

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 507**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011** **E 11817525 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2585114**

54 Título: **Conjugados terapéuticos de un polímero de dextrina y colistina**

30 Prioridad:

23.06.2010 GB 201010500

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

26.11.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF
CONSULTANTS, LTD. (100.0%)
30-36 Newport Road
South GlamorganCardiff CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**FERGUSON, ELAINE;
THOMAS, DAVID y
WALSH, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 507 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

Conjugados terapéuticos de un polímero de dextrina y colistina

La invención se refiere a un nuevo conjugado de fármaco que comprende un péptido antimicrobiano y un polímero biodegradable; una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado; un terapéutico de combinación que comprende dicho conjugado y/o dicha composición y al menos otro terapéutico diferente; dicho conjugado, dicha composición o dicho terapéutico de combinación para uso en un método de tratamiento; y un método para la fabricación de dicho conjugado, dicha composición o dicho terapéutico de combinación.

Introducción

La resistencia bacteriana a la terapia con anticuerpos es un problema de salud mundial primordial. Desafortunadamente, las disminuciones en el diseño y desarrollo de nuevas entidades de antibiótico se han visto reflejadas en una resistencia microbiana incrementada a los antibióticos disponibles actualmente. Además, la predominancia de infecciones por organismos Gram-negativos, resistentes a múltiples fármacos, está creciendo anualmente.

Los ejemplos de bacterias Gram-negativas incluyen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, y otras *Enterobacteriaceae*. Otros *cocci* Gram-negativos médicamente relevantes incluyen *Neisseria gonorrhoeae*, que causa enfermedad transmitida sexualmente, *Neisseria meningitidis* que causa meningitis, y *Moraxella catarrhalis* que causa síntomas respiratorios. Los *bacilli* Gram-negativos médicamente relevantes incluyen *Hemophilus Influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, que causan principalmente problemas respiratorios, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, que causan principalmente problemas urinarios y *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, que causan principalmente problemas gastrointestinales. Las bacterias Gram-negativas asociadas con infecciones nosocomiales incluyen *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter iwoffi*, que causan bacteremia, meningitis secundaria y neumonía asociada a ventilador en unidades de cuidado intensivo de establecimientos hospitalarios.

Para elaborar sólo un ejemplo, el patógeno Gram-negativo, oportunista *Pseudomonas aeruginosa* es un problema clínico primordial particularmente, pero no exclusivamente, en pacientes con fibrosis quística, quemaduras y heridas en la piel. Además, la resistencia a β -lactama, aminoglicósido y fluoroquinolona es común en este organismo.

La necesidad de combatir las infecciones microbianas ha dado lugar al uso por los médicos de antimicrobianos que son eficaces frente a organismos Gram-negativos pero que también se sabe que tienen problemas de toxicidad (por ejemplo, colistina y polimixina B). En la práctica, esto significa que la utilización eficaz de estos agentes es indeseable y está limitada gravemente.

La colistina es un péptido anti-microbiano (AMP) catiónico que es altamente activo frente a bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos. Sin embargo, este AMP no se absorbe fácilmente oralmente y se sabe que el fármaco libre es particularmente nefro y neurotóxico. Consecuentemente, su uso clínico es limitado. Típicamente, se administra intravenosamente como metanosulfonato de colistina (CMS). Aunque la sulfometilación disminuye la potencia antibacteriana *in vitro* de la colistina, ventajosamente, se reduce la toxicidad y efectos secundarios indeseables de la colistina. CMS es, por lo tanto, esencialmente, un pro-fármaco que se hidroliza fácilmente a derivados parcialmente sulfometilados y colistina en disolución acuosa (Fig. 1). Sin embargo, esta hidrólisis es incontrolada, y puede ocurrir incluso antes de la administración al paciente - dando lugar a muertes reportadas. Consecuentemente, un sistema de administración seguro y eficaz para este AMP revolucionaría el tratamiento de pacientes con infecciones por Gram-negativas e incrementaría el uso seguro del AMP cuando actualmente no existe alternativa.

Hemos desarrollado un nuevo sistema de administración basado en nanomedicina para dirigir la administración de colistina, como un modelo de AMP, a sitios de infección incrementando de esta manera la bioactividad y biodisponibilidad mientras se disminuye la toxicidad sistémica y se mejora la eficacia clínica.

Declaraciones de la Invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un conjugado de péptido anti-microbiano (AMP) polímero que comprende colistina y un polímero de dextrina en el que dicho polímero de dextrina tiene un peso molecular entre 5.000-60.000 g/mol y está modificado por succinilación que incrementa la estabilidad del conjugado y retrasa así la degradación de la dextrina ralentizando de esta manera la velocidad a la que se libera la colistina.

Consideramos que las dextrinas de bajo peso molecular tal como 10.000 ± 5.000 g/mol (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15×10^3 g/mol) son útiles para tratar infecciones agudas en las que se desea la liberación relativamente rápida de AMP tal como liberación del 50% de AMP en 24h. Idealmente, la dextrina tiene un peso molecular de 8.000 g/mol.

Alternativamente, las dextrinas de alto peso molecular tal como 50.000 ± 10.000 g/mol (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ó 60×10^3 g/mol) son útiles para tratar infecciones crónicas en las que se desea una liberación relativamente lenta de AMP tal como liberación del 50% de AMP en 72 h. Por ejemplo, cuando se trata la fibrosis quística. Idealmente, la dextrina tiene un peso molecular de 51.000 g/mol.

5 Hemos descubierto ventajosamente que la conjugación de polímero de dextrina con un AMP podría, no sólo limitar la toxicidad sistémica, sino dirigir pasivamente el AMP a sitios de inflamación mediante, creemos, el "efecto de Permeabilidad y Retención Aumentada (EPR)" observado en inflamación y cáncer. El efecto EPR es la propiedad mediante la cual moléculas con un determinado tamaño, típicamente fármacos macromoleculares, tienden a acumularse en tejidos inflamados, enfermos, mucho más que en el tejido sano normal. La explicación general que se proporciona para este fenómeno es el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular incrementados en los sitios enfermos.

10 En la presente invención el AMP es colistina, lo más idealmente, en su forma de fármaco libre. De hecho, hemos descubierto que la conjugación de colistina con el polímero de dextrina nos permite usar la forma de fármaco libre de colistina en lugar de CMS. Esto es porque el polímero enmascara eficazmente el AMP durante el proceso de su direccionamiento pasivo y supera así cualesquiera problemas de toxicidad que de otra forma serían perjudiciales. 15 Además, el uso de la forma de fármaco libre es ventajoso además porque hace que la producción del conjugado sea más sencilla. En una realización preferida de la invención, los conjugados dextrina-colistina contienen típicamente ~3 enlaces amida por molécula de colistina, más específicamente 1-4 enlaces por molécula de colistina y todavía más específicamente 0,97-3,54 enlaces por molécula de colistina.

20 Más preferiblemente, la proporción molar de dextrina a colistina es entre 1:0,6 y 1:1,8 como se muestra en la Tabla 2. Preferiblemente, 1:0,6 ó 1:0,7 ó 1:1 ó 1:1,2 ó 1:1,3 ó 1:1,4 ó 1:1,5 ó 1:1,6 ó 1:1,8.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que la dextrina es un producto de la hidrólisis del almidón. Es un polímero de glucosa que consiste en varias longitudes de cadena diferentes. Como resultado, se usa un promedio para definir su peso molecular, tal como el peso molecular promedio en peso Mw; o el peso molecular promedio en número Mn. En la invención anterior, el peso molecular promedio en peso se usa para hacer referencia al tamaño del intervalo de MW de la dextrina.

