farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y un antibiótico beta - lactámico.

10

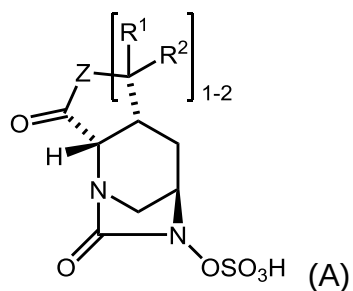
33. Un método para tratar un sujeto que tiene una infección bacteriana Gram - negativa, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antibiótico beta-lactámico y un compuesto de la Fórmula (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

15

34. El método de la reivindicación 33, en el que el compuesto de la Fórmula (A) se administra en una cantidad eficaz para potenciar la actividad antibacteriana del antibiótico beta-lactámico.

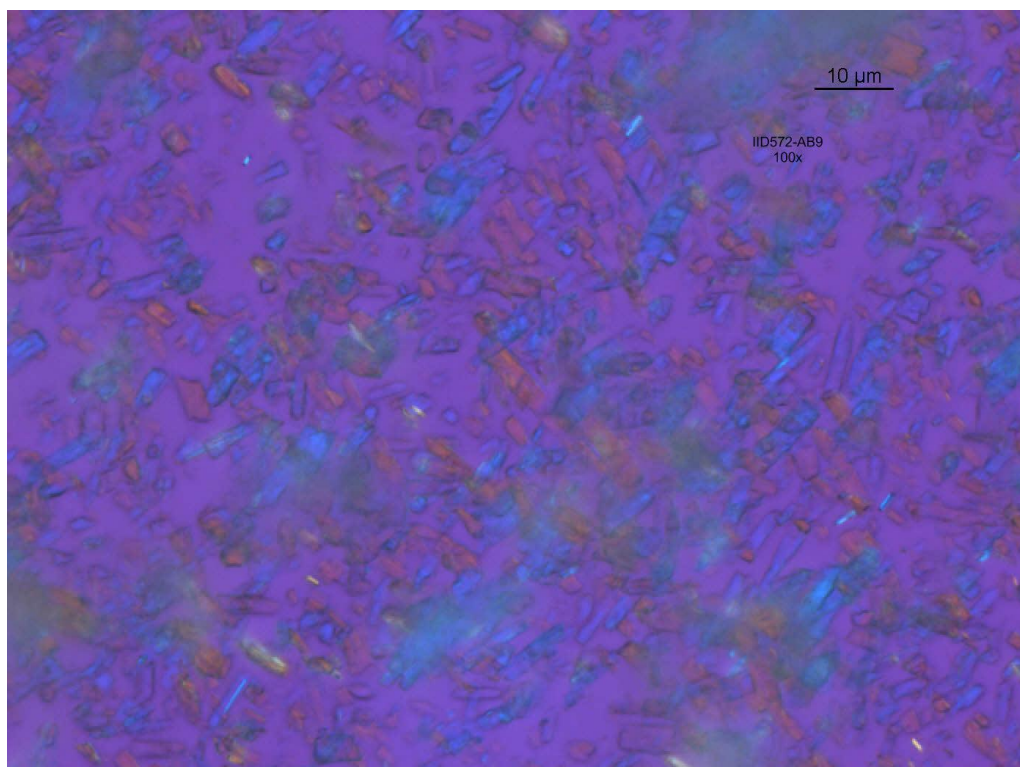
RESUMEN

Esta invención se refiere generalmente a compuestos de la Fórmula (A),



como se describen adicionalmente en la presente, los cuales actúan como
5 inhibidores de beta-lactamasa, y sales, formas cristalinas y formulaciones de los
mismos. En ciertos aspectos, la invención se refiere a métodos para usar tales
compuestos en combinación con un antibiótico beta-lactámico para tratar
infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, incluyendo cepas resistentes a
fármacos.

FIGURA 1 Imagen del microscopio electrónico de barrido de la forma cristalina del compuesto de la fórmula (VII).



