

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 521**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/409** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A01N 43/36** (2006.01)  
**A01N 43/50** (2006.01)  
**A01N 59/00** (2006.01)  
**A01N 59/06** (2006.01)  
**A01N 59/16** (2006.01)  
**A01N 59/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09759759 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2355816**

54 Título: **Compuestos de porfirina para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de biopelículas microbianas**

30 Prioridad:

**24.10.2008 US 193054 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.09.2014**

73 Titular/es:

**DESTINY PHARMA LIMITED (100.0%)  
Sussex Innovation Centre Science Park Square  
Falmer Brighton BN1 9SB, GB**

72 Inventor/es:

**LOVE, WILLIAM GUY y  
RHYS-WILLIAMS, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 491 521 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 de porfirina para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de biopelículas microbianas

### 5 **Campo**

La presente invención se refiere a nuevos usos de compuestos de porfirina y, en particular, al uso de dichos compuestos en la eliminación, inhibición o prevención de biopelículas microbianas (en medicina así como en entornos domésticos, comerciales e industriales).

10

### **Antecedentes**

La formación de biopelículas es una estrategia de supervivencia bacteriana universal. Las biopelículas se producen tanto en soportes inertes como vivos, en entornos naturales y en instalaciones industriales.

15

Una biopelícula es una comunidad estructurada de microorganismos encapsulados dentro de una matriz polimérica auto-desarrollada y que prefiere una superficie viva o inerte. Además, las biopelículas a menudo se caracterizan por la unión de superficie, heterogeneidad estructural, diversidad genética, interacciones complejas de la comunidad, y una matriz extracelular de sustancias poliméricas.

20

Los organismos unicelulares por lo general presentan dos modos distintos de comportamiento. El primero es la capacidad de movimiento libre familiar, o planctónico, forma en la cual las células individuales flotan o nadan independientemente en algún medio líquido. El segundo es un estado unido en el cual las células se empaquetan de forma muy cercana y se unen firmemente entre sí y normalmente forman una superficie sólida. Un cambio de contentamiento es desencadenado por muchos factores, que incluyen la detección del quórum, así como otros mecanismos que varían entre especies. Cuando una célula cambia de modo, esta experimenta un cambio fenotípico en el comportamiento en el que grandes conjuntos de genes están regulados de forma positiva y de forma negativa.

25

### Formación

30

La formación de una biopelícula comienza con la unión de microorganismos que flotan libremente a una superficie. Estos primeros colonizadores se adhieren a la superficie inicialmente a través de fuerzas de Van der Waals reversibles y débiles. Si los colonizadores no se separan inmediatamente de la superficie, se pueden anclar por sí mismos de forma más permanente usando estructuras de referencia celular tales como los pili.

35

Los primeros colonizadores facilitan la llegada de otras células al proporcionar sitios de adherencia más diversos y al comenzar a construir la matriz que soporta la biopelícula unidad. Algunas especies no son capaces de unirse a una superficie por sí mismas pero a menudo son capaces de anclarse por sí mismas a la matriz o directamente a los primeros colonizadores. Es durante esta colonización cuando las células son capaces de comunicarse a través de la detección del quórum. Una vez que ha comenzado la colonización, la biopelícula crece a través de la combinación de división y reclutamiento celular. La etapa final de la formación de la biopelícula se conoce como desarrollo, y es la etapa en la que la biopelícula se establece y solamente puede cambiar de forma y tamaño. Este desarrollo de biopelículas permite que las células se hagan más resistentes a los antibióticos. Se cree que las biopelículas bacterianas son refringente es a la acción de los antibióticos por al menos dos razones; la biopelícula forma una barrera física que evita la penetración del antibiótico en la bacteria, y en segundo lugar la bacteria dentro de biopelículas tiende a crecer más lentamente, proporcionando de este modo un perfil metabólico más bajo para los antibióticos a los que se dirige.

40

45

### Propiedades

50

Por lo general, las biopelículas se encuentran en sustratos sólidos sumergidos o expuestos a alguna solución acuosa, aunque pueden formar una especie de esteras flotantes sobre superficies líquidas y también en la superficie de hojas, en particular en climas con una humedad elevada. Cuando se proporcionan suficientes recursos para el crecimiento, una biopelícula crecerá rápidamente para ser macroscópica. Las biopelículas pueden contener muchos tipos diferentes de microorganismos, por ejemplo, bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas; realizando cada grupo funciones metabólicas especializadas. Sin embargo, algunos organismos formarán películas de monoespecies en determinadas condiciones.

55

Parece que las biopelículas son capaces de defenderse a sí mismas frente a agentes desinfectantes y antibióticos, fagocitos y el sistema inmune humano.

60

### Matriz extracelular

La biopelícula se mantiene en conjunto y se protege con una matriz de compuestos poliméricos excretados denominada EPS. EPS es una abreviatura para cualquier sustancia polimérica o exopolisacárida. Esta matriz proteger las células dentro de ella y facilita la comunicación entre ellas a través de señales bioquímicas. Se ha

65

encontrado que algunas biopelículas contienen canales de agua que ayudan a distribuir nutrientes y moléculas de señalización. Esta matriz es lo suficientemente fuerte de modo que en determinadas condiciones, las biopelículas pueden llegar a fosilizarse.

- 5 Las bacterias que viven en una biopelícula tienen por lo general propiedades significativamente diferentes de las de las bacterias que flotan libremente de las mismas especies, ya que el entorno denso y protegido de la película les permite cooperar e interactuar de diversas maneras. Un beneficio de este entorno es la mayor resistencia a detergentes y antibióticos, ya que la matriz extracelular densa y la capa exterior de las células protegen el interior de la comunidad. En algunos casos, la resistencia a los antibióticos puede aumentar en 1000 veces (véase Stewart P, Costerton J, 2001, Lancet 358 (9276): 135-8).

### Ejemplos

15 Las biopelículas son ubicuas. Casi todas las especies de microorganismos, no solamente bacterias y arqueas, tienen mecanismos mediante los cuales se pueden adherir a superficies y las unas a las otras.

- Las biopelículas se pueden encontrar en rocas y cantos rodados en el fondo de la mayoría de los arroyos o ríos y a menudo se forman en la superficie de charcos con agua estancada. De hecho, las biopelículas son componentes importantes de las cadenas alimenticias en ríos y arroyos y son picoteadas por los invertebrados acuáticos de los que se alimentan muchos peces.
- Las biopelículas crecen en piscinas naturales ácidas y calientes en el Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos de América) y en glaciares en la Antártida.
- Las biopelículas pueden crecer en las luchas muy fácilmente ya que proporcionan un entorno húmedo y cálido para que la biopelícula se desarrolle.
- Las biopelículas se pueden desarrollar en los interiores de las tuberías conduciendo a la obstrucción y corrosión. Las biopelículas en suelos y mostradores pueden hacer difícil la higiene en las áreas de preparación de alimentos. Se sabe que las biopelículas en sistemas de agua de refrigeración reducen la transferencia de calor (véase W.G. Characklis, *et al.*, 1981, Heat Trans. Eng. 3: 23-37).
- La adherencia bacteriana en cascos de barcos sirve como base de obstrucción biológica de los buques de navegación marítima. Una vez que se forma una película de bacterias, es más fácil que se unan otros organismos marinos, tales como los percebes. Dicha obstrucción biológica puede inhibir la velocidad de la embarcación en hasta un 20 %, haciendo que los viajes sean más largos y necesiten combustible adicional. El tiempo en el muelle seco para volver a ajustar y a pintar reduce la productividad de los activos de transporte marítimo, y la vida útil de los barcos también se ve reducida debido a la corrosión y a la retirada mecánica (raspado) de organismos marinos los cascos de los barcos.
- Además, las biopelículas también se pueden aprovechar con fines constructivos. Por ejemplo, muchas plantas de tratamiento de aguas residuales incluyen una etapa de tratamiento en la que el agua residual pasa sobre biopelículas que crecen en los filtros, que extraen y digieren compuestos orgánicos. En dichas biopelículas, las bacterias son responsables principalmente de la eliminación de la materia orgánica (BOD); mientras que los platos y los rotíferos son responsables principalmente de la eliminación de los sólidos suspendidos (SS), incluyendo patógenos y otros microorganismos. Los filtros lentos de arena se basan en el desarrollo de biopelículas de la misma manera que filtran el agua superficial de las fuentes de lagos, manantiales corridos con fines potables. Lo que los inventores consideran agua limpia es un material de desecho para estos organismos microcelulares ya que no son capaces de extraer cualquier nutrición adicional de agua purificada.
- Las biopelículas pueden ayudar a eliminar el aceite del petróleo de los océanos o sistemas marinos contaminados. En aceite se elimina mediante las actividades de degradación de hidrocarburos de comunidades microbianas, en particular por un notable grupo de especialistas descubiertas recientemente, las denominadas bacterias hidrocarburoclásticas (HCB).
- Además, las biopelículas están presentes en los dientes de la mayoría de los animales como placa dental, en la que éstas pueden llegar a ser responsables de las caries y de enfermedades de las encías.
- Las biopelículas se encuentran en la superficie y en el interior de las plantas. Ambos pueden contribuir a enfermedades de los cultivos o, como en el caso del *Rhizobium*, que fijan nitrógeno en las raíces, existen simbióticamente con la planta [6]. Ejemplos de enfermedades de cultivos relacionadas con las biopelículas incluyen Cancro Cítrico, Enfermedad de Pierce de las uvas, y Mancha Bacteriana de plantas tales como pimientos y tomates.

### Biopelículas y enfermedades infecciosas

- 60 Se ha encontrado que las biopelículas están implicadas en una amplia diversidad de infecciones microbianas en el organismo, con una estimación de un 80 % de todas las infecciones (véase "Research on microbial biofilms (PA-03-047)", NIH, National Heart, Lung, and Blood Institute, 20-12-2002). Los procesos infecciosos en los que se han visto implicadas las biopelículas incluyen problemas comunes tales como infecciones del tracto urinario, infecciones por catéteres, infecciones del oído medio, formación de placa dental, gingivitis, revestimiento de lentes de contacto, y, menos comunes pero más letales, procesos tales como endocarditis, infecciones en la fibrosis quística, e infecciones por dispositivos de implantación permanente tales como prótesis de articulaciones y válvulas cardíacas.

Se ha demostrado recientemente que las biopelículas están presentes en el tejido extirpado en un 80 % de los pacientes sometidos a cirugía para la sinusitis crónica. Se mostró que los pacientes con biopelículas habían sido desprovistos de cilios y células caliciformes, a diferencia de los controles sin biopelículas que presentaban morfología normal en cilios y células caliciformes. Además, las biopelículas se encontraron en muestras de dos de los 10 controles sanos mencionados. Las especies de bacterias de cultivos interoperatorios no correspondían con las especies de bacterias en la biopelícula en el tejido respectivo del paciente. En otras palabras, los cultivos eran negativos aunque las bacterias estaban presentes.

*Biopelículas de Pseudomonas aeruginosa*

Los logros de la atención médica en sociedades industrializadas se ven notablemente alterados debido a las infecciones oportunistas crónicas que se han vuelto cada vez más evidentes en los pacientes inmunodeprimidos y en el envejecimiento de la población. Las infecciones crónicas siguen siendo un desafío importante para la profesión médica y son de gran importancia económica ya que la terapia tradicional con antibióticos por lo general no es suficiente para erradicar estas infecciones. Parece que una razón principal para la persistencia es la capacidad de las bacterias para crecer dentro de las biopelículas que las protege de factores ambientales adversos. *Pseudomonas aeruginosa* no es solamente un agente patógeno y causante oportunista importante de infecciones nosocomiales emergentes sino que también se consideran un organismo modelo para el estudio de diversos mecanismos bacterianos que contribuyen a la persistencia bacteriana. En este contexto, la elucidación de los mecanismos moleculares responsables para la transición de crecimiento planctónico a un fenotipo de biopelícula y el papel de la comunicación entre bacterias en enfermedades persistentes debería proporcionar nuevos conocimientos sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa*, contribuir a una mejor dirección clínica de los pacientes infectados de forma crónica y debería conducir a la identificación de nuevas dianas farmacológicas para el desarrollo de estrategias alternativas de tratamiento antiinfeccioso.

*Placa dental*

La placa dental es el material que se adhiere a los dientes y consiste en células bacterianas (principalmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*), polímeros salivares y productos extracelulares bacterianos. La placa es una biopelícula en las superficies de los dientes. Esta acumulación de microorganismos somete a los dientes y otros tejidos gingivales a concentraciones elevadas de metabolitos bacterianos que dan como resultado una enfermedad dental.

*Legionelosis*

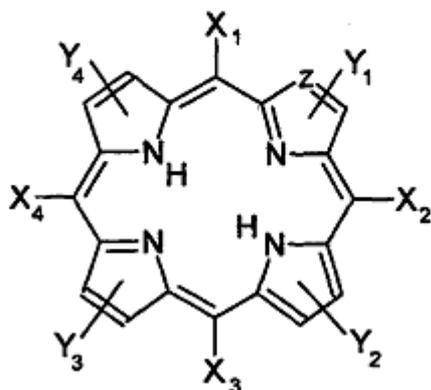
Se sabe que las bacterias *Legionella* crecen en determinadas condiciones en las biopelículas, en las que se protegen frente a diferentes agentes desinfectantes. Los trabajadores de torres de refrigeración, las personas que trabajan en habitaciones con aire acondicionado y la gente que se da una ducha pueden estar expuestos a la *Legionella* por inhalación cuando los sistemas no están ni bien construidos ni diseñados, ni se mantienen adecuadamente. De forma interesante, microorganismos tales como bacterias que atacan a una superficie y crecen como una biopelícula son menos vulnerables a los tratamientos convencionales con antibióticos. La susceptibilidad reducida a los antibióticos contribuye a la persistencia de las infecciones por biopelículas tales como las asociadas con dispositivos implantados. Los mecanismos de protección en el trabajo en las biopelículas parece que son distintos de los que son responsables de la resistencia convencional a antibióticos. En las biopelículas, se tiene la hipótesis de que una escasa penetración de los antibióticos, limitación de nutrientes, crecimiento lento, respuestas de estrés adaptativo, y formación de células persistentes constituyen una defensa de múltiples capas.

Además, los cultivos de biopelícula por lo general son muy resistentes a la erradicación con quimioterapia, sin desarrollar resistencia genotípica. En consecuencia, el número de opciones terapéuticas es limitado y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con actividad antibiopelícula es cada vez más importante.

Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos métodos para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de biopelículas microbianas (tanto en entornos médicos como no médicos).

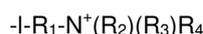
**Resumen de la invención**

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula microbiana:



en donde:

- 5  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , y  $X_4$  representan independientemente (es decir, son los mismos o diferentes) un átomo de hidrógeno, una fracción lipofílica, un grupo fenilo, un grupo alquilo, alarilo o aralquilo inferiores, o un grupo catiónico de la siguiente fórmula;



10

en donde:

I es una fracción de enlace o está ausente;

- 15  $R_1$  representa un alquileo inferior, un alquenileno inferior o un alquinileno inferior, el cual es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido por oxígeno), flúor,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$ ; y

- 20  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente (es decir, son los mismos o diferentes) H, arilo, alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior, los últimos tres de los cuales son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados a partir de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido por oxígeno), arilo,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$

Z es  $-CH$  o N:

- 25  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , e  $Y_4$  están ausentes o de manera independiente representan arilo, alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior, los últimos tres de los cuales son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados a partir de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido por oxígeno), arilo,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$  o, tomados en conjunto con el anillo de pirrol al que se unen, pueden formar un grupo cíclico; y

30

$R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  y  $R_{14}$  representan independientemente H o un alquilo inferior

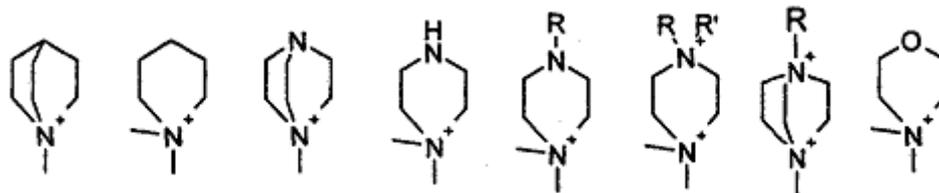
- 35 siempre que al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$ , sea un grupo catiónico, según la definición antes mencionada y al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$ , sea un átomo de hidrógeno, un grupo fenilo, un resto lipofílico, o un grupo alquilo inferior, alquilarilo o aralquilo.

- 40 Por "biopelícula" los inventores incluyen comunidades microbianas (por ejemplo, de bacterias, hongos, algas), envueltas por lo general con una matriz extracelular producida por las células microbianas, que se pueden adherir a la superficie de contacto de un líquido y a una superficie (por ejemplo, sobre una membrana de mucosa dentro del organismo, cualquier tejido u órgano huésped, o sobre la superficie de un dispositivo médico implantado de forma permanente o semi-permanente (por ejemplo, catéter venoso)).

- 45 El término "alquilo inferior" pretende incluir alquilo  $C_1$ -  $C_{20}$  lineal o ramificado, cíclico o acíclico, el cual puede ser interrumpido por oxígeno (preferiblemente no más de cinco átomos de oxígeno están presentes en cada cadena de alquilo). Los grupos alquilos inferiores que pueden representarse con  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  y  $R_{14}$  incluyen alquilos  $C_1$ - $C_{18}$ , alquilos  $C_1$ - $C_{16}$ , alquilos  $C_1$ - $C_{14}$ , alquilos  $C_1$ - $C_{12}$ , alquilos  $C_1$ - $C_{10}$ , alquilos  $C_1$ - $C_9$ , alquilos  $C_1$ - $C_8$ , alquilos  $C_1$ - $C_7$ , alquilos  $C_1$ - $C_6$ , alquilos  $C_1$ - $C_5$ , alquilos  $C_1$ - $C_4$ , alquilos  $C_1$ - $C_3$  y alquilos  $C_1$ - $C_2$ . Los grupos alquilos inferiores preferidos que pueden representarse con  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,

R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> incluyen alquilos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>16</sub>.

Así, uno o más de N<sup>+</sup>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>R<sub>4</sub> y/o N<sup>+</sup>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>R<sub>14</sub> pueden representar grupos amino/amonio cíclicos, por ejemplo:



5

(en los que el grupo está unido al compuesto mediante el enlace sin definir del átomo de N<sup>+</sup>, tal como se muestra al fondo de las estructuras anteriores).

10 Se apreciará que los grupos amino/amonio cíclico también puedan constar de menos o más de seis elementos, por ejemplo esos grupos podrán comprender anillos de 4, 5, 7, 8, 9 o 10 elementos.

El término "alquilenio inferior" debe ser interpretado de acuerdo con ello.

15 Los términos "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior" pretenden incluir alquenos y alquinos C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, lineales o ramificados, cíclicos o acíclicos, respectivamente, cada uno de los cuales puede ser interrumpido por oxígeno (preferiblemente no más de cinco átomos de oxígeno están presentes en cada cadena de alquenilo o alquinilo).

20 El término "alquenilo inferior" también incluye ambos isómeros geométricos *cis* y *trans*. Los grupos alquenos inferiores que pueden estar representados con R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> incluyen alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>17</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> y alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Los grupos alquenos preferentes que pueden estar representados con R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> incluyen alquenos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>.

25

El término "alquilenio inferior" debe ser interpretado de acuerdo con ello.

30 Los grupos "alquinilos inferiores" que pueden estar representados con R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> incluyen alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> y alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Los grupos alquinos preferentes que pueden estar representados con R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> incluyen alquinos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> y C<sub>14</sub>.

30

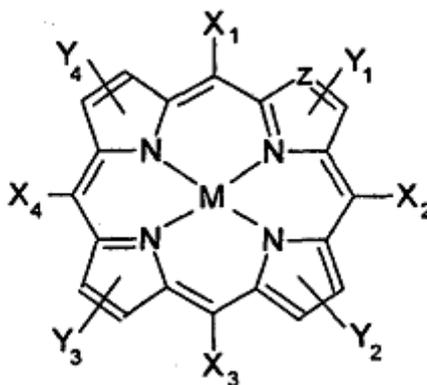
El término "alquinileno inferior" debe ser interpretado de acuerdo con ello.

35

El término "arilo" significa grupos aromáticos carbocíclicos de seis a diez elementos, tales como fenilo y naftilo, cuyos grupos son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del flúor, ciano, nitro, alquilos inferiores (es decir, alcarilos), OR<sub>5</sub>, C(O)R<sub>6</sub>, C(O)OR<sub>7</sub>, C(O)NR<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>.

40 El término "aralquilo" incluye grupos arilos unidos al anillo de porfirinas mediante un grupo alquilo inferior.

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de un compuesto de la fórmula II para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula microbiana:



II

en donde M es un elemento metálico o un elemento metaloide y X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub> y Z son como se definieron anteriormente.

5 El término "elemento metálico" pretende incluir un elemento metálico divalente o trivalente. Preferiblemente, el elemento metálico es diamagnético. Como alternativa, el elemento metálico puede ser paramagnético.

10 Con mayor preferencia, el elemento metálico es seleccionado de Zn (II), Cu (II), La (III), Lu (III), Y (III), In (III), Cd (II), Mg (II), Al (III), Ru, Ni (II), Mn (III), Fe (III), y Pd (II). Más preferentemente, el elemento metálico es Cu (II) o Fe (III).

15 El término "metaloide" pretende incluir un elemento que posea propiedades físicas y químicas tales como la capacidad de conducir electricidad, que son intermedias a las de tanto los metales como los no metales. El término "elemento metaloide" incluye átomos de silicio (Si) y germanio (Ge) que son opcionalmente sustituidos con uno o más ligandos.

20 Se apreciará que los términos elemento metálico y elemento metaloide incluyen un elemento metal o un elemento metaloide que posee un estado de oxidación positivo, los cuales pueden sustituirse con uno o más ligandos seleccionados de flúor, OH, OR<sub>15</sub>, donde R<sub>15</sub> es alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior, aralquilo, arilo o alcarilo según la definición anterior (en la cual arilo y alcarilo son monosustituidos).

25 Los compuestos de las fórmulas I y II contienen al menos un grupo catiónico. De esta forma, los compuestos de la invención pueden poseer una carga positiva neta, por ejemplo, una carga de +1, +2, +3, +4, +5, +6 o más. En una realización preferente, los compuestos poseen una carga neta menor que +4, por ejemplo, +1, +2 ó +3. En una realización particularmente preferida, los compuestos poseen una carga neta de +2.

30 Se apreciará por los expertos en la técnica que los compuestos de las fórmulas I y II pueden ser contrarrestados por aniones de compensación. Los contra aniones ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, haluros (por ejemplo: fluoruro, cloruro y bromuro), sulfatos (por ejemplo, decilsulfato), nitratos, percloratos, sulfonatos (por ejemplo, sulfonato de metano) y trifluoroacetato. Otros contra aniones serán bien conocidos por los expertos en la técnica. De esta forma, derivados farmacéutica y/o veterinariamente aceptables de los compuestos de las fórmulas I y II, tales como sales y solvatos, también están incluidos dentro del campo de la invención. Las sales que pueden ser mencionadas incluyen: sales a las que se les puede adicionar ácidos, por ejemplo, sales formadas con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico con ácidos carboxílicos o con ácidos organosulfónicos; sales de adición básica; sales metálicas formadas con bases, por ejemplo, las sales de sodio o de potasio.

40 Los expertos en la técnica también podrán apreciar que los compuestos de la fórmula I pueden mostrar tautomerismo. Todas las formas tautoméricas y mezclas de las mismas están incluidas en el campo de la invención.