Ventajosamente, la dextrina es completamente biodegradable y está aprobada por la FDA para uso sistémico.

En una realización preferida de la invención, dicha dextrina está modificada por la adición de grupos cargados positivamente, grupos neutros o grupos cargados negativamente.

En la presente invención, dicha dextrina está modificada por succinilación.

30 En una realización preferida adicional más de la invención, dicha dextrina está modificada por 1-30% en moles de succinilación.

El % en moles es el número de grupos reactivos por 100 monómeros de dextrina.

Más preferiblemente, dicha succinilación es 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 2, 2,2, 2,5, 3, 3,4, 4, 4,7, 5, 6, 6,1, 7, 8, 8,3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,4, 18, 19, 20, 21,3, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28,6, 29 ó 30%.

35 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición o formulación farmacéutica que comprende el conjugado AMP polímero según cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores de la invención en combinación con un vehículo adecuado.

Preferiblemente, dicha composición se formula para uso médico o veterinario.

40 El vehículo o, si está presente más de uno, cada uno de los vehículos, debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor.

La formulación incluye aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, bronquial (inhalaado), tópica (incluyendo gotas oculares, bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e intradérmica) y puede prepararse por cualesquiera métodos muy conocidos en la técnica farmacéutica.

45 La ruta de administración dependerá de la afección que se va a tratar pero las composiciones preferidas se formulan para administración intravenosa, parenteral, oral, nasal, bronquial o tópica.

La composición puede prepararse asociando el conjugado AMP polímero de la invención y el vehículo. En general, las formulaciones se preparan asociando uniformemente e íntimamente el conjugado con vehículos líquidos o vehículos

sólidos finamente divididos o ambos, y si es necesario dando forma al producto. La invención se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprenden asociar un conjugado de la invención con un transportador o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

Las formulaciones para administración oral en la presente invención pueden presentarse como: unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del conjugado activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión del conjugado activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida aceite en agua o una emulsión líquida agua en aceite; o como un bolo, etc.

Para las composiciones para administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), el término "vehículo aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, por ejemplo, agentes de unión, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; materiales de relleno y vehículos, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato de dicalcio, cloruro de sodio y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal. También pueden usarse agentes saporíferos tales como menta, aceite de gaulteria, sabor de cereza y semejantes. Puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también pueden recubrirse por métodos muy conocidos en la técnica.

Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el conjugado activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden hacerse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente.

Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen tabletas que comprenden el conjugado activo en una base saborizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el conjugado activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y lavados bucales que comprenden el agente activo en un vehículo líquido adecuado.

Para aplicación tópica en la piel, el conjugado puede prepararse en una crema, pomada, jalea, disolución o suspensión etc. Las formulaciones en crema o pomada que puede usarse para el conjugado son formulaciones convencionales muy conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en libros de texto estándar de productos farmacéuticos tales como la Farmacopea Británica.

Los conjugados de la invención pueden usarse para el tratamiento del tracto respiratorio por administración nasal, bronquial o bucal, por ejemplo, de aerosoles o pulverizadores que pueden dispersar el conjugado farmacológico activo en la forma de un polvo o en la forma de gotas de una disolución o suspensión. Las composiciones farmacéuticas con propiedades de dispersión de polvo contienen habitualmente, además del conjugado activo, un propelente líquido con un punto de ebullición menor que la temperatura ambiente y, si se desea, adyuvantes, tales como tensioactivos líquidos o sólidos no iónicos o aniónicos y/o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas en las que el conjugado farmacológico activo está en disolución contienen, además de éste, un propelente adecuado, y además, si es necesario, un disolvente y/o estabilizante adicional. En lugar del propelente, también puede usarse aire comprimido, siendo posible producir esto según se requiera mediante un dispositivo de compresión y expansión adecuado.

Las formulaciones parenterales serán generalmente estériles.

Típicamente, la dosis del conjugado se determinará de manera que se mantenga el fármaco en el plasma o en el sitio diana a una concentración eficaz para inhibir la actividad Gram-negativa. La cantidad precisa de un conjugado de la presente invención que es terapéuticamente eficaz, y la ruta mediante la cual dicho compuesto se administra de la mejor manera, es determinada fácilmente por un experto en la técnica comparando el nivel sanguíneo del conjugado o el nivel en el sitio diana con la concentración requerida para tener un efecto terapéutico.

Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un terapéutico de combinación que comprende el conjugado descrito anteriormente, en cualquier aspecto o realización de éste, en combinación con al menos otro terapéutico diferente.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para tratar a un mamífero que padece una infección por bacterias Gram-negativas que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de dicho conjugado o composición o terapéutico de combinación de la invención.

- Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para tratar a un mamífero que padece sepsis que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de dicho conjugado o composición o terapéutico de combinación de la invención. En este aspecto de la invención, hemos descubierto ventajosamente que la colistina libre o desenmascarada se une a los lipopolisacáridos (LPS) característicos de la sepsis, tratando de esta manera la afección. Este dato se muestra en las Figs. 10 y 11.
- Los LPS son componentes característicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La liberación de LPS puede desencadenarse por la desintegración de las bacterias, tal como durante la división celular o terapia con antibiótico. El LPS libre se detecta por el receptor semejante a toll 4 (TLR4), que induce una respuesta inflamatoria y la activación/secreción de citoquinas pro-inflamatorias. La exposición prolongada a LPS en la corriente sanguínea da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica, conocida como sepsis, que se caracteriza por fiebre, cambios en los recuentos de las células sanguíneas blancas, coagulación intravascular diseminada, hipotensión, choque y muerte. La sepsis es una afección extremadamente peligrosa, de hecho, aproximadamente el 20-35% de los pacientes con sepsis grave y el 40-60% de los pacientes con choque séptico mueren en 30 días.
- En un método preferido de la invención, dicho conjugado, composición o terapéutico de combinación está en la forma de una cualquiera o más de las realizaciones preferidas, ideales o descritas referidas en la presente memoria.
- En un método preferido adicional de la invención, dicho mamífero es un ser humano, equino, canino, felino, porcino o cualquier otra especie doméstica o agrícola.
- Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para fabricar un conjugado de péptido anti-microbiano (AMP) polímero que comprende:
- disolver dextrina succinilada entre 1-30% en moles en un disolvente preparatorio;
 - disolver colistina en un disolvente preparatorio;
 - añadir los dos disolventes juntos y, opcionalmente, al mismo tiempo, o posteriormente, elevar el pH;
 - permitir que la mezcla de reacción reaccione; y
 - separar el conjugado de la mezcla de reacción
- En una realización preferida del método, dicha dextrina está succinilada hasta el grado deseado entre 1-30% en moles. Idealmente, dicho disolvente preparatorio de dextrina es H₂O destilada (dH₂O) a la que se añade idealmente Hidrocloruro de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), y *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS).
- Preferiblemente, dicho disolvente preparatorio de colistina es dH₂O.
- Idealmente, se usa NaOH para elevar el pH, aunque pueden usarse otras disoluciones básicas. Preferiblemente, el pH se eleva hasta 8 o aproximadamente.
- Idealmente, la mezcla de reacción se deja hasta 18 h, típicamente 2h. Durante este tiempo, la mezcla de reacción idealmente se agita o revuelve. El conjugado se purifica entonces de la mezcla de reacción idealmente por FPLC, aunque pueden usarse otros métodos tales como HPLC, cromatografía de intercambio iónico o diálisis.
- Idealmente, el conjugado se liofiliza y almacena a -20⁰C.
- Idealmente aún, dicho conjugado se mezcla con al menos un vehículo y/o un terapéutico adicional para proporcionar una composición farmacéutica y/o terapéutico de combinación.
- En resumen, hemos desarrollado una serie de conjugados de dextrina, típicamente de colistina, y los hemos caracterizado para optimizar la difusión, administración y eficacia clínica.
- La base racional para esta estrategia es que el conjugado dextrina-AMP con respuesta biológica se localizará en los sitios de inflamación/infección, después de la administración. El tamaño macromolecular del conjugado lo administra eficazmente a los sitios de inflamación/angiogénesis por el efecto EPR a la vez que “protege” eficazmente al péptido del sistema inmune y ralentiza el aclaramiento renal. Posteriormente, la degradación lenta de la dextrina en el tejido inflamado, infectado por la amilasa sérica libera el AMP en el sitio diana.
- Hemos empleado dextrina como el vehículo polimérico ya que se usa ampliamente en clínica; siendo no tóxica, no inmunogénica y aprobada por la FDA. La dextrina se degrada rápidamente (en minutos) por la amilasa para rendir maltosa e isomaltosa, pero la modificación por succinilación para introducir grupos laterales para la conjugación disminuye la velocidad de degradación mediada por amilasa y puede usarse para personalizar la velocidad de liberación