5

FIGURA 2 Espectro XRPD del Compuesto Cristalino de la Fórmula (VII)

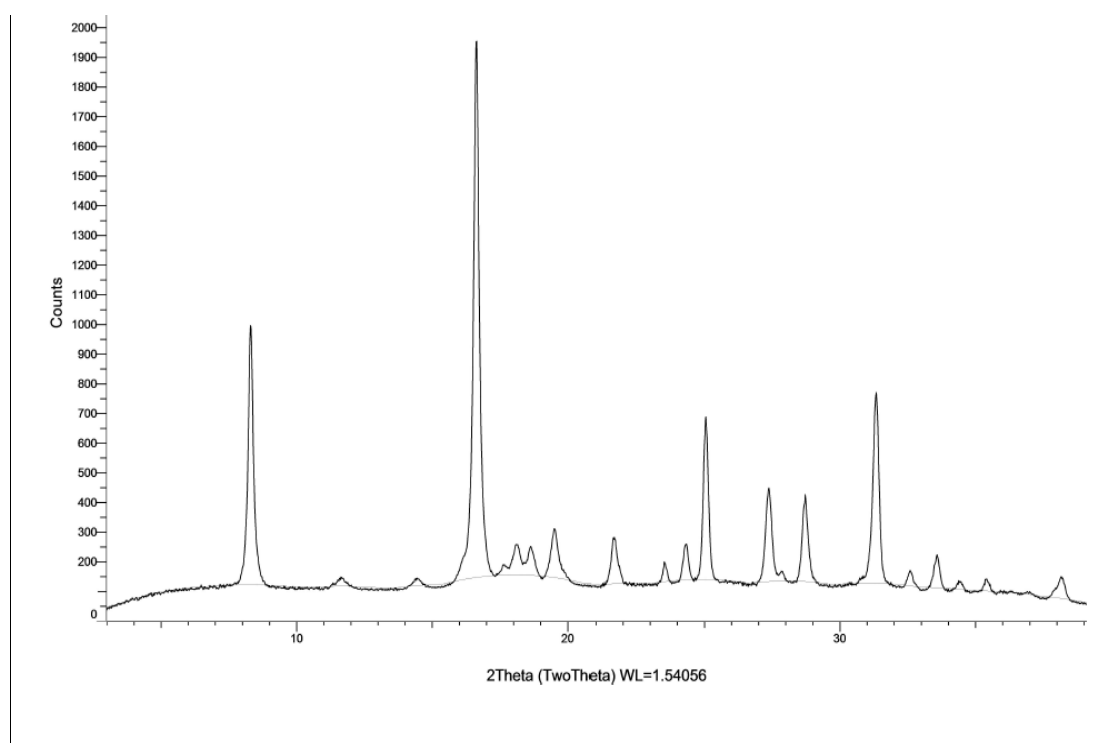
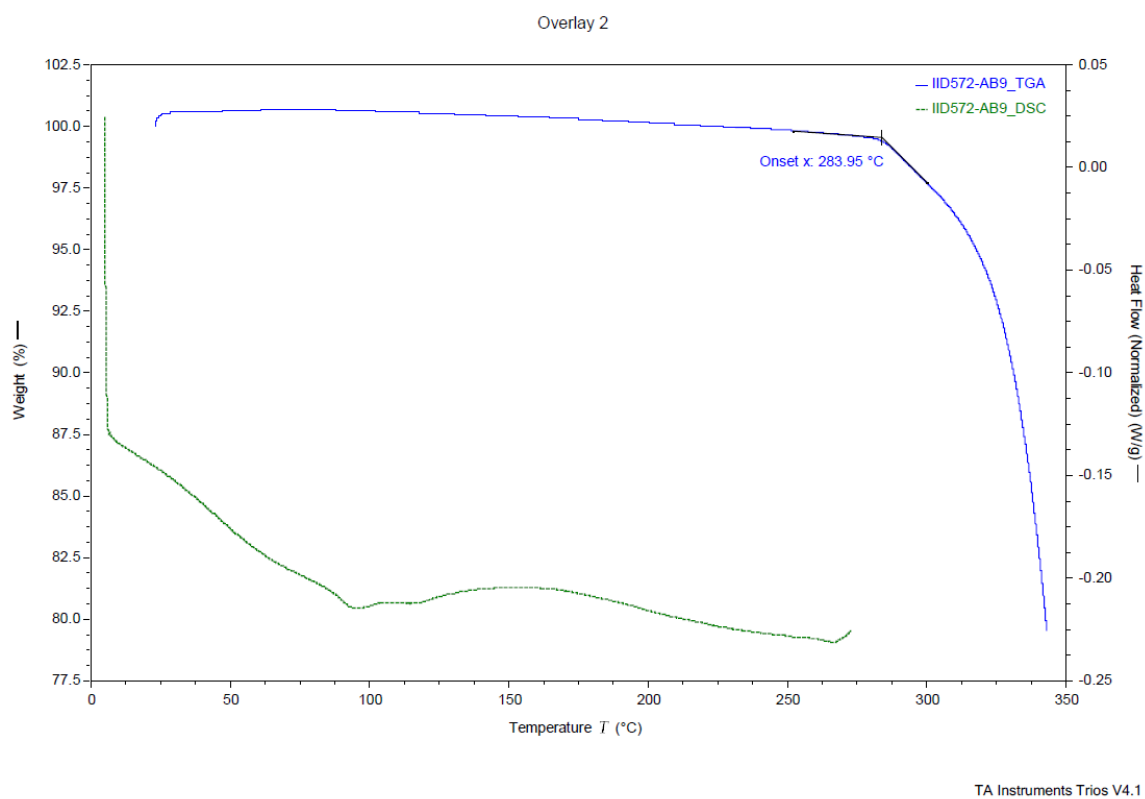