45 Los compuestos de las fórmulas I y II también pueden contener uno o más átomos asimétricos de carbono y pueden por lo tanto mostrar isomerismo óptico y/o diastereoisomerismo. Los diastereoisómeros pueden ser separados usando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía o cristalización fraccional. Los distintos estereoisómeros pueden ser aislados por separación de una mezcla racémica u otra mezcla de los compuestos usando técnicas convencionales, por ejemplo, cristalización fraccional o HPLC. Alternativamente, los isómeros ópticos deseados pueden ser obtenidos por reacción de los productos iniciales ópticamente activos apropiados en condiciones que no causarán racemización o epimerización, o por derivación, por ejemplo con un ácido homoquiral, seguido por separación de los ésteres diastereoisómeros por medios convencionales (por ejemplo, HPLC, cromatografía sobre sílice). Todos los estereoisómeros están incluidos en el campo de la invención.

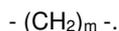
50

En una realización preferente de los aspectos primero y segundo de la invención, Z es -CH.

Una característica distintiva de los aspectos primero y segundo de la invención es que al menos uno de los grupos sustituyentes  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  es un grupo catiónico amonio cuaternario de la fórmula  $-R_1-N^+(R_2)(R_3)R_4$ , según lo definido anteriormente. Preferiblemente, ninguno de los  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , y  $X_4$  es un grupo catiónico anilínico o piridinio.

En una realización preferente,  $R_1$  es un grupo alquileo inferior, alquencileno inferior o alquinileno inferior no sustituido.

Ventajosamente,  $R_1$  es un grupo alquileo inferior de cadena lineal de la fórmula:



Preferiblemente, "m" es un entero entre 1 y 20. Más preferiblemente, "m" es un entero entre 1 y 10, por ejemplo entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4 ó entre 1 y 3. Los grupos alquilenos inferiores de cadenas lineales preferentes que pueden ser representados por  $R_1$  incluyen grupos de la fórmula anterior en la cual "m" es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Más preferiblemente "m" es 2 ó 3.

Los tres grupos sustituyentes restantes de la fracción cuaternaria de amonio, es decir  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser los mismos o diferentes y son seleccionados de H, alquilo inferior, alquencilo inferior o alquinilo inferior, los tres últimos de los cuales son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$ .

En una realización preferente,  $R_2$ ,  $R_3$  y/o  $R_4$  son un grupo alquilo inferior, alquencilo inferior o alquinilo inferior.

Preferiblemente,  $R_2$ ,  $R_3$  y/o  $R_4$  son grupos alquilos inferiores no sustituidos.

Opcionalmente, al menos uno de  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  es un grupo alquilo que es sustituido con un grupo amino primario, secundario o terciario o un grupo amonio cuaternario.

En una realización preferente de los aspectos primero y segundo de la invención,  $R_1$  es  $-(CH_2)_3-$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son  $CH_3$  y  $R_4$  es  $-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$ .

En una realización preferente alternativa de los aspectos primero y segundo de la invención  $R_1$  es  $-(CH_2)_3-$ , y  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son  $CH_3$  cada uno.

En una realización preferente alternativa adicional de los aspectos primero y segundo de la invención,  $R_1$  es  $-(CH_2)_3-$ , y  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son  $C_2H_5$  cada uno.

Ventajosamente, al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  es un grupo catiónico como se definió anteriormente y al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  es un átomo de hidrógeno.

Preferiblemente, cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  es un átomo de hidrógeno o un grupo catiónico como se definió anteriormente.

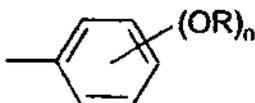
Convenientemente, el valor pK de cualquier grupo amino primario, secundario o terciario, si están presentes en los compuestos de la invención, es mayor que 8 para asegurar que el grupo esté protonado cuando está en un ambiente fisiológico.

El grupo catiónico amonio cuaternario está opcionalmente enlazado al anillo de porfirina a través de una fracción de enlace, l.

Las fracciones de enlace preferidas, l, incluyen fenoxi, fenileno, sulfonilamido, aminosulfonilo, sulfonilimino, fenilsulfonilamido, fenil-aminosulfonilo, urea, uretano y fracciones de enlace de carbamato.

En una realización preferente, el grupo catiónico amonio cuaternario está enlazado al anillo de porfirina mediante un enlace fenoxi.

Así,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y/o  $X_4$  pueden tener la siguiente fórmula:



en donde R es  $R_1 - N^+(R_2)(R_3)R_4$ , según se define anteriormente, y "n" es un entero entre 1 y 3 (y en donde el grupo está unido al anillo de porfirina a través de la unión libre en la parte izquierda).

5 En una realización alternativa preferente, el grupo catiónico amonio cuaternario está enlazado al anillo de porfirina por un enlace fenileno.

De esta forma,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y/o  $X_4$  puede tener la siguiente fórmula:

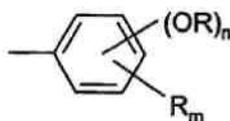


10 en donde R es  $R_1 - N^+(R_2)(R_3)R_4$ , según se define anteriormente, y "m" es un entero entre 1 y 3 (y en donde el grupo está unido al anillo de porfirina a través de la unión libre en la parte izquierda).

Preferiblemente, "m" es 2, y más preferiblemente 1.

15

En una realización preferente alternativa,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y/o  $X_4$  pueden tener la siguiente fórmula:



20 en donde R es  $R_1 - N^+(R_2)(R_3)R_4$ , "n" y "m" son como se definen anteriormente y "n+m" está entre 1 y 3 (y en donde el grupo está unido al anillo de porfirina a través de la unión libre en la parte izquierda).

25 Ventajosamente, L contiene un anillo de benceno (por ejemplo, fenoxi, fenileno, fenilsulfonilamido o fenilaminosulfonilo) mono-sustituido en la posición *para* con respecto a la posición del anillo de benceno en donde está unido el macrociclo de porfirina. Alternativamente, L puede ser *mono* o *di*-sustituido en las posiciones *meta* u *orto* con respecto a las posiciones del anillo de benceno en donde está unido el macrociclo de porfirina. L también puede ser ambos, *para*- y *orto*-sustituido.

30 En una realización preferente alternativa, el grupo catiónico amonio cuaternario está directamente enlazado al anillo de porfirina, o sea, l está ausente.

35 En una realización preferente de los aspectos primero y segundo de la invención, el compuesto contiene dos grupos catiónicos, según se definen anteriormente, en lados opuestos del anillo de porfirina, o sea, en las posiciones 5 y 15 del anillo o en las posiciones 10 y 20 del anillo. Por ejemplo,  $X_1$  y  $X_3$  pueden ser un átomo de hidrógeno, una fracción lipofílica, un grupo fenilo, un grupo alquilo inferior, un grupo alcarilo o aralquilo, y  $X_2$  y  $X_4$  pueden ser grupos catiónicos, o viceversa. Preferiblemente, tanto  $X_1$  como  $X_3$  son átomos de hidrógeno y tanto  $X_2$  como  $X_4$  son un grupo catiónico, o viceversa.

40 Alternativamente, el compuesto puede incluir dos grupos catiónicos, según se define anteriormente, en posiciones vecinas del anillo de porfirina, o sea, en las posiciones 5 y 10 del anillo, o en las posiciones 10 y 15 del anillo, o en las posiciones 15 y 20 del anillo, o en las posiciones 20 y 5. Por ejemplo,  $X_1$  y  $X_2$  pueden ser hidrógeno y  $X_3$  y  $X_4$  pueden ser grupos catiónicos, o  $X_2$  y  $X_3$  pueden ser hidrógeno y  $X_4$  y  $X_1$  pueden ser grupos catiónicos, etc.

45 Se apreciará por los expertos en la técnica que surgen posibilidades estructurales isoméricas adicionales cuando Z representa nitrógeno. Tales posibilidades se incluyen en el ámbito de la presente invención.

50 En una realización mas preferente de los aspectos primero y segundo de la invención, se sustituye el compuesto en uno o más de sus anillos de pirrol constituyentes. De ahí que,  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , e  $Y_4$  pueden estar ausentes o representar independientemente arilo, alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior, los tres últimos de ellos están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior, alquilenilo inferior (opcionalmente interrumpidos con oxígeno), arilo,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8$ ,  $R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$ . Se apreciará por personas calificadas que  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y/o  $Y_4$  pueden comprender grupos cíclicos, que pueden ser saturados o aromáticos. Por ejemplo, uno o más de los anillos de pirrol se pueden sustituir para formar un grupo iso-

55 indol, es decir,  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y/o  $Y_4$  junto con el anillo de pirrol al cual están unidos pueden ser cíclicos. En una realización preferente alternativa del primer y segundo de los aspectos de la invención  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  e  $Y_4$  están ausentes. De esta forma, el anillo de porfirina es preferentemente sustituido sólo en una o más de las posiciones 5,

10, 15 o 20.

En una realización mas preferente de los aspectos primero y segundo de la invención, al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  es o contiene una fracción lipofílica.

Por 'fracción lipofílica' incluimos fracciones que tienen un coeficiente de partición entre 1-*n*-octanol y agua expresado como log P mayor que 1,0 a pH fisiológico y 25 °C.

Convenientemente, la fracción lipofílica es un grupo alquilo saturado de cadena recta de fórmula  $-(CH_2)_pCH_3$ , o un grupo alquileo equivalente de fórmula  $-(CH_2)_p-$ , en donde "p" es un entero entre 1 y 22, por ejemplo entre 1 y 18. Preferiblemente, "p" está entre 1 y 18, más preferiblemente entre 2 y 16, entre 4 y 16, entre 6 y 18, entre 8 y 16 ó entre 4 y 12. Más preferiblemente, "p" está entre 10 y 12.

Se apreciará que  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y/o  $X_4$  pueden ser un grupo catiónico, según se define anteriormente, el cual también contiene una fracción lipofílica.

En una realización preferente alternativa de los aspectos primero y segundo de la invención, ninguno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  ó  $X_4$  son una fracción lipofílica.

Ventajosamente, los compuestos utilizados en los aspectos primero y segundo de la invención son solubles en agua. Preferiblemente, los compuestos pueden disolverse en agua hasta obtener una concentración de al menos 5 µg/l, por ejemplo, al menos 10 µg/l, 15 µg/l, ó 20 µg/l. Más preferiblemente, los compuestos pueden disolverse en agua hasta obtener una concentración de al menos 100 µg/l, por ejemplo 200 µg/l, 300 µg/l, 400 µg/l, 500 µg/l, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml ó 100 mg/ml.

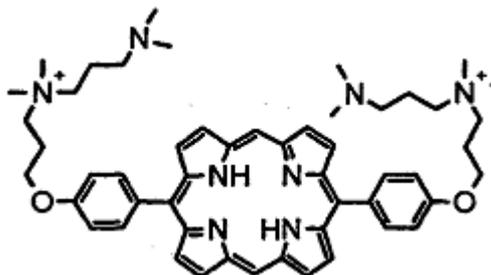
Convenientemente, los compuestos utilizados en los aspectos primero y segundo de la invención muestran toxicidad selectiva ante agentes microbianos. Entendiendo por 'selectiva' que el compuesto es preferentemente tóxico para uno o varios microorganismos (tales como bacterias, micoplasmas, levaduras, hongos y/o virus) en comparación con células huésped de mamíferos, por ejemplo humanas. Preferiblemente, la toxicidad del compuesto para un microorganismo diana es al menos dos veces mayor que la toxicidad de este compuesto para células de mamíferos, más preferiblemente al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos ocho veces, al menos diez veces, al menos quince veces o al menos veinte veces. Más preferiblemente, el compuesto de la invención es sustancialmente no-tóxico para células de mamíferos.

De esta manera, cuando los compuestos se utilizan para tratar infecciones bacterianas, por ejemplo, los regímenes de dosificación pueden ser seleccionados de tal manera que las células bacterianas sean destruidas con un mínimo daño al tejido huésped sano. De esta forma, los compuestos para uso en los aspectos primero y segundo de la invención preferentemente muestran una "ventana terapéutica".

En una realización preferente, el compuesto es tóxico para el microorganismo diana (por ejemplo, células bacterianas) en dosis bajas. Preferiblemente, el compuesto es tóxico para el microorganismo diana en una concentración menor de 10 µM, por ejemplo menor de 1 µM, menor de 0,1 µM, menor de 0,01 µM, menor de 0,005 µM o menor de 0,001 µM (véase Ejemplo B).

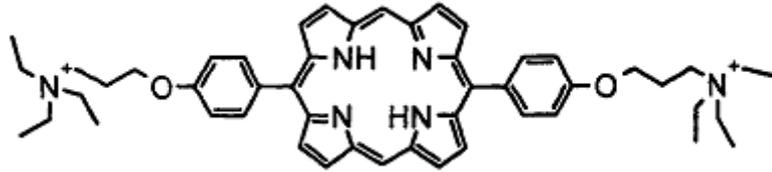
Los compuestos preferentes para uso en los aspectos primero y segundo de la invención incluyen los siguientes:

(a) 5,15-bis-(4-(3-[(3-Dimetilamino-propil)-dimetil-amonio]-propiloxi)-fenil)-porfirina ("Compuesto 8").



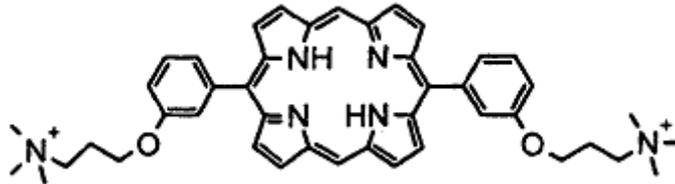
Preferiblemente, este compuesto se suministra como sal dicloruro o tetracloruro.

(b) 5,15-bis-[4-(3-Trietilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina ("Compuesto 9").



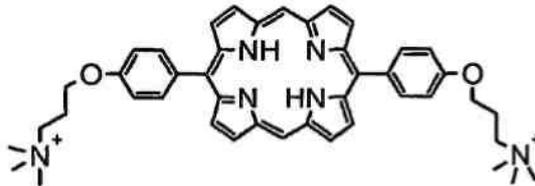
Preferiblemente este compuesto se suministra como una sal dicloruro.

- 5 (c) 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina (también denominado en el presente documento "Compuesto 12" o "XF-70").



10 Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de sal dicloruro.

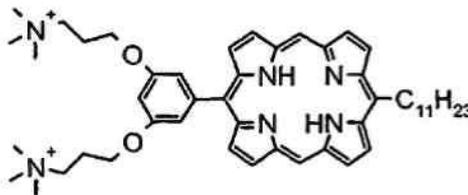
- (d) 5,15-bis-[4-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina (también denominado en el presente documento "Compuesto 10" o "XF-73");



15

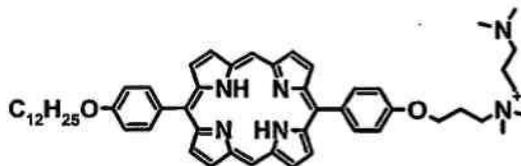
Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal dicloruro.

- 20 (e) 5-[3,5-bis-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-15-undecil-porfirina ("Compuesto 6");



Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de sal dicloruro.

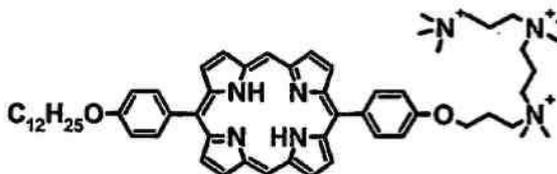
- 25 (f) 5-[4-[3-Dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amonio-propiloxi]-fenil]-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina ("Compuesto 23");



30

Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal cloruro o dicloruro.

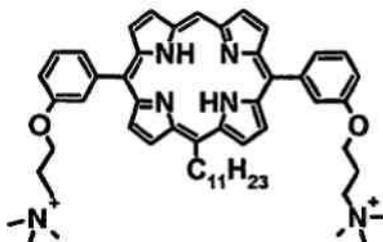
(g) 3-[[3-[[3-[[15-(4-Dodeciloxi-fenil)-porfirina-5-il]-fenoxi]-propil]-dimetil-amonio]-propil]-dimetil-amonio)-propil]-trimetil-amonio ("Compuesto 25");



5

Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal tricloruro.

(h) 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-10-undecil-porfirina ("Compuesto 28");

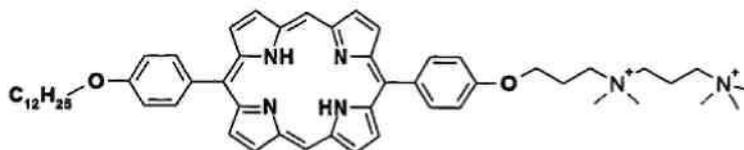


10

Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal dicloruro.

(i) 5-[4-[3-Dimetil-(3-trimetilamonio-propil)-amonio-propiloxi]-fenil]-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina ("Compuesto 31"); y

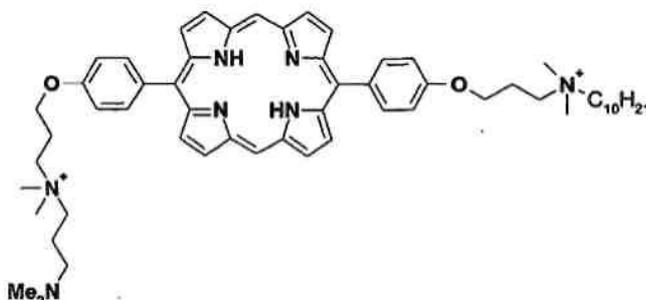
15



20

Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal dicloruro.

(j) 5-[4-(3-Dimetildecil-amoniopropiloxi)-fenil]-15-[4-[3-dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amoniopropiloxi]-fenil]-porfirina. ("Compuesto 32").



25

Preferiblemente, este compuesto se suministra en forma de una sal dicloruro.

En una realización particularmente preferente, el compuesto es la sal de dicloruro del Compuesto 10 o del Compuesto 12 mencionado anteriormente.

30

Se apreciará que los compuestos anteriores pueden estar alternativamente en una forma metalada, es decir, pueden incluir un elemento metálico quelado o un elemento metaloide dentro del anillo de porfirina.

Los elementos metálicos quelados preferentes incluyen Cu(II) y Fe(III).

35

En una realización particularmente preferente, el compuesto es la sal de dicloruro de Fe(III)-Compuesto 10.

El compuesto, preparado conforme a los aspectos primero o segundo de la invención, puede formularse en diferentes concentraciones, dependiendo de la eficacia /toxicidad del compuesto que se está usando y la indicación para la que está siendo usado. Preferiblemente, el compuesto se formula en una concentración de entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 1 mM, más preferiblemente entre 1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , entre 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , entre 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , entre 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  y más preferiblemente alrededor de 30  $\mu\text{M}$ . Para aplicaciones *in vitro*, las formulaciones pueden comprender una concentración inferior de un compuesto, por ejemplo entre 0,0025  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ .

Se apreciará por expertos en la técnica que, cuando se usa en medicina, el compuesto se administrará generalmente en mezclas con un diluyente, excipiente o un portador farmacéutico adecuado seleccionado teniendo en cuenta la vía de administración proyectada y la práctica farmacéutica estándar (por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA). Vías adecuadas de administración se examinan a continuación e incluyen la administración tópica, intravenosa, oral, pulmonar, nasal, auditiva, ocular, vesical y CNS.

Por ejemplo, para aplicación tópica, por ejemplo en la piel o el área de una herida, los compuestos pueden ser administrados en forma de loción, solución, crema, gel, ungüento o polvo (por ejemplo, véase Remington, supra, páginas 1586 a la 1597). De esta forma, los compuestos pueden ser formulados como un ungüento apropiado que contenga el compuesto activo en suspensión o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, mezcla de polioxietileno con polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden ser formulados como una loción o crema adecuada, en suspensión o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, sulfato de e-laurilo, un alcohol (por ejemplo, etanol, alcohol cetearilo, 2-octildodecanol, alcohol bencílico) y agua.

En una realización preferente, el medicamento (por ejemplo, loción, solución, crema, gel o ungüento) tiene base acuosa.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca también incluyen pastillas que contienen el ingrediente activo en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que contienen el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina o glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que contienen el ingrediente activo en un portador líquido adecuado.

El medicamento para uso en los aspectos primero o segundo de la invención, también puede ser administrado intranasalmente o por inhalación y es convenientemente administrado en forma de inhalador de polvo seco o con una presentación de spray de aerosol desde un contenedor, una bomba, spray o nebulizador presurizado con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A<sup>3</sup> ó 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA227EA<sup>3</sup>), dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede determinarse mediante una válvula que suministre la cantidad medida. El contenedor, bomba, spray o nebulizador presurizado puede contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, el cual puede adicionalmente contener un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitano. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para usarse en un inhalador o insuflador para contener una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones de aerosol o polvo seco son preferiblemente dispuestas de manera que cada dosis medida o "bocanada" contenga al menos 1 mg de un compuesto para dispensar al paciente. Se apreciará que la dosis total con un aerosol variará de un paciente a otro y en dependencia de la indicación de cada paciente, y puede administrarse en una dosis única o, más comúnmente, en dosis divididas durante el día.

Alternativamente, pueden emplearse otras vías de administración convencionales conocidas en la técnica también; por ejemplo, el medicamento, preparado para uso en los aspectos primero o segundo de la invención, pueden suministrarse de forma oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, demorada o controlada. El medicamento, también puede administrarse de forma intra-ocular (véase más adelante), intra-auditiva o mediante inyección intracavernosa.

El medicamento también puede administrarse de forma parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracranial, intramuscular o subcutánea (incluyendo vía un juego de agujas finas o usando tecnología sin aguja *Powderject*®), o puede administrarse por técnicas de infusión. La mejor manera de usarlos es en forma de solución acuosa estéril, la cual puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para que la solución se convierta en isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar en un buffer adecuado (preferiblemente a un pH de 3 a 9), de ser necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra rápidamente mediante técnicas farmacéuticas estándares bien conocidas por los expertos en la técnica.