del péptido (Hreczuk-Hirst, D., Chicco, D., German, L. y Duncan, R. Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups. *International Journal of Pharmaceutics* **230**, 57-66 (2001), Hreczuk-Hirst, D., German, L. y Duncan, R. Dextrins as Carriers for Drug Targeting: Reproducible Succinylation as a Means to Introduce Pendant Groups, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **16**, 353-365 (2001)). Como resultado, la dextrina tiene el potencial de ser usada como una parte del polímero en el contexto de un concepto denominado "Polymer masked-Unmasked Protein Therapy" (PUMPT) (Duncan, R., Gilbert, H.R.P., Carbajo, R.J. y Vicent, M.J. Polymer Masked-Unmasked Protein Therapy (PUMPT) 1. Bioresponsive dextrin-trypsin and -MSH conjugates designed for α -amylase activation. *Biomacromolecules* **9**, 1146-1154 (2008)). PUMPT usa la conjugación de un polímero biodegradable para enmascarar la actividad de una proteína o péptido. La degradación desencadenada posterior del polímero regenera la bioactividad de una manera controlada (en el sitio diana, debido a una acumulación aumentada). Hemos encontrado que la velocidad de desenmascaramiento puede personalizarse usando dextrinas de diferente peso molecular y grado de succinilación para optimizar las necesidades de farmacocinética/farmacodinámica de la proteína usada.

Nuestra conjugación y desenmascaramiento eficaz es controlable por modificación química del polímero. Esto permite la optimización de la difusión, migración del fármaco y rinde la oportunidad de combinar agentes bioactivos (por ejemplo, antimicrobianos/anti-inflamatorios) en cadenas de polímero individuales. Además, hemos mostrado que la conjugación polímero-AMP reduce los efectos secundarios neuro y nefro-tóxicos asociados con el péptido colistina nativo.

Nuestra tecnología tiene las ventajas siguientes.

- El tamaño grande del conjugado evita el acceso a sitios de toxicidad (por ejemplo, riñón, cerebro)
- La dextrina enmascara la colistina del sistema inmune y proteasas de heridas
- Velocidades de "desenmascaramiento" potencialmente mayores en sitios de infección crónica debido a mayores concentraciones de amilasa
- Velocidades de degradación controladas según la succinilación y longitud de cadena de la dextrina
- La colistina desenmascarada ejerce su efecto en bacterias Gram-negativas y salvaguarda frente a sepsis mediante la unión a LPS

En las reivindicaciones que siguen y en la descripción precedente de la invención, excepto cuando el contexto requiere otra cosa debido a un lenguaje explícito o implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se usa en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características declaradas pero no para descartar la presencia o adición de características adicionales en varias realizaciones de la invención.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser como se describe en conexión con cualquiera de los demás aspectos.

Otras características de la presente invención serán evidentes a partir de los ejemplos siguientes.

La invención se describirá ahora sólo como ejemplo con referencia a las figuras siguientes, en las que:

La Figura 1 representa la hidrólisis de metanosulfonato de colistina (CMS) disponible comercialmente a una variedad de derivados metanosulfonados y colistina;

La Figura 2 muestra las etapas sintéticas para la preparación de conjugados dextrina-colistina;

La Figura 3 muestra el espectro de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) de dextrina 51.000 g/mol y 8.000 g/mol y formas succiniladas (17,4% en moles, 28,6% en moles a 51.000 g/mol; 8,3% en moles, 21,3% en moles, 4,7% en moles, 2,5% en moles, 1,1% en moles a 8.000 g/mol) de dextrinas, que ilustra el incremento en la intensidad del pico a 1.720cm^{-1} (*) cuando se incorporan grupos éster de succinoilo en la dextrina;

La Figura 4 ilustra la elución de los conjugados dextrina-colistina (que contienen 8.000 g/mol de dextrina a 8,3% en moles, 4,7% en moles y 2,5% en moles de succinilación) y colistina libre de una columna de FPLC Superdex 75. Los conjugados eluyen en el volumen vacío (~7,5 mL) debido a su mayor tamaño que la colistina, facilitando la separación por FPLC;

La Figura 5 demuestra el efecto de la modificación de la dextrina (por succinilación) y peso molecular (8.000 g/mol; 15.000 g/mol; 30.000 g/mol y 51.000 g/mol) en la degradación por amilasa (100 UI/L en PBS);

La Figura 6(A-D) muestra la elución de conjugados dextrina-colistina tratados con amilasa (100 UI/L en PBS) con el tiempo de una columna de FPLC Superdex 75. Los conjugados intactos eluyen en el volumen vacío (~ 7,5 mL) debido a su mayor tamaño, mientras la colistina “desenmascarada” eluye después (~ 16 mL), facilitando la cuantificación de la colistina libre;

5 La Figura 7 ilustra la liberación de colistina de los conjugados dextrina-colistina (medida por (a) FPLC y (b) GPC) durante la incubación con amilasa humana (100 UI/L en PBS) a 37°C (en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4). Los datos en el panel (a) se expresan como el porcentaje de colistina total;

La Figura 8 muestra una comparación de la velocidad de liberación de colistina de los conjugados dextrina-colistina tratados con amilasa e hidrólisis de CMS en PBS (medida por FPLC). Los datos se expresan como el porcentaje de colistina total;

10 La Figura 9 ilustra la estabilidad de dextrina-colistina en agua y PBS a pH 7,4 sin enzimas (medida por FPLC). Los datos se expresan como el porcentaje de colistina total;

La Figura 10 muestra la precipitación de LPS con colistina, CMS y conjugados dextrina-colistina (8.000 g/mol de dextrina con 1% en moles de succinilación). El panel (a) muestra la precipitación dependiente de la concentración de LPS de *E. coli* (64-1.000 µg/ml) con colistina (4 mg/mL) durante 2h. Los paneles (b) y (c) muestran la precipitación de colistina, CMS, dextrina-colistina (+/- amilasa) y dextrina succinilada (4 mg/mL) con LPS de *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente (1.000 µg/mL).

