



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 805**

51 Int. Cl.:
C07H 17/08 (2006.01) **C07D 313/00** (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) **A61P 1/04** (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01) **A61P 1/08** (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01) **A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03755757 .6**
96 Fecha de presentación : **26.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1532131**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Compuestos motílicos.**

30 Prioridad: **29.08.2002 US 407345 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **PFIZER Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US

72 Inventor/es: **Santi, Daniel;**
Metcalf, Brian;
Carreras, Christopher;
Liu, Yaoquan;
McDaniel, Robert y
Rodriguez, Eduardo, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 316 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos motílicos.

5 **Campo técnico**

La presente invención proporciona agentes procinéticos con propiedades farmacológicas y farmacocinéticas superiores para el tratamiento de trastornos de motilidad gastrointestinal. La invención se refiere a los campos de química, química médica, medicina, biología molecular y farmacología.

10

Técnica anterior

15 La motilidad gastrointestinal (“GI”) regula el movimiento ordenado del material ingerido a través del intestino para asegurar la adecuada absorción de nutrientes, electrolitos y fluidos. El tránsito adecuado a través del esófago, estómago, intestino delgado y colon depende del control regional de la presión intraluminal y de varios esfínteres que regulan el movimiento hacia delante e impiden el flujo retrógrado del contenido GI. El patrón normal de la motilidad GI puede alterarse por diversas circunstancias, incluida la enfermedad y la cirugía.

20 Entre los trastornos de la motilidad gastrointestinal se incluyen, por ejemplo, la gastroparesia y la enfermedad por reflujo gastroesofágico (“ERGE”). La gastroparesia es el retraso del vaciado del contenido del estómago. Los síntomas de gastroparesia incluyen molestias estomacales, ardor de estómago, náuseas y vómitos. La gastroparesia aguda puede estar causada por, por ejemplo, fármacos (p. ej., opiáceos), enteritis viral e hiperglucemia, y normalmente se trata tratando la enfermedad subyacente en lugar del trastorno de motilidad. Las causas más frecuentes de gastroparesia crónica están asociadas con la diabetes de larga duración o la pseudoobstrucción idiopática, a menudo con la denominada dispepsia “no ulcerosa” o “funcional”.

25 La ERGE se refiere a las variadas manifestaciones clínicas del reflujo al esófago de los contenidos del estómago y del duodeno. Los síntomas más frecuentes son ardor de estómago y disfagia; también se puede producir pérdida de sangre por la erosión esofágica. La ERGE puede estar asociada con el tono bajo y la inadecuada relajación del esfínter esofágico inferior y se produce con gastroparesia en aproximadamente el 40% de los casos. En la mayoría de los casos, la ERGE parece ser tratable con agentes que reducen la liberación del irritante ácido en el estómago (p. ej., Prilosec) o agentes que incrementan el tono del esfínter esofágico inferior (p. ej., cisaprida). Otros ejemplos de trastornos cuyos síntomas incluyen alteración de la motilidad gastrointestinal son anorexia, estasis de la vesícula biliar, íleo paralítico posquirúrgico, esclerodermia, pseudoobstrucción intestinal, gastritis, émesis y estreñimiento crónico (inercia colónica).

30 Generalmente, estos trastornos GI se tratan con agentes procinéticos que potencian la motilidad propulsora. Los motílicos son compuestos macrólidos, tales como eritromicina y sus derivados, que son agonistas del receptor de la motilina. Entre las pruebas de la potencial utilidad clínica de los motílicos se incluye su capacidad para inducir la fase III de los complejos motores migratorios (“CMM”). CMM se refiere a las cuatro fases (I-IV) de la actividad eléctrica mostrada por el estómago y el intestino delgado en estado de ayunas. La contracción muscular se produce en las fases III y IV, coincidiendo con una onda peristáltica que propulsió los contenidos entéricos distalmente durante el ayuno. Entre otros efectos clínicamente relevantes se incluyen: Incremento del peristaltismo esofágico y la presión LES en voluntarios sanos y pacientes con ERGE; aceleración del vaciado gástrico en pacientes con paresia gástrica; y estimulación de las contracciones de la vesícula biliar en voluntarios normales, pacientes después de la eliminación de cálculos biliares y diabéticos con neuropatía autonómica.

35 Las eritromicinas son una familia de antibióticos macrólidos producidos mediante fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythreus*). La eritromicina A, un antibiótico de uso habitual, es el miembro más abundante e importante de la familia.

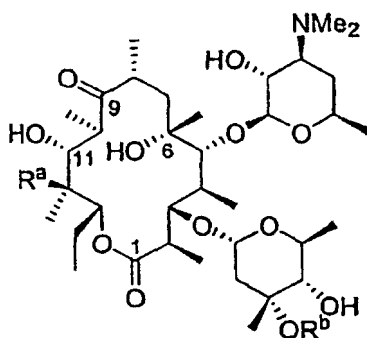
Eritromicina A $R^a = OH$ $R^b = Me$

55 Eritromicina B $R^a = H$ $R^b = Me$

Eritromicina C $R^a = OH$ $R^b = H$

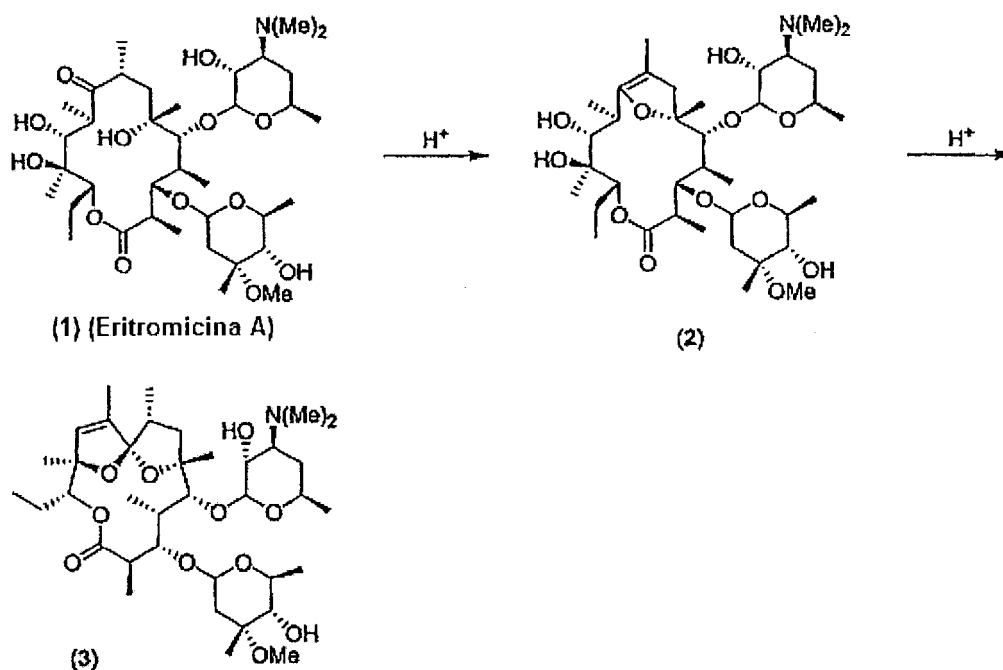
60 Eritromicina D $R^a = H$ $R^b = H$

65



Desde la década de 1950 se sabe que la eritromicina A (1) es la causa de los efectos secundarios GI, tales como náuseas, vómitos y molestias abdominales. La eritromicina A sufre degradación catalizada por ácido en el estómago, formando, inicialmente, 8,9-anhidro-6,9-hemiacetal 2 (también conocido como eritromicina A enol éter) y, después, espirocetal 3, como se muestra en el Esquema A. Los efectos secundarios GI se explican en gran parte mediante la actividad de agonista de la motilina en la propia eritromicina A y hemiacetal 2. (El espirocetal 3 es inactivo).

Esquema A



Omura y col., "Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and the structure activity relationship", J. Antibiotics (1985) 38: 1631-2, describen la capacidad relativa de la eritromicina A, 9-dihidroeritromicina A, y otros macrólidos para estimular la contracción intestinal en perros conscientes. En este ensayo, se comunicó que la 9-dihidroeritromicina A era un 65% tan activa como la eritromicina, a una dosis de 1 mg/kg. Dado que la 9-dihidroeritromicina no puede formar un enol éter, está claro que la formación del enol éter no es esencial para la actividad del motílido. Actualmente, la eritromicina se usa para tratar los trastornos de la motilidad, aunque su actividad antibacteriana plantea problemas sobre la generación de microorganismos resistentes. Dado que la 9-dihidroeritromicina también muestra actividad antibacteriana, existen problemas similares con su uso como motílido.

ES 2 316 805 T3

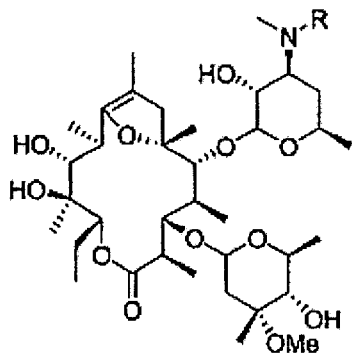
Se ha preparado como motílicos un número de análogos de la eritromicina enol éter, incluidos EM-523 (4); EM-574 (5); LY267,108 (6); GM-611 (7); y ABT-229 (8), cuyas estructuras se muestran a continuación. Véanse las patentes de EE.UU. números 5.578.579; 5.658.888; 5.922.849; 6.077.943; y 6.084.079.

5

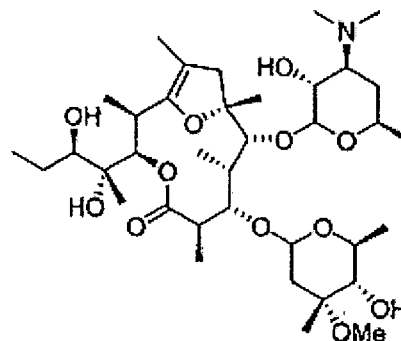
10

15

20



(4) R= etilo
(5) R= isopropilo



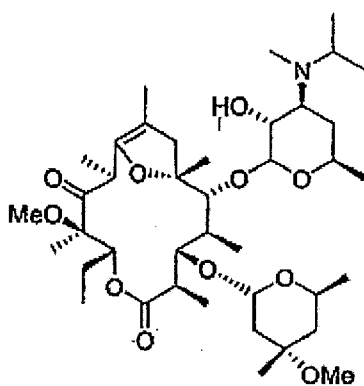
(6)

25

30

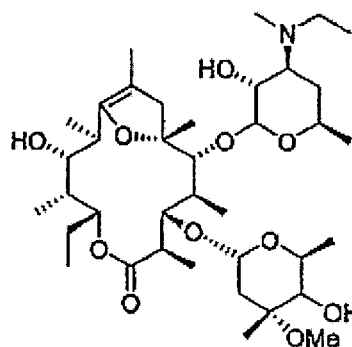
35

40



(7)

and



(8)

45

Otros motílicos de interés incluyen enol éteres de lactama y derivados epóxido de lactama. Véanse las patentes de EE.UU. números 5.712.253; 5.523.401; 5.523.418; 5.538.961; y 5.554.605.