- 5 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección, acuosas y no-acuosas, que pueden contener antioxidantes, buffers, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor tratado; y suspensiones estériles acuosas y no-acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitarias o de multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden ser almacenadas en condición seca por congelación (liofilizada) requiriendo sólo la adición de un portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de usarse. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección ocasionales a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.
- 10 El medicamento puede también administrarse por vía ocular, particularmente para tratar enfermedades oculares. Para uso oftálmico, los compuestos también pueden formularse como suspensiones micronizadas en soluciones salinas isotónicas estériles de pH ajustado, o preferiblemente, como soluciones en solución salina isotónica estéril de pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Alternativamente, pueden formularse en un ungüento tal como petrolato.
- 15 Para uso veterinario, un compuesto es administrado en una formulación aceptable según la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración más apropiada para el animal en particular.
- 20 Los medicamentos pueden almacenarse en un contenedor o vasija apropiada conocida en la técnica. Se apreciará por los expertos en la técnica, que el contenedor o vasija debe preferiblemente estar hermético y/o esterilizado. Ventajosamente, el contenedor o vasija está hecho de material plástico, tal como polietileno.
- 25 Se apreciará que los compuestos para uso en los aspectos primero o segundo de la invención puedan ser utilizados para destruir una serie de tipos de microorganismos formadores de biopelículas, incluyendo bacterias, arqueas, protozoos, hongos y/o algas. Dichos microorganismos pueden ser resistentes a uno o más antibióticos convencionales, tales como metilina (por ejemplo, MRSA).
- 30 En una realización, los microorganismos están en una fase estática o de crecimiento lento.
- Será aún más apreciado por los expertos en la materia que los compuestos pueden utilizarse para prevenir y/o tratar la infección con tales microorganismos, es decir, que los compuestos son adecuados para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Por ejemplo, el compuesto puede ser utilizado para prevenir o reducir la propagación o la transferencia de un patógeno a otros sujetos, por ejemplo, pacientes, personal sanitario, etc.
- 35 En una realización del primero y segundo aspectos de la invención, los microorganismos son bacterias.
- Las bacterias pueden ser bacterias Gram positivas, tales como las seleccionadas entre el grupo que consiste en Estafilococos o Estreptococos.
- 40 Por ejemplo, las bacterias pueden ser Estafilococos, tales como *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, MRSA).
- 45 Como alternativa, las bacterias pueden ser Estreptococos, tales como *Streptococcus mutans* y/o *Streptococcus sanguis*.
- Las bacterias también pueden ser bacterias Gram negativas, tales como Legionella.
- 50 En una realización alternativa del primer y segundo aspectos de la invención, los microorganismos son hongos (tales como *Candida spp*).
- Además, en una realización del primer y segundo aspectos de la invención, los microorganismos son arqueas.
- 55 Además, en otra realización del primer y segundo aspectos de la invención, los microorganismos son protozoos.
- Además, en otra realización del primer y segundo aspectos de la invención, los microorganismos son algas.
- 60 Las dosis del compuesto para uso en los aspectos primero o segundo de la invención dependerán de varios factores; que incluyen el compuesto particular utilizado, la formulación, la vía de administración y el uso para el que se prescribe el compuesto. Por lo general, sin embargo, las dosis fluctuarán entre 0,01 y 20 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal, preferiblemente desde 0,1 hasta 15 mg/kg, por ejemplo de 1 a 10 mg/kg de peso corporal.
- 65 Los expertos en la materia observarán que los compuestos que se describen en el presente documento se pueden usar para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula microbiana en cualquier entorno en el que se pueden encontrar dichas biopelículas. Por lo tanto, la biopelícula se puede asociar con cualquiera de un soporte

inerte o un soporte vivo.

En una realización, la biopelícula está asociada con un soporte vivo. Por ejemplo, la biopelícula puede crecer o puede ser susceptible al crecimiento en una superficie dentro del organismo humano o animal.

5 Por lo tanto, la invención proporciona un compuesto tal como se ha definido anteriormente para uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la presencia o crecimiento de una biopelícula.

10 Por ejemplo, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno o afección asociados con el crecimiento de una biopelícula microbiana en uno de los siguientes sitios dentro del organismo:

(a) La cavidad oral, incluyendo las superficies de los dientes y encías (por ejemplo, placa dental, gingivitis, infecciones endodónticas, candidiasis oral, aspergilosis oral, periodontitis).

15 Sin embargo, en una realización, los compuestos no se usan para el tratamiento curativo y/o profiláctico de periodontitis o de otras infecciones dentales.

(b) El tracto urinario (por ejemplo, cistitis).

20 (c) Los senos (por ejemplo, sinusitis crónica).

(d) El oído (por ejemplo, infecciones del oído medio).

25 Sin embargo, en una realización, los compuestos no se usan para el tratamiento curativo y/o profiláctico de la otitis.

(e) El corazón (por ejemplo, endocarditis).

(f) La próstata (por ejemplo, prostatitis bacteriana crónica).

30 (g) Los huesos (por ejemplo, osteomielitis)

Sin embargo, en una realización, los compuestos no se usan para el tratamiento curativo y/o profiláctico de de la osteomielitis.

(h) Los pulmones (por ejemplo, infecciones en la fibrosis quística tales como neumonía)

35 Sin embargo, en una realización, los compuestos no se usan para el tratamiento curativo y/o profiláctico de infección por *Pseudomonas* en pacientes con fibrosis quística.

(i) Los riñones (por ejemplo, cálculos renales infecciosos y en diálisis peritoneal).

40 (j) La piel.

Sin embargo, en una realización, los compuestos no se usan para el tratamiento curativo y/o profiláctico de dermatitis atópica.

45 Además, en una realización, la biopelícula está asociada con un soporte inerte. Por lo tanto, la biopelícula puede crecer o ser susceptible al crecimiento sobre la superficie de un dispositivo implantado o insertado de otro modo dentro del organismo humano o animal.

50 Por ejemplo, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden usar para tratar o prevenir una infección asociada con el crecimiento de una biopelícula microbiana sobre una de las siguientes superficies inertes dentro del organismo:

(a) Un catéter (por ejemplo, para uso intravascular o en el tracto urinario).

55 (b) Una endoprótesis vascular (por ejemplo, una endoprótesis vascular coronaria).

(c) Una anastomosis (por ejemplo, una anastomosis cerebroespinal).

(d) Un tubo de intubación o traqueotomía.

60 (e) Un dispositivo oftálmico (por ejemplo, lentes de contacto, hebillas esclerales y lentes intraoculares).

(f) Una prótesis de articulación (es decir, artroplastia e implantación de otros dispositivos ortopédicos).

(g) Una válvula cardíaca artificial.

65 (h) Un implante de mama.

Por lo tanto, se observará que los compuestos tal como se describen en el presente documento son particularmente adecuados para el tratamiento y la prevención de infecciones nosocomiales.

5 En una realización preferente, los compuestos para uso en los aspectos primero o segundo de la invención son usados en combinación con agentes antimicrobianos convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden ser usados en combinación con uno o más de los antibióticos convencionales siguientes: agentes antibacterianos, por ejemplo las penicilinas naturales y sintéticas y las cefalosporinas, sulfonamidas, eritromicina, kanamicina, tetraciclina, cloramfenicol, rifampicina e incluso la gentamicina, ampicilina, benzipenicilina, benetaminpenicilina, penicilina benzatínica, feneticilina, fenoximetil penicilina, procainpenicilina, cloxacilina, flucoxacilina, meticilina sódica, amoxicilina, hidrocloreuro de bacampicilina, ciclacilina, mexlocilina, pivampicilina, hidrocloreuro de talampicilina, cafecilina sódica, piperacilina, ticarcilina, mecilina, pirmecilina, cefaclor, cefadroxil, cefotaxima, cefotaxime, cefoxitina, cefsulodina sódica, ceftazidime, ceftizoxime, cefuroxime, cefalexina, cefalotina, cefamandol, cefazolina, cefradina, latamoxef disódico, aztreonam, hidrocloreuro de clorotetraciclina, clomociclina sódica, hidrocloreuro de demeclociclina, doxiciclina, limeciclina, minociclina, oxitetraciclina, amikacina, sulfato de frameticina, sulfato de neomicina, netilmicina, tobramicina, colistina, fusidato sódico, sulfato de polimixina B, espectinomina, vancomicina, sulfaloxato de calcio, sulfametopirazina, sulfadiazina, sulfadimidina, sulfaguanidina, sulfúrea, capreomicina, metronidazol, tinidazol, ácido nalidíxico, trimetoprimisulfametoxazol, clindamicina, lincomicina, cicloserina, isoniazida, etambutol, etionamida, pirazinamida y otros similares; los agentes antifungales, por ejemplo: miconazol, quetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina, flucitosina, griseofulvina, namaticina, nistatina y sus similares; y agentes antivíricas tales como: aciclovirus, AZT, ddI, hidrocloreuro de amantadina, inosinpranobex, vidarabina y otros similares.

25 En otra realización preferente, los medicamentos comprenden y/o son coadministrados con agentes que aceleran la penetración tales como poli-(etilenimina) o agentes antibióticos que muestran tal capacidad de acelerar la penetración (por ejemplo, polimixina o colistina).

30 Los compuestos para uso en el primer y segundo aspectos de la invención también se pueden usar para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de biopelículas microbianas *in vitro*. Por ejemplo, los compuestos también se pueden usar forma de una solución de esterilización o de lavado para prevenir el crecimiento de biopelículas microbianas de una superficie o sustrato, tal como en un entorno doméstico (por ejemplo, superficies de trabajo en la cocina, duchas, tuberías, suelos, etc.) o en un entorno comercial o en un entorno industrial (por ejemplo, dentro de sistemas de refrigeración, tuberías, superficies de suelo, etc.).

35 Preferentemente, dicho medicamento comprende el compuesto antimicrobiano en solución en una concentración de 1 a 100 µg/ml.

40 Preferentemente, la solución comprende adicionalmente un agente de superficie activa o tensioactivo. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos aniónicos (por ejemplo, un sulfonato alifático), tensioactivos anfóteros y/o zwitteriónicos (por ejemplo, derivados de compuestos de amonio cuaternario alifático, fosfonio y sulfonio) y tensioactivos no iónicos (por ejemplo, alcoholes alifáticos, ácidos, amidas o alquil fenoles con óxidos de alquileno)

45 De forma conveniente, el agente de superficie activa está presente en una concentración de un 0,5 a un 5 por ciento en peso.

50 En usos tanto *in vitro* como *in vivo*, los compuestos para uso en los aspectos primero y segundo de la invención están preferentemente expuestos a la superficie diana durante al menos cinco minutos. Por ejemplo, el tiempo de exposición puede ser de al menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 12 horas y 24 horas.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un uso de un compuesto tal como se describe en el presente documento para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de bacterias en una fase de crecimiento lento.

55 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un uso de un compuesto tal como se describe en el presente documento para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de bacterias en una fase estática.

60 Por lo tanto, la invención proporciona un compuesto tal como se ha definido anteriormente para uso en el tratamiento o prevención de una afección asociada con la presencia o crecimiento de bacterias o en una fase de crecimiento lento o una fase estática.

Tal como se demuestra en los Ejemplos adjuntos, los compuestos de la invención se pueden usar para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de bacterias en una fase de crecimiento lento o una fase estática.

65 Los expertos en la materia entenderán que, en determinadas condiciones (tal como condiciones ambientales y/o fisiológicas), las bacterias pueden entrar en una fase de crecimiento lento (en la que se reduce la velocidad de

crecimiento de las bacterias) y/o una fase estática (en la que no se puede detectar el crecimiento de las bacterias). Por "crecimiento", los inventores incluyen la replicación y/o reproducción y/o división de una célula bacteriana (o población de dichas células), y también incluyen la reproducción y/o replicación componentes celulares y/o agentes químicos dentro de una célula bacteriana (o población de dichas células).

Es bien conocido que la velocidad de crecimiento variará entre bacterias, de modo que diferentes géneros, especies, tipos y cepas de bacterias pueden tener diferentes velocidades de crecimiento. La velocidad de crecimiento también se determina mediante las condiciones ambientales en particular a las que están sometidas las bacterias de interés, y variarán dependiendo del contenido y la composición de los nutrientes en el medio que nos rodea, y otros factores tales como temperatura, ventilación, agitación, luz y pH.

La velocidad de crecimiento óptima para las bacterias se puede determinar *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo en tubo de ensayo de laboratorio o matraz) midiendo la velocidad de crecimiento durante la fase de crecimiento exponencial en condiciones estándar (es decir, un medio de cultivo definido y temperatura, ventilación, agitación, luz y pH).

Dependiendo de las bacterias, el tiempo necesario para que una célula bacteriana se divida y la población duplique su tamaño ("tiempo de generación") varía de aproximadamente 12 minutos a 24 horas o más. Los métodos para calcular el tiempo de generación de bacterias es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Brock *et al.*, Biology of Microorganisms, 6ª Ed, 1991, Prentice Hall, y <http://www.textbookofbacteriology.net/growth.html>).

El tiempo de generación para *E. coli* en el laboratorio de 15-20 minutos, pero se estima que en el tracto intestinal sea de 12-24 horas. Para las bacterias más conocidas que se pueden cultivar, los tiempos de generación varían de aproximadamente 15 minutos a 1 hora (aunque simbioses tales como *Rhizobium* y litótrofos, tales como las bacterias nitrificantes, tienden a tener tiempos de generación más elevados). Algunas bacterias que son agentes patógenos, tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Treponema pallidum*, tienen tiempos de generación especialmente largos. Los tiempos de generación para unas pocas bacterias se muestran al dorso:

Bacteria	Medio	Tiempo de generación (minutos)
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa-sales	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sacarosa-sales	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Leche	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Caldo de lactosa	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo de infusión de corazón	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Extractos de manitol-sales-levadura	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sintético	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Testículos de conejo	1980

Se entenderá que las bacterias en fase de crecimiento lento o en una fase estática se pueden identificar por comparación de la velocidad de crecimiento óptima de esas bacterias *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo en tubo de ensayo de laboratorio o matraz en condiciones estándar de medio de cultivo, temperatura, ventilación, agitación, luz y pH).

Por ejemplo, una velocidad de crecimiento lento puede ser inferior a un 50 % de la velocidad de crecimiento óptimo de esa bacteria, tal como inferior a un 60 % o un 70 % o un 80 % o un 90 % o un 95 % de la velocidad de crecimiento óptimo de esa bacteria *in vitro*).

En una realización preferente, las bacterias de acuerdo con el tercer o el cuarto aspecto de la invención son tal como se han descrito anteriormente (en relación al primer aspecto de la invención). Preferentemente, las bacterias de acuerdo con el tercer u otro aspecto adicional de la invención están sobre o en el organismo de un mamífero vivo, tal como un ser humano, por ejemplo, tal como ser descrito anteriormente ( en relación al primer aspecto de la invención).

Es conocido que las infecciones (tal como las infecciones en mamíferos) las pueden causar bacterias en una fase de crecimiento lento o estática seleccionada entre el grupo que consiste en o que comprende:

micobacterias (En: Laboratory diagnosis of bacterial infections; editado por Nevoi Cimolai y publicado por Informa Healthcare, 2001, página 384-5);

actinomicetos (En: Laboratory diagnosis of bacterial infections; editado por Nevoi Cimolai y publicado por Informa Healthcare, 2001, página 384-5);

variantes de colonias pequeñas de *Staphylococcus aureus* (Vaudaux P *et al.* Difficult to diagnose and difficult to treat, *Clinical Infectious Diseases* (2006); 43: 968-70); y

brucella. (Guerra H. The brucellae and their success as pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* (2007); 33 (4): 325-31).

5 En consecuencia, en una realización referente, el tercer y cuarto aspectos de la invención comprenden un uso en el que la bacteria en una fase de crecimiento lento o en una fase estática se seleccionan entre la lista que consiste en o que comprende: micobacterias; actinomicetos; variantes de colonias pequeñas de *Staphylococcus aureus*; brucellae.

10 Un quinto aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un paciente que padece o que es susceptible a una enfermedad o afección asociada con o causada por una biopelícula microbiana, método que comprende administrar al paciente un compuesto tal como se describe en el presente documento.

15 Un sexto aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un paciente que padece o que es susceptible a una enfermedad o afección asociada con o causada por una bacteria en una fase de crecimiento lento, método que comprende administrar al paciente un compuesto tal como se describe en el presente documento.

20 Tal como se ha analizado anteriormente, se conoce que las infecciones (tales como infecciones en mamíferos) pueden ser provocadas por bacterias en una fase de crecimiento lento o estática seleccionadas entre el grupo que consiste en o que comprende: micobacterias; actinomicetos; variantes de colonias pequeñas de *Staphylococcus aureus*; y brucellae.

25 En consecuencia, en una realización preferente, el quinto aspecto de la invención comprende un método en el que las bacterias en una fase de crecimiento lento o una fase estática se seleccionan entre la lista que consiste en o que comprende: micobacterias; actinomicetos; variantes de colonias pequeñas de *Staphylococcus aureus*; y brucellae.

30 Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un paciente que padece o que es susceptible a una enfermedad o afección asociada con o causada por una bacteria en una fase estática, método que comprende administrar al paciente un compuesto tal como se describe en el presente documento.

35 Los expertos en la materia observarán que los compuestos se pueden usar en forma de terapia fotodinámica o, como alternativa, se puede aprovechar su actividad antimicrobiana inherente (tal como se describe en las Solicitudes de Patente Internacional N<sup>os</sup>: PCT/GB2003/005649 [documento WO 2004/056828] y PCT/GB2005/002457 [documento WO 2006/000765]).

Los compuestos se pueden formular y administrar usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar por vía oral, por vía parenteral o por vía tópica.

40 Tal como se ha analizado anteriormente, la biopelícula puede estar en un soporte vivo en la cavidad oral, tracto urinario, senos, oído, corazón, próstata, hueso, pulmones, riñones y/o piel.

45 Como alternativa, la biopelícula puede estar sobre un soporte inerte dentro del organismo, tal como un catéter, una endoprótesis vascular, una derivación, un tubo para intubación o traqueotomía, un dispositivo oftálmico, una prótesis de articulación, una válvula cardíaca artificial y/o un implante de mama.

Un octavo aspecto de la invención proporciona un dispositivo médico implantable que está impregnado, revestido o de otro modo tratado con un compuesto tal como se describe en el presente documento.

50 Por ejemplo, el dispositivo médico implantable se puede seleccionar entre el grupo que consiste en dispositivos intravasculares, catéteres, derivaciones, tubos para intubación y traqueotomía, dispositivos oftálmicos, la tesis de articulación, válvulas cardíacas artificiales e implantes de mama. Por "dispositivo implantable" los inventores incluyen dispositivos unidos a la superficie del organismo, por ejemplo, lentes de contacto.

55 Preferentemente, el dispositivo médico implantable se envasa en un envase cerrado herméticamente y estéril antes de su uso.

60 Además, la invención proporciona un método para preparar un dispositivo médico implantable de acuerdo con el octavo aspecto de la invención, método que comprende tratar un dispositivo médico implantable sin tratar, o los componentes o ingredientes del mismo, con un compuesto tal como se describe en el presente documento.

65 Por 'tratamiento', en el contexto de este aspecto de la invención, los inventores se refieren a que el compuesto se reviste, se impregna, se une covalentemente a o de otro modo se mezcla con dispositivo médico implantable sin tratar, o los componentes o ingredientes del mismo.

Preferentemente, el dispositivo médico implantable se reviste con el compuesto. Por 'revestido', los inventores se refieren a que el compuesto se aplica a la superficie del dispositivo médico implantable. Por lo tanto, el dispositivo médico implantable se puede pintar o pulverizar con una solución que comprende un compuesto. Como alternativa, el dispositivo médico implantable se puede sumergir en un depósito del compuesto en solución.

5 Por ejemplo, el dispositivo médico implantable se puede incubar durante la noche a 4 °C en una solución que comprende un compuesto tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, el compuesto se puede inmovilizar en el dispositivo médico implantable por evaporación o por incubación a temperatura ambiente.

10 Como alternativa, el dispositivo médico implantable está impregnado con el compuesto. Por 'impregnado', los inventores se refieren a que el compuesto se incorpora o se mezcla de otro modo con los componentes o ingredientes del dispositivo médico implantable durante la fabricación, de modo que se distribuye a través de todo el dispositivo ensamblado.

15 Realizaciones preferidas de la invención, no limitantes, serán descritas a continuación a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que acompañan, en los cuales:

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la estructura de la piel.

20 La Figura 2 muestra la toxicidad celular de los fibroblastos dérmicos humanos normales después de 5 minutos, 1 hora y 4 horas de incubación con el compuesto 10.

NHDF fueron incubadas con diferentes concentraciones del compuesto 10 durante 5 minutos, 1 hora y 4 horas (0 μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM). Las células fueron entonces incubadas durante 24 horas en la oscuridad. La toxicidad fue comprobada por un ensayo MTT estándar. La viabilidad celular fue normalizada a uno, lo que significa, que los valores de las células de control fueron normalizados a uno. Línea de puntos grises: 5 minutos de incubación; la de puntos negros: 1 hora de incubación; línea negra: 4 horas de incubación; (n=3, media ± SD).

30 La figura 3 muestra la toxicidad celular de los queratinocitos epidérmicos humanos normales después de 5 minutos, 1 hora y 4 horas de incubación con el compuesto 10.

35 NHEK fueron incubadas con diferentes concentraciones del compuesto 10 durante 5 minutos, 1 hora y 4 horas (0 μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM). Las células fueron entonces incubadas durante 24 horas en la oscuridad. La toxicidad fue comprobada por un ensayo MTT estándar. La viabilidad celular fue normalizada a uno, lo que significa, que los valores de las células de control fueron normalizados a uno. Línea de puntos rojos: 5 minutos de incubación; la de puntos negros: 1 hora de incubación; la de puntos azules: sólo 4 horas de incubación; (n=3, media ± SD).

40 La Figura 4 muestra la estabilidad química del Compuesto 10 formulado (A) como un sólido, (B) en agua y (C) en PBS.

La Figura 5 muestra una representación gráfica en 3D de la estabilidad (medida por HPLC) del Compuesto 10 después de 21 días en tampón PBS.

45 La Figura 6 muestra la estabilidad durante 8 semanas de varias formulaciones (A) del Compuesto 1, (B) del Compuesto 8, (C) del Compuesto 12 y (D) del Compuesto 10.

La Figura 7 muestra la estabilidad extendida durante 17 semanas de varias formulaciones (A) del Compuesto 10 y (B) del Compuesto 8.

50 La Figura 8 muestra los efectos del Compuesto 10 ("XF-73") y agentes de control a una MIC 4x frente a cultivos en frío de SH1000 de *S. aureus*.

La Figura 9 muestra los efectos del Compuesto 10 ("XF-73") y agentes de control a una MIC 4x frente a cultivos de SH1000 de *S. aureus* rigurosos†.

55 La Figura 10 muestra los efectos del Compuesto 12 ("XF-70") y del Compuesto 10 ("XF-73") y de agentes de comparación (a una MIC 4x) sobre la viabilidad de cultivos de SH1000 de *S. aureus* rigurosos. Se añadió mupirocina (5 ug/ml) en el punto temporal -30 minutos para inducir la respuesta rigurosa, seguido por otros inhibidores y fármacos en el punto temporal cero.

60 La Figura 11 muestra los efectos del Compuesto 12 ("XF-70") y del Compuesto 10 ("XF-73") y agentes de comparación (a una MIC 4x) sobre la viabilidad de SH1000 de *S. aureus* mantenida a 4 °C en Caldo de Mueller-Hinton.

65 La Figura 12 muestra la cinética de eliminación del Compuesto 10 ("XF-73"), el Compuesto 12 ("XF-70") y un número de agentes antimicrobianos frente a cepas SH1000 de *S. aureus* que expresan la respuesta rigurosa. Los

valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de tres replicados a partir de tres experimentos independientes.

5 La Figura 13 muestra la cinética de eliminación del Compuesto 10 ("XF-73"), el Compuesto 12 ("XF-70") y un número de agentes antimicrobianos frente a cepas SH1000 de *S. aureus* en cultivos fríos. Los valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de tres replicados a partir de tres experimentos independientes.

10 La Figura 14 muestra la cinética de eliminación del Compuesto 10 ("XF-73"), el Compuesto 12 ("XF-70") y un número de agentes antimicrobianos frente a cepas SH1000 de *S. aureus* en la fase estacionaria temprana. Los valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de tres replicados a partir de tres experimentos independientes.

15 La Figura 15 muestra la cinética de eliminación del Compuesto 10 ("XF-73"), el Compuesto 12 ("XF-70") y un número de agentes antimicrobianos frente a cepas SH1000 de *S. aureus* en la mitad de la fase estacionaria. Los valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de tres replicados a partir de tres experimentos independientes.

20 La Figura 16 muestra la cinética de eliminación del Compuesto 10 ("XF-73"), el Compuesto 12 ("XF-70") y un número de agentes antimicrobianos frente a cepas SH1000 de *S. aureus* al final de la fase estacionaria. Los valores mostrados son las medias y las desviaciones estándar de tres replicados a partir de tres experimentos independientes.