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) convencional después de la incubación de LAL con LPS de *E. coli* (0-50 ng/mL) preincubado durante 3 h a 37°C con (a) colistina, CMS o agua sin pirógenos, y (b) dextrina-colistina 8.000 g/mol de dextrina con 1% en moles de succinilación (+/- amilasa) a 4 µg/mL.

La Figura 12 muestra cómo la unión de colistina a dextrina reduce su toxicidad frente a células de riñón HK2 en un ensayo MTT *in vitro* (incubación de 72 h);

La Figura 13 muestra la toxicidad reducida de los conjugados dextrina-colistina en células de riñón HK2, comparada con colistina y CMS, en un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) *in vitro* (incubación de 24 h).

25 La Tabla 1 muestra las características típicas de lotes de dextrinas succiniladas;

La Tabla 2 muestra las características típicas de lotes de conjugados dextrina-colistina;

La Tabla 3 muestra la actividad antimicrobiana de conjugados seleccionados, es decir, 8.000 g/mol a 1,1% en moles, 2,5% en moles y 4,7% en moles de succinilación.

Materiales y Métodos

30 **Materiales.** La dextrina de tipo 1 de maíz (Mw ~ 51.000 g/mol) fue de ML laboratories (Keele, Reino Unido). La dextrina de tipo I de maíz (Mw ~ 8.000 g/mol), dextrina de almidón de maíz (Mw ~ 30.000 g/mol), colistina, α-amilasa de saliva humana, N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), disolución al 4% p/v de sulfato de cobre (II) pentahidrato, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), disolución de ácido bicinconínico (BCA), etanolamina, ninhidrina, hidrindantina, acetato de litio dihidrato, ácido acético, dimetil sulfóxido (DMSO), lipopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* 10, lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 026:B6 (5) fueron todos de Sigma-Aldrich (Poole, Reino Unido). La dextrina de almidón de patata (Mw ~ 15.000 g/mol) fue de Fluka (Gillingham, Reino Unido). Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) (EDC) fue de Pierce (Rockford, EEUU). Hidrógeno fosfato de disodio, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) fueron de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). El kit de ensayo de endotoxina LAL cromogénico sensor de toxina fue de Jencons (Lutterworth, Reino Unido). Los estándares de filtración en gel Pululano (Mw= 11.800-210.000 g/mol) fueron de Polymer Laboratories (Church Stretton, Reino Unido). El kit de ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) fue de abcam (Cambridge, Reino Unido). El kit de ensayo de amilasa Phadebas® fue suministrado por Magle Life Sciences (Lund, Suecia). A no ser que se afirme otra cosa, todos los químicos fueron de grado analítico. Todos los disolventes fueron de grado reactivo general (a no ser que se afirme otra cosa) y fueron de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido).

Las células de túbulo proximal de riñón humano (CRL-2190) fueron de ATCC (Manassas, EEUU). Las células se cribaron y se encontró que no tenían contaminación por micoplasma antes de su uso. Suero fetal de ternera (FCS), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) y 0,05% p/v tripsina-0,53 mM EDTA se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Paisley, Reino Unido).

Síntesis y purificación de los conjugados dextrina-colistina.

En primer lugar, se sintetizaron las dextrinas succiniladas (1-60% en moles) (**Fig. 2a**). Brevemente, con dextrina de Mw 8.000 g/mol, se consiguió una succinilación de 5% en moles como sigue. La dextrina (1.000 mg, $6,17 \times 10^{-3}$ moles) se disolvió en DMF anhidro (10 mL) en un matraz de fondo redondo de 50 mL. Se añadieron posteriormente anhídrido succínico (61,7 mg, $6,17 \times 10^{-4}$ moles) y DMAP (28,6 mg, $2,34 \times 10^{-4}$ moles) y la reacción se purgó con nitrógeno, se selló y se dejó con agitación a 50°C durante 18 h. Después, la mezcla de reacción se vertió en éter dietílico agitado vigorosamente (250 mL) y se agitó toda la noche. El éter se eliminó por filtración en vacío y el sólido residual se disolvió en agua destilada (dH₂O) mínima, se vertió en una membrana de diálisis (punto de corte de peso molecular 2.000 g/mol) y se dializó frente a 4 x 5 L de dH₂O. La disolución resultante se liofilizó para rendir dextrina succinilada. El grado de succinilación se cuantificó por titulación frente a una disolución estándar de NaOH (5×10^{-4} M) con azul de bromofenol como indicador, y el producto se caracterizó adicionalmente por FT-IR (espectrómetro Avatar 360 ESP con software EZ OMNIC ESP 5.2; Thermo Nicolet, Loughborough, Reino Unido) para confirmar la identidad y por cromatografía de permeación en gel (GPC) (columnas TSK G4000PW_{XL} y G3000 PW_{XL} (Polymer Laboratories, Church Stretton, Reino Unido) en serie, fase móvil PBS (pH 7,4), caudal de 1 mL/min) para medir su peso molecular aproximado y polidispersidad (comparado con los estándares pululano). Las muestras para GPC se prepararon en PBS (3 mg/mL) y el eluato se monitorizó usando un refractómetro diferencial (Gilson 153). Para el análisis de los datos se usó software PL Caliber Instrument, versión 7.0.4, de Polymer Laboratories (Church Stretton, Reino Unido).

Las dextrinas succiniladas (1-30% en moles de succinilación) se conjugaron con colistina (**Fig. 2b**). Brevemente, para dextrina succinilada 10% en moles, se disolvió dextrina succinilada (200 mg, $1,11 \times 10^{-4}$ mol COOH; $2,50 \times 10^{-5}$ moles de dextrina) con agitación en dH₂O (1 mL) en un matraz de fondo redondo de 10 mL. A esto, se añadieron EDC (21,3 mg, $1,11 \times 10^{-4}$ moles) y sulfo-NHS (24,1 mg, $1,11 \times 10^{-4}$ moles) y la mezcla se dejó con agitación durante 30 min. Posteriormente, se añadió colistina (35 mg, $2,50 \times 10^{-5}$ moles) disuelta en dH₂O (1 mL), seguido de NaOH (0,5 M) gota a gota para elevar el pH hasta ~8,0. La mezcla de reacción se dejó con agitación durante hasta 18 h, típicamente durante 2 h. El conjugado se purificó de la mezcla de reacción por cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) (ÅKTA FPLC; Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) usando una columna pre-empaquetada Superdex 75 10/300 GL con un detector UV y análisis de datos usando software Unicorn 4.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). Las muestras de la mezcla de reacción (0,5 mL) se inyectaron en un bucle de 500 µL usando PBS (pH 7,4), pH 7,4 a 0,5 mL/min como una fase móvil. Se recogieron fracciones (1 mL), se desalaron usando tubos Vivaspín (5.000 g/mol de punto de corte) y se ensayaron para contenido de proteínas (ensayo BCA) antes de combinar las fracciones que contenían el conjugado (típicamente fracciones 6-13). El conjugado final se liofilizó y se almacenó a -20°C.

Caracterización de los conjugados dextrina-colistina.

La dextrina-colistina se caracterizó por FPLC y GPC para evaluar la pureza y estimar el peso molecular y el contenido de proteínas total del conjugado se determinó por el ensayo BCA usando estándares de colistina.