FIGURA 3 Análisis termogravimétrico y DSC del Compuesto Cristalino de la Fórmula (VII).



5 DSC: inferior
TGA –superior



(51) International Patent Classification:

C07D 519/06 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)
A61K 31/535 (2006.01) **C07D 471/18** (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2017/055973

(22) International Filing Date:

28 September 2017 (28.09.2017)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

62/401,022 28 September 2016 (28.09.2016) US

(71) Applicant: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(72) **Inventors: CASAREZ, Anthony**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, 94608 (US). **FUREGATI, Markus**; Novartis Pharma AG, Postfach, 4002 Basel (CH). **KOCH, Guido**; Novartis Pharma AG, Postfach, 4002 Basel (CH). **LIN, Xiaodong**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, California 94608 (US). **OSSOLA, Flavio**; Novartis Pharma AG, Postfach, 4002 Basel (CH). **RECK, Folkert**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, California 94608 (US). **SIMMONS, Robert Lowell**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, California 94608 (US). **ZHU, Qingming**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, California 94608 (US).

(74) Agent: **NOVARTIS AG**; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,

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

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

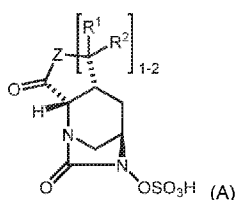
Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: BETA-LACTAMASE INHIBITORS



(57) **Abstract:** This invention pertains generally to compounds of Formula (A), as further described herein, which act as beta-lactamase inhibitors, and salts, crystalline forms and formulations thereof. In certain aspects, the invention pertains to methods of using such compounds in combination with a beta-lactam antibiotic to treat infections caused by Gram-negative bacteria, including drug-resistant strains.