50

El documento WO-A-00/63225 describe macrólidos representados por una fórmula de Markush que parcialmente se superpone con la presente fórmula (I) y su uso como agentes antimicrobianos.

El documento US-B2-6 437 151 describe eritromicinas con sustituyentes concretos en C-13 y su uso para, entre otras cosas, la reducción de la motilidad gástrica.

55

A pesar de la elevada potencia de los enol éteres de eritromicina como motílicos, su inestabilidad metabólica ha dificultado su desarrollo en la clínica. Otros compuestos, tales como el 7 y el 8, muestran la desensibilización del receptor de la motilina en ensayos de contractilidad con tiras de músculo y con base de células. Esta desensibilización puede anunciar una disminución de la eficacia tras administración de múltiples dosis del motílicido.

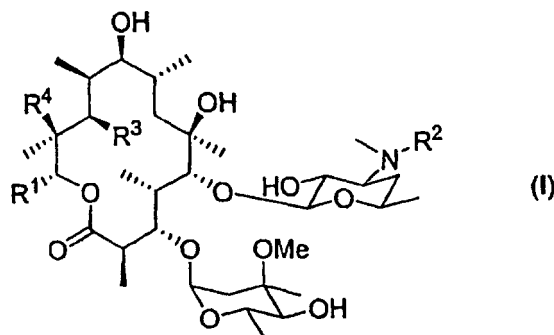
60

Por tanto, existe una necesidad de nuevos compuestos motílicos con menor actividad antibacteriana, mayor estabilidad metabólica y menor desensibilización del receptor. La presente invención proporciona análisis de 9-dihidroerytomicina que cumple esta necesidad.

65

Descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona compuestos que tienen la fórmula (I);



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que R¹ es alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heterociclo sustituido o insustituido; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heterociclo sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados en juntos, forman O-C(=O)-O, con la condición de que cuando (a) R¹ es etilo y (b) R³ es OH o R³ y R⁴, tomados juntos, forman -C(=O)-O, R² no es H o metilo.

En un segundo aspecto, se proporciona un compuesto de esta invención para tratar un trastorno de la motilidad gástrica en un paciente que lo sufre.

En un tercer aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, se usan compuestos (I) de esta invención para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno de la motilidad gástrica en un sujeto.

También se describe una célula huésped recombinante que produce 11-desoxieritromicinas (particularmente 11-desoxieritromicina B), junto con los genes de la policétido sintasa modificados que expresan y los vectores que se usan para su ingeniería. Las 11-desoxieritromicinas son útiles como productos intermedios para la síntesis de compuestos de esta invención. La célula huésped recombinante tiene un gen *eryAI* sometido a ingeniería mediante sustitución del dominio de cetoreductasa en el módulo 2 del mismo con un casete que contiene un dominio de deshidratasa, un dominio de enoilreductasa y un dominio de cetoreductasa. También se describe un procedimiento de producir 11-desoxieritromicinas, que comprende cultivar tal célula huésped recombinante.

Modos para realizar la invención*Definiciones*

Las definiciones de los términos que se dan más adelante se aplican a los términos tal como se usan a lo largo de esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

“Alquilo” significa una fracción de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene el número especificado de átomos de carbono en la cadena o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica, hasta 5 átomos de carbono en la cadena.

“Alqueno” significa una fracción de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono y el número especificado de átomos de carbono en la cadena o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica, hasta 5 átomos de carbono en la cadena.

“Alquino” significa una fracción de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono y el número especificado de átomos de carbono en la cadena o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica, hasta 5 átomos de carbono en la cadena.

ES 2 316 805 T3

“Alquilarilo”, “arilalquilo”, “heterocicloalquilo”, “alquilheteroarilo”, “alquilheterociclo” significan un grupo arilo, heterocíclico o heteroarilo, según el caso, unido directamente a una fracción de alquilo, como en bencilo, fenetilo.

5 “Arilo” significa un sistema de anillos de hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 6 a 12 átomos de carbono en la porción de anillo, tal como fenilo, naftilo, y fracciones de bifenilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido en una o más posiciones.

10 “Cicloalquilo” significa un sistema de anillos de hidrocarburo cíclico saturado opcionalmente sustituido, que, preferentemente, contiene de 1 a 3 anillos y de 3 a 7 carbonos por anillo, que además pueden estar condensados con un anillo carbocíclico insaturado de C₃-C₇. Entre los ejemplos de sistemas de anillo de cicloalquilo se incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, ciclododecilo y adamantilo.

15 “Halógeno” o “halo” significa flúor, cloro, bromo y yodo.

20 “Heterociclo”, “heterocíclico” o “heterociclo” significa un sistema de anillos aromáticos o no aromáticos, completamente saturados o insaturados, por ejemplo, que es un sistema de anillos monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros o tricíclico de 10 a 15 miembros, que tiene, al menos, un heteroátomo en al menos un anillo que contiene un átomo de carbono. “Heteroarilo” significa un heterociclo en el que el sistema de anillo es arilo. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de N, O y S, en los que N y S pueden estar opcionalmente oxidados y el N puede estar opcionalmente cuaternizado.

25 Ejemplos de sistemas de anillo heterocíclicos monocíclicos incluyen pirrolidinilo, pirrolilo, indolilo, pirazolilo, oxetanilo, pirazolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, furilo, tetrahidrofurilo, tienilo, oxadiazolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxazepinilo, azepinilo, 4 piperidonilo, piridinilo, N-oxo-piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, tetrahidropirranilo, tetrahidrotiopirranilo, tetrahidrotiopirranilo sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo sulfóxido, tiomorfolinilo sulfona, 1,3-dioxolano y tetrahidro-1,1-dioxotienilo, dioxanilo, isotiazolidinilo, tietanilo, tiiranilo, triazinilo y triazolilo. Entre los grupos heterociclo preferidos se incluyen piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tienilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo.

30 “Sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal de un compuesto adecuada para la formulación farmacéutica. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición de ácido que pueden formarse mediante, por ejemplo, mezcla de una solución de un compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido carbónico. Cuando un compuesto lleva una o más fracciones ácidas, se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables mediante el tratamiento de una solución del compuesto con una solución de una base farmacéuticamente aceptable, tal como hidróxido de litio, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de tetraalquilamonio, carbonato de litio, carbonato sódico, carbonato potásico, amoniaco, alquilaminas.

35 Cuando un grupo se caracteriza por estar sustituidos (como en “alquilo sustituido”, “alqueno sustituido”, etc.), tal grupo puede tener uno o más sustituyentes seleccionados de forma independiente, preferentemente en un número de uno a cinco, más preferentemente en un número de uno o dos. Se entiende que un experto en la técnica puede seleccionar los sustituyentes y los patrones de sustitución para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los procedimientos expuestos en la presente memoria descriptiva. Ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen alquilo, alqueno, alquino, arilo, halo, trifluorometoxi, trifluorometilo, hidroxilo, alcoxi, cicloalquil-oxi, heterociclooxi, alcanilo, alcanilo, amino, alquilamino de amonio cuaternario, aralquilamino, cicloalquilamino, heterocicloamino, dialquilamino, alcanilo, alquilamino, alquiltio, cicloalquiltio, heterocicloalquiltio, ureido, nitro, ciano, carboxi, carboxilalquilo, carbamilo, alcoxycarbonilo, alquiltio, ariltio, alquilsulfonilo, sulfonamido, ariloxi, además de los especificados en la presente memoria descriptiva. El sustituyente puede sustituirse además con, por ejemplo, halo, hidroxilo, alquilo, alcoxi; arilo, arilo sustituido, alquilo sustituido, aralquilo sustituido.

40 A menos que se indiquen específicamente estereoisómeros concretos (p. ej., mediante un enlace en negrita o en línea discontinua en un estereocentro relevante en una fórmula estructural), todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención, en forma de compuestos puros así como de mezclas de los mismos. A menos que se indique otra cosa, enantiómeros individuales, diastereómeros, isómeros geométricos y combinaciones y mezclas de los mismos están todos abarcados dentro de la presente invención. También quedan abarcadas dentro del alcance de esta invención formas cristalinas polimórficas y solvatos.

45 Es posible fabricar profármacos de los compuestos de esta invención. Tales profármacos son, en general, derivados funcionales de los compuestos que se pueden convertir fácilmente *in vivo* en el compuesto requerido. Procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados adecuados del profármaco se describen en, por ejemplo, Design of Prodrugs, Bundgaard, ed., Elsevier, 1985.

ES 2 316 805 T3

Compuestos y procedimientos

5 En una forma de realización se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido o heterociclo sustituido o insustituido; R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O, con la condición de que cuando R¹ es etilo y R³ es OH o R³ y R⁴, tomados juntos, forman -C(=O)-O, R² no es H o metilo

10 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O, con la condición de que cuando (a) R¹ es etilo y (b) R³ es OH o R³ y R⁴, tomados juntos, forman -C(=O)-O, R² no es H o metilo.

15 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es etilo; R² es alquilo C₂-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

20 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es etilo; R² es etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

25 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es etilo sustituido; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

30 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es fluoroetilo o azidoetilo; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

35 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es etilo sustituido; R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

40 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es fluoroetilo o azidoetilo; R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

45 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es propilo; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

50 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es propilo; R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

55 En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es vinilo, butilo, bencilo, but-3-en-1-ilo, fenilo o 4-hidroxifenilo; R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido o alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R¹ es vinilo, butilo, bencilo, but-3-en-1-ilo, fenilo o 4-hidroxifenilo; R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H u OH; y R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados juntos, forman O-C(=O)-O.