El sistema FPLC descrito anteriormente para purificación se usó de nuevo para la caracterización del conjugado final. Se disolvieron muestras (200 µL) en PBS (pH 7,4) y se inyectaron en un bucle de 100 µL a 0,5 mL/min. El peso molecular se estimó usando GPC respecto a estándares pululano.

Ensayo de ninhidrina.

Antes de la conjugación del polímero a la proteína, era importante en primer lugar determinar el número de grupos amino disponibles en la colistina para conjugación y cuántos grupos amino se usaron posteriormente para la unión a dextrina.

En primer lugar, se preparó una disolución de tampón de acetato de litio 4 M disolviendo acetato de litio dihidrato (40,81 g) en 60 mL de dH₂O. Se añadió ácido acético (glacial) suficiente hasta que se alcanzó pH 5,2. El volumen se completó hasta un volumen final de 100 mL con dH₂O. A continuación, se disolvieron ninhidrina (0,2 g) y hidrindantina (0,03 g) en 7,5 mL de DMSO y 2,5 mL de tampón de acetato de litio. Se añadió reactivo de ninhidrina tamponado (86 µL) a una cantidad igual de disolución de muestra/estándar (eppendorf de 1,5 mL) y se calentó en un baño de agua a 100°C durante 15 min. La mezcla se enfrió posteriormente hasta temperatura ambiente y se añadieron 130 µL de 50% v/v etanol. La disolución se mezcló antes de añadir 200 µL de la disolución final a pocillos de una placa de 96 pocillos. Se realizó un análisis espectrofotométrico a 570 nm. La calibración del ensayo se consiguió usando etanolamina (0-0,1158 mM).

Degradación de dextrina, dextrina succinilada y conjugados dextrina-colistina por amilasa. Para comparar la velocidad de la degradación por amilasa de la dextrina, dextrina succinilada y conjugados dextrina-colistina, se prepararon disoluciones (3 mg/mL en PBS, pH 7,4) de cada muestra que contenían amilasa (100 UI/L en PBS) y se incubaron a 37°C durante hasta 48 h. A diferentes puntos de tiempo, se tomaron muestras (300 µL), se congelaron rápidamente inmediatamente en nitrógeno líquido para parar la reacción y se almacenaron a -20°C hasta el análisis por GPC y FPLC (sólo los conjugados). Antes del análisis, las muestras se pusieron en un baño de agua (100°C) durante 5

min para desnaturalizar la actividad enzimática de la amilasa y para parar la degradación del polímero. El sobrenadante se analizó por GPC para determinar el cambio en el peso molecular con el tiempo y por FPLC para determinar el cambio en la colistina libre con el tiempo.

Medida de la actividad antimicrobiana.

- 5 La actividad antimicrobiana se midió usando microdilución en caldo en un ensayo de concentración inhibidora mínima (MIC) según el Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente NCCLS; 2003, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard – Sexta Edición. M7A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA). Los organismos de ensayo se suspendieron en caldo ajustado con cationes Mueller Hinton (100 μ L, $1-5 \times 10^4$ CFU/mL) y se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en diluciones seriadas de dos veces de los compuestos de ensayo.

La actividad antimicrobiana de dextrina-colistina también se determinó después de la incubación del conjugado con amilasa. Los conjugados dextrina-colistina (3 mg/mL eq.de colistina) se incubaron en primer lugar con amilasa (100 UI/mL durante hasta 48 h a 37°C en tampón PBS(pH 8,2)).

Ensayo de turbidez de LPS

- 15 Se usó una técnica de ensayo turbidimétrico en el que la unión de LPS a colistina resulta en la precipitación de agregados y turbidez incrementada que puede medirse espectrofotométricamente a 625 nm.

El LPS se disolvió en tampón PBS pre-calentado (0-1.000 μ g/mL, 37°C) que contenía colistina, CMS, dextrina-colistina o dextrina-colistina desenmascarada (4 mg/mL, 200 μ L por pocillo) y se añadió a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras control sólo contenían LPS disuelto en PBS. Las placas se incubaron a 37°C a lo largo del experimento y se leyó la absorbancia a 625 nm a varios puntos de tiempo (0, 15, 30, 60, 90, 120 min). Las muestras se ensayaron en triplicado y los experimentos se repitieron una vez, y se calcularon las medias de los resultados.

- 25 Para estudiar el efecto de la amilasa en la actividad de los conjugados dextrina-colistina, los conjugados dextrina-colistina (10 mg/mL) se incubaron en primer lugar con amilasa (100 UI/L) durante 6 h y 24 h a 37°C en PBS (pH 8,2). Después se realizaron ensayos de actividad de unión a endotoxina como se ha descrito anteriormente.

Ensayo LAL

Se usó una técnica de ensayo colorimétrico en la que se midió la reacción de coagulación del lisado de amebocito de Limulus (LAL) en presencia de LPS espectrofotométricamente a 540 nm.

- 30 El LPS se disolvió en agua sin pirógenos (0-50 ng/mL) que contenía colistina, CMS, dextrina-colistina o dextrina-colistina desenmascarada (4 μ g/mL, 100 μ L) en viales sin pirógenos. Las muestras control sólo contenían LPS disuelto en agua sin pirógenos. Las disoluciones se mezclaron bien y se incubaron a 37°C durante 3 h. Se añadió LAL reconstituido (100 μ L) y la disolución se mezcló bien antes de incubarla a 37°C durante 45 min. A continuación, se añadió a cada vial disolución de sustrato reconstituido (100 μ L), se mezcló bien y se incubó durante 6 min más. Finalmente, la reacción se terminó por la adición de disolución de parada reconstituida y estabilizadores del color. Las muestras (100 μ L) se pipetearon en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (6 pocillos por muestra) y se leyó la absorción espectrofotométricamente a 540 nm. La concentración de LPS que produjo el 50% de la absorción máxima se tomó como la DE₅₀.

- 40 Para estudiar el efecto de la amilasa en la actividad de los conjugados dextrina-colistina, los conjugados dextrina-colistina (0,5 mg/mL) se incubaron en primer lugar con amilasa (100 UI/L) durante 6 y 24 h a 37°C en PBS (pH 8,2). Después se realizaron ensayos de actividad de unión a endotoxina como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de toxicidad *in vitro*

Ensayo MTT

- El ensayo MTT se usó para evaluar la viabilidad celular (incubación de 72 h) en una línea celular de riñón humano (HK2). Las células se sembraron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos (1×10^5 células/mL) en 0,1 mL/pocillo de medio (DMEM) que contenía FCS (10% v/v). Se dejó que se adhirieran durante 24 h. El medio se eliminó y los compuestos de ensayo (esterilizados con un filtro de 0,2 μ m) se añadieron a las células. Para estudiar el efecto de la colistina, CMS, conjugado dextrina-colistina y dextrina succinilada (8.000 g/mol, 1,1% en moles de succinilación) en la viabilidad celular, el medio completo (+ FCS) se suplementó con un intervalo de concentraciones de cada uno. Para estudiar el efecto de dextrina-colistina “desenmascarada” en la viabilidad celular, el medio completo (+FCS) se suplementó con un intervalo de concentraciones de conjugado y amilasa (100 UI/L). Después de una incubación de 67 h

más, se añadió MTT (20 µL de una disolución 5 mg/mL en PBS) a cada pocillo y las células se incubaron durante 5 h más. El medio se eliminó y los cristales de formazán precipitados se solubilizaron por la adición de DMSO de grado óptico (100 µL) durante 30 min. La absorbancia se midió a 540 nm usando un lector de placas de microtitulación. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje de la viabilidad de las células control no tratadas. Los valores CI_{50} se expresaron como media $\pm$ SEM (n= 18).