190131 PAT057369_LISTADO DE SECUENCIAS
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG
 <120> INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASA
 <130> PAT057369-WO-PCT
 <140> PCT/IB2017/055973
 <141> 2017-09-28
 <150> 62/401,022
 <151> 2016-09-28
 <160> 41
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 1
 tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg 32
 <210> 2
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 2
 aatcgaattc ttactgacca ttaacgccc agc 33
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 3
 tcgcctcgag gcgagccgc aaccgctgga 30
 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 4
 aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtcaa tc 32
 <210> 5
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 5
 cgctctcgag agcgtccgc tgtacgaca aacg 34
 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"
 <400> 6
 aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc 32
 <210> 7
 <211> 884
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:

polinucleótido sintético"

<400> 7
 atgggcatc atcatcatca tcacagcagc ggcctggaag ttctgttcca ggggcccgcg 60
 actgcgctga cgaatttggt ggccgagccg ttcgcgaaat tggagcaaga ttttggtggt 120
 tcgatcggtg tctacgcgat ggacaccggt agcgggtgcca ccgtgagcta ccgtgccgaa 180
 gagcgttttc cgctgtgtag ctctttcaag ggttttctgg ccgcagccgt gctggcacgc 240
 agccaacagc aagcgggcct gctggacacc ccgatccgtt acggcaaaaa tgcgctggtt 300
 ccgtggagcc cgattagcga aaagtacctg accaccggca tgacggtggc ggagttgagc 360
 gctgcggcgg ttacagtattc cgataacgct gcggcaaatc tgctgctgaa agaactgggc 420
 ggtccagcgg gtctgacggc tttcatgcgt tctattggcg acaccacctt tcgcttgagc 480
 cgctgggagc tggagctgaa cagcgcgatt ccgggagcgc cacgtgatac gagcagcccg 540
 cgtgcagtga ccgagagcct gcagaagctg accctgggca gcgcactggc cgcaccgcag 600
 cgccaacagt tcgtcgattg gctgaagggg aacaccaccg gtaaccatcg tattcgcgca 660
 gcgggtcccgg ctgattgggc agttggtgac aagactggta cgtgcggcgt ttatggtacg 720
 gcgaatgact acgcggttgt ttggcctacg ggtcgtgcgc cgatcgtcct ggcggtgtat 780
 acccgctgctc cgaacaaaga cgataaacac tccgaagcgg tcatcgccgc agcagcgcgt 840
 ctggccctgg aaggcttggg cgtaaatggt cagtaacgcc ggcg 884

<210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

<400> 8
 tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg 32

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

<400> 9
 aatcgaattc ttactgacca ttaacgcccc agc 33

<210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

<400> 10
 gcttgggcgt taatggctcag taagaattcg att 33

<210> 11
 <211> 866
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

<400> 11
 atgggcatc atcatcatca tcacagcagc ggcctggaag ttctgttcca ggggcccgcg 60
 agcccgaac cgctggagca gatcaagcag tctgagagcc agctgagcgg ccgtgtgggt 120
 atgatcgaga tggatctggc ttccggccgt acgctgacgg catggcgtgc cgacgaacgt 180
 ttcccgatga tgctgacctt taaagttggt ctgtgtggtg cggctctggc acgtgtagac 240
 gcgggtgacg aacaactgga gcgcaagatc cattaccgcc aacaggactt ggtcgactac 300
 agcccgggta gcgaaaagca cctggcggat ggcatgaccg tgggtgaatt gtgcgccgct 360
 gcgattacca tgagcgacaa tagcgcggtt aatctgctgt tggcgaccgt tgggtggcca 420
 gcgggcttga ccgcatttct gcgtcaaacg ggcgataatg ttacgcgtct ggatcgctgg 480
 gaaacggagc tgaacgaggc actgccgggt gatgcccggt ataccacgac tcctgctagc 540
 atggcagcga ccctgcgtaa actgctgacc agccagcgtc tgagcgcacg tagccaacgc 600

cagctgctgc aatggatggt ggatgaccgc gtggcgggtc cgctgatccg ctccgtcctg 660
ccagcaggct ggttcattgc ggacaaaact ggtgcctcta agcgtggtgc gcgtggtatc 720
gtcgcgctgc tgggtccgaa caacaaagcc gaacgtattg tggttatcta tctgcgcgac 780
accccgga gcatggccga gcgcaaccag caaattgcgg gcattggtgc ggcactgatt 840
gagcactggc agcgtaacg ccggcg 866

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 12
tcgcctcgag gcgagccgc aaccgctgga 30