## Ejemplos

### 25 EJEMPLO A: SINTESIS DE COMPUESTOS A MODO DE EJEMPLO

#### ***Materiales y métodos***

##### Mediciones – NMR

30 Los espectros de NMR de protón fueron registrados en un instrumento Broker B-ACS60 (300 MHz) usando TMS como estándar interno. Los cambios químicos se dan en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz en el disolvente indicado. Algunas abreviaturas para NMR: singlete (s), singlete amplio (bs), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), quinteto, multiplete (m).

##### Productos químicos

40 Todos los disolventes y reactivos fueron comprados a Aldrich, Fluka, Merck y Lancaster y usados sin ninguna purificación adicional.

El dipirrolmetano fue preparado según lo descrito por C. Broker *et al.*, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2 455 (1998).

##### Cromatografía

45 La cromatografía en columna fue llevada a cabo usando gel de sílice (Merck Silicagel 60, Fluka 60; 0,040-0,063 mm) y Sephadex LH-20 (Pharmacia). Todos los disolventes (Synopharm) para la cromatografía se encontraban en grado técnico puro.

##### Abreviaturas

50 DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona  
DMF: N,N-dimetilformamida  
TFA: Acido trifluoroacético

### 55 ***Vías de síntesis para los compuestos de ensayo***

Fueron sintetizados los siguientes compuestos de ensayo tal como se describe en el documento WO 2004/056828, el documento WO 2006/000765 y el documento WO 2007/074340.

60 *Compuestos de ejemplo para uso en la invención*

Compuestos 6, 8 hasta el 10, 12, 23, 25, 28, 31 y 32.

*Compuestos de referencia (para usarse como controles comparativos)*

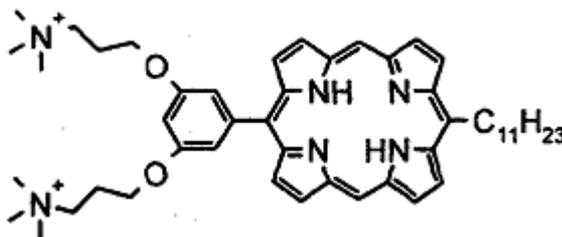
65 Compuestos 1, 3, 16, 19, 26, 29, 33, 36, 37, 39, 41 y 46 hasta 51.

*Compuestos químicos intermedios*

Compuestos 2, 4, 5, 7, 11, 13 hasta el 15, 17, 18, 20 hasta 22, 24, 27, 30, 34, 35, 38, 40 y 42 hasta 45.

5 COMPUESTO 6

Dicloruro de 5-[3,5-bis-(3-trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-15-undecil-porfirina



10 A una suspensión agitada vigorosamente del Compuesto 5 (80 mg, 0,14 mmol) y  $K_2CO_3$  (230 mg, 1,7 mmol) en DMF (30 ml), se le adiciona una solución de bromuro de (1-bromopropil)- trimetilamonio (0,3 g, 16,6 mmol) a 50 °C y la mezcla es agitada a esta temperatura durante 18 horas. Después de extraer el DMF a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y filtrado a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (de 3,5 cm de diámetro). Después de lavar la capa con metanol (ca. 1 l), el producto crudo es eluido con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Se recogen las fracciones apropiadas y, después de la evaporación del disolvente a baja presión, se purifica el residuo obtenido por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20 eluyéndolo con n-butanol: agua: ácido acético (5:4:1, en vol., fase superior). Después de extraer el disolvente de las fracciones apropiadas a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y la solución es pasada por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). Después de recoger el eluato, se extrae el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se seca a alto vacío hasta obtener la sal de dicloruro en forma de un sólido de color violeta.  $^1H$ -NMR:

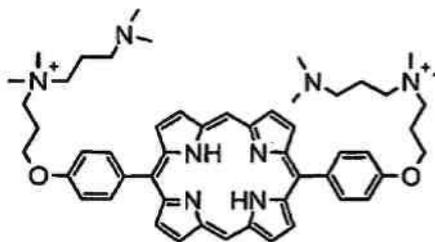
15  $\delta_H$  (300Mz,  $CD_3OD$ ): 0,75 (t,  $^3J$  7,5 Hz, 3 H), 1,05-1,20 (m, 14 H), 1,45-1,50 (m, 2 H), 2,05-2,15 (m, 4 H), 2,15-2,20 (m, 2H), 2,95 (s, 18 H), 3,35-3,45 (m, 4 H), 3,95 (t,  $^3J$  7,5 Hz, 4 H), 4,55 (t,  $^3J$  7,5 Hz, 2 H), 6,85 (m, 1 H), 7,35 (m, 2 H), 8,85-8,90, 9,15-9,20, (3 x m, 8 H), 10,10 (s, 2 H).

20

25

30 COMPUESTO 8

30 Dicloruro de 5,15-bis-(4-{3-[(3-dimetilamino-propil)-dimetil-amonio]-propiloxi}-fenil)-porfirina



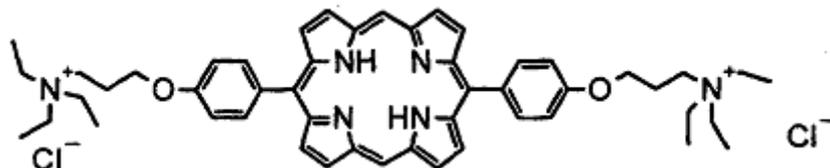
35 El Compuesto 7 (200 mg, 0,27 mmol) es disuelto en DMF absoluto (40 ml) con N, N, N', N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (5 ml, 13,9 mmol) y la solución es agitada a 50 °C en argón durante la noche. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y la solución es filtrada a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (3,5 cm de diámetro). La capa es eluida con metanol (ca. 1l) seguido por ácido acético:metanol:agua (3:2:1, en vol.). Después de la evaporación del disolvente de las fracciones apropiadas, el producto crudo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y posteriormente purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20 usando n-butanol: agua: ácido acético (4:5:1, en vol., fase superior) como fase en desarrollo. La primera fracción eluida es el producto deseado. Después de extraer el disolvente a baja presión, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y pasado por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). Después de extraer el disolvente del eluato a presión reducida, el residuo es tratado con dietil-éter y secado a alto vacío para obtener el producto en forma de un sólido de color violeta.  $^1H$ -NMR:

40  $\delta_H$  (300MHz,  $CD_3OD$ ): 2,20-2,35 (m, 4 H), 2,40-2,50 (m, 4 H), 2,80 (s, 12 H), 3,05 (4 H, t,  $^3J$  7,8, 2 H), 3,25 (s, 12 H), 3,45-3,55 (bs, 4 H), 3,65-3,75 (m, 4 H), 4,30 (t,  $^3J$  4,2 Hz, 4 H), 7,40, 8,10 (2 x d,  $^3J$  7,5 Hz, 2 x 4 H), 8,95, 9,45 (2x d,  $^3J$  4,2 Hz, 8 H), 10,40 (s, 2 H).

45

COMPUESTO 9

Dicloruro de 5,15-bis-[4-(3-trietilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina



5

A una solución del Compuesto 7 (50 mg, 0,068 mmol) en DMF absoluta (20 ml) se adiciona trietilamina (4,7 ml, 0,034 mol, 500 eq.). La mezcla es agitada a 60 °C durante 24 h. El disolvente es extraído a presión reducida y el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y filtrado a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (de 3,5 cm de diámetro). Después de lavar con metanol (ca. 1L), la capa es eluída con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Después de la evaporación del disolvente de la fracción eluída, el producto crudo es disuelto en metanol (5 ml) y purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20, eluyéndolo con n-butano: agua: ácido acético (4:5:1, en vol., fase superior). Los disolventes son extraídos a baja presión de las fracciones apropiadas, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y la solución es pasada por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro), para obtener el producto en forma de un sólido de color violeta después de la evaporación del disolvente. <sup>1</sup>H-NMR:

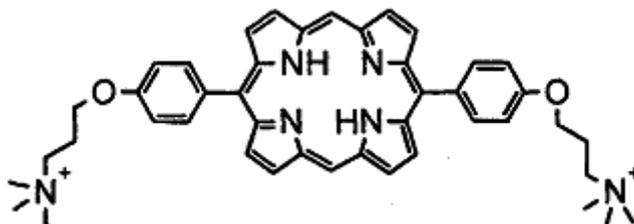
$\delta_H$  (300Mz, CD<sub>3</sub>OD): 1,25 (m, 18H), 2,13 (m, 4H), las señales para -CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub> (16H) se encuentran en el área de 3,00-3,40 como parte de un multiplete cubierto por las señales de los disolventes, 4,15 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz), 7,36 (d, 4H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz), 8,15 (d, 4H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz), 9,05 (d, 4H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz), 9,54 (d, 4H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz), 10,45 (s, 2H).

20

COMPUESTO 10

Dicloruro de 5,15-bis-[4-(3-trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina

25



Se transfiere una solución del Compuesto 7 (300 mg, 0,41 mmol) en DMF absoluto (50 ml) a una autoclave de 100 ml. Después de adicionar trimetilamina (4,5 g), la mezcla es agitada a 50 °C durante 16 h. Después de la evaporación del disolvente, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y la solución es filtrada a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (de 3,5 cm de diámetro). Después del lavado con metanol (ca. 1L) se eluye la capa con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Después de la evaporación del disolvente de las fracciones apropiadas, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20, eluyéndolo con n-butanol: agua: ácido acético (4:5:1, en vol., fase superior). Se obtienen dos fracciones, la primera elución de estas fracciones es el producto deseado. El disolvente es extraído a presión reducida y el residuo obtenido se vuelve a disolver en metanol (5 ml) y la solución es pasada por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo es tratado con metanol: dietil-éter y secado a alto vacío para obtener el producto en forma de un sólido de color violeta. <sup>1</sup>H-NMR:

$\delta_H$  (300Mz, CD<sub>3</sub>OD): 2,40-2,60 (m, 4 H), 3,30-3,25 (bs, 18 H), 3,75-3,80 (m, 4 H), 4,40 (t, <sup>3</sup>J 7,5 Hz, 4 H), 7,40, 8,20 (2 x d, <sup>3</sup>J 8,5 Hz, 8 H), 9,05, 9,50 (2 x d, <sup>3</sup>J 4,5 Hz, 8 H), 10,45 (s, 2 H).

40

*Ruta de síntesis alternativa para el Compuesto 10*

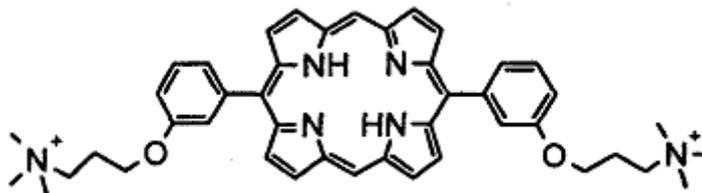
El compuesto 42 (100 mg, 0,2mMol; ver más abajo) se disuelve y se suspende carbonato de potasio (230mg 1.7mMol) en DMF (30 ml) y se añade a gotas a 50°C una solución de (1-bromopropil)-trimetilamonio bromuro (350 mg, 1.3mMol) en DMF (5mL) a la mezcla agitada vigorosamente durante 30 minutos. La mezcla es calentada durante 15 h. DMF es eliminado por evaporación rotatoria y el residuo obtenido es disuelto en metanol y la solución filtrada a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada sobre una frita de acero (de 3,5 cm de diámetro). Después de lavar con metanol (ca. 1L), la capa es eluída con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Después de la evaporación de fracciones adecuadas del disolvente, el residuo obtenido es disuelto en metanol

50

(5 ml) y purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20, eluyéndolo con n-butano: agua: ácido acético (4:5:1, en vol., fase superior). Se obtienen dos fracciones, la primera elución es el producto deseado. El disolvente es extraído a baja presión y el residuo obtenido es redisoluto en metanol (5 ml) y la solución es pasada por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). Después de la evaporación del disolvente bajo presión reducida, el residuo es tratado con metanol: dietiéter y secado a alto vacío para obtener el producto en forma de un sólido de color violeta.

#### COMPUESTO 12

10 Dicloruro de 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina



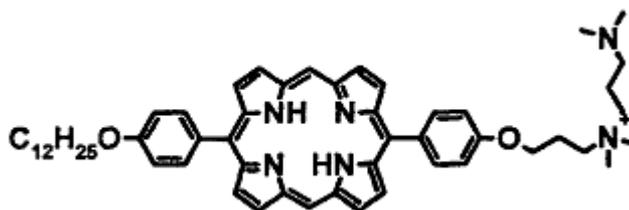
15 Una solución del Compuesto 11 (400 mg, 0,543 mmol) en DMF (50 ml) es transferida a una autoclave de 100 ml. Después de la adición de trimetilamina (6,3g), la mezcla es agitada a 50 °C durante 8 h. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y la solución es filtrada a través de una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (de 3,5 cm de diámetro). Después de lavar la capa con metanol (ca. 1L), el eluato con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, por vol) proporciona fracciones que, después de la evaporación del disolvente a presión reducida, producen un residuo

20 sólido. Este es disuelto en metanol (5 ml) y purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20, eluyéndolo con n-butanol: agua: ácido acético (4:5:1, en vol., fase superior). Se eluyen dos fracciones de la columna, la primera de las cuales es el producto deseado. Después de extraer el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml). La solución es pasada por una columna corta (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro), el disolvente es extraído a presión reducida y el producto crudo es tratado con metanol: dietil-éter para obtener un sólido de color violeta el cual es secado a alto vacío. <sup>1</sup>H-NMR:

25  $\delta_H$  (300Mz, CD<sub>3</sub>OD): 2,30-2,35 (m, 4 H), 3,15 (s, 18 H), 3,95-4,05 (m, 4 H), 4,20-4,25 (m, 4 H), 7,40-7,45, 7,65-7,70, 7,80-7,85 (3 x m, 8 H), 9,00-9,05, 9,40-9,45, (2 x m, 8 H), 10,40 (m, 2 H).

#### 30 COMPUESTO 23

Cloruro de 5-{4-[3-dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amonio-propiloxi]fenil}-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina.



35 El Compuesto 20 (30 mg, 0,038 mmol) es disuelto con N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (156 mg, 1,2 mmol) en THF: DMF(1:1 en vol., 20 ml) y agitado a 50 °C durante 18 h. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo es disuelto en diclorometano y purificado por cromatografía de columna (gel de sílice Merck 60) y se eluye con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Después de combinar las fracciones apropiadas y extraer el disolvente a presión reducida, el residuo es cristalizado a partir del diclorometano: hexano para obtener el producto en forma de un sólido de color violeta. <sup>1</sup>H-NMR:

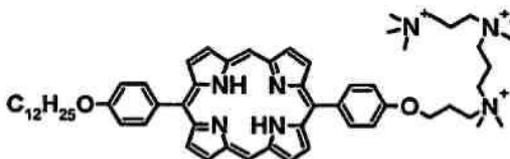
40  $\delta_H$  (300Mz, CDCl<sub>3</sub>+1 % ácido acético): 0,85 (m, 3 H), 1,20-1,40 (m, 18 H), 1,55-1,60 (m, 2 H), 1,60-1,65 (m, 4H), 2,10-2,20 (bs, 8 H), 3,15-3,25 (m, 8 H), 3,75 (bs, 2 H), 4,20 (bs, 2 H), 4,35 (bs, 2 H), 7,15-7,20, 8,10-8,15 (2 x m, 8 H), 8,95-9,00, 9,10-9,15, 9,25-9,30 (3 x bs, 8 H), 10,20 (s, 2H).

45

COMPUESTO 25

Tricloruro de 3-[(3-[(3-{4-[15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina-5-il]-fenoxi)-propil]-dimetil-amonio]-propil]-dimetil-amonio)-propil]-trimetil-amonio.

5



El Compuesto 23 (20 mg, 0,022 mmol) y bromuro de (1-bromopropil)-trimetil-amonio (26 mg, 0,1 mmol) son disueltos en DMF (15 ml) y agitados durante la noche a 50 °C. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo es disuelto en metanol (5 ml) y aplicado a una capa (3 cm de profundidad) de gel de sílice que se lava con metanol (500 ml) seguido por ácido acético:metanol:agua (3:2:1 por vol). Después de la evaporación del disolvente el residuo es purificado por cromatografía de columna (gel de sílice, Merck 60) usando primero ácido acético: metanol: agua (3:2:1 en vol.) y después piridina: ácido acético (1:1 en vol.). Se recoge la segunda fracción eluída y se seca al vacío. Se disuelve el residuo en metanol (2 ml) y se purifica por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20 la cual es eluída con n-butanol: ácido acético: agua (5:1:4 en vol., fase superior). Después de extraer el disolvente a presión reducida, el residuo es secado al vacío a 80 °C. La espectroscopía de NMR indica que el producto está contaminado con una pequeña proporción de productos de eliminación.

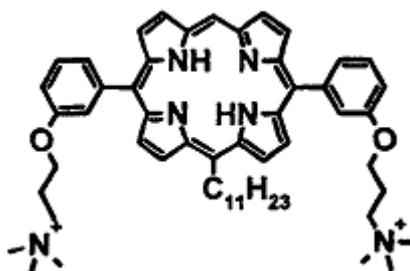
10

15

COMPUESTO 28

20

Dicloruro de 5,15-bis-[3-(3-trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-10-undecil-porfirina



A una solución del Compuesto 27 (50 mg, 0,08 mmol) en DMF (20 ml), en una atmósfera de argón, se añade K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mg, 0,72 mmol) y (3-bromopropil)-bromuro de trimetilamonio (300 mg, 1,2 mmol) y la mezcla se agita a 50 °C durante 18 h. Después de extraer el disolvente a alto vacío, el residuo obtenido es disuelto en metanol (5 ml) y filtrado por una capa de gel de sílice (de 2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (3,5 cm de diámetro). Después de lavar la capa con metanol (500 ml), se eluye con ácido acético:metanol:agua (3:2:1, v:v). Después de secar las fracciones combinadas adecuadas a alto vacío, el residuo es disuelto en metanol y purificado por cromatografía de columna en Sephadex LH-20, se eluye con n-butanol:ácido acético:agua (5:1:4, en vol., fase superior). Después de la evaporación del disolvente, el residuo obtenido de la primera fracción eluída es disuelto en metanol y pasado por una columna corta de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro, para obtener, después de la evaporación del disolvente, el producto puro. <sup>1</sup>H-NMR: δ<sub>H</sub> (300Mz, CD<sub>3</sub>OD): 0,85 (t, <sup>3</sup>J 7,5 Hz, 3 H), 1,20-1,40 (m, 12 H), 1,50 (m, 2 H), 1,80 (m, 2 H), 2,40 (bs, 4 H), 2,55 (m, 2 H), 3,20 (bs, 18 H), 3,65 (bs, 4 H), 4,35 (bs, 4 H), 5,10 (m, 2 H), 7,50-7,55, 7,70-7,85 (2 x m, 8 H), 8,95-9,00, 9,25-9,24, 9,50-9,70 (3 x bs, 8 H), 10,15 (bs, 1H).

25

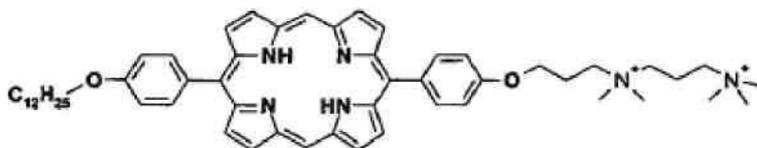
30

35

COMPUESTO 31

40

Dicloruro de 5-{4-[3-dimetil-(3-trimetilamonio-propil)-amonio-propiloxi]-fenil}-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina.



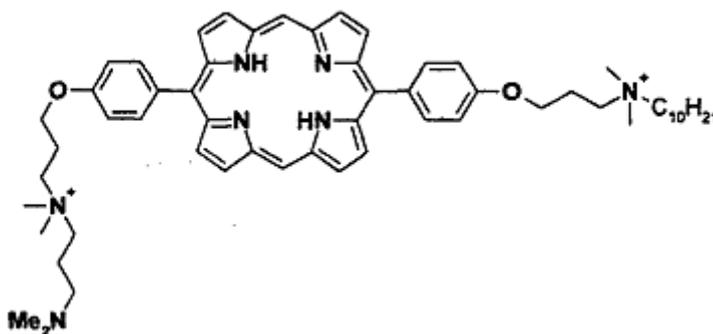
El Compuesto 23 (50 mg, 0,055 mmol) es disuelto con yoduro de metilo (5 ml, 80 mmol) en DMF absoluto (30 ml) y la mezcla es agitada a 40 °C durante 3 h. Después de la evaporación del disolvente, se disuelve el residuo obtenido en metanol (5 ml) y se filtra por una capa de gel de sílice (2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (3,5

45

cm de diámetro). Después de lavar la capa con metanol (ca. 1 l), se eluye con diclorometano: metanol (2:3 en vol., 500 ml) y posteriormente con ácido acético: agua: metanol (3:1:2, en vol.). Después de extraer el disolvente de las fracciones reunidas, el residuo obtenido es disuelto en ácido acético y purificado por cromatografía de columna en Sephadex LH-20, y se eluye con ácido acético. Después de la evaporación del disolvente de las fracciones reunidas apropiadas y de secar el residuo obtenido a alto vacío, el residuo es disuelto en metanol y pasado por una columna pequeña (3,5 x 20 cm) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). Después de la evaporación del disolvente del eluato, el producto es secado a alto vacío.

#### COMPUESTO 32

Dicloruro de 5-[4-(3-Dimetildecil-amoniopropiloxi)-fenil]-15-{4-[3-dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amoniopropiloxi]-fenil}-porfirina.



Se disuelve el Compuesto 23 (50 mg, 0,068 mmol) con N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propanodiamina (354 mg, 1,36 mmol) y N,N-dimetildecilamina (1 g, 2,72 mmol) en DMF:THF(30 ml, 1:1, en vol.) y la mezcla es agitada a 50 °C durante la noche. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol (10 ml) y filtrado a través de una capa de gel de sílice (2 cm de profundidad) soportada en una frita de acero (3,5 cm de diámetro). Después de lavar la capa con metanol (ca. 500 ml), este es eluido con ácido acético: metanol: agua (3:2:1, en vol.). Las dos primeras fracciones eluidas son combinadas y después de la evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido es disuelto en metanol y purificado por cromatografía en una columna (2,5 x 40 cm) de Sephadex LH-20, se eluye con n-butanol: agua: ácido acético (4:5:1, en vol.). Después de extraer el disolvente a presión reducida de la segunda fracción eluida, el residuo es disuelto en metanol (5 ml) y pasado por una columna corta (3,5 x 20 cm.) de resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA 400, en forma de cloruro). El eluato es evaporado hasta secarse y el residuo obtenido es secado a alto vacío para obtener el producto.

<sup>1</sup>H-NMR:

$\delta_H$  (300MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0,80 (m, 3 H), 1,05-1,25 (m, 10 H), 1,25-1,40 (bs, 2 H), 1,80-1,90 (bs, 4 H), 2,15-2,30 (bs, 2 H), 2,80-3,60 (m, 20 H), 3,80-3,95 (bs, 4 H), 7,05-7,15, 7,85-8,00 (2 x m, 2 x 4 H), 8,75-8,90, 9,20-9,35 (2bs, 24H), 10,15 (bs, 2 H).