Ensayo LDH

La LDH se usó para evaluar el daño en la membrana celular (incubación de 24 h) en una línea celular HK2. Las células se sembraron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos (1×10^5 células/mL) en 0,1 mL/pocillo de medio (DMEM) que contenía FCS (10% v/v). Se dejó que se adhirieran durante 24 h. El medio se eliminó y los compuestos de ensayo (esterilizados con un filtro de 0,2 µm) se añadieron a las células. Para estudiar el efecto de la colistina, CMS y conjugado dextrina-colistina en la integridad de la membrana celular, el medio completo (+ FCS) se suplementó con un intervalo de concentraciones de cada uno. Para estudiar el efecto de dextrina-colistina “desenmascarada” en la viabilidad celular, el medio completo (+FCS) se suplementó con un intervalo de concentraciones de conjugado y amilasa (100 UI/L). Después de 24 h, las placas de microtitulación se centrifugaron (600 g, 10 min) y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos limpia y se almacenó a -20°C hasta la determinación del contenido de LDH. El contenido de LDH en el sobrenadante celular se determinó usando un kit de ensayo de citotoxicidad de LDH comercial (abcam) siguiendo el protocolo del fabricante. La absorbancia de midió a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Los valores de absorbancia se expresaron como media $\pm$ SEM (n= 6).

Resultados

Síntesis y caracterización de los conjugados dextrina-colistina.

Las características de la biblioteca de dextrinas succiniladas sintetizadas se resumen en la **Tabla 1**. Se sintetizaron intermedios dextrina succinilados que tenían un grado de modificación de 1-29% en moles y mostraron una fuerza incrementada en la señal FT-IR del pico de éster ($\sim 1.720 \text{ cm}^{-1}$) respecto al grado de modificación (**Fig. 3**). Esto significa la incorporación de grupos éster en la dextrina, es decir, succinilación. Así, la señal se incrementa al incrementarse la succinilación. La GPC usando estándares pululano sugirió un incremento en el peso molecular de la dextrina después de la succinilación con un cambio pequeño en la polidispersidad.

Usando este intermedio de dextrina succinilado, se preparó una serie de conjugados dextrina-colistina (**Tabla 2**). Se muestran los perfiles de elución de FPLC típicos de los conjugados purificados y colistina libre (**Fig. 4**). Hubo una buena separación entre la colistina unida y libre, con el conjugado eluyendo típicamente en el volumen vacío de la columna, permitiendo así la separación de la colistina libre y unida. El contenido de proteínas fue 3-23% p/p. El análisis por FPLC confirmó la presencia de un conjugado de alto peso molecular, sin embargo, el contenido de colistina libre fue siempre < 4%. El ensayo de ninhidrina indicó que la colistina tiene 4,8 grupos NH_2 por molécula y que la dextrina se unió típicamente a ~ 3 de estos grupos en los conjugados dextrina-colistina.

Degradación de dextrina y conjugado dextrina-colistina por amilasa.

El análisis por GPC de la degradación de dextrina por amilasa reveló una disminución en el peso molecular con el tiempo de una manera dependiente de la concentración (**Fig. 5**). Mientras la dextrina se degradó rápidamente ($t_{1/2} < 30 \text{ min}$) en presencia de amilasa, la modificación química por succinilación retrasó la velocidad de degradación ($t_{1/2} \geq 4 \text{ h}$).

Cuando se analizaron por FPLC los conjugados dextrina-colistina degradados, apareció un pico correspondiente a colistina libre ($\sim 16 \text{ mL}$), que se incrementó en intensidad con el tiempo (**Fig. 6**). En paralelo, el pico correspondiente al conjugado dextrina-colistina ($\sim 7,5 \text{ mL}$) disminuyó durante el curso de tiempo de la incubación. Esto corresponde a una concentración incrementada de colistina libre en paralelo a concentraciones reducidas del conjugado dextrina-colistina – indicativo de la liberación de la colistina del conjugado debido a la degradación por amilasa de la dextrina. En estos experimentos, los conjugados dextrina-colistina que contenían dextrina de bajo peso molecular (8.000 g/mol) con un nivel bajo de modificación del polímero (1,1% en moles) liberaron la mayor colistina libre (85%) después de una incubación de 48 h (**Fig. 7**). Los conjugados dextrina-colistina tratados con amilasa sintetizados usando dextrina de bajo peso molecular (8.000 g/mol) liberaron más del doble de colistina libre en 48 h que el CMS disponible comercialmente (**Fig. 8**).

Medida de la actividad antimicrobiana.

La conjugación de dextrina enmascaró eficazmente la actividad antimicrobiana de la colistina en un panel de bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la incubación con amilasa (a concentraciones fisiológicas) degradó el polímero y reinstauró la actividad antimicrobiana hasta varios grados en 16 h (**Tabla 3**). La actividad antimicrobiana fue la mayor para los conjugados que contenían dextrina de bajo peso molecular (8.000 g/mol) con un grado bajo de succinilación

(1,1% en moles). La resistencia a fármacos ocurre frecuentemente cuando las bacterias se exponen a concentraciones sub-óptimas de antibiótico, mientras dosis altas pueden causar efectos secundarios desagradables o dañinos. El enmascaramiento de la actividad del antibiótico en tránsito seguido de la reinstauración eficaz de la actividad del antibiótico después de la localización pasiva en sitios de infección e inflamación por el efecto EPR proporciona un medio ideal para optimizar la dosificación del fármaco para reducir la aparición de resistencia.

Estabilidad de dextrina-colistina y CMS *in vitro*.

Los conjugados dextrina-colistina (conjugados 8.000 g/mol a 2,5, 4,7 y 8,3% en moles) fueron muy estables en agua y disolución salina tamponada con fosfato a 4°C (**Fig. 9**). Después de 7 días, el porcentaje de colistina liberada fue típicamente < 5%. Los conjugados dextrina-colistina fueron menos estables en agua a 37°C en ausencia de enzimas (en particular, amilasa) e incluso se liberó más colistina en tampón fosfato a 37°C en ausencia de enzimas (en particular, amilasa). La liberación de colistina por hidrólisis también fue más significativa para los conjugados que contenían bajos grados de succinilación. Este descubrimiento indica que aunque la amilasa desencadena una liberación significativa de colistina libre de los conjugados, el fármaco también puede liberarse a una velocidad menor en ausencia de la amilasa. Algunos pacientes, tales como aquellos con fibrosis quística, presentan niveles fisiológicos reducidos de amilasa. La liberación sin enzima del fármaco sería por lo tanto necesaria para estos pacientes. En todos los casos, la liberación de colistina libre de los conjugados dextrina-colistina fue menor que la de los conjugados activados con amilasa.

Unión de LPS/neutralización de endotoxinas

Los LPS son componentes característicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que, cuando se liberan, inducen una respuesta inflamatoria y la activación/secreción de citoquinas pro-inflamatorias, dando lugar finalmente a sepsis y muerte. La colistina tiene una afinidad muy alta por LPS, dando lugar a la neutralización de las endotoxinas.