<210> 13
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 13
aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtcaa tc 32

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 14
gattgagcac tggcagcgtt aagaattcga tt 32

<210> 15
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 15
cgctctcgag agcgtcccg tgtacgcaca aacg 34

<210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 16
aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc 32

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 17
gccctcgagg gcgaggcccc ggcggatcgc 30

<210> 18
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 18
tgagaattct cagcgcttca gcggcacct 29

<210> 19

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 19
 ttcactgcag tgaacgttgc gaagcaacgg c 31

<210> 20
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 20
 tcgaggatcc tcgagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc g 41

<210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 21
 ccgtctagac ggatggcctt ttgcgtttc 30

<210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 22
 aatcgaattc ttactgacca ttaacgcca agc 33

<210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 23
 aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtcaa tc 32

<210> 24
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 24
 aatcgaattc ttacagaccg tcggtgacaa tc 32

<210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 25
 gaattcgcta gcccaaaaa acgg 24

<210> 26
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 26
 cgtcttgctc caggccgcga ttaaattcc 29

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 27
 tcgcggcctg gagcaagacg tttc 24

 <210> 28
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 28
 tcacgtagcg atagcggag 19

 <210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 29
 cgcgagaccc acgcttaccg gctccaga 28

 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 30
 ctcgccttga tagttgggaa ccgga 25

 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 31
 cggttcccaa ctatcaaggc gagt 24

 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 32
 gacattgccg tctactgcgtc t 21

 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 33
 tcacgtagcg atagcggag 19

 <210> 34
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
 polinucleótido sintético"

 <400> 34
 gtaactcgcc ttgatagttg ggaaccggag ctgaatgaag c 41

```

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

<400> 35
gcgggaccaa agccatgaca                                20

<210> 36
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

<400> 36
accgcgagac ccacgcttac cggctccaga tttatcagca ataaacc    47

<210> 37
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

<400> 37
gtaagaattc ttaccaatgc ttaatcagtg aggc                  34

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

<400> 38
ccgtctagac ggatggcctt tttgcgtttc                        30

<210> 39
<211> 875
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

<400> 39
atggggccatc atcatcatca tcacagcagc ggcctggaag ttctgttcca ggggcccagc    60
gtcccgtgtg acgcacaaac ggccgacgtg caacagaaac tggcggagtt ggaacgtcag    120
agcggtgggc gtttggtgtg agccctgac aataccgcgg acaatagcca aattctgtat    180
cgtgctggagc aacgcttcgc gatgtgcagc acgagcaagg tgatggccgc tgcggccggt    240
ctgaagaaat ccgagagcga gccgaacttg ctgaatcagc gcgttgagat caagaagtcg    300
gatctggtga actataacct tatcgcgga aaacatgtca acggcaccat gtccctggca    360
gagctgagcg cggctgcgtt gcagtactct gataacgtcg caatgaataa actgatcgca    420
cacgtcggtg gcccagcaag cgtgaccgcc tttgcgcgtc aactgggcga tgaaactttt    480
cgtctggatc gtaccgaacc gaccctgaat acggcaattc cgggtgatcc gcgcgacacg    540
acgagcccgc gtgcaatggc acagaccctg cgcaacctga ccctgggtaa agcgtggggc    600
gatagccaac gtgcgcagct ggttacgtgg atgaagggtg acaccaccgg tgcggccagc    660
attcaagcgg gcctgccggc cagctggggt gttggtgata aaactggctc cggtggttat    720
ggtaccacga atgacatcgc ggttatattg ccgaaggacc gtgcgccggt gatcctggtg    780
acctacttca cccagccgca gccgaaagct gagtctcgcc gtgacgtgct ggcgagcgca    840
gctaagattg tcaccgacgg tctgtaacgc cggcg                                875

<210> 40
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
        polinucleótido sintético"

```

<400> 40
tgccttcctg tttttgctct cgag

24

<210> 41
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /note="Descripción de la Secuencia Artificial:
polinucleótido sintético"

<400> 41
tggagccggt aagcgtgggt ctcgcggt

28