#### EJEMPLO B: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA INNATA DEL COMPUESTO 10 - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (MIC) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (MBC)

La Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) para un agente antimicrobiano contra un microorganismo específico es definida como la concentración mínima de un agente antibacteriano donde no se observa crecimiento aparente visible del organismo (definición de FDA de Concentración Inhibitoria Mínima). La MIC se determina normalmente utilizando las concentraciones tradicionalmente derivadas de series de diluciones dobles (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Manual M7-A5: Métodos de Ensayo de Susceptibilidad de Dilución Antimicrobiana para Bacterias que Crecen Aeróbicamente; Normativa aprobada -5ª edición volumen 20 número 2. de Enero de 2000). La MIC se investigó para 10 compuestos en ausencia de luz, utilizando un protocolo basado en el protocolo MIC producido por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Manual M7-A5, supra).

La concentración mínima de bactericidas (MBC) se define como la concentración mínima necesaria de medicamento para eliminar la mayoría (99,9%) de los organismos viables tras su incubación durante un período de tiempo fijo (generalmente 24 horas) bajo un conjunto dado de condiciones (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Manual M26-A; "Methods for determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Directrices Aprobadas" Volumen 19 número 18, Septiembre 1999).

**Metodología**

En este estudio se utilizó el *Staphylococcus aureus* BAA-44, una cepa Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) obtenida del catálogo ATCC resistente a multimedicamentos. Se investigaron las siguientes concentraciones del compuesto 10: 0,764; 0,382; 0,191; 0,0955; 0,0478; 0,0239, 0,0119; 0,00597; 0,00298; 0,00149; 0,00075 y 0,00037 µg/ml. Se formaron soluciones madre en agua destilada y se hizo una serie de diluciones de ésta para producir las concentraciones requeridas inmediatamente antes de su uso

Al menos de 3 a 5 colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico fueron seleccionadas de un cultivo de placa de agar y el crecimiento transferido a un tubo que contiene 100 ml de caldo de Isosensitest y el caldo de cultivo se incubó a 37 °C durante la noche. El cultivo fue entonces diluido a una densidad final de 104 células/ml con un caldo de Isosensitest fresco e incubado con agitación a 37 °C hasta que las células entraron en un crecimiento exponencial.

Se transfirieron 0,09 ml del inóculo ajustado a cada uno de 24 pocillos de una placa de microtitración de poliestireno de 96 pocillos. Un pocillo de control de bacterias solo en presencia del medio de crecimiento solo fue incluido (como un control positivo).

Se pipetearon 0,09 ml de las soluciones madre del Compuesto 10 de la serie de dilución en el pocillo correspondiente a las placas de microtitración y se incubaron en la oscuridad a 37°C y las placas se examinaron tras 24 horas de incubación para determinar la turbidez en cada pocillo. Estos datos se utilizan para determinar la MIC.

Después de 24 horas de incubación a 37°C, 25 µl muestras del líquido de los pocillos sin crecimiento bacteriano visible (de cuatro pocillos para arriba) fueron inoculados en placas de agar nutriente como manchas e incubados a 37°C para tras 24 horas para determinar la MBC.

**Resultados**

Los resultados demostraron que la MIC para el compuesto 10 en ausencia de luz era 0,0955 µg/ml, y que la MBC era de 0,382 µg/ml (Tabla 1).

**Tabla 1**

Datos MIC y MBC para Compuesto 10		
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<b>Serie 1</b>	0,09555	0,382*
<b>Serie 2</b>	0,09555	No determinado
*Crecimiento en sub de 0,191 muy reducido desde el inóculo inicial a unos 10 <sup>3</sup> /ml		

**Conclusiones**

Los resultados demuestran que en ausencia de luz el compuesto 10 tiene valores bajos de MIC y MBC. Estos datos indican que el compuesto 10 es considerablemente más potente como un antibiótico que algunos antibióticos tradicionales (ver Tabla 2):

**Tabla 2**

Valores MIC y MBC para el compuesto 10 y antibióticos convencionales		
Compuesto	Valores MIC (µg/ml)	Valores MBC (µg/ml)
Compuesto 10	0,0955	0,382
Vancomicina	1 <sup>a</sup>	4 – 16 <sup>b</sup>
Zyvox® (Linezolid)	4 <sup>a</sup>	4 - >64 <sup>c</sup>
(a) Critchey LA <i>et al.</i> Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> (2003); 47(5): 1689-93		
(b) Biavasco F <i>et al.</i> In vivo antibacterial activity of LY333328, a new semisynthetic glycopeptide. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> (1997); 41(10): 2165-72		
(c) Fuchs PC <i>et al.</i> In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> (2002); 49: 467-70		

**EJEMPLO C: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA INNATA DEL COMPUESTO 10 - ACTIVIDAD EN UNA GAMA DE CEPAS Y AISLADOS CLÍNICOS DE REFERENCIA**

5 Las Concentraciones Mínimas de Inhibición (MIC's) para el compuesto 10, en una gama de cepas y aislados clínicos de referencia, fue determinada utilizando medio de IsoSensite® y concentraciones mínimas de bactericida (MBC) determinadas por subcultivo sobre agar sangre Columbia.

**Metodología**

- 10 1. Se formó una solución en agua de 5 mg/ml de la reserva del compuesto 10.
2. Se llevó a cabo una serie de diluciones para producir una gama de concentraciones de entre 32 – 0,001 mg/l.
- 15 3. Los microorganismos de ensayo fueron cultivados durante la noche en medio IsoSensite®.
4. Los cultivos fueron luego diluidos con caldo fresco a una concentración final de 104 organismos/ml y colocados en un agitador durante 90 minutos a 37°C.
- 20 5. 90 µl del caldo de cultivo conteniendo los microorganismos fueron transferidos a cada uno de 12 pocillos en una fila en una bandeja de microtitración y repetidos en una bandeja de control - cuatro organismos por bandeja.
6. 90 µl de la adecuada dilución del compuesto 10 se añadieron luego a cada pocillo conteniendo organismos para dar una serie final de dilución de 16 mg/l a 0,0005 mg/l.
- 25 7. Las soluciones fueron bien mezcladas e incubadas en la oscuridad durante 24 horas.
8. La MIC fue registrada y 25 µl de los pocillos que no mostraban ningún crecimiento fueron subcultivados en agar sangre para la determinación de MBC.
- 30 9. Los valores de MBC se registraron después de una noche de incubación de los subcultivos.
10. Controles del caldo no inoculado y de caldo más inóculo se llevaron a cabo para cada organismo en cada cubeta.

**Resultados**

Los resultados se muestran en la Tabla 3

**Tabla 3**

Valores MIC y MBC para el compuesto 10 y antibióticos convencionales			
Organismo	Cepa	Cpd 10 MIC (mg/l)	Cpd 10 MBC (mg/l)
<i>(a) Staphylococcus Aureus (Resistente a Meticilina)</i>			
	ATCC BAA-44 Experimento 1	0,5	0,5
	Experimento 2	0,5	1
	Experimento 3	2	2
	Experimento 4	0,5	1
	Experimento 5	0,5	>1
	Experimento 6	0,5	1
	NCTC 11939 (EMRSA-1)	0,5	0,5
	EMRSA-15*	1	1
	EMRSA-16*	0,5	0,5

40

<i>(b) Staphylococcus Aureus (Sensible a Metilina)</i>			
	NCTC 6571	0,5	0,5
	ATCC 25923	0,5	1
<i>(c) Staphylococcus Epidermis (Resistente a Metilina)</i>			
	38808*	0,5	0,5
	33759*	0,5	1
	33659*	0,5	1
	36572*	0,25	0,25
<i>(d) Staphylococcus Epidermis (Sensible a Metilina)</i>			
	37453*	0,5	0,5
<i>(e) Enterococcus Faecium</i>			
	NCTC 12204	1	1
	E1*	0,5	1
	E5*	0,5	1
	E19*	0,5	0,5
	E44*	0,5	0,5
<i>(f) Enterococcus Faecalis</i>			
	ATCC 29212	1	>1
	E3*	0,5	1
	E4*	0,5	0,5
	E10*	0,5	1
	E37*	0,5	1
* = Aislados clínicos			

### Conclusiones

- 5 Los resultados demuestran que el compuesto 10 tiene muy bajos los valores de MIC y MBC para una gama de cepas bacterianas gram-positiva. Los valores de MIC y MBC son casi idénticos dentro de las limitaciones de la metodología, que sugiere que el modo de actividad antimicrobiana es bactericida frente a bacteriostática.

### EJEMPLO D: ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL COMPUESTO 10 SOBRE CÉLULAS HUMANAS

10

#### Metodología

15 Loa compuestos de ensayo se identificaron sistemáticamente en cuanto a toxicidad contra cultivos de células de piel humana utilizando queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), comprados a CellSystems Biotechnologie GmbH, Alemania.

20 Las células NHEK y NHDF fueron utilizadas entre los pasos 3 y 10. Las células fueron sembradas con 7,5 y/o 15 x 10<sup>4</sup> células/pocillo (placa de microtitración) y se les permitió unirse durante la noche en una incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Tras la incubación con diferentes concentraciones de los fotosensibilizadores seleccionados para varios períodos, las células fueron incubadas durante 24 horas en la oscuridad.

La toxicidad fue comprobada por un ensayo MTT estándar (Mossman *et al.*, 1983 J. Immunological Methods 65: 55 - 63). MTT es un indicador de células metabólicamente activas. Dependiente de la actividad enzimática en la mitocondria puede ser visualizada una reacción de color que puede ser medida por lector ELISA (540 nm). La

viabilidad celular fue normalizada a uno, lo que significa que los valores OD de las células después de incubación en ausencia de un compuesto de ensayo se normalizaron a uno. Cada experimento fue repetido tres veces.

### Resultados

Los resultados de los estudios de toxicidad en los queratinocitos y fibroblastos se muestran en las figuras 2 y 3. Los datos demuestran que el compuesto 10 no muestra una toxicidad innata para queratinocitos epidérmicos humanos normales o fibroblastos dérmicos humanos normales a dosis que se sabe que tienen un efecto antibacteriano.

### EJEMPLO E: ENLACE DE LOS COMPUESTOS EJEMPLARES CON CELULAS BACTERIANAS

#### Enlaces de los Compuestos 8, 10 y 12 con *E. coli*

Se incubaron células de *E. coli* durante 5 min. con los Compuestos 8, 10 ó 12 a varias concentraciones (1-7,5  $\mu\text{M}$ ). Al finalizar el período de incubación, se realizó la sedimentación de las células por centrifugado para extraer la fracción del compuesto de ensayo no ligado y el pellet celular fue resuspendido en 2 ml de SDS 2% para obtener lisados de células. Después de la incubación durante la noche con SDS, la cantidad de compuesto de ensayo enlazado se estimó mediante análisis espectrofluorimétrico de las células lisadas. La concentración de los compuestos en las células lisadas se calculó mediante la medición de las intensidades al máximo del espectro de emisión de fluorescencia y mediante la interpolación de datos en un gráfico de calibración. La cantidad de compuesto de ensayo de células ligadas se expresó en nmoles del compuesto por mg de proteína celular. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951, J. Biol. Chem. 193:265-275).

Todos los experimentos se efectuaron por triplicado y los resultados representan el promedio de las 3 determinaciones con desviaciones estándar.

La cantidad de porfirina recuperada de las células se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Concentración de compuesto ( $\mu\text{M}$ )	Compuestos enlazados (nmol/mg de proteínas celulares)		
<u>(a) 0 lavados</u>			
	Compuesto 8	Compuesto 12	Compuesto 10
0,01	0,024 $\pm$ 0,01	0,041 $\pm$ 0,02	0,026 $\pm$ 0,005
0,1	0,056 $\pm$ 0,02	0,151 $\pm$ 0,02	0,274 $\pm$ 0,05
0,5	0,522 $\pm$ 0,2	0,806 $\pm$ 0,14	1,542 $\pm$ 0,350
1	3,670 $\pm$ 0,7	2,70 $\pm$ 0,30	2,70 $\pm$ 0,354
<u>(b) 3 lavados</u>			
	Compuesto 8	Compuesto 12	Compuesto 10
0,01	0,009 $\pm$ 0,001	0,021 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,0004
0,1	0,030 $\pm$ 0,02	0,089 $\pm$ 0,02	0,078 $\pm$ 0,02
0,5	0,274 $\pm$ 0,15	0,622 $\pm$ 0,10	0,334 $\pm$ 0,092
1	2,230 $\pm$ 0,8	1,930 $\pm$ 0,20	,278 $\pm$ 0,102

Los resultados expuestos en la tabla 3 muestran que los tres compuestos de ensayo se enlazan a la *E. coli* con una eficiencia similar y que aproximadamente el 50% del compuesto que se asocia a las células al final del período de incubación (5 min.) se extrae mediante 3 lavados con PBS.

**EJEMPLO F: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD*****Estabilidad química***

5 La siguiente metodología HPLC se estableció para el análisis de los compuestos ejemplares de la invención.

El método comprende la detección por UV a una longitud de onda de 420 nm, la cual es muy específica para estos compuestos. Con el fin de supervisar las impurezas no relacionadas con la estructura de la porfirina (y por tanto que no absorben a 420 nm) los espectros UV de todos los cromatogramas también se registraron entre 200 nm y 700 nm mediante DAD (Diode Array Detector) en algunos experimentos.

Columna: Zorbax Phenyl, 250 x 4,6 mm, 5 µm

Eluyente A: 1,5 g de dodecilsulfato de sodio + 1ml de ácido fórmico en 1000 ml de agua

Eluyente B: 1,5 g de dodecilsulfato de sodio + 1ml de ácido fórmico en 200 ml de agua + 800 ml de tetrahidrofurano

Gradiente:

15

Tiempo [min]	Eluyente B [%]
0	50
31	65
32	90
33	50
43	50

Velocidad de Flujo: 0,4 ml/min

Detección: 420 nm

Temperatura de la Columna: 25 °C

20

Volumen de Inyección: 10 µl

Soluciones: Derivados de la porfirina fueron disueltos en el eluyente A para lograr una concentración final de aproximadamente 0,3 mg/ml.

25

El tiempo de retención típico de los compuestos ejemplares fue de aproximadamente 8 minutos (18 minutos de funcionamiento).

30

Se efectuaron ensayos de estrés cualitativos en los compuestos ejemplares de la invención. Se realizó el análisis mediante HPLC y LC-MS. Se efectuó ensayo de estrés a los compuestos en su forma sólida, en una solución acuosa y en una solución salina tamponada con fosfato. Las muestras fueron inicialmente incubadas durante más de 7 días a 50 °C y se extrajo una muestra para ensayo. Las muestras fueron entonces incubadas por otros 7 días a 70 °C, se extrajeron muestras como antes y las muestras fueron incubadas después durante 7 días a 90 °C. Se efectuaron análisis de HPLC de soluciones recién preparadas y se compararon con las muestras después de 7, 14 y 21 días de incubación. Se efectuó, entonces, una comparación visual de los cromatogramas y se determinaron los contenidos de los productos principales y los subproductos en forma de valores porcentuales de área (véase Figura 4).

35

Los gráficos en 3D de los cromatogramas no muestran indicaciones de formación adicional de fragmentos (no hay señal a longitudes de onda inferiores).

40

En el gráfico de la Figura 5 se observa una muestra después de 21 días en buffer PBS, la cual mostró el mayor efecto de degradación. Los resultados demostraron una degradación mínima en el análisis del medicamento sólido y el medicamento en solución calentada a 80 °C durante varias semanas.

**Conclusiones**

45

Se encontró que los Compuestos 10 y 12 exhiben una buena estabilidad y eran muy estables incluso en las condiciones extremas del protocolo de ensayo. Aunque el Compuesto 8 era menos estable que los compuestos 10 y 12, se encontró que la estabilidad demostrada era suficiente para su uso práctico.

50

***Estabilidad de los compuestos ejemplares en las formulaciones***

La estabilidad de los tres compuestos ejemplares (Compuestos 8, 10 y 12) y un compuesto de referencia (Compuesto 1), almacenados a 40 °C en la oscuridad durante 8 semanas en frascos de polietileno en varias formulaciones de base acuosa, fue evaluada como sigue:

- Sulfato sódico láureo (SLES) + agua
- 9:1 de agua:etanol
- SLES + mezcla 9:1 de agua:etanol

5 Los espectros UV fueron registrados en el intervalo de 350-700 nm durante un período de 7 semanas y se realizó una evaluación visual de las muestras a las 8 semanas.

Los resultados indican que todos los compuestos ensayados exhibieron una buena estabilidad durante un período de 8 semanas (véase Figura 6).

10

Para los Compuestos 8 y 10, los estudios de estabilidad se extendieron por 17 semanas (véase Figura 7).

#### **EJEMPLO G: ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA DEL COMPUESTO 10**

15 El compuesto 10 fue ensayado en 3,2 mM en una formulación tópica en una ensayo de toxicidad dérmica aguda estándar para determinar si era posible detectar alguna toxicidad clínica o histológica del compuesto.

El protocolo de toxicidad aguda se basó en la Guía para ensayos de productos químicos OECD/ Sección 4 – Ensayo de efectos en la salud número 402: Toxicidad dérmica aguda.

20

#### Resultados y Conclusiones

Después de observación clínica, macroscópica y microscópica, no se observó toxicología clínica. No se observó toxicología histológica en ninguno de los órganos importantes (incluyendo la piel).

25

En conclusión, el Compuesto 10 no produjo ningún efecto tóxico agudo: de hecho, no se observaron signos clínicos o patológicos significativos relacionados con la sustancia y su vehículo de aplicación.

#### **EJEMPLO H: EFICACIA DEL COMPUESTO 10 FRENTE A BIOPELÍCULAS Y CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE CRECIMIENTO LENTO**

30

#### Resumen

**Antecedentes:** Una característica fundamental de la formación de biopelículas es la capacidad de las bacterias para resistir la actividad antibiótica. La velocidad de crecimiento más lenta de las bacterias en biopelículas puede ser un factor importante en la mayor resistencia. Los inventores han investigado la actividad del Compuesto 10, el compuesto principal en una clase totalmente nueva de agentes antimicrobianos, frente a biopelículas y cultivos de *Staphylococcus aureus* de crecimiento lento.

35

**Métodos:** Las MIC se determinaron para cultivos planctónicos por microdilución de caldo de acuerdo con la Sociedad Británica para Directrices de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC). Las MIC de biopelículas (bMIC) y las concentraciones mínimas de erradicación de biopelícula (MBEC) se determinaron usando el dispositivo Calgary de biopelícula. El efecto del Compuesto 10 sobre la viabilidad de las células de cultivo en frío se determinó haciendo crecer células SH1000 de *S. aureus* hasta una fase casi exponencial a 37 °C y resuspendiendo las células en medios enfriados previamente, en los que se mantuvieron en presencia y en ausencia del Compuesto 10 y agentes de control. El efecto del Compuesto 10 sobre las células de crecimiento lento que expresan la respuesta rigurosa también se determinó mediante el crecimiento de cultivos hasta una fase casi logarítmica y la respuesta rigurosa inducida por la adición del inhibidor de la isoleucil-ARNt sintetasa, la mupirocina. A continuación, se añadieron el Compuesto 10 y agentes de control y se recuperaron muestras para determinaciones viables de células.

40

45

50

**Resultados:** El Compuesto 10 presentaba una actividad antibiopelícula potente con una bMIC de 1 µg/ml y una MBEC de 2 µg/ml frente a células SH1000 de *S. aureus*, en comparación con las bMIC de 4, 0,5, 0,5 y 0,03 µg/ml y las MBEC > 256, > 256, > 256 y 128 µg/ml para ciprofloxacina, ácido fusídico, tetraciclina y rifampicina respectivamente. El cultivo del frío y los cultivos de respuesta rigurosa permanecieron susceptibles al Compuesto 10 con una caída logarítmica de 5 en la viabilidad observada en 1 hora en comparación con ninguna pérdida de viabilidad para los cultivos tratados con fosfomicina, vancomicina y daptomicina.

55

**Conclusiones:** La actividad potente del Compuesto 10 frente a biopelículas de *S. aureus* y cultivos de *S. aureus* de crecimiento lento demuestra que su actividad antibacteriana es independiente del estado de crecimiento de la bacteria y sugiere la utilidad del Compuesto 10 en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* asociadas a biopelículas.

60

#### Introducción

65 La formación de biopelículas cada vez se reconoce más como un factor principal en una amplia gama de infecciones por bacterias. Las infecciones asociadas a cuerpos extraños, la infección crónica del pulmón en pacientes con

fibrosis quística y las infecciones dentales son solamente unos pocos ejemplos de infecciones mediadas por biopelículas. De hecho, recientemente se ha informado de que un 80 % de infecciones humanas en el mundo desarrollado son un resultado directo de la formación de biopelículas<sup>1</sup>.

5 Además, los cultivos de biopelículas por lo general son altamente resistentes a la erradicación con quimioterapia, sin desarrollar resistencia genotípica. En consecuencia, el número de opciones terapéuticas es limitado y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con actividad antibiopelícula cada vez es más importante.

10 El Compuesto 10 es un ejemplo de una nueva clase de agentes antimicrobianos y representa un nuevo enfoque para la terapia antibacteriana. El Compuesto 10 es un agente bactericida (MBC<sub>50</sub> de 1 µg/ml) y se ha mostrado anteriormente que es activo (MIC<sub>50</sub> de 1 µg/ml) frente a una gama de cepas de *S. aureus* que incluyen *S. aureus* resistente a meticilina (MSSA), *S. aureus* resistente a meticilina asociado con la atención sanitaria, y *S. aureus* resistente a meticilina asociado con comunidades<sup>2</sup>.

15 El objetivo de este estudio era demostrar la actividad del Compuesto 10 frente a biopelículas y otros cultivos bacterianos de crecimiento lento.

### Métodos

- 20
- Las MIC planctónicas se determinaron de acuerdo con las directrices de BSAC<sup>3</sup>
  - Las bMIC y las MBEC se determinaron en un dispositivo Calgary de acuerdo con metodologías estándar<sup>4</sup>
  - Las cinéticas de eliminación del Compuesto 10 frente a cepas SH1000 de *S. aureus* (MSSA) en cultivo en frío se determinaron usando protocolos estándar de tiempo de eliminación, con las excepciones de que los cultivos se mantuvieron a 4 °C
  - Las cinéticas de eliminación del Compuesto 10 frente a cultivos rigurosos de células SH1000 de *S. aureus*, inducidos con mupirocina, se determinaron de acuerdo con el método de Oliva et al. (2003)<sup>5</sup>
- 25

### Resultados

- 30
- El Compuesto 10 presentaba una actividad antibiopelícula con una bMIC de 1 µg/ml y una MBEC de 2 µg/ml frente a cepas SH1000 de *S. aureus* en comparación con las bMIC de 4, 0,5, 0,5, y 0,03 µg/ml y las MBEC > 256, > 256, > 256 y 128 µg/ml para la ciprofloxacina, ácido fusídico, tetraciclina y rifampicina respectivamente (Tabla 5)
  - El cultivo en frío y los cultivos de respuesta rigurosa permanecieron susceptibles al Compuesto 10, con una caída logarítmica de 5 de la viabilidad observada en 1 hora, en comparación con ninguna pérdida de viabilidad para cultivos tratados con fosfomicina (Figuras 8 y 9)
- 35

40 Tabla 5.  
Susceptibilidad de biopelículas de SH1000 de *S. aureus* hacia el Compuesto 10 (XF-73) y agentes de control

Fármaco	MIC <sub>a</sub> (µg/ml)	bMIC <sub>b</sub> (µg/ml)	MBEC <sub>c</sub> (µg/ml)
Compuesto 10	1	1	2
Daptomicina	1	2	> 256
Vancomicina	1	2	> 256
Nisina	2	64	> 256
Fosfomicina	16	8	> 256
Ácido fusídico	0,25	0,5	> 256
Tetraciclina	1	0,5	> 256
Rifampicina	0,008	0,02	> 256
Ciprofloxacina	2	4	> 256
Cefotaxima	0,5	4	> 256
Clorhexidina	2	1	> 256
CTABa	2	2	> 256
Flucloxacilina	0,125	4	> 256
Gentamicina	0,5	1	> 256

Meropenem	0,5	0,5	> 256
Mupirocina	0,125	0,25	> 256

### Conclusiones

- 5 • El Compuesto 10 presenta una actividad anti-biopelícula de *S. aureus* más elevada cuando se compara con ciprofloxacina, ácido fusídico, tetraciclina y rifampicina
- El Compuesto 10 permanece fuertemente bactericida frente a cultivos en frío y cultivos de respuesta rigurosa, en los que la actividad bacteriana de otros agentes antibacterianos se ve reducida significativamente
- Estos datos demuestran que la actividad bactericida del Compuesto 10 es independiente del estado de crecimiento de las bacterias tratadas
- 10 • La actividad antibiopelícula de *S. aureus* potente del Compuesto 10 combinada con su actividad bactericida mantenida frente a cultivos de crecimiento lento le convierte en un agente útil para la prevención y tratamiento de dichas infecciones

### Referencias

- 15 1. National Institute of Health [Internet]. [citado el 17 de septiembre de 2008]; Disponible en <http://grants.nih.gov/grants/guide/pafiles/PA-03-047.html>
2. Love WG, Rhys-Williams W, Hayter I *et al.* 2008 ECCMID Barcelona. Resumen P559.
3. Andrews JM. J Antimicrob Chemother. 2001; 48 (Supl. S1): 5-16.
- 20 4. Ceri H, Olson ME, Stremick C, *et al.* J Clin Microbiol. 1999; 37 (6): 1771-1776.
5. Oliva B, Miller K, Caggiano N, *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47 (2): 458-466.