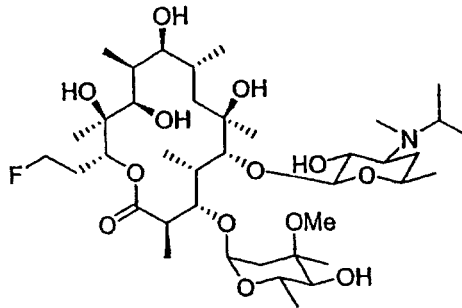
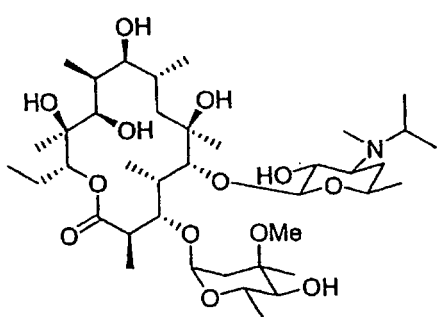
60 En otra forma de realización de la invención, se proporcionan compuestos que tienen la fórmula (I), en la que R³ y R⁴ son, de forma independiente, H u OH; R¹ se selecciona del grupo compuesto por etilo, 2-fluoroetilo y 1-propilo; y R² se selecciona del grupo compuesto por metilo, etilo, isopropilo y 2-butilo; con la condición de que R¹ es etilo y R³ es OH; en consecuencia R₂ no es metilo.

En otra forma de realización, R¹ es alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido (preferentemente etilo); R² es H, metilo, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; R³ es H; y R⁴ es H u OH.

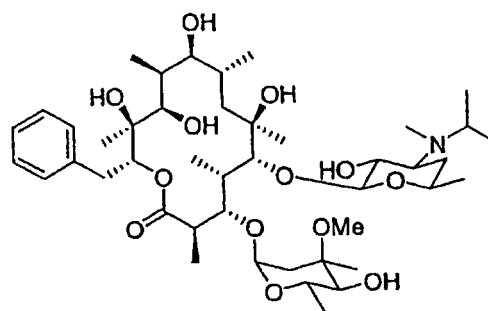
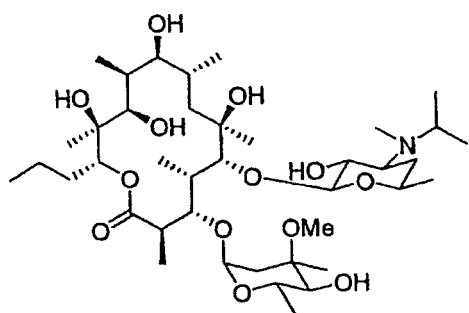
65

En otra forma de realización de la invención se proporcionan compuestos que tienen las estructuras:

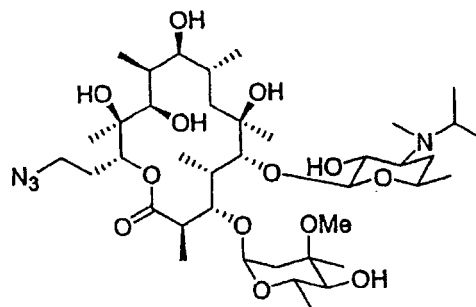
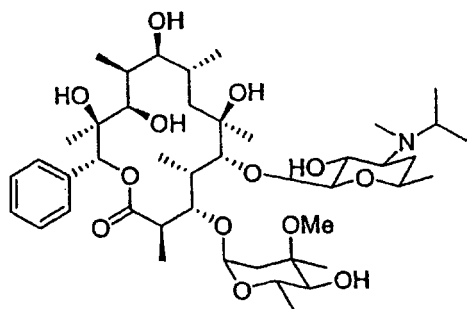
5



20



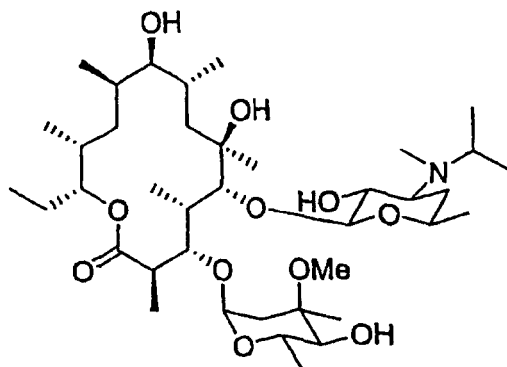
35



45

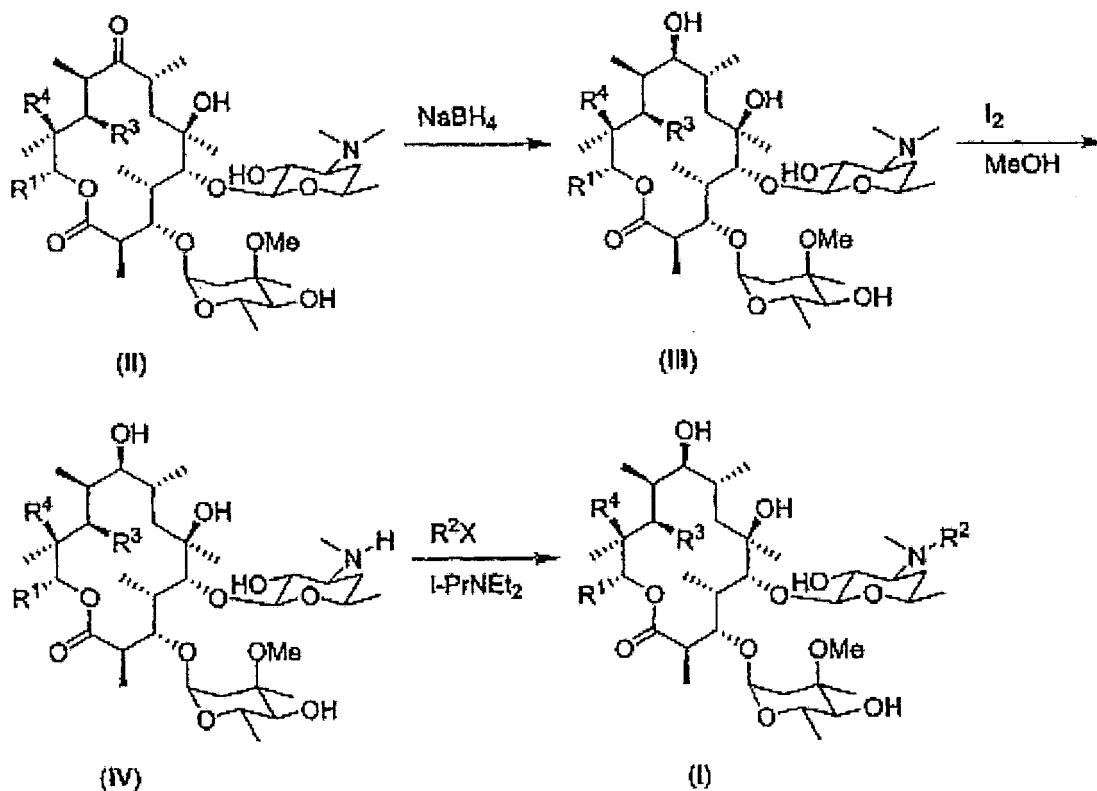
y

50



También se describen procedimientos para la preparación de los compuestos de fórmula (I). En una forma de realización, los compuestos de fórmula (I) se preparan a partir de las correspondientes eritromicinas (II) como se ilustra en el Esquema 1.

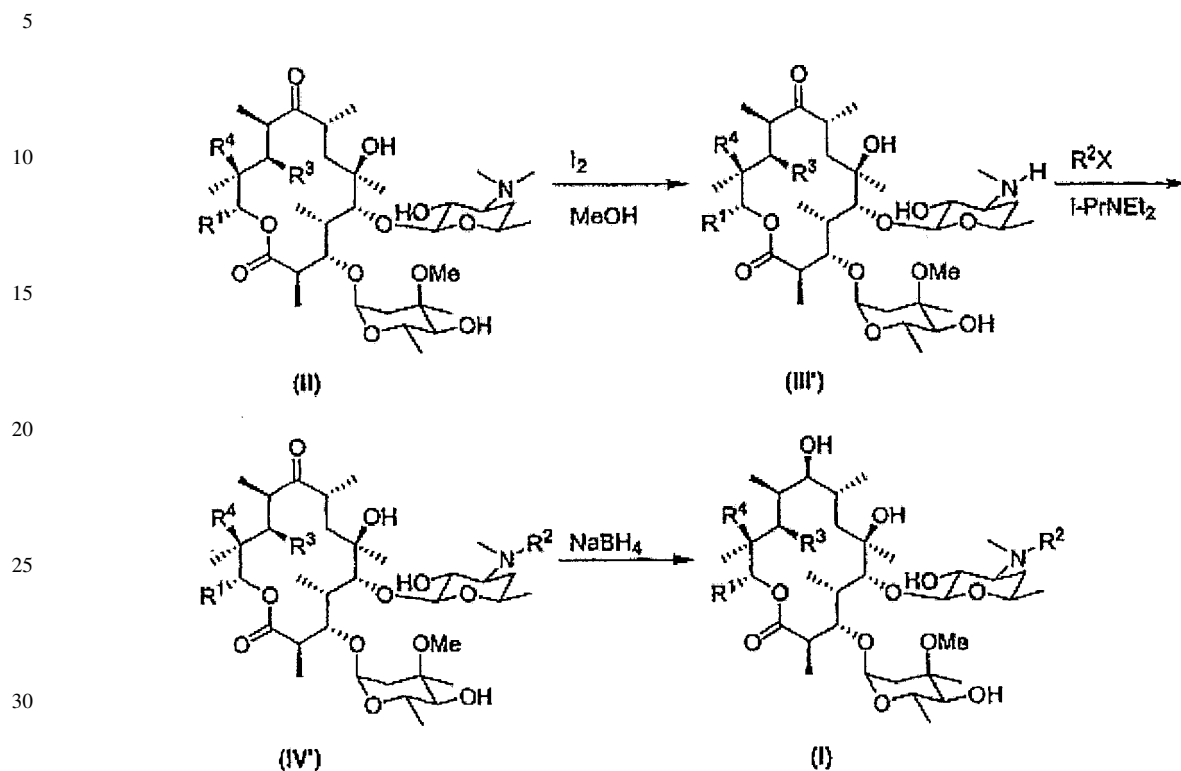
Esquema 1



En esta forma de realización, la eritromicina (II) se trata con borohidruro sódico en metanol para proporcionar la (9S)-9-dihidroeritromicina, (III). El compuesto (III) se desmetila usando, por ejemplo, yodo y luz en metanol tamporado o usando N-yodosuccinimida en acetonitrilo, para proporcionar el compuesto (IV). La alquilación del compuesto (IV) usando R^2X , en el que R^2 es como se ha definido antes y X es un haluro, preferentemente bromo o yodo, o sulfonato, preferentemente triflato o tosilato, en presencia de una base tal como N,N-diisopropiletilamina proporciona los compuestos de fórmula (I).