Ensayo de turbidez

La turbidez incrementada se usó como un marcador de la formación de agregado de LPS con colistina, CMS o conjugado dextrina-colistina. La **Fig. 10a** (gráfico superior) muestra la formación de agregados del LPS de *E. coli* a 64-1.000 µg/mL con colistina a 4 mg/mL constante y demuestra que la turbidez incrementada está relacionada claramente con la concentración de sustrato. Cuando se compara a concentración de colistina equivalente, se observaron diferencias significativas entre la turbidez de colistina y CMS, dextrina-colistina (± amilasa) o dextrina succinilada/control. Puede verse que la unión de LPS del conjugado se redujo (hasta ~ 50% y ~ 20% para LPS de *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente) comparado con colistina libre (**Fig. 10b,c** – gráfico medio e inferior). Cuando la dextrina-colistina se pre-incubó con amilasa, la turbidez no se incrementó significativamente.

Ensayo LAL

La colistina, y CMS en menor grado, fue capaz de inhibir la escisión del sustrato cromogénico por el LPS de *E. coli* (**Fig. 11a**). La neutralización de LPS por colistina requirió 20 veces más de LPS para desencadenar la gelificación del lisado de amebocitos de *Limulus* comparado con LPS en agua y fue significativamente mayor que CMS.

A pesar de que el conjugado dextrina-colistina desenmascarado tiene una actividad considerable en los ensayos de actividad antimicrobiana, todas las muestras de conjugado gelificaron el lisado de amebocitos de *Limulus* sin la adición de LPS, lo que es indicativo de contaminación de endotoxina (**Fig. 11b**). Sin embargo, a las concentraciones más bajas de LPS, el conjugado desenmascarado fue capaz de unir más LPS que el conjugado enmascarado y hubo una tendencia hacia unión incrementada de endotoxina después del desenmascaramiento por amilasa (6 h > 24 h > 0 h).

Ensayo de toxicidad *in vitro*

La colistina es de forma inherente neuro y nefrotóxica, lo que limita su uso clínicamente. Aquí, hemos evaluado la toxicidad *in vitro* de conjugados dextrina-colistina en una línea celular de riñón humano. El conjugado dextrina-colistina fue de alguna forma menos tóxico que la colistina libre y CMS en células HK2: los valores Cl_{50} fueron 90, 20 y 25 µg/mL, respectivamente, del ensayo MTT (**Fig. 12**). Aunque la viabilidad celular se redujo ligeramente en presencia del conjugado dextrina-colistina con amilasa, la toxicidad fue todavía 3 veces menor que la colistina libre. De manera similar, el ensayo LDH en células HK2 demostró que el conjugado dextrina-colistina causó significativamente menos daño en la membrana que la colistina o CMS (**Fig. 13**).

Estos descubrimientos demuestran la toxicidad reducida de los conjugados dextrina-colistina, comparado con el fármaco libre y el CMS disponible comercialmente.

Conclusión

Los conjugados dextrina-antimicrobiano, especialmente los conjugados dextrina-colistina, son capaces de administrar fármacos potencialmente tóxicos para el tratamiento de infecciones por Gram-negativas. La liberación se desencadena por amilasa fisiológica, aunque el fármaco también se libera por hidrólisis en ausencia de enzimas. Esto puede ser significativo en el tratamiento de fibrosis quística o pancreatitis crónica en las que las enzimas pueden no estar presentes. La colistina “desenmascarada” de los conjugados dextrina-colistina retiene la actividad antimicrobiana y puede beneficiarse además de la acumulación en áreas de infección e inflamación debido al efecto EPR *in vivo*. Los conjugados que contienen dextrina de bajo peso molecular 5.000-15.000 g/mol (~8.000 g/mol) que tienen un grado bajo de modificación por succinilación (~ 1,1 ó 2,5% en moles) parecen ser los sistemas más favorables para tratar infecciones bacterianas agudas, mientras los conjugados que contienen dextrina con un peso molecular mayor 40.000-60.000 g/mol o mayor grado de modificación por succinilación (> 10% en moles) parecen ser los sistemas más favorables para tratar infecciones crónicas.

Tabla 1

Peso molecular de la dextrina (g/mol)	Grado de succinilación (% en moles)	Mw (g/mol)
51.000	28,6	98.000
51.000	17,4	97.000
30.000	6,1	45.000
30.000	3,4	40.000
30.000	2,0	28.000
15.000	7,0	18.000
15.000	4,3	17.000
15.000	2,2	13.500
8.000	21,3	15.000
8.000	8,3	12.000
8.000	4,7	9.500
8.000	2,5	9.000
8.000	1,1	8.500

Tabla 2

Características del conjugado	Peso molecular (g/mol)	Contenido de proteína (% p/p)	Proporción molar (dextrina:colistina)	NH ₂ conjugados por molécula*	Proteína libre (%)	% de liberación de colistina después de 24 h
Colistina	1.408	100	-	0	100	100
CMS	1.743	80,8	-	5	<1	23,6
51.000 g/mol 28,6% en moles	66.500	7,3	1:1,4	1,3	0,1	5,3
51.000 g/mol 17,4% en moles	55.000	5,1	1:1	1,2	0,1	9,9
30.000 g/mol 6,1% en moles	270.000	6,6	1:15	1,0	0,9	ND
30.000 g/mol 3,4% en moles	140.000	3,0	1:0,7	1,4	1,3	ND
30.000 g/mol 2,0% en moles	95.000	3,3	1:0,7	2,2	1,4	ND
15.000 g/mol 7,0% en moles	180.000	14,5	1:1,8	1,4	2,8	ND
15.000 g/mol 4,3% en moles	165.000	11,5	1:1,4	1,6	2,4	ND
15.000 g/mol 2,2% en moles	35.000	10,6	1:1,3	1,4	2,9	ND
8.000 g/mol 21,3% en moles	16.500	22,1	1:1,6	ND	0,8	17,7
8.000 g/mol 8,3% en moles	17.000	21,6	1:1,6	3,5	0,8	30,2
8.000 g/mol 4,7% en moles	15.500	22,2	1:1,6	3,0	2,0	39,1
8.000 g/mol 2,5% en moles	14.500	17,0	1:1,2	3,2	2,7	48,4
8.000 g/mol 1,1% en moles	9.000	10,1	1:0,6	3,3	3,7	68,2

*= habitualmente 4,8 NH₂ por colistina libre (ensayo de ninhidrina), ND= no determinado

Tabla 3

Especie bacteriana	2% en moles				5% en moles				10% en moles				Colistina	CMS
	0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	64	128	256	64	256	256	128	128	512	256	256	256	0,06	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R22	128	128	128	128	256	256	256	256	>1024	1024	1024	1024	0,03	0,5
PSA														
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR 301 PSA	512	512	512	512	1024	512	512	512	>1024	>1024	>1024	>1024	0,125	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP05 506	4	8	16	16	512	64	32	64	1024	512	128	256	0,125	2
<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR ACB	8	16	16	16	16	32	32	32	1024	256	128	256	0,125	4
<i>Escherichia coli</i> AM-1	<1	<1	<1	<1	16	32	32	32	1024	256	128	256	0,01	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IR25	8	16	16	16	32	16	8	16	64	64	128	256	0,03	2
<i>Providencia stuartii</i> IR57	4	32	8	8	<1	<1	<1	<1	64	32	16	16	0,01	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K3	8	16	64	32	32	16	8	16	64	64	128	256	0,06	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	64	256	256	256	64	128	32	32	128	128	128	512	0,03	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	128	128	64	64	32	32	16	128	512	256	256	256	0,25	4
<i>Escherichia coli</i> 5702	4	8	8	2	64	32	64	32	128	128	64	64	0,03	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5725	2	8	8	4	32	32	32	64	128	64	64	128	0,03	1