### EJEMPLO I: EFICACIA DEL COMPUESTO 10 Y DEL COMPUESTO 12 FRENTE A BIOPELÍCULAS Y CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE CRECIMIENTO LENTO

25 El siguiente Ejemplo se refiere a la eficacia del Compuesto 10 (XF-73) y del Compuesto 12 (XF-70) frente a biopelículas y cultivos de *S. aureus* de crecimiento lento, y proporciona una comparación de esos compuestos y diversos agentes de control.

#### 30 Efecto de fármacos XF sobre estafilococos que no se dividen

Durante la infección, las bacterias rara vez se encuentran con condiciones óptimas de crecimiento y de hecho son normales largos periodos de crecimiento limitado, o detenido en los que los organismos entran en un estado inactivo (Kolter *et al.*, 1993) que pueden contribuir con la creación de infecciones bacterianas persistentes (Nataro *et al.*, 2000). Se sabe que *S. aureus* modula la expresión genética para soportar condiciones de crecimiento sub-óptimas (Somerville *et al.*, 2002) y es probable que las bacterias que no se dividen estén presentes en la endocarditis y osteomielitis por estafilococos (Mascio *et al.*, 2007). Por lo tanto, los fármacos antimicrobianos que son bactericidas en condiciones de crecimiento detenido pueden tener ventajas clínicas sobre los que no presentan dichas actividades (Mascio *et al.*, 2007).

40 Cuando los nutrientes se convierten en limitantes para el crecimiento, las bacterias ajustan su metabolismo desde uno que apoya el crecimiento a uno que proporciona una supervivencia larga en ausencia de nutrientes. En muchas bacterias, un facilitador clave para este cambio fisiológico, conocido como respuesta rigurosa, es la acumulación de pirofosfato y pentafofosfato de guanosina (Traxler *et al.*, 2008). El antibiótico mupirocina es un inductor fuerte de la respuesta rigurosa en *S. aureus* y provoca una inanición de forma efectiva del isoleucil ARNt mediante la inhibición potente de la isoleucil ARNt sintetasa (IRS) (Oliva *et al.*, 2003). La actividad de los fármacos XF frente a cepas SH1000 de *S. aureus* evitó el crecimiento mediante la adición de mupirocina (Oliva *et al.*, 2003), y por lo tanto se examinó (Figura 10). Como un método alternativo para detener el crecimiento, las bacterias se suspendieron en medio de cultivo en frío (Mascio *et al.*, 2007) y también se determinó la actividad bactericida de los fármacos XF en estas condiciones (Figura 11).

Estudios previos han demostrado que la respuesta rigurosa elimina completamente la actividad bactericida de fosfomicina, cicloserina,  $\beta$ -lactamas y vancomicina frente a 8325-4 de *S. aureus* (Oliva *et al.*, 2003). La fosfomicina se incluyó como un control en los estudios presentes con la cepa SH1000 (Figura 10) y los resultados demuestran, no inesperadamente, que la actividad bactericida de la fosfomicina se atenúa completamente en condiciones de rigurosidad validando de este modo el uso de mupirocina como un inductor de la respuesta rigurosa en la cepa SH1000. XF-70 y XF-73 mantuvieron una actividad bactericida potente frente a cultivos sin crecimiento de SH1000 aislados de crecimiento por inducción de la respuesta rigurosa (Figura 10). La nisina mantiene alguna actividad bactericida en condiciones rigurosas pero esta no es tan predominante como la presentada por XF-70 y XF-73 (Figura 10).

60 El efecto de los fármacos XF sobre la viabilidad de células en cultivo frío se determinó mediante el crecimiento de células SH1000 de *S. aureus* a la primera fase exponencial a 37 °C, cosechando las células mediante centrifugación

(5.000 x g, 10 min.) y volviendo suspenderlas en medios enfriados previamente en los que se mantuvieron en presencia y ausencia de fármacos XF y agentes de control durante 5 horas. XF-70 y XF-73 mantuvieron una actividad bactericida potente frente a cepas SH1000 de *S. aureus* cuyo crecimiento se había detenido mediante la disminución de la temperatura a 4 °C (Figura 11). En estas condiciones, tanto la daptomicina como la nisina mantuvieron alguna actividad bactericida, pero la capacidad de la vancomicina para eliminar los organismos se eliminó (Figura 11).

#### Actividad de fármacos XF frente a biopelículas de células SH1000 de *S. aureus*

Una biopelícula es una comunidad de células microbianas que se asocian de forma irreversible con una superficie y que se incluyen en una matriz de material polisacárido segregado por los organismos (Costerton 2001; Donlan, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Las biopelículas formadas en catéteres y en otros dispositivos médicos permanentes por bacterias Gram-positivas patógenas presentan problemas significativos en el entorno hospitalario (Costerton 2001; Donlan, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Toney 2007). Las biopelículas son notoriamente resistentes a la terapia con antibióticos y por lo general no se someten la eliminación mediante la respuesta inmune del huésped. Existe una clara necesidad de identificar agentes antimicrobianos con la capacidad de prevenir la formación de biopelículas bacterianas, o de erradicarlas una vez formadas (Toney 2007). La velocidad de crecimiento más lenta de las bacterias en biopelículas puede ser un factor importante para la mayor resistencia a los antibióticos convencionales. En vista de la capacidad de XF-70 y de XF-73 para mantener la actividad bactericida frente a la estafilococos sin crecimiento (véase anteriormente) los inventores también han investigado la actividad de estos fármacos frente a biopelículas de células SH1000 de *S. aureus*.

Las MIC de las biopelículas y las concentraciones mínimas de eliminación de biopelícula (MBEC) se determinaron en el Dispositivo de Biopelículas Calgary (Nunc Inc, Roskilde, Dinamarca) tal como se describe en Miller *et al.*, 2005. Esto implica las siguientes etapas. Se añadieron alícuotas (200 µl) de cultivos en fase exponencial de la cepa SH1000 acaba pocillo de una bandeja de microtitulación de 96 pocillos. A continuación, el conjunto de la tapa, que tiene 96 sujeciones de poliestireno que corresponden a cada pocillo, se reemplazó y el sistema se incubó durante 24 horas a 37 °C en una plataforma oscilante. Después de esto, una biopelícula de aproximadamente 10<sup>7</sup> cfu maduro en cada sujeción. A continuación la tapa se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el crecimiento planctónico residual y a continuación se colocó en una bandeja de microtitulación con medios recién preparados que contenían diluciones de duplicación del antibiótico de ensayo. A continuación, el sistema se incubó durante 24 horas a 37 °C en una plataforma oscilante. La MIC se definió como la concentración más baja de antibiótico que inhibe completamente el crecimiento visible después de esta incubación. Después de registrar la MIC, el conjunto de la tapa se lavó de nuevo dos veces en PBS para eliminar las células planctónicas el antibiótico restante ya continuación se colocó en medios recién preparados sin fármacos. El sistema se incubó durante 24 horas adicionales y la MBEC se definió como la concentración más baja de antibióticos que inhiben completamente el reestablecimiento del crecimiento planctónico.

Los compuestos de XF muestran una actividad excelente frente a biopelículas de SH1000 de *S. aureus* en comparación con otros muchos agentes antimicrobianos (Tabla 6). Esto se reflejó en los valores bajos de bMIC y se extendió a la actividad potente de erradicación de biopelículas (MBEC), una propiedad no presentada por otros agentes antimicrobianos usados como controles (Tabla 6).

**Tabla 6.** Susceptibilidad de biopelículas de SH1000 de *S. aureus* hacia el Compuesto 12 (XF-70), el Compuesto 10 (XF-73) y antibióticos de comparación. bMIC = MIC de biopelícula, MBEC = concentración mínima de eliminación de la biopelícula.

Fármaco	MIC (µg/ml)	bMIC (µg/ml)	MBEC (µg/ml)
Ciprofloxacina	2	4	> 256
Ácido fusídico	0,25	0,5	> 256
Tetraciclina	1	0,5	> 256
Rifampicina	0,008	0,02	> 256
Cpd 12 (XF-70)	1	1	2
Cpd 10 (XF-73)	1	1	2
Cefotaxima	0,5	4	> 256
Clorhexidina	2	1	> 256
CTAB <sup>a</sup>	2	2	> 256
Daptomicina	1	2	> 256
Flucloxacilina	0,125	4	> 256

Fosfomicina	16	8	> 256
Gentamicina	0,5	1	> 256
Meropenem	0,5	0,5	> 256
Mupirocina	0,125	0,25	> 256
Nisina	2	64	> 256
Vancomicina	1	2	> 256

### Referencias

- 5 Costerton, J.W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology* 9: 50-52.
- Donlan, R.M.. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890.
- 10 Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., y Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2: 95-108.
- Kolter, R.D., Siegle, D.A., y Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology* 47: 855-874.
- 15 Mascio, C.T.M., Alder, J.D. y Silverman, J.A. (2007). Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 4255-4260.
- 20 Nataro, J.P., Blaser, M.J., y Cunningham-Rundles, S. (2000). Persistent bacterial infections: commensalism gone awry or adaptive niche? In, *Persistent Bacterial Infections* (J.P. Nataro, M.J. Blaser y S. Cunningham-Rundles, eds.), American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- 25 Oliva, B., Miller, K., Caggiano, N., O'Neill, A.J., Cuny, G.D., Hoemann, M.Z., Hauske, J.R. y Chopra, I. (2003). Biological properties of novel antistaphylococcal quinoline-indole agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 458-466.
- Somerville, G.A., Chaussee, M.S., Morgan, C.I., Fitzgerald, J.R., Dorward, D.W., Reitzer, L.J. y Musser, J.M. (2002). *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival.
- 30 Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., y Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 68: 1128-1148.
- 35 Toney, J.H. (2007). Biofilms- a neglected antibacterial target? *Current Opinion in Investigational Drugs* 8: 598-599.

### EJEMPLO J: EFICACIA DEL COMPUESTO 10 Y DEL COMPUESTO 12 FRENTE A CULTIVOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE CRECIMIENTO LENTO

#### 40 **Métodos**

Las actividades anti-estafilococos del Compuesto 10, el Compuesto 12 y una gama de agentes de comparación frente a cultivos de *Staphylococcus aureus* de crecimiento lento se estudiaron usando una metodología estándar de tiempo de eliminación (Oliva *et al.* 2003, Hobbs *et al.* 2008). Se desarrollaron cultivos de cepas SH1000 de *Staphylococcus aureus* hasta una fase casi exponencial (DO<sub>600nm</sub> de 0,2) en caldo de Mueller-Hinton (MHB) antes de su exposición a agentes antibacterianos a una MIC 4X. Un cultivo sin tratar sirvió como el control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 50 Cultivos que expresan la respuesta rigurosa

55 El antibiótico mupirocina es un fuerte inductor de la respuesta rigurosa en *S. aureus* y provoca la inanición de la isoleucil ARNt cargada mediante la inhibición potente de la isoleucil ARNt sintetasa (IRS) (Oliva *et al.* 2003, Cassels *et al.* 1995). La rigurosidad se indujo en cultivos de SH1000 mediante la adición de mupirocina (4 mg/l) a células en la fase de crecimiento casi exponencial (DO<sub>600nm</sub> de 0,2) (Oliva *et al.* 2003, Cassels *et al.* 1995). Los cultivos se incubaron con mupirocina durante 30 minutos antes de que comenzara el muestreo. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, y las muestras se tomaron a intervalos de 30 minutos durante 300 minutos, se diluyó en serie en solución

salina tamponada con fosfato (PBS) y el cultivo diluido se propagó en agar de Mueller-Hinton y se incubó a 37 °C durante 18-24 horas antes de que se hiciera el recuento del número de CFU.

#### Cultivos en frío

Los cultivos en frío se prepararon cultivando células SH1000 hasta una fase casi exponencial ( $DO_{600nm}$  de 0,2) a 37 °C. A continuación, los cultivos centrifugaron y el sedimento celular se volvió a suspender en MHB enfriado previamente a 4 °C. La cinética de eliminación de los agentes antimicrobianos se estudió tal como se ha descrito en la sección mencionada anteriormente, con la excepción de que los cultivos se mantuvieron a 4 °C durante el periodo de muestreo de 5 horas.

#### **Resultados**

##### Efectos del Compuesto 10 y del Compuesto 12 sobre *S. aureus* que expresa la respuesta rigurosa

Se examinó la actividad del Compuesto 10 y del Compuesto 12 frente a SH1000 de *S. aureus* que se había inhibidor del crecimiento mediante la adición de mupirocina. Los estudios anteriores han demostrado que la respuesta rigurosa elimina completamente la actividad bactericida de antibióticos de  $\beta$ -lactama y fosfomicina frente a *S. aureus* (Oliva *et al.* 2003). La fosfomicina se incluyó como un control en los presentes estudios. A una MIC 4X, la actividad de la fosfomicina se atenuó completamente en condiciones de rigurosidad (Figura 12). Se observaron efectos similares para la rifampicina (Figura 12). Por el contrario, el Compuesto 10 y el Compuesto 12 mantuvieron una actividad bactericida potente frente a cultivos de SH1000 inhibidos del crecimiento mediante la inducción de la respuesta rigurosa (Figura 12).

##### Efectos del Compuesto 10 y del Compuesto 12 en cultivos en frío

El efecto del Compuesto 10 y del Compuesto 12 sobre la viabilidad células cultivo frío se determinó durante un periodo de 5 horas (Figura 13). La temperatura baja no tuvo efecto alguno en la actividad del Compuesto 10 y del Compuesto 12 que mantuvo una actividad bactericida potente frente a la cepa SH1000 de *S. aureus* cuyo crecimiento se había detenido con el cambio de temperatura (Figura 13). En estas condiciones, tanto la daptomicina como la nisina mantuvieron actividad bactericida limitada, pero se eliminó la capacidad de otros agentes para eliminar los organismos (Figura 13).

#### **Conclusiones**

*El Compuesto 10 y el Compuesto 12* permanecieron altamente activos frente a diversas formas de *S. aureus* de crecimiento lento o sin división.

#### **Referencias**

- Cassels R, Oliva B, Knowles D. Occurrence of the regulatory nucleotides ppGpp and pppGpp following induction of the stringent response in staphylococci. *J Bacteriol* 1995; 177: 5161-65.
- Hobbs JK, Miller K, O'Neill AJ *et al.* Consequences of daptomycin mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1003-8.
- Oliva B, Miller K, Caggiano N, *et al.* Biological properties of novel antistaphylococcal quinoline-indole agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 47: 458-466.

### **EJEMPLO K: EFICACIA DEL COMPUESTO 10 Y DEL COMPUESTO 12 FRENTE A CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN FASE ESTACIONARIA**

#### **Métodos**

Las actividades anti-estafilococos del Compuesto 10, el Compuesto 12 y una gama de agentes de comparación frente a cultivos de *Staphylococcus aureus* en fase estacionaria se estudiaron usando una metodología estándar de tiempo de eliminación (Oliva *et al.* 2003, Hobbs *et al.* 2008). Se construyó una curva de crecimiento para identificar cuándo entran y salen de la fase estacionaria los cultivos de SH1000. Se inocularon 50 ml de caldo de Mueller-Hinton (MHB) con 500  $\mu$ l de cultivo durante una noche de SH1000 de *Staphylococcus aureus* y se mantuvo a 37 °C con agitación durante 8 días. La turbidez del cultivo a  $DO_{600nm}$  se midió a intervalos regulares usando un espectrofotómetro Jenway 6300 con un paso de luz de 1 cm (Jenway, Essex, Reino Unido).

Se desarrollaron cultivos de SH1000 de *Staphylococcus aureus* hasta una fase temprana, media y tardía a 37 °C mediante la incubación durante 24, 48 y 72 horas respectivamente. Los cultivos centrifugaron, se retiró el sobrenadante, y a continuación una porción del sedimento celular se volvió a suspender en el sobrenadante homologó hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2 ( $10^8$  bacterias/ml). A continuación, se realizó un ensayo de tiempo de eliminación sobre estas suspensiones en fase estacionaria para estudiar los efectos de agentes antimicrobianos sobre la viabilidad de las células bacterianas. Un cultivo sin tratar sitio como el control negativo. Los experimentos se

realizaron por triplicado.

### **Resultados**

#### 5 Efectos del Compuesto 10 y del Compuesto 12 sobre cultivos de *S. aureus* en fase de estacionaria

10 Se establecieron el inicio y el final para cepas SH1000 de *S. aureus* cultivadas en MHB a 37 °C al examinar las curvas de crecimiento para el organismo durante períodos de tiempo prolongados. Se definieron las células como entrando en la fase estacionario después de 24 horas de crecimiento y saliendo a las 96 horas, tras lo cual la turbidez celular disminuyó, lo que indica lisis y muerte bacteriana. Por lo tanto, se consideró que la fase estacionaria temprana comenzaba a las 24 horas después de la inoculación, la fase estacionaria media a las 48 horas y la fase estacionaria tardía a las 72 horas. Para evitar los efectos del inóculo para el ensayo de susceptibilidad asociada con las altas densidades celulares conseguidas en los cultivos en fase estacionaria, se recuperaron organismos en: temporales de 24 horas, 48 horas y 72 horas y se diluyeron hasta 10<sup>8</sup> bacterias/ml en el medio de crecimiento consumido a partir de estos cultivos antes de la determinación de las actividades bactericidas de los inhibidores.

20 El Compuesto 10 y el Compuesto 12 mantuvieron una actividad bactericida potente frente a células recuperadas a partir de todos los puntos temporales en la fase estacionaria (Figuras 14 - 16). En contraste con el Compuesto 10 y el Compuesto 12, la actividad de agentes de comparación frente a cultivos en fase estacionaria era escasa (Figuras 14 - 16).

### **Conclusiones**

25 El Compuesto 10 y el Compuesto 12 se mantuvieron muy activos frente a cultivos de *S. aureus* en la etapa temprana, media y tardía de la fase estacionaria.

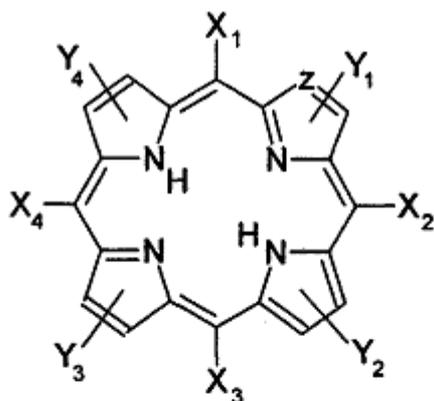
### **Referencias**

30 Hobbs JK, Miller K, O'Neill AJ *et al.* Consequences of daptomycin mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1003-8.  
Oliva B, Miller K, Caggiano N, *et al.* Biological properties of novel antistaphylococcal quinoline-indole agents. Antimicrob Agents Chemother 2003 47: 458-466.

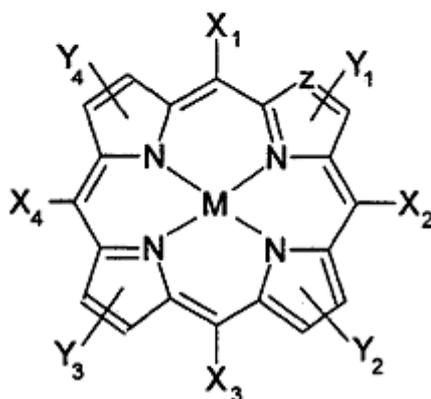
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I o II siguiente para uso en el tratamiento o la prevención de una afección o trastorno asociados a la presencia o el crecimiento de una biopelícula microbiana sobre o en el cuerpo de un mamífero vivo

5



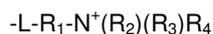
I



II

en donde:

10  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  representan de forma independiente un átomo de hidrógeno, una fracción lipofílica, un grupo fenilo, un grupo alquilo, alcarilo o aralquilo inferiores, o un grupo catiónico de la fórmula siguiente:



15 en donde:

L es una fracción de enlace o está ausente;

20  $R_1$  representa alquileo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior, el cual está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido con oxígeno), flúor,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$ ; y

$R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente H, arilo, alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior, de los cuales los últimos tres están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido con oxígeno), arilo,  $OR_5$ ,  $C(O)R_6$ ,  $C(O)OR_7$ ,  $C(O)NR_8R_9$ ,  $NR_{10}R_{11}$  y  $N^+R_{12}R_{13}R_{14}$ .