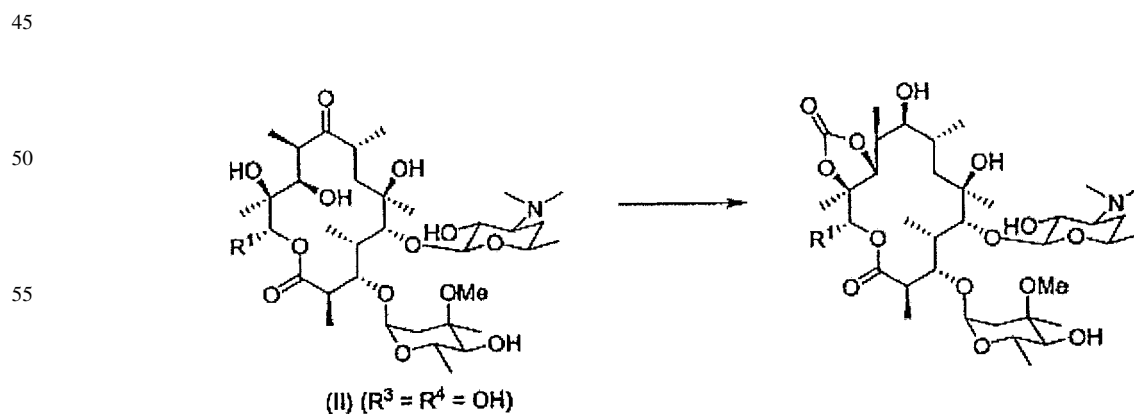
Como alternativa, la secuencia de las etapas de desmetilación/y la etapa de reducción con borohidruro se puede invertir, como se muestra en el Esquema 1A:

Esquema 1A



En otra forma de realización de la invención, las eritromicinas (II) en las que R^3 y R^4 tomados juntos forman O-C(=O)-O se preparan tal como se ilustra en el Esquema 2.

Esquema 2

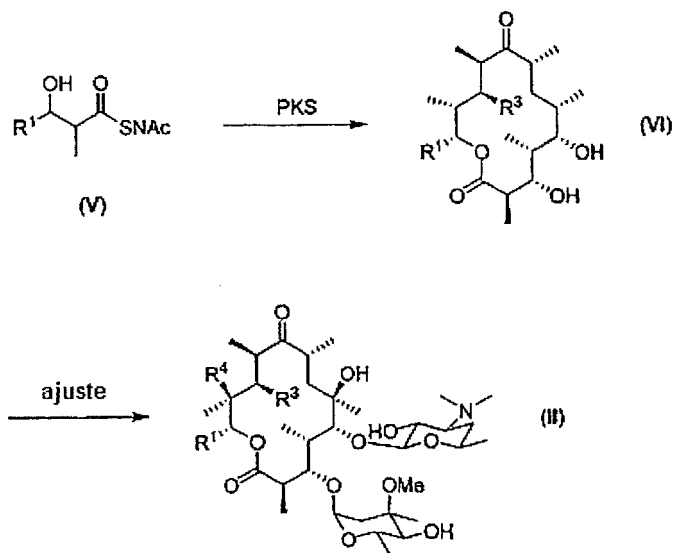


La reacción de la eritromicina (II), en la que R^3 y R^4 son ambos OH, con un reactivo carbonilante, por ejemplo carbonato de etileno o 1,1-carbonildiimidazol, en presencia de una base, por ejemplo carbonato potásico o 4-(dimetilamino)piridina, proporciona el 11,12-carbonato cíclico. A continuación, los carbonatos cíclicos se convierten en los productos finales de acuerdo con el procedimiento ilustrado en el Esquema 1.

ES 2 316 805 T3

Las eritromicinas de fórmula (II) se preparan como se ilustra en el Esquema 3 y se describen en las patentes de EE.UU. 6.066.721; 6.261.816; y 6.395.710.

Esquema 3



En resumen, a una policétido sintasa se suministra un dicétido tioéster de fórmula (V) para producir un policétido de estructura (VI). La preparación de dicétido tioésteres se describe en el documento WO 00/44717. En la presente invención, la policétido sintasa es una 6-desoxieritronolida B sintasa o una 8,8a-desoxioleandolida sintasa. Ejemplos adecuados de 6-desoxieritronolida B sintasas se encuentran en, por ejemplo, *Saccharopolyspora erythraea*, como se describe en la patente de EE.UU. 5.824.513, y en *Micromonospora megalomicea*, como se describe en el documento WO 01/27284. Un ejemplo de una 8,8a-desoxioleandolida sintasa se encuentra en *Streptomyces antibioticus*, como se describe en la patente de EE.UU. 6.251.636. Estas policétido sintasas se modifican de modo que se impida la incorporación de sus unidades iniciadoras nativas. Procedimientos para mutar las policétido sintasas de modo que se impida la incorporación de unidades iniciadoras nativas mediante, por ejemplo, inactivación de la cetosintasa del módulo 1, se describen en la patente de EE.UU. 6.066.721.

Aunque el dicétido tioéster (V) se puede suministrar a una forma sin células de la policétido sintasa, como se describe en la patente de EE.UU. 6.080.555, es más cómodo introducirlo (V) en un cultivo de un organismo que exprese la policétido sintasa mutada. El organismo puede ser un actinomiceto, tal como *Streptomyces* o *Saccharopolyspora*, preferentemente *Streptomyces coelicolor*, como se describe en la patente de EE.UU. 6.066.721 Y en la publicación DE PCT WO 01/83803, o un organismo que no sea un actinomiceto, tal como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en el documento WO 01/31035. El policétido resultante (VI) se aísla opcionalmente del medio de cultivo. En el Ejemplo 1 que se expone más adelante se detalla un procedimiento para este proceso. Usando las policétido sintasas nativas se producen policétidos con $R^3 = OH$.

En un procedimiento, la policétido sintasa nativa ha mutado de modo que produzca un policétido que tenga $R^3 = H$. Procedimientos para producir policétido sintasas mutadas en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.391.594 y 6.403.775.

El policétido (VI) se convierte en una eritromicina (II) a través de una serie de etapas de ajuste que incluyen hidroxilación en C-6, adición de desoxamina al 5-OH, hidroxilación en C-12 y mutilación en micarosa-3''-OH. Otras formas de la eritromicina se pueden preparar usando la subpoblación adecuada de enzimas de ajuste. Por ejemplo, la eritromicina B ($R^4 = H$) se prepara omitiendo la hidroxilación en C-12.

Este ajuste se realiza de un modo más conveniente suministrando policétido (VI) a un cultivo de un organismo que exprese todas las enzimas necesarias para las transformaciones, por ejemplo un mutante de *Saccharopolyspora erythraea* que comprende una policétido sintasa inactiva tal y como se describe en la patente de EE.UU. 6.395.710. Un procedimiento para este proceso se detalla en el Ejemplo 2 que figura más adelante.

ES 2 316 805 T3

Los compuestos de fórmula (I) son agonistas del receptor de la motilina. La tabla 1 muestra los valores de CE_{50} para la activación del receptor de la motilina, medidos mediante un ensayo de influjo de calcio tal y como se describe en Carreras y col., Anal. Biochem. 300,146-151 (2002).

5

10

15

20

25

30

35

Tabla 1					
Activación del receptor de la motilina					
Ref. del compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	CE ₅₀ (μM)
Eritromicina A ¹	CH ₃ CH ₂	CH ₃	OH	OH	1,1
A ¹	CH ₃ CH ₂	CH ₃	OH	OH	2,5
B	CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	0,49
C	FCH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH	5
D	FCH ₂ CH ₂	CH ₂ CH ₃	OH	OH	2
E	FCH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	0,52
F	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH	8,6
G	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	1,4
H	CH ₃ CH ₂ CH ₂	C(CH ₃)CH ₂ CH ₃	OH	OH	3,3
J	CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	H	H	0,16
¹ Compuesto comparativo no según esta invención.					

40

La actividad antibacteriana (Tabla 2) se determinó mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, una cepa sensible a macrólidos, usando procedimientos conocidos en la técnica de microbiología.

45

50

55

60

Tabla 2	
Concentraciones mínimas inhibidoras <i>in vitro</i> frente a ATCC 6301	
Compuesto	CMI I (mg/ml)
Eritromicina A	0,03
A	0,3
F	1
G	>100
J	>100

65

Se analizaron los compuestos para detectar desensibilización del receptor de motilina usando el ensayo basado en células que se describe en Carreras y col., US 2002/0192709 A1 (2002), "Methods for Evaluating Therapeutic

Efficacy". Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, los compuestos mostraron poca o ninguna desensibilización tras la exposición a cantidades 1 ó 10 mM del compuesto analizado.

5

10

15

20

Tabla 3		
Desensibilización del receptor de motilina		
Compuesto	Actividad tras la exposición al compuesto (% de la actividad original conservada)	
	Compuesto 1 mM	Compuesto 10 mM
F	100	100
G	100	100
J	88	88

25

30

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de compuestos que tienen fórmula (I) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la motilidad gástrica alterada. En general, usando los compuestos de la presente invención comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Ejemplos ilustrativos de trastornos que se pueden tratar con los compuestos de la invención se incluyen gastroparesia, enfermedad de reflujo gastroesofágico, anorexia, estasis de la vesícula biliar, íleo paralítico posquirúrgico, esclerodermia, pseudoobstrucción intestinal, gastritis, émesis y estreñimiento crónico (inercia colónica).

35

40

La cantidad terapéuticamente eficaz se puede expresar en forma de una dosis diaria total del compuesto o compuestos de esta invención y se puede administrar a un sujeto en una dosis única o dividida. La dosis diaria total puede ser en cantidades de, por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, o, más habitualmente, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal. Las composiciones para dosis única puede contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas hasta obtener la dosis diaria. En general, los regímenes de tratamiento de acuerdo con la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesite aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg del compuesto(s) de la presente invención al día en dosis única o múltiples.

45

50

Normalmente, el compuesto de la invención será parte de una composición o preparación farmacéutica que puede estar en cualquier forma adecuada tal como forma sólida, semisólida o líquida. En general, la preparación farmacéutica contendrá uno o más de los compuestos de la invención como un ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Normalmente, el ingrediente activo está en mezcla con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicación externa, enteral o parenteral. El ingrediente activo puede mezclarse con, por ejemplo, los portadores habituales farmacéuticamente no tóxicos para comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, pesarios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para usar. Las formas de dosificación oral se pueden preparar esencialmente tal y como describen Hondo y col., 1987, Transplantation Proceedings XIX, Supp. 6: 17-22.

55

Los portadores que se pueden usar incluyen agua, glucosa, lactosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores adecuados para usar en la fabricación de preparaciones en forma sólida, semisólida o licuada. Además, se pueden usar agentes auxiliares estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden utilizar con hidroxipropilmetilcelulosa esencialmente como se describe en la patente de EE.UU. 4.916.138 o con un tensioactivo esencialmente como se describe en la publicación de patente EPO nº 428.169.

60

En resumen, la presente invención proporciona compuestos motílicos y su uso, que además se ilustran mediante los ejemplos siguientes.

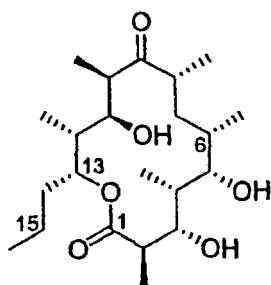
65

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la fabricación de 15-metil-6-desoxieritronolida B (también denominada 13 propil-6-dEB o 15-metil-6-dEB), un producto intermedio usado en la síntesis de ciertos compuestos de esta invención. (Otras eritro-

ES 2 316 805 T3

nolidas se nombran de forma análoga; por ejemplo, la eritronolida con un grupo flúor en lugar de un grupo metilo en la posición 15 se denomina 15-flúor-6-dEB).



15-Metil-6-desoxieritronolida B

Un vial de 1 ml del banco de células de trabajo CH999/pJRJ2 (*Streptomyces coelicolor* que contiene un PKS en el que el dominio de la cetosintasa del módulo 1 se ha inactivado mediante mutación) se descongela y el contenido del vial se añade a 50 ml de Medio 1 en un matraz con placas deflectoras de 250 ml.

El Medio 1 comprende 45 g/l de almidón de maíz; 10 g/l de licor de maíz fermentado; 10 g/l de lavadura de cerveza inactivada seca; y 1 g/l de CaCO_3 . Esta solución se esteriliza en autoclave durante 90 minutos a 121°C . Tras la esterilización, antes de usar se añaden 1 ml/l de tioestrepto de 50 mg/ml filtrado estéril en DMSO 100% y 1 ml/l de emulsión de silicio B antiespuma al 100% (J.T. Baker).

El matraz que contiene las células descongeladas y el Medio 1 se coloca en un incubador/agitador mantenido a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y a 175 ± 23 RPM durante 48 ± 1 horas. A continuación, a un matraz con placas deflectoras de 2,8 ml que contiene 500 ml de Medio 1 se añaden los 50 ml del cultivo. Este matraz se incuba en un incubador/agitador a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y a 175 ± 25 RPM durante 40 ± 10 horas. Después, el cultivo de 500 ml se usa para inocular un fermentador de 10 l que contiene 5 l de Medio 1. El fermentador se controla a 30°C , pH 6,5 mediante la adición de H_2SO_4 2,5N y NaOH 2,5N, a una tasa de agitación de 600 RPM y a un caudal de aire de 1-2 LPM. La espuma se controla mediante la adición de una solución al 50% de Antiespuma B según sea necesario. El cultivo del fermentador se deja crecer en estas condiciones durante 24 ± 5 horas.

Un fermentador de 150 l se prepara mediante esterilización de 100 l de Medio 1 a 121°C durante 45 minutos. Tras el periodo de crecimiento, el contenido del fermentador de 10 l se añade asépticamente a un fermentador de 150 l. El fermentador se controla a 30°C , pH 6,5 mediante la adición de H_2SO_4 2,5N y NaOH 2,5N, saturación de aire $\geq 80\%$ oxígeno disuelto mediante tasa de agitación (500-700 RPM), caudal de aire de (10-50 LPM) y un control de presión retrógrado (10-40 kPa). La espuma se controla mediante la adición de una solución al 50% de Antiespuma B según sea necesario.

A las 35 ± 5 horas, una vez que el oxígeno disuelto ha alcanzado un mínimo y el contenido de CO_2 en el fermentador de gas ha alcanzado un máximo se añade (\pm) (6)-(2R*,3S*)-2-metil-3-hidroxihexanoil-N-propionilcisteamina (propil dicétido) hasta una concentración final de 4 g/l. El propil dicétido se prepara mediante la disolución en metilsulfóxido a una proporción de 2:3 (entre el dicétido y el DMSO) y, después, se esteriliza mediante filtración (0,2 μl , filtro de nylon). La producción de 15-metil-6-desoxieritronolida B (13-propil-6-dEB) cesa el día 8 y se procede a recoger el fermentador. El caldo de fermentación se centrifuga a 20.500 g en una centrífuga Alpha Laval AS-26. El producto se encuentra, predominantemente, en el sobrenadante; la masa celular centrifugada se desecha.

Tras la centrifugación, se realiza la extracción en fase sólida usando una resina HP20 (Mitsubishi). El tamaño de la columna se selecciona en base al volumen y el título del sobrenadante, de modo que no se supera la capacidad de carga de 15 g de 15-metil-6-dEB por litro de resina HP20. El caldo centrifugado se pasa a través del lecho de la resina a un caudal lineal de 300 ± 20 cm/h. La presión en la columna no deberá superar los 103,42 kPa. A continuación, la resina se lava con 2 volúmenes de columna (VC) de agua y después con 2 VC de metanol al 30%, cada uno a una velocidad de 300 ± 20 cm/h. se eluye 13-propil-6-dEB usando 7-10 VC de metanol al 100% a una velocidad de 300 ± 20 cm/h. Durante la elución se recogen fracciones de 1 VC. Después se analizan las fracciones y las que contengan el producto se combinan para dar un producto acumulado que contiene $> 95\%$ de la 15-metil-6-dEB original en el caldo centrifugado. El producto acumulado se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria. La pureza del producto en esta etapa es de 5-35%. El material insoluble en metanol se elimina del producto acumulado mediante suspensión de los sólidos en 3 l de metanol al 100% por 100 l del volumen de caldo original, mezclado durante 20 minutos y filtración.

La etapa de purificación final es la cromatografía usando resina HP20SS (Mitsubishi). El tamaño de la columna se selecciona en base a una cantidad de producto, de modo que no se supera la capacidad de carga de 15 g de 15-metil-6-dEB por litro de resina HP20SS. La solución de metanol filtrada se diluye mediante la adición de un volumen igual de agua. La solución de metanol al 50% se pasa a través de lecho de la resina a un caudal lineal de 300 ± 20 cm/h. a continuación, la columna se lava con 2 VC de metanol al 50% a una velocidad de 300 ± 20 cm/h. El producto se eluye usando 12 VC de metanol al 70% a una velocidad de 300 ± 20 cm/h. Durante la elución se recogen fracciones de 1 VC. Después se analizan las fracciones y las que contengan > 50 mg/l de 15-metil-6-dEB y que tengan una pureza

ES 2 316 805 T3

cromatográfica > 20% se combinan. El producto acumulado se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria. La pureza del producto en esta etapa es > 65% y es adecuada para la bioconversión en la eritromicina adecuada.

5 Otros análogos modificados de 6-dEB se preparan de acuerdo con el mismo procedimiento, sustituyendo el dicétido tioéster adecuado en lugar del propil dicétido. Por tanto, el 15-flúor-6-dEB se prepara usando (\pm) (2R*,3S*)-5-fluoro-2-metil-3-hidroxipentanoil-N-propionilcisteamina.

10 Asimismo, la síntesis de 15-metil-6-dEB y 15-fluoro-6-dEB se enseña en Ashley y col., documento WO 00/44717 A2 (2000), cuya descripción se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia.

Ejemplo 2

15 Este ejemplo describe la conversión de 15-metil-6-desoxieritronolida B en 15-metileritromicina A (fórmula II, R¹=CH₂CH₂CH₃; R³ = R⁴ = OH). Las técnicas de conversión también se enseñan en Carreras y col., J. Biotechnology, 92, 217-228 (2002).

20 Un vial de 1 ml del banco de células de trabajo K39-14V (un mutante *eryA* de *S. erythraea* incapaz de producir 6-dEB) se descongela y el contenido del vial se añade a 50 ml de Medio 2 en un matraz con placas deflectoras de 250 ml.

25 El medio 2 comprende 16 g/l de almidón de maíz; 10 g/l de dextrina de maíz; 15 g/l de harina de soja; 4 g/l de CaCO₃; 5 g/l de licor fermentado de maíz; 6 g/l de aceite de soja; 2,5 g/l de NaCl y 1 g/l de ((NH₄)₂SO₄). Esta solución se esteriliza mediante autoclave durante 60 minutos a 121°C y antes de usar se añaden 1 ml/l de emulsión de silicio B antiespuma (J.T. Baker) al 100%.

30 El matraz que contiene las células descongeladas y el Medio 2 se coloca en un incubador/agitador mantenido a 34 ± 1°C y a 175 ± 25 RPM durante 48 ± 10 horas. A continuación, a un matraz con placas deflectoras de 2,8 ml que contiene 500 ml de Medio 2 se añaden los 50 ml del cultivo. El matraz se incuba en un incubador/agitador a 34 ± 1°C y 175 ± 25 RPM durante 48 ± 10 horas. Después, el cultivo de 500 ml se usa para inocular un fermentador de 10 l que contiene 5 l de Medio 2. El fermentador se controla a 34°C, pH 7,0 mediante la adición de H₂SO₄ 2,5N y NaOH 2,5N, a una tasa de agitación de 600 RPM y a un caudal de aire de 1-2 LPM. La espuma se controla mediante la adición de una solución al 50% de Antiespuma B según sea necesario. El cultivo del fermentador se deja crecer en estas condiciones durante 24 ± 5 horas.