25

Z es -CH o N; y

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> e Y<sub>4</sub> están ausentes o representan independientemente arilo, alquilo inferior, alquenilo inferior o alquililo inferior, de los cuales los tres últimos están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo inferior, alquileo inferior (opcionalmente interrumpido con oxígeno), arilo, OR<sub>5</sub>, C(O)R<sub>6</sub>, C(O)OR<sub>7</sub>, C(O)NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>, N<sup>+</sup>R<sub>12</sub>R<sub>13</sub>R<sub>14</sub>, o, tomados junto con el anillo de pirrol al que están unidos, forman un grupo cíclico;

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> representan independientemente H o alquilo inferior; y

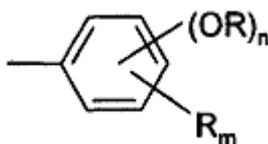
M es un elemento metálico o un elemento metaloide

siempre que al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> sea un grupo catiónico según se ha definido anteriormente y al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> sea un átomo de hidrógeno.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que R<sub>1</sub> es un grupo alquileo inferior, alquenileno inferior, alquenileno inferior para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Un compuesto según las reivindicaciones 1 o 2, en el que R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y/o R<sub>4</sub> son grupos alquilo inferior no sustituidos para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y/o X<sub>4</sub> son



en donde cada R es -R<sub>1</sub>-N<sup>+</sup>(R<sub>2</sub>)(R<sub>3</sub>)R<sub>4</sub> según se define en la reivindicación 1 y "n" y "m" son números enteros entre 0 y 3 y donde la suma de "n" y "m" es un número entero entre 1 y 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son hidrógeno y X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son grupos catiónicos, o X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son hidrógeno y X<sub>4</sub> y X<sub>1</sub> son grupos catiónicos para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en 5,15-bis-(4-{3-[(3-Dimetilamino-propil)-dimetil-amonio]-propil-oxi}-fenil)-porfirina, 5,15-bis-[4-(3-Trietilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina, 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina, 5,15-bis-[4-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina, 5-[3,5-bis-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-15-undecil-porfirina, 5-[4-[3-Dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amonio-propil-oxi]-fenil]-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina, 3-[[{3-[(3-{4-[15-(4-Dodeciloxi-fenil)-porfirina-5-il]-fenoxi)-propil]-dimetil-amonio]-propil]-dimetil-amonio)-propil]-trimetil-amonio, 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-10-undecil-porfirina, 5-[4-[3-Dimetil-(3-trimetilamonio-propil)-amonio-propiloxi]-fenil]-15-(4-dodeciloxi-fenil)-porfirina, 5-[4-(3-Dimetildecil-amonio-propiloxi)-fenil]-15-[4-[3-dimetil-(3-dimetilaminopropil)-amonio-propiloxi]-fenil]-porfirina, y sales de los mismos, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el compuesto es 5,15-bis-[4-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina ("XF-73") o 5,15-bis-[3-(3-Trimetilamonio-propiloxi)-fenil]-porfirina ("XF-70"), o una sal de dicloruro del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

8. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en donde el compuesto comprende un ión metálico central para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la biopelícula microbiana comprende o consiste en bacterias para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la biopelícula está en la cavidad oral, tracto urinario, senos, oído, corazón, próstata, hueso, pulmones, riñones o piel para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la biopelícula se une a un soporte inerte dentro del cuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

12. Un compuesto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para el uso en la eliminación, la inhibición o la prevención del crecimiento de bacterias en una fase de crecimiento lento o estático para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

13. Un dispositivo médico implantable que está impregnado, revestido o tratado de otro modo con un compuesto tal como se ha descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

5 14. Un dispositivo médico implantable de acuerdo con la reivindicación 13 seleccionado entre el grupo que consiste en dispositivos intravasculares, catéteres, derivaciones, tubos para intubación y traqueotomía, dispositivos oftálmicos, prótesis de articulación, válvulas cardíacas artificiales e implantes de mama.

10 15. Un método *in vitro* para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula microbiana que comprende poner en contacto la biopelícula con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la biopelícula está en un entorno doméstico, comercial o industrial.

FIGURA 1

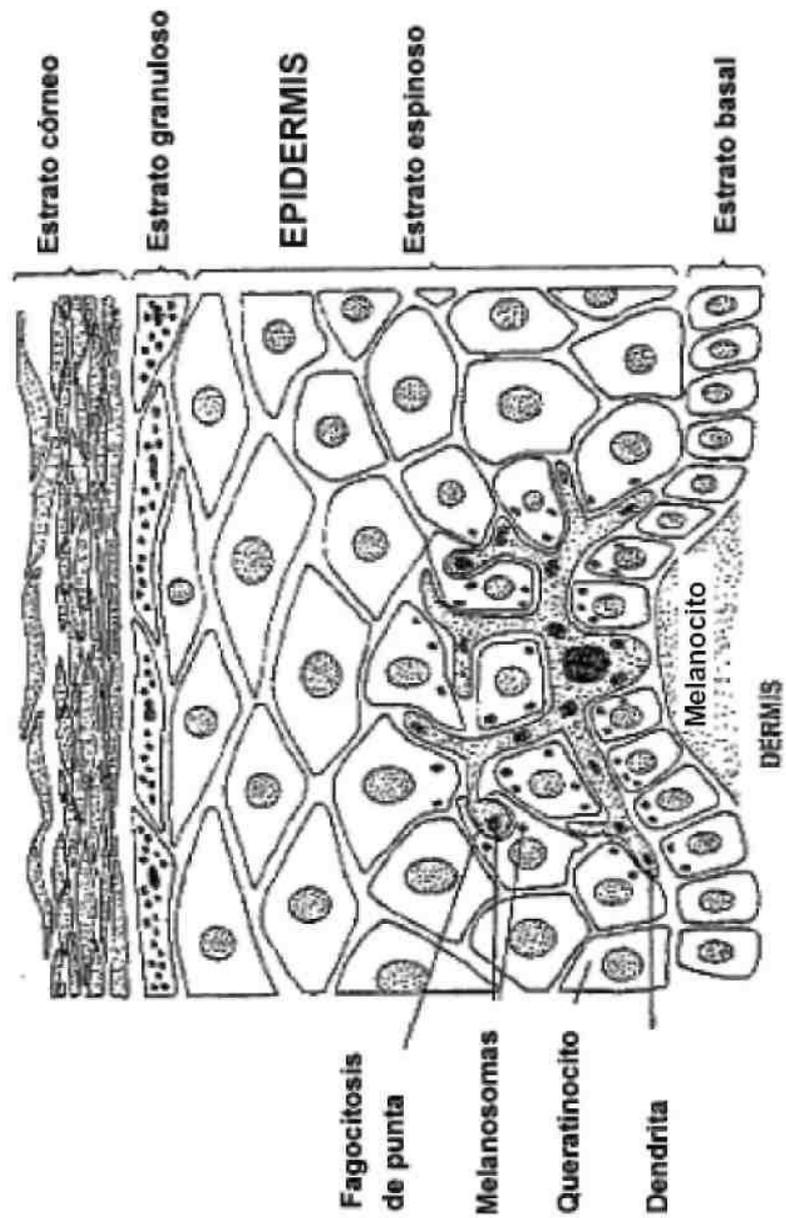


FIGURA 2

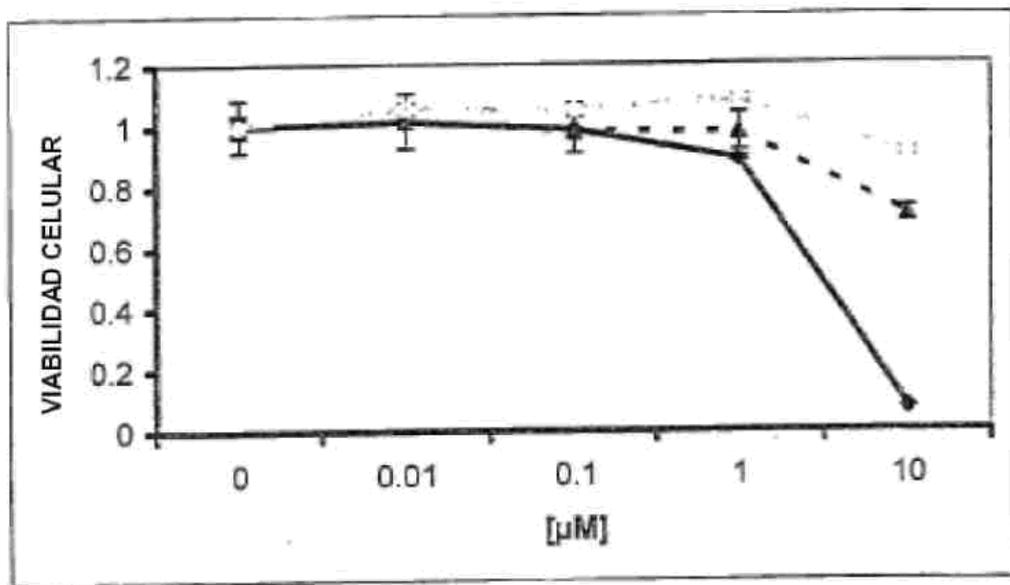


FIGURA 3

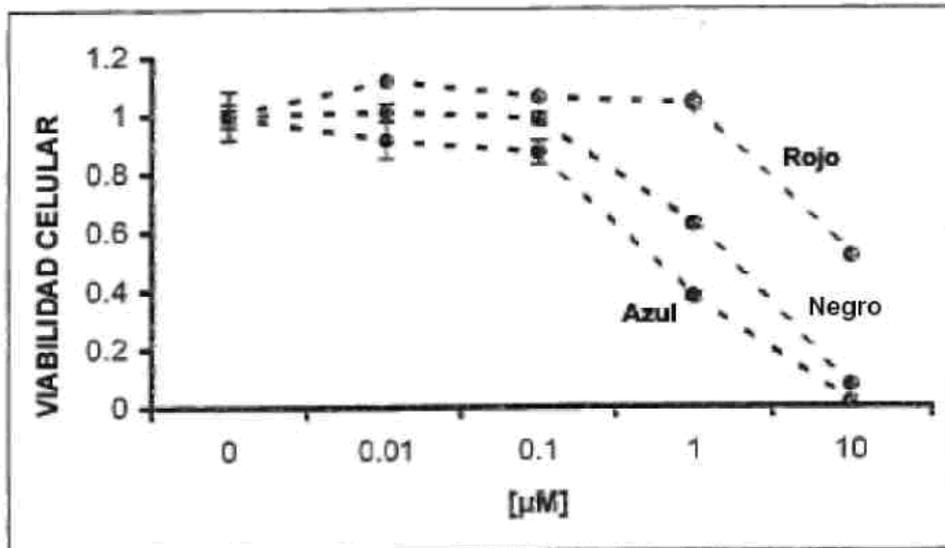


FIGURA 4(A)

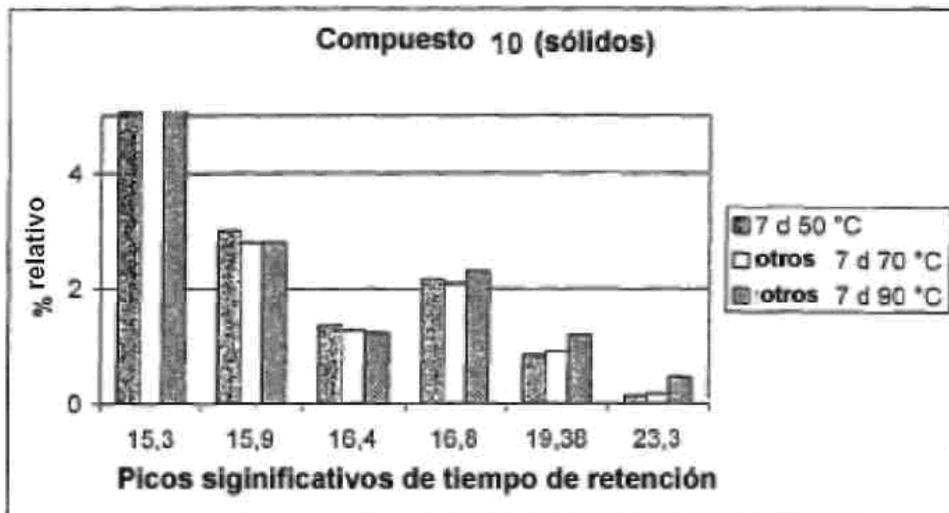


FIGURA 4(b)

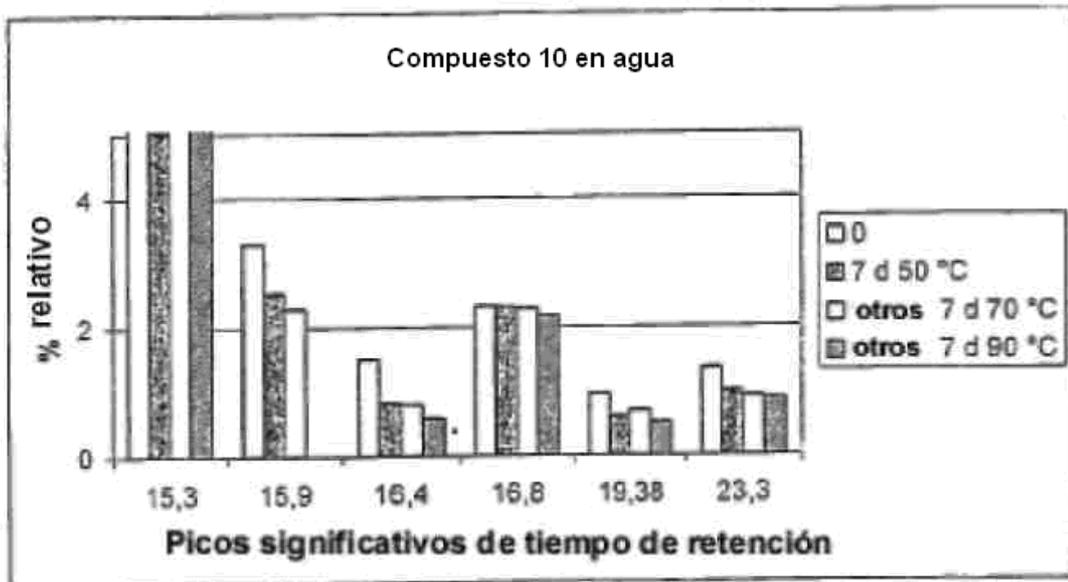


FIGURA 4(C)

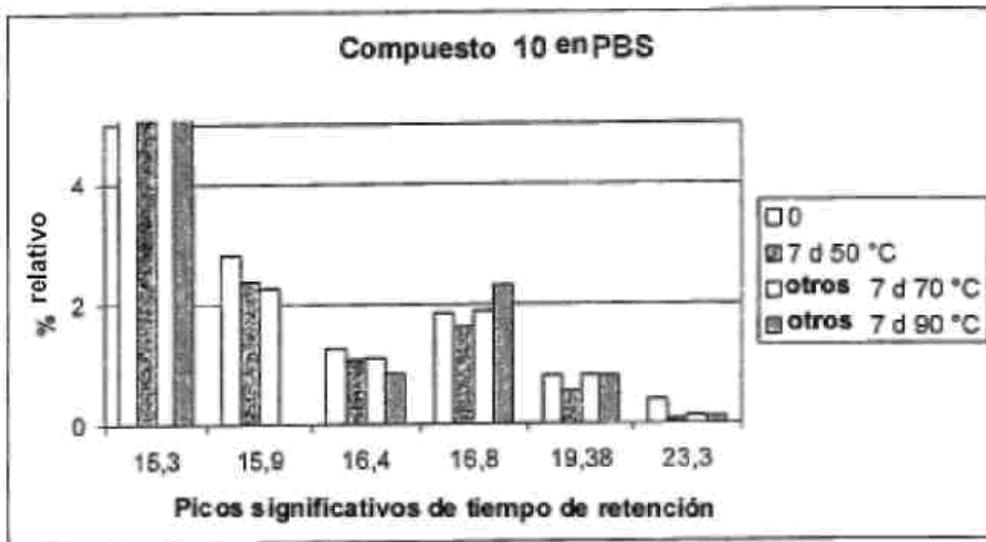


FIGURA 5

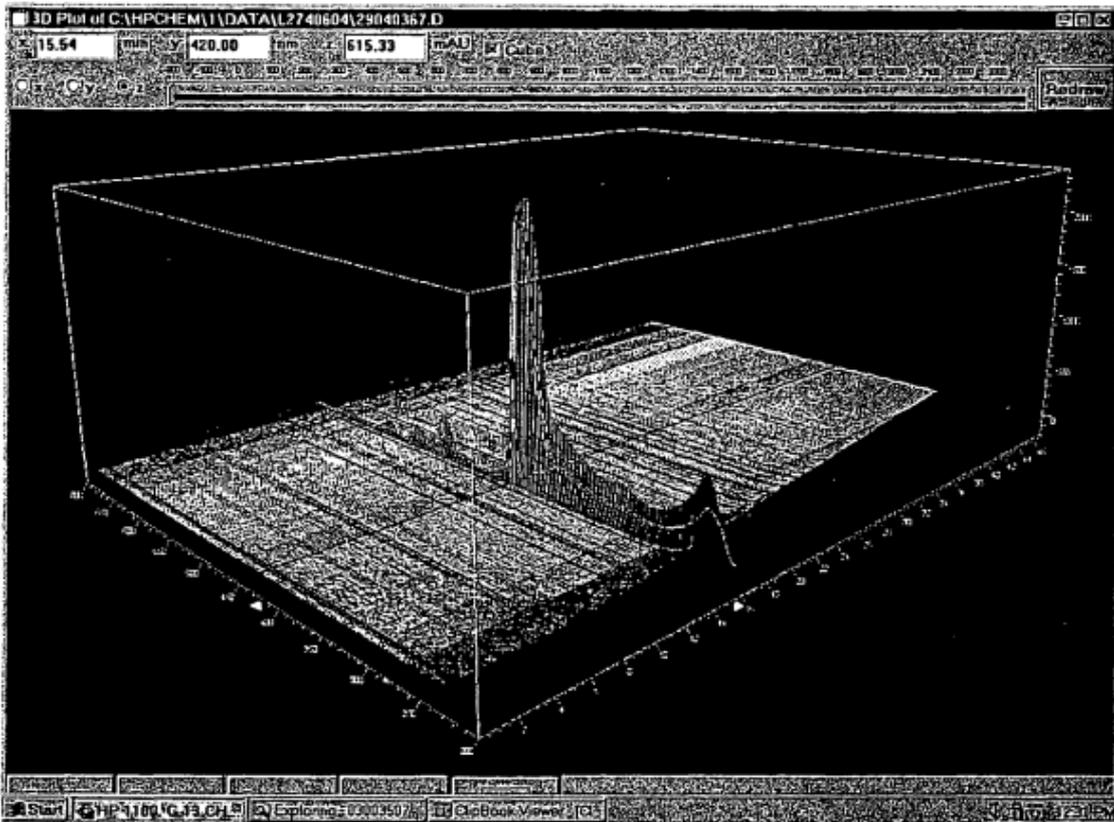


FIGURA 6(A)

# Compuesto 1

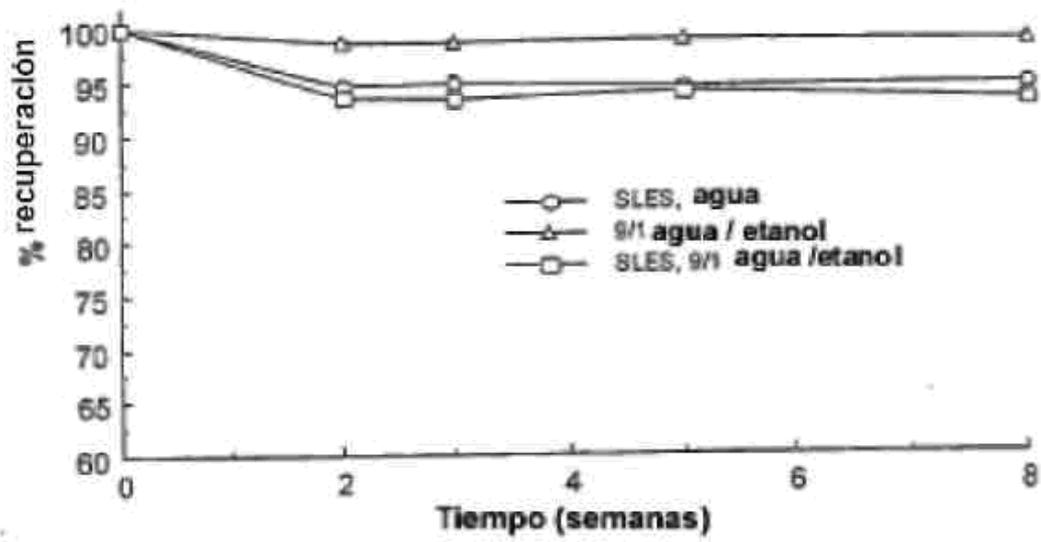


FIGURA 6(B)

### Compuesto 8

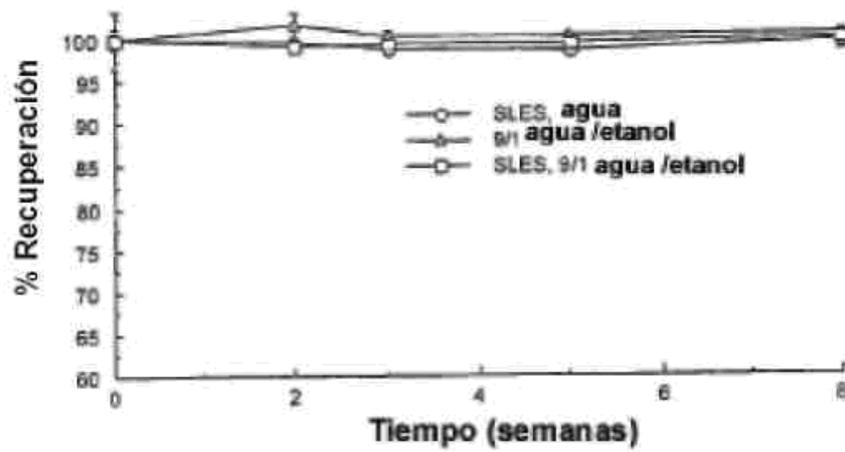


FIGURA 6(C)

# Compuesto 12

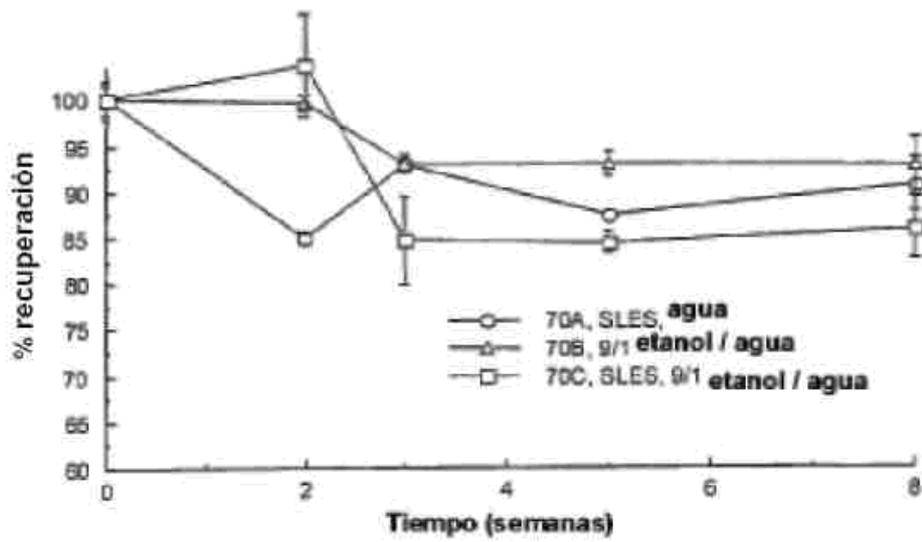


FIGURA 6(D)