35 Un fermentador de 150 l se prepara mediante esterilización de 100 l de Medio 3 a 121°C durante 45 minutos. El medio 3 comprende 17,5 g/l de almidón de maíz; 16 g/l de dextrina de maíz; 16,5 g/l de harina de soja; 4 g/l de CaCO₃; 5 g/l de licor fermentado de maíz; 3 g/l de aceite de soja; 3,5 g/l de NaCl y 1 g/l de ((NH₄)₂SO₄). Tras el periodo de crecimiento, el contenido del fermentador de 10 l se transfiere aseptícamente al fermentador de 150 l. El fermentador se controla a 34°C, pH 7,0 mediante la adición de H₂SO₄ 2,5N y NaOH 2,5N, saturación de aire ≥ 80% oxígeno disuelto mediante tasa de agitación (500-700 RPM), caudal de aire de (15-50 LPM) y un control de presión retrógrado (10-40 kPa). La espuma se controla mediante la adición de una solución al 50% de Antiespuma B.

40 A 24 ± 5 horas se inicia la alimentación a 58-60 ml/hora de 15% de dextrina (p/v). La solución de dextrina se mezcla continuamente durante el periodo de alimentación. A las 24 ± 5 horas se añaden 25 gramos de 13-propil-6-dEB al fermentador. La 13-propil-6-dEB se prepara mediante solubilización de 25 gramos de 13-propil-6-dEB en 400-600 ml de etanol al 100% y filtración (0,2 mm, filtro de nylon). La conversión de 13-propil-6-dEB en 13-propil-eritromicina A cesa tras 60 ± 10 horas y el fermentado se recoge. El caldo de fermentación se centrifuga a 20.500 g en una centrífuga Alpha Laval AS-26. El producto se encuentra, predominantemente, en el sobrenadante; la masa celular centrifugada se desecha.

55 Tras la centrifugación, se realiza la extracción en fase sólida usando una resina HP20 (Mitsubishi). El tamaño de la columna se selecciona en base al volumen y el título del sobrenadante, de modo que no se supera la capacidad de carga de 15 g de 15-metileritromicina A por litro de resina HP20. El caldo centrifugado se ajusta a un pH 9, después se pasa a través del lecho de la resina a un caudal lineal de 275 ± 25 cm/h. La presión en la columna no deberá superar los 103,42 kPa. A continuación, la resina se lava con 1 volumen de columna (VC) de agua a un caudal de 275 ± 25 cm/h. Se eluye 15-metileritromicina usando 5 VC de metanol al 100% a una velocidad de 275 ± 25 cm/h. Durante la elución se recogen fracciones de 1 VC. A continuación se analizan las fracciones y se combinan las que contienen producto para dar un producto acumulado. El producto acumulado se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria.

60 El material insoluble en metanol se elimina del producto acumulado mediante suspensión de los sólidos en 1 l de metanol al 100% por 100 l del volumen de caldo original, ajusta hasta un pH de 9 y filtración. El producto acumulado (filtrado) se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria.

65 La 15-metileritromicina A se extrae del producto acumulado (sólidos) mediante adición de 2 l de hexano:acetona a 4:1 por 100 l de volumen del caldo original, mezcla durante 20 minutos y filtración. Los sólidos restantes se extraen del mismo modo dos veces más y los filtrados se combinan. El producto acumulado se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria.

ES 2 316 805 T3

La etapa de purificación final es la cromatografía usando resina HP20SS (Mitsubishi). El tamaño de la columna se selecciona en base a una cantidad de producto, de modo que no se supera la capacidad de carga de 15 g de 15-metileritromicina A por litro de resina HP20SS. Los sólidos de las etapas anteriores se disuelven en 1 l de metanol por 100 l de volumen de caldo original y se añade un volumen igual de agua. La solución de metanol al 50% se pasa a través de lecho de la resina a un caudal lineal de 275 ± 25 cm/h. A continuación, la columna se lava con 1 VC de metanol al 50%, después 3 CV de metanol al 60%, cada uno a una velocidad de 3275 ± 25 cm/h. El producto se eluye usando 3 VC de metanol al 70% a una velocidad de 275 ± 25 cm/h. Durante la elución se recogen fracciones de 1 VC. Después se analizan las fracciones y se combinan las que contienen 15-metileritromicina A. El producto acumulado se reduce a sólidos usando evaporación rotatoria.

Otras eritromicinas modificadas se preparan usando el mismo procedimiento y sustituyendo el análogo de 6-dEB adecuado en lugar de 15-metil-6-dEB. Por tanto, la 15-fluoroeritromicina A se prepara usando 15-flúor-6-dEB.

15 Ejemplo 3

Este ejemplo describe un procedimiento general para la preparación de (9S)-9-dihidroeritromicinas (fórmula II), con referencia al Esquema 1.

Una solución de la eritromicina (0,36 mmol) en etanol/éter 1:3 (20 ml) se enfría hasta -15°C y se trata con borohidruro sódico (0,9 mmol). La reacción se deja calentar lentamente hasta la temperatura ambiente durante 4 horas. El exceso de borohidruro se destruye mediante la adición de tampón fosfato, pH 6, y se añaden 10 ml de trietanolamina. Después de 1 hora, la mezcla se extrae con acetato de etilo, se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra hasta sequedad a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando acetona:hexanos a 1:1 con 1% de trietilamina. Los compuestos siguientes se prepararon usando este procedimiento:

(9S)-9-dihidroeritromicina A;

(9S)-9-dihidro-15-metileritromicina A; y

(9S)-9-dihidro-15-fluoroeritromicina A.

35 Ejemplo 4

Este ejemplo describe un procedimiento general para la preparación de (N-desmetil-(9S)-9 dihidroeritromicinas (fórmula III), con referencia al Esquema 1.

A una solución de la (9S)-9-dihidroeritromicina (150 mg) en 10 ml de metanol/agua a 8:2 se añade secuencialmente trihidrato acetato sódico (139 mg) y yodo (62 mg). Una solución 0,2M de LiOH (1 ml) se añade en 4 porciones en 1 hora. La reacción completa se determina mediante análisis cromatográfico en capa fina. El exceso de reactivos se inactiva mediante la adición de tiosulfato sódico saturado y los volátiles se eliminan a presión reducida y la mezcla se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con NaHCO_3 saturado, se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y se concentra para dar el producto bruto. La cromatografía en gel de sílice (acetona/hexanos + 2% de Et 3N) da el producto puro. Los compuestos siguientes se prepararon usando este procedimiento:

N-desmetil (9S)-9-dihidroeritromicina A;

N-desmetil (9S)-9-dihidro-15-metileritromicina A; y

N-desmetil (9S)-9-dihidro-15-fluoroeritromicina A.

55 Ejemplo 5

Este ejemplo describe la preparación de N-desmetil-N-R2-(9S)-9-dihidroeritromicinas, con particular referencia al Esquema 1, compuestos que tienen la fórmula II ($\text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{OH}$).

Una mezcla del análogo N-desmetil (9S)-9-dihidro-eritromicina A (0,035 mmol), diisopropiletilamina (62,5 μl), R^2I (1,3 mmol) y acetonitrilo (1 ml) se sella y agita a 70°C durante la noche. La mezcla se enfría, diluye con NaHCO_3 acuoso y se extrae con acetato de etilo. El extracto se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando hexanos/acetona + 1% de Et_3N . Los compuestos siguientes se prepararon de acuerdo con este procedimiento:

(a) N-desmetil-N-etil (9S)-9-dihidro-15-fluoroeritromicina A, usando N-desmetil (9S)-9 dihidro-15-fluoroeritromicina A y yoduro de etilo;

ES 2 316 805 T3

(b) N-desmetil-N-isopropil (9S)-9-dihidro-15-fluoroeritromicina A, usando N-demetil (9S)-9 dihidro-15-fluoroeritromicina A y yoduro de isopropilo;

5 (c) N-desmetil-N-isopropil (9S)-9-dihidro-15-metileritromicina A, usando N-demetil (9S)-9 dihidro-15-metileritromicina A y yoduro de isopropilo;

(d) N-desmetil-N-(2-butil) (9S)-9-dihidro-15-metileritromicina A, usando N-demetil (9S)-9 dihidro-15-metileritromicina A y 2-yodobutano.

10

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la etapa de desmetilación del Esquema 1A, con referencia específica a N desmetil-15-metileritromicina A (compuesto III; $R^1 = 1$ -propilo; $R^3 = R^4 = OH$), aunque debe entenderse que el procedimiento
15 generalmente es aplicable a otros compuestos análogos.

Una mezcla de 15-metileritromicina A (compuesto III, $R^1 = 1$ -propilo; $R^3 = R^4 = OH$; 5,00 g, 6,15 mmol) y trihidrato acetato sódico (4,18 g, 30,75 mmol) en metanol-agua (8:2 V/V, 100 ml) se agitó a 50°C. A continuación se añadió yodo (1,56 g, 6,15 mmol). Durante la reacción se añadió hidróxido sódico 1N (6,15 ml) en porciones pequeñas.
20 La reacción completa se determinó mediante análisis cromatográfico en capa fina. Tras la eliminación del disolvente, la mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo, se secó sobre sulfato sódico. El producto bruto (4,97 g) se obtuvo en forma de un sólido amarillo, que se usó para la siguiente etapa sin más purificación.

25 Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la etapa de alquilación del Esquema 1A, con referencia específica a N desmetil N-isopropil-15-metileritromicina A (compuesto IV⁷, $R^1 = 1$ -propilo; $R^2 =$ isopropilo; $R^3 = R^4 = OH$), aunque debe entenderse que el procedimiento generalmente es aplicable a otros compuestos análogos.

30

Una mezcla de la N-desmetil-15-metileritromicina A del ejemplo anterior (2,50 g, 3,41 mmol), diisopropiletilamina (6,1 ml, 10 equiv.), 2-yodopropano (10,2 ml, 30 equiv.) en acetonitrilo (50 ml) se calentó en un baño de 70°C. Se añadieron agua y bicarbonato sódico saturado. La solución se extrajo tres veces con acetato de etilo y se secó sobre sulfato magnésico. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (3:1 hexano:acetona, 1% de trietilamina) para dar N desmetil-N-isopropil-15-metileritromicina A (1,80 g, rendimiento del 75% para dos etapas). m/z : 777,0 (MH); RMN ¹³C (CDCl₃): 221,86, 175,62, 103,11, 96,15, 83,30, 79,85, 78,01, 75,10, 74,90, 74,59, 72,58, 70,35, 68,91, 68,75, 65,48, 62,79, 52,49, 49,47, 45,12, 44,76, 39,32, 38,43, 37,85, 34,96, 33,06, 30,76, 30,19, 26,93, 21,48, 21,41, 20,99, 20,46, 19,47, 18,62, 18,27, 16,15, 15,84, 14,00,12,04, 9,01.

40

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la etapa de reducción de carbonilo del Esquema 1A, con particular referencia a N desmetil-N-isopropil-15-metil-(9S)-9-dihidroeritromicina A (compuesto I; $R^1 = 1$ -propilo; $R^2 =$ isopropilo; $R^3 = R^4 = OH$), aunque debe entenderse que el procedimiento generalmente es aplicable a otros compuestos análogos.

45

El compuesto N-desmetil-N-isopropil-15-metileritromicina A (1,74 g, 2,24 mmol) se disolvió en metanol-éter (1:3 V/V, 50 ml), después se enfrió hasta -20°C. Se añadió borohidruro sódico (189 mg, 5,0 mmol). A continuación, la mezcla se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente durante un periodo de 3 horas. El exceso de borohidruro sódico se destruyó mediante la adición de tampón fosfato a pH 6,0, seguido por trietanolamina (10 ml). Después de 30 minutos, la mezcla se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre sulfato magnésico. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, (3:1 hexano-acetona con 1% de trietilamina). Se obtuvo N-desmetil-N-isopropil-15-metil-(9S)-9-dihidroeritromicina A pura (1,63 g, rendimiento de 93%). m/z : 779,0 (MH); RMN-¹³C (CDCl₃): 177,28, 102,59, 95,81, 83,45, 82,76, 78,81, 77,86, 75,68, 75,03, 74,67, 72,68, 70,38, 70,24, 69,26, 65,97, 62,28, 52,52, 49,34, 44,83, 42,00, 36,78, 34,80, 34,37, 33,01, 31,96, 31,02, 30,76, 25,46, 21,58, 21,28, 21,10, 20,41, 19,93, 19,74, 18,27, 16,37, 14,86, 14,30, 14,02, 9,17.

55

Ejemplo 9

60

Este ejemplo describe la construcción de una cepa de *Saccharopolyspora erythraea* (K24-1/159 44) capaz de biosintetizar 11-desoxieritromicinas, con particular referencia a 11-desoxieritromicina B, que son útiles como productos intermedios para la síntesis de ciertos compuestos de esta invención.

65 El compuesto 11-desoxieritromicina B se puede prepara en una fermentación sencilla en una célula huésped sometida a ingeniería genética que expresa una versión modificada del conjunto de genes DEBS (*eryAI*, *eryAII* y *eryAIII*). El gen *eryAI* se somete a ingeniería mediante sustitución del dominio de la cetoreductasa en el módulo 2 con un casete que contiene un dominio de deshidratasa, un dominio de enoilreductasa y un dominio de cetoreductasa to-

5 mados de, por ejemplo, el módulo 1 de la rapamicina PKS. Los procedimientos para la sustitución de dominios se proporcionan en, por ejemplo, McDaniel, documento US 6.403.775 (2002), que se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia. El gen *eryAI* sometido a ingeniería se incorpora junto con los genes *eryAII* y *eryAIII* en una célula huésped competente en la producción de eritromicinas una vez que se han añadido los genes de la PKS
 10 sometidos a ingeniería. En formas de realización preferidas, estas células huésped son “huéspedes limpios”, en las que se han eliminado sus genes nativos de PKS. Entre los ejemplos de huéspedes adecuados se incluyen el huésped limpio *Saccharopolyspora erythraea* K24-1 y las cepas de *Saccharopolyspora erythraea* que poseen genes mutados de la PKS, tales como los descritos en Santi y col., documento US 2002/0004229 A1 (2002). En la cepa K24-1 se ha sustituido los genes nativos *eryAI*, *eryAII* y *eryAIII* con el sitio de inserción del fago *attB* del actinofago Φ C31, que se describe en la patente de EE.UU. 5.190.871, que se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia, y seguido por el promotor *ermE**. Esto permite que los vectores plasmídicos que comprenden el sitio de inserción complementario del fago *attP* junto con los genes se puedan integrar en el cromosoma en el sitio *attB* en presencia de una integrasa del fago. Entre los ejemplos de los vectores del fago de integración adecuado se incluyen pSET152 y sus derivados.

15 La preparación de la cepa huésped de partida *Saccharopolyspora erythraea* K24-1 se describe en Santi y col., documento US 2002/0004229 A1 (2002), ya la cepa se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection), P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, EEUU, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest del 12 de marzo de 2003 con número de registro PTA-5054.

20 pKOS159-8 y pKOS159-10 son derivados de pSET152 que contienen los genes *eryA* bajo el control del promotor *rmEp** y del par promotor-activador *actIp/actII-ORF4*, respectivamente. Un fragmento de *NsiI* de 35 kb de pKAO127 que lleva los genes *eryA* y la región *actIp/actII-ORF4* se clonó en pKOS97-64c (derivado de a pSET152 que contiene el promotor *ermEp** y un sitio cos de λ) para hacer pKOS159 10. El terminador de la transcripción *fd* del fragmento pKAO127 impide la expresión de cualquier gen del promotor *ermEp** en este plásmido. El fragmento que contiene el terminador *fd* y el segmento *actIp/actII-ORF4* en pKOS159-10 se eliminó mediante digestión con *PacI* y auto-ligadura para generar pKOS159-8. Para la expresión de los genes *eryA* bajo el control de su promotor natural, se construyó pKOS159-31 clonando el fragmento *NdeI-XbaI* portador de los genes *eryA* (y el sitio cos de λ) de pKOS159-10 y fragmento del lado izquierdo de *eryAI* amplificado por PCR digerido con *XbaI-NdeI* anterior en pSET152 digerido con
 25 *XbaI*. El pKOS159 33, que contiene los genes *eryA* de *S. erythraea* K41-135 se construyó de un modo análogo usando el fragmento *eryA* de pKOS108-04. Asimismo, todos los plásmidos de expresión de DEBS sometidos a ingeniería se fabricaron usando pKOS 159-31 como estructura y las enzimas de restricción adecuadas para mover el fragmento de *eryA* genéticamente modificado de los plásmidos existentes.

30 pKOS159-44 es un plásmido derivado de pSET152 (Bierman y col., Gene 116, 43-49 (1992), “Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.”) que tiene genes *eryA* genéticamente modificados (KR2 \rightarrow rapDH/ER/KR1) bajo el control del promotor *eryAI* (Rodríguez y col., J. Ind. Microbio. Biotechnol., “Rapid Engineering of Polyketide Overproduction by Gene Transfer to Industrially Optimized Strains”, publicado en la web como el documento N° 10.1007/s10295-003-0045-1 (<http://link.springer-ny.com>) (16 de abril de 2003)). Un fragmento de *NdeI-NsiI* de 30 kb (que portan genes *eryA* genéticamente modificados) de PKOS11-66 (Xue y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96,11740-11745 (1999), “A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides”) se aisló y ligó en un fragmento *NdeI NsiI* de 8 kb de pKOS159-33 (Rodríguez *et al.*, citado *ant.*), que contiene el vector pSET152, el promotor *eryAp* y el sitio cos de λ). La mezcla de unión se empaquetó usando extracto de de empaquetado Gigapack III Gold (Stratagene) y se usó para infectar *E. coli* XL-1 Blue. Los recombinantes se
 35 seleccionaron en placas de agar LB que contienen 60 μ g/ml de apramicina. El ADN del plásmido pKOS159-44 se aisló y comprobó mediante digestión de restricción.

40 La cepa K24-1 de *S. erythraea* que contiene una delección cromosómica de los tres genes *eryA* y la inserción de los loci *attB* para el fago ϕ C31 de *Streptomyces* procedente de *Streptomyces lividans*, seguido por el promotor *ermE** en su lugar, se preparó recogiendo esporas de las cepas cultivadas en placas 1-2M1 (por litro, 5 g de glucosa, 5 g de tristona, 0,5 g de clorhidrato de betaína, 5 g de almidón de maíz, 1 g de licor fermentado (50%), 200 mg de MgSO₄·7H₂O, 2 mg de ZnSO₄·7H₂O, 0,8 mg de CuSO₄·5H₂O, 0,2 mg de CoCl₂·6H₂O, 4 mg de FeSO₄·7H₂O, 80 mg de CaCl₂·6H₂O, 150 mg de KH₂PO₄, 10 g de NaCl, 20 g de agar) filtrando las esporas a través de algodón estéril y resuspendiéndolas en 1 ml de glicerol al 20%. Las suspensiones de esporas se almacenaron a -20°C. A 5 ml de 2xYT se añadió una alícuota de 20 μ l de la suspensión de esporas y se incubó a 30°C con agitación. Tras
 45 1 hora, las esporas se recogieron mediante centrifugación células receptoras). Las células donantes se prepararon mediante transformación de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con pKOS159-44 y seleccionando sólo según la resistencia a apramicina. De la placa de transformación primaria se escogieron varias colonias y se usaron para inocular 5 ml de LB con cloranfenicol (10 μ g/ml), canamicina (100 μ g/ml) y apramicina (60 μ g/ml). Las células se cultivaron a 37°C durante 3-4 horas (DO600 de 0,4-0,6), se recogieron mediante centrifugación, se lavaron en 5 ml de LB, se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de LB. La transferencia conjugada entre las células donantes y receptoras se llevó a cabo mediante la resuspensión de las células receptoras en la suspensión de donantes de 100 μ l t las células se diseminaron en placas R5 (Hopwood y col., Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual (The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985), que contiene 50 μ g/ml de ácido malidíxico y se incubaron a 34°C
 50 durante 16 horas. Después, las placas se superpusieron con 3 ml de agar nutritivo blando que contiene 1 mg de ácido malidíxico y 2 mg de apramicina. Los exconjugantes K24 1/159-44 se observaron tras 48 horas de incubación adicional.