# Compuesto 10

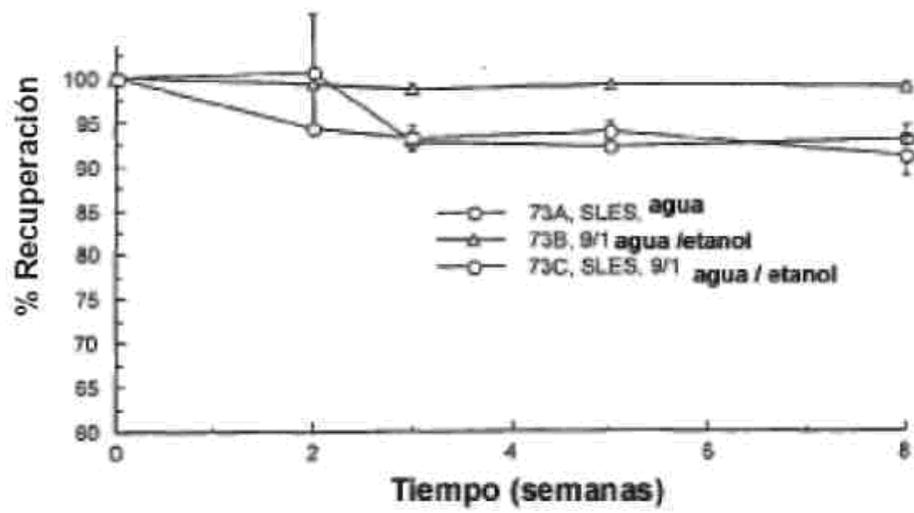
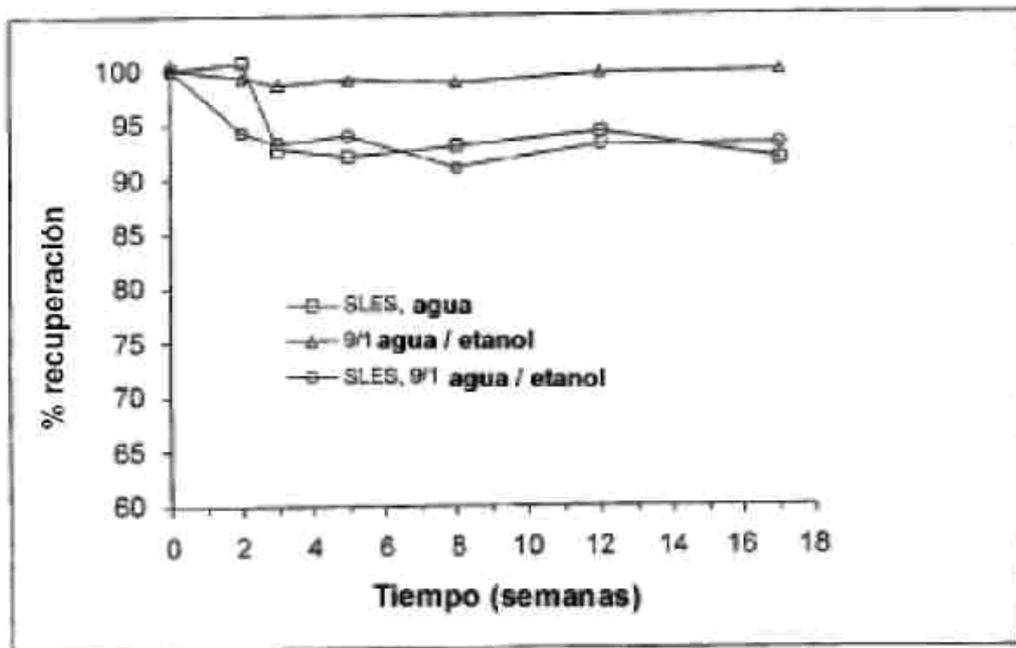


FIGURA 7(A)



**FIGURA 7(B)**

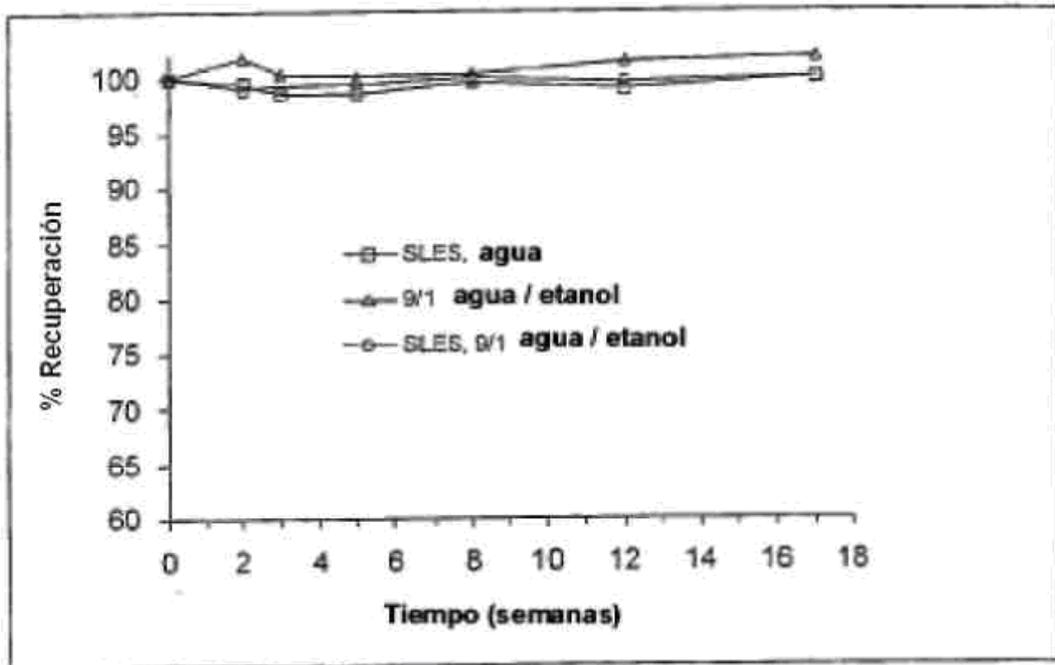


FIGURA 8

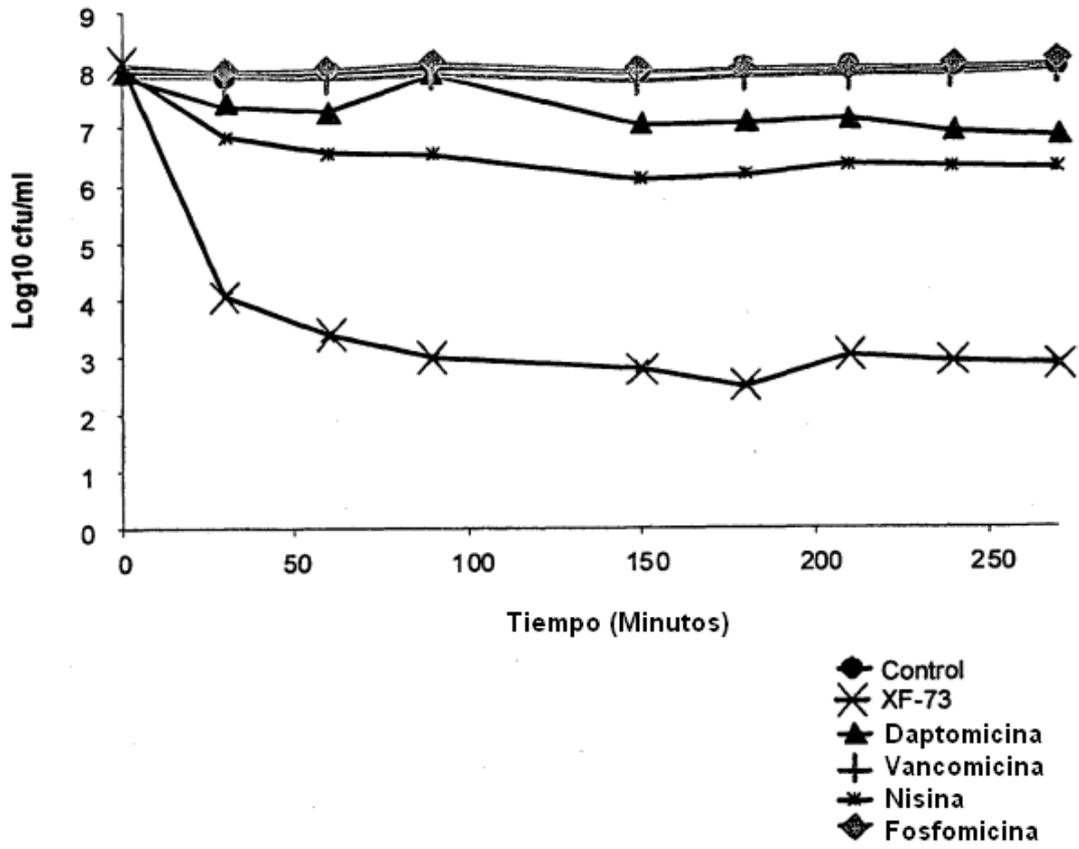


FIGURA 9

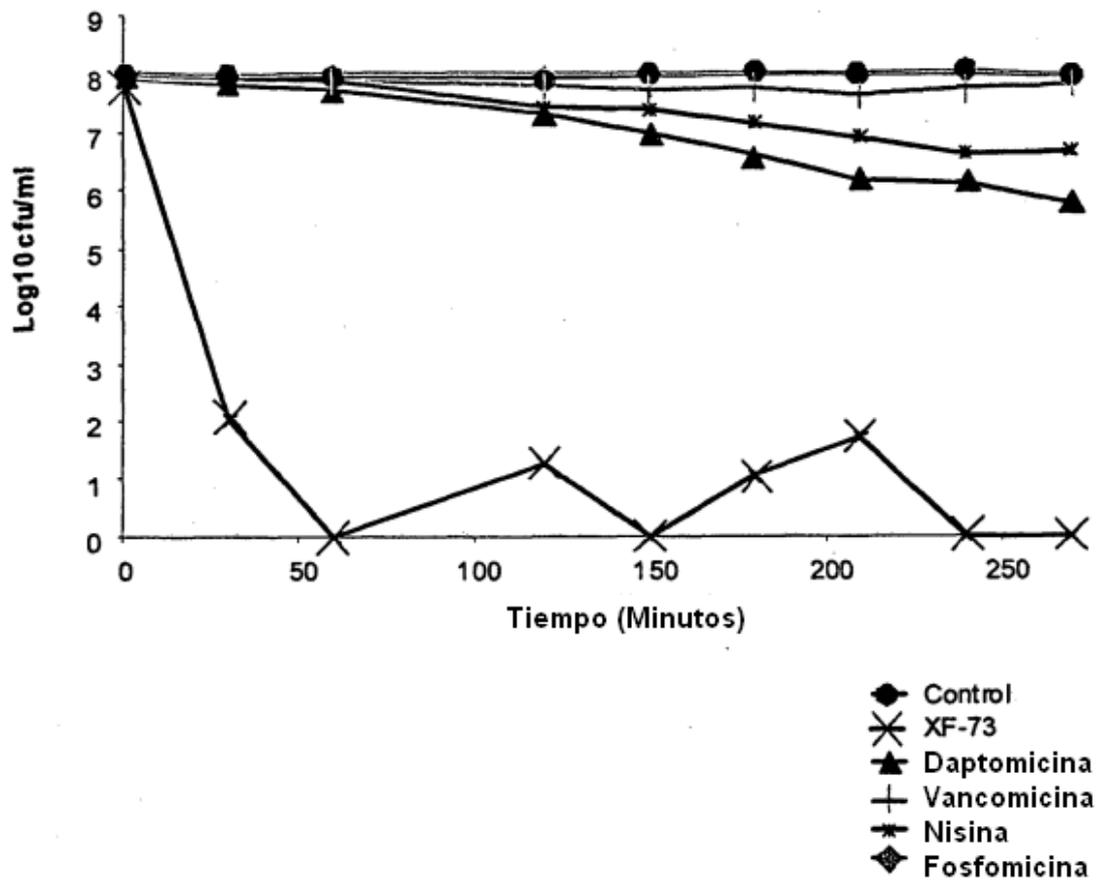


FIGURA 10

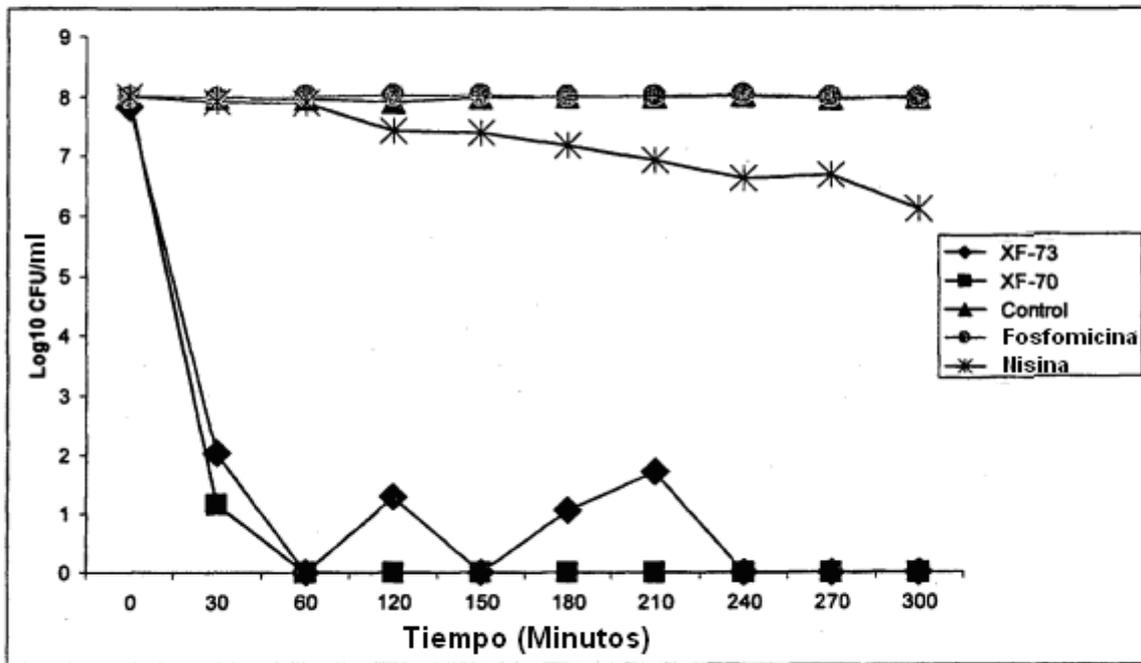


FIGURA 11

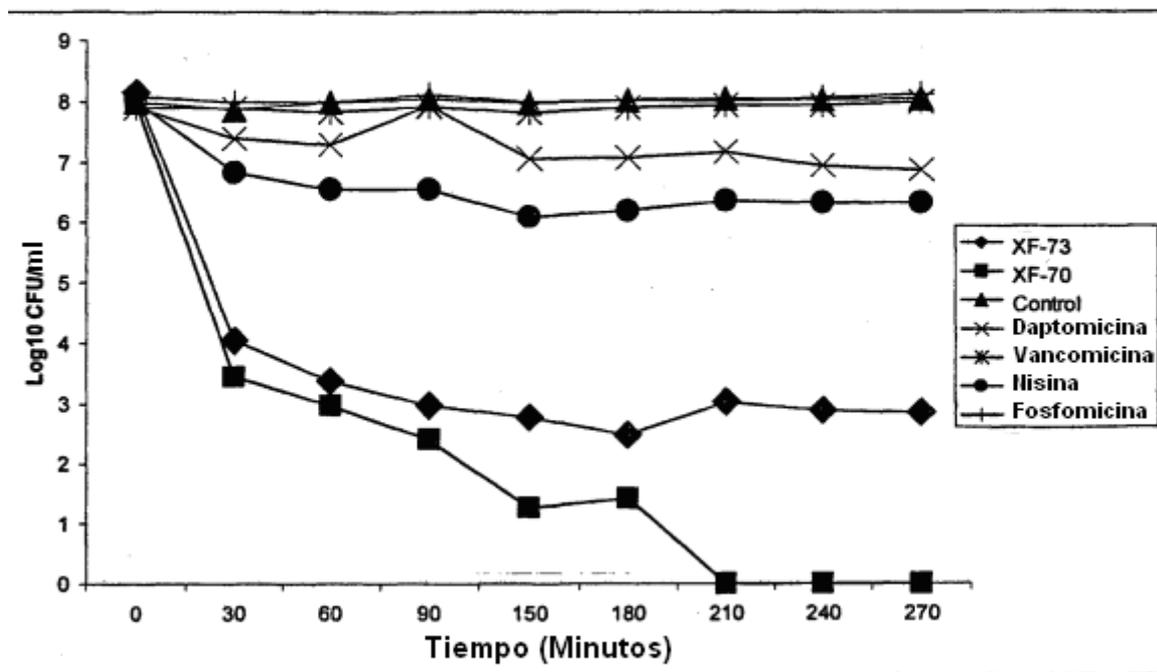


FIGURA 12

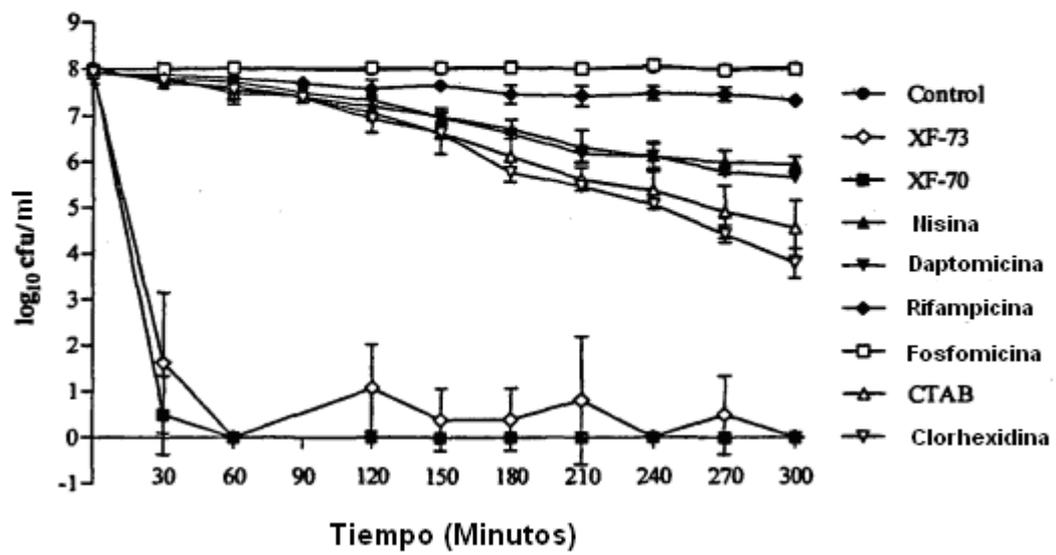


FIGURA 13

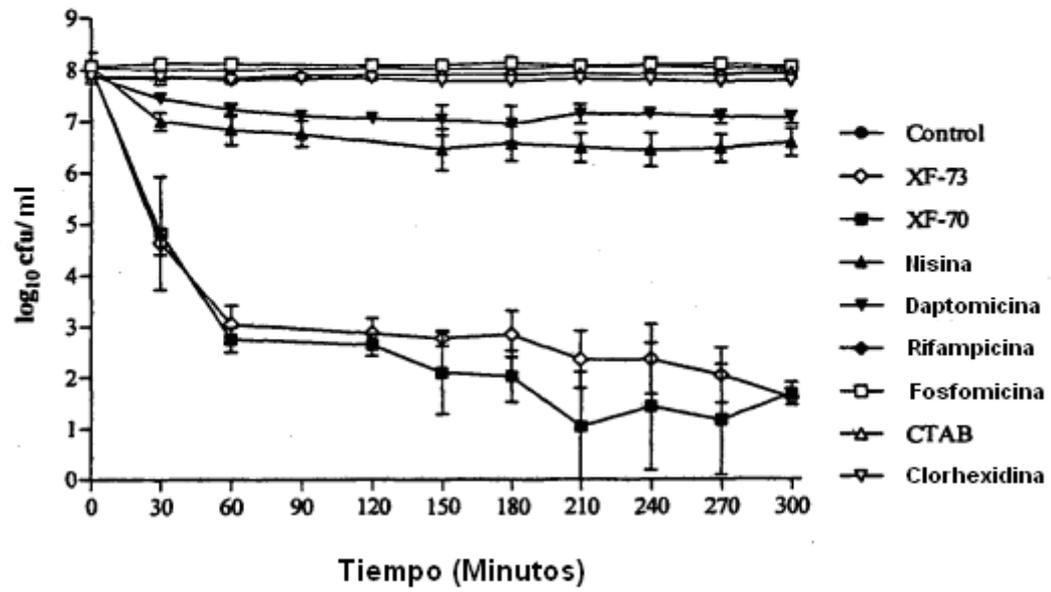


FIGURA 14

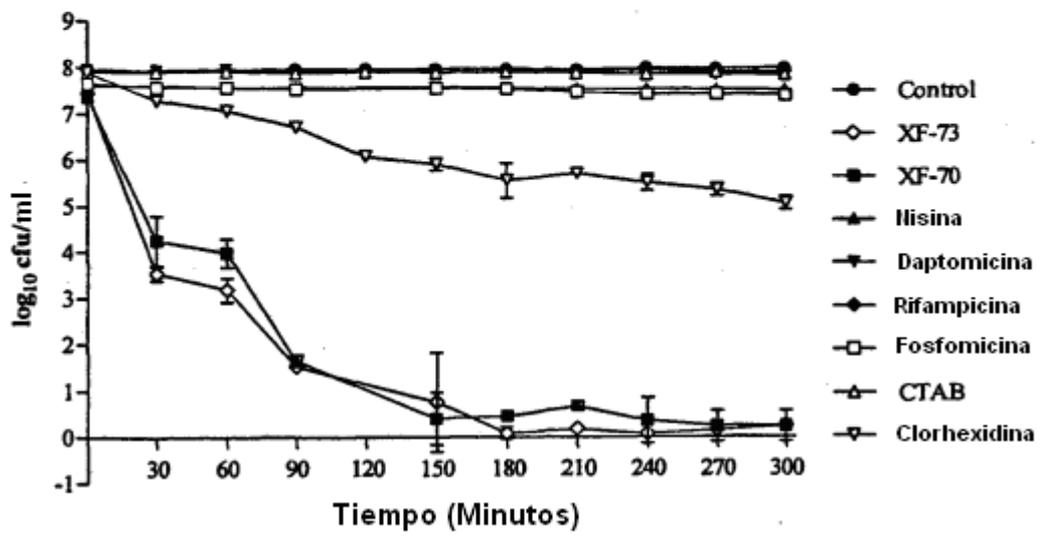


FIGURA 15

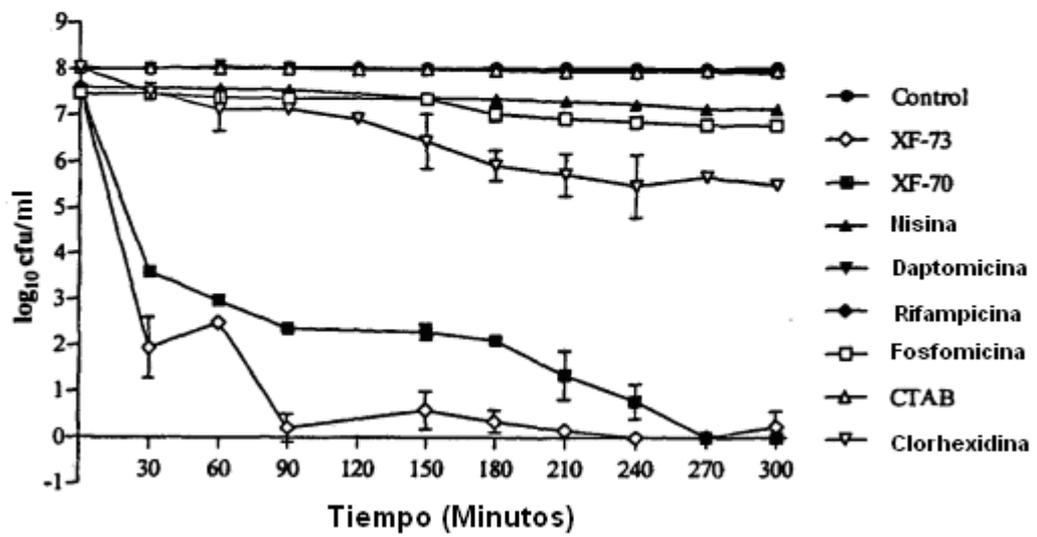


FIGURA 16