ES 2 316 805 T3

Ejemplo 11

Este ejemplo describe la conversión de 11-desoxieritromicina B en N-demetil-N-isopropil 11 desoxi-(9S)-9-dihidroeritromicina B (compuesto I, R₁ = etilo, R₂ = isopropilo y R₃ = R₄ = H; compuesto J, Tabla 1), usando el enfoque del Esquema 1.

El compuesto 11-desoxieritromicina B (200 mg, 0,285 mmol) se redujo generalmente siguiendo el procedimiento del ejemplo 8 para dar (9S)-9-dihidroeritromicina B (94 mg, rendimiento de 47%). m/z 705,0 (MH); RMN-¹³C (CDCl₃): 176,82, 0,102, 0,38, 95,82, 83,04, 80,95, 80,23, 79,01, 77,82, 74,89, 72,71, 70,89, 69,14, 66,04, 65,12, 49,28, 44,67, 42,23, 40,28 (2x), 37,36, 0,34, 0,81, 33,50, 32,58, 29,39, 28,90, 25,29, 25,17, 21,53, 21,16, 20,04, 18,13, 17,98, 13,82, 10,59, 10,22, 9,24.

Generalmente siguiendo los procedimientos de los ejemplos 6 y 7, la 11-desoxi-(9S)-9-dihidroeritromicina B (94 mg, 0,134 mmol) se convirtió después en N-desmetil-N-isopropil-11-desoxi-(9S)-9-dihidroeritromicina B (57 mg, rendimiento del 58%). m/z: 733,0 (MH); RMN-¹³C (CDCl₃): 176,98, 102,05, 95,55, 82,33, 81,11, 80,22, 78,90, 77,89, 74,93, 72,69, 70,29, 69,11, 65,98, 65,16, 52,53, 49,28, 44,52, 42,38, 37,27, 34,91, 34,73, 33,38, 32,96, 32,60, 30,99, 29,38, 25,18 (2x), 21,54, 21,22, 21,05, 20,34, 19,91, 18,12, 17,85, 13,68, 10,45, 10,21, 9,10.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I)

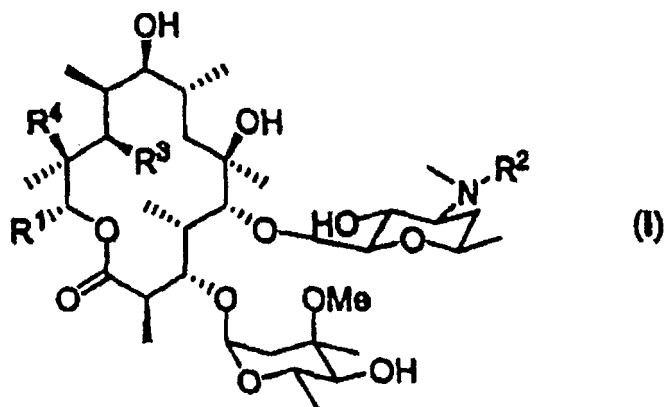
5

10

15

20

25



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

30

R¹ es alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, alquino C₄-C₁₀ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido o heterociclo sustituido o insustituido;

35

R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido o heterociclo sustituido o insustituido;

R³ es H u OH; y

R⁴ es H u OH, o R³ y R⁴, tomados en juntos, forman O-(C=O)-O;

40

con la condición de que cuando (a) R¹ es etilo y (b) R³ es OH o R³ y R⁴, tomados juntos, forman -C(=O)-O, entonces R² no es H o metilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

45

R¹ es alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido o heterociclo sustituido o insustituido;

R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; y

50

R³ y R⁴ son OH,

con la condición de que cuando R¹ es etilo, entonces R² no es H o metilo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

55

R¹ es alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido;

R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alqueno C₂-C₅ sustituido o insustituido, alquino C₂-C₅ sustituido o insustituido; y

60

R³ y R⁴ son OH,

con la condición de que cuando R¹ es etilo, entonces R² no es H o metilo.

65

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

R¹ es etilo sustituido;

ES 2 316 805 T3

R² es etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; y

R³ y R⁴ son OH.

5 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

R¹ es etilo sustituido;

10 R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alquenilo C₂-C₅ sustituido o insustituido, alquinilo C₂-C₅ sustituido o insustituido; y

R³ y R⁴ son OH.

15 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

R¹ es etilo sustituido;

R² es H, etilo, propilo, isopropilo o 2-butilo; y

20 R³ y R⁴ son OH.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

25 R¹ es propilo;

R² es H, alquilo C₁-C₅ sustituido o insustituido, alquenilo C₂-C₅ sustituido o insustituido, alquinilo C₂-C₅ sustituido o insustituido; y

30 R³ y R⁴ son OH.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

R³ y R⁴ son, de forma independiente, H u OH;

35 R¹ se selecciona del grupo constituido por etilo, 2-fluoroetilo y 1-propilo; y

R² se selecciona del grupo constituido por metilo, etilo, isopropilo y 2-butilo; con la condición de que cuando R¹ es etilo y R³ es OH, R² no es metilo.

40 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹, R², R³ y R⁴ son de acuerdo con las combinaciones expuestas en la tabla siguiente:

45

R ¹	R ²	R ³	R ⁴
CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH
FCH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH
FCH ₂ CH ₂	CH ₂ CH ₃	OH	OH
FCH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH
CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH
CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH
CH ₃ CH ₂ CH ₂	C(CH ₃)CH ₂ CH ₃	OH	OH
CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	H	H

65

10. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo compuesto por:

5

10

15

20

25

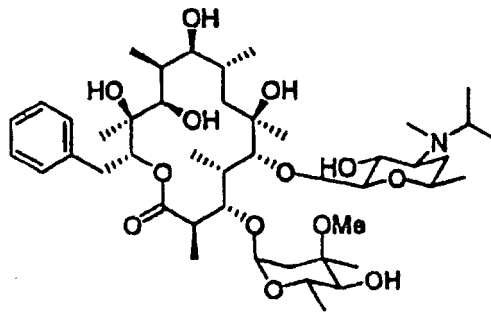
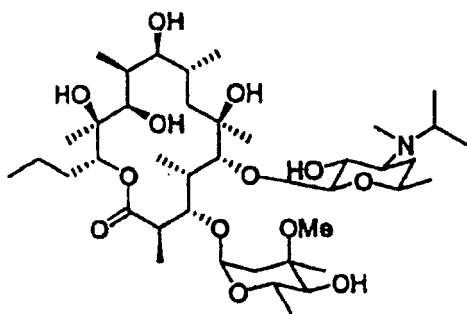
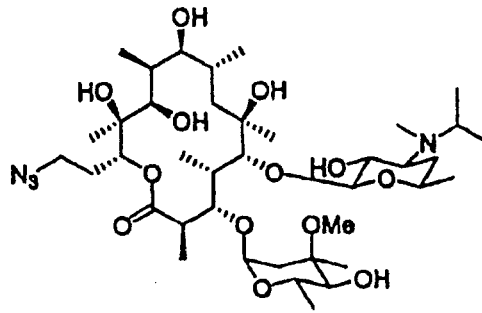
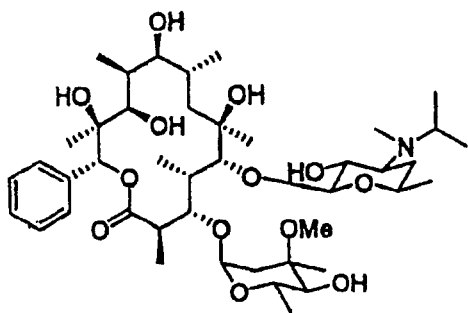
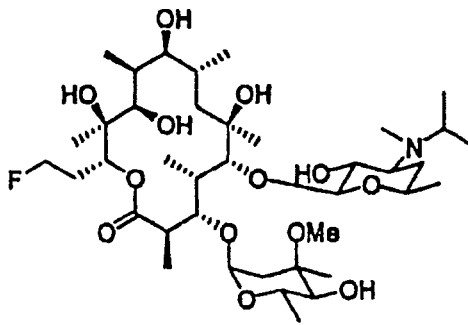
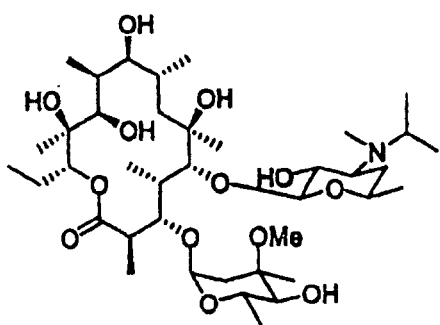
30

35

40

45

50

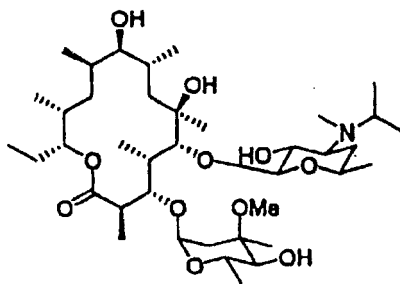


y

55

60

65

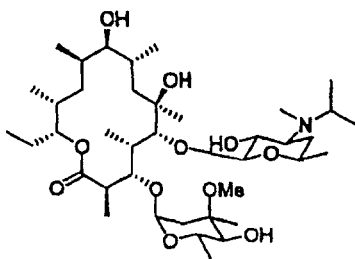


ES 2 316 805 T3

11. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene una estructura de la fórmula:

5

10

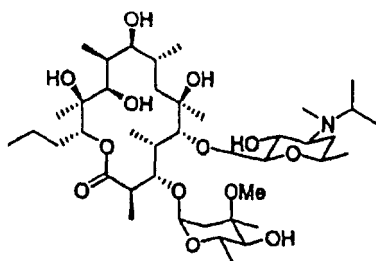


15

12. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene una estructura de la fórmula:

20

25



30

13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar en el tratamiento de un trastorno de la motilidad gástrica.

40

15. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno gástrico en un paciente.

45

50

55

60

65