<i>Acinetobacter baumannii</i> 7789	8	16	16	8	>1024	1024	1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	0.03	2
<i>Acinetobacter</i> <i>hwjff</i> 8065	8	8	8	4	64	64	32	32	512	256	128	128	ND	ND	ND
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> 1554	>1024	1024	512	512	256	128	128	64	1024	512	256	256	4	8	8
<i>Acinetobacter</i> <i>hwjff</i> 6056	32	32	16	16	4	4	4	4	64	32	16	128	0.03	2	2
<i>Escherichia coli</i> 7273	4	32	16	8	64	32	32	16	512	256	256	128	<0.5	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>mucoid strain</i>	128	64	32	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>mucoid strain</i>	64	32	64	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.008	0.25	0.25

ND = no determinado

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptido anti-microbiano (AMP) polímero que comprende colistina y un polímero de dextrina en el que dicho polímero de dextrina tiene un peso molecular entre 5.000-60.000 g/mol y está modificado por succinilación que incrementa la estabilidad del conjugado y así retrasa su degradación ralentizando de esta manera la velocidad a la que se libera la colistina.
2. El conjugado según la reivindicación 1 en el que dicho peso molecular es entre 5.000-15.000 g/mol.
3. El conjugado según la reivindicación 2 en el que dicho peso molecular es 8.000 g/mol.
4. El conjugado según la reivindicación 1 en el que dicho peso molecular es entre 40.000-60.000 g/mol.
5. El conjugado según la reivindicación 4 en el que dicho peso molecular es 51.000 g/mol.
6. El conjugado según cualquier reivindicación precedente en el que dicha colistina está en su forma de fármaco libre.
7. El conjugado según la reivindicación 6 en el que los conjugados dextrina a colistina contienen típicamente aproximadamente 3 enlaces amida por molécula de colistina.
8. El conjugado según las reivindicaciones 1-6 en el que la proporción molar de dextrina a colistina es entre 1:0,6 y 1:1,8.
9. El conjugado según cualquier reivindicación precedente en el que dicha dextrina se modifica por la adición de grupos cargados positivamente, grupos neutros o grupos cargados negativamente.
10. El conjugado según cualquier reivindicación precedente en el que dicha dextrina se modifica por 0,5-30% en moles de succinilación.
11. El conjugado según cualquier reivindicación precedente en el que dicha succinilación es 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1, 1,1, 2, 2,2, 2,5, 3, 3,4, 4, 4,7, 5, 6, 6,1, 7, 8, 8,3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,4, 18, 19, 20, 21,3, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28,6, 29 ó 30%.
12. Una composición o formulación farmacéutica que comprende el conjugado AMP polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
13. La composición o formulación farmacéutica según la reivindicación 12 en la que dicha composición se formula para uso médico o veterinario.
14. Un método para fabricar un conjugado péptido anti-microbiano (AMP) polímero que comprende:
 - a) disolver dextrina succinilada entre 1-30% en moles en un disolvente preparatorio;
 - b) disolver colistina en un disolvente preparatorio;
 - c) añadir los dos disolventes juntos y, opcionalmente, al mismo tiempo, o posteriormente, elevar el pH; permitiendo que la mezcla de reacción reaccione; y
 - d) separar el conjugado de la mezcla de reacción.
15. El método según la reivindicación 14 en el que dicho pH se eleva hasta 8 o aproximadamente.
16. El método según la reivindicación 14 ó 15 en el que la mezcla de reacción se deja durante hasta 2 h.
17. Un terapéutico de combinación que comprende el conjugado o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y al menos otro agente terapéutico diferente.

Figura 1

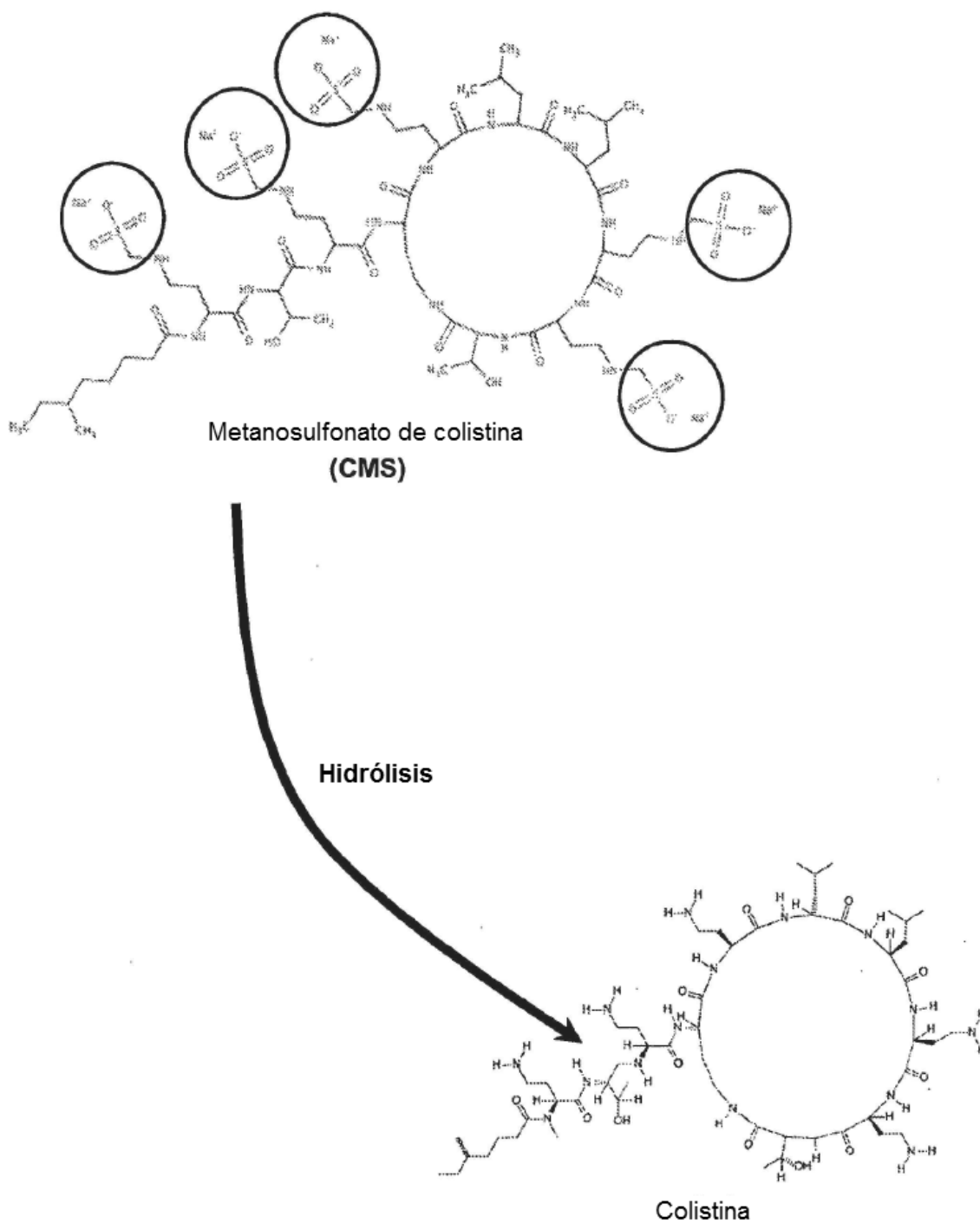


Figura 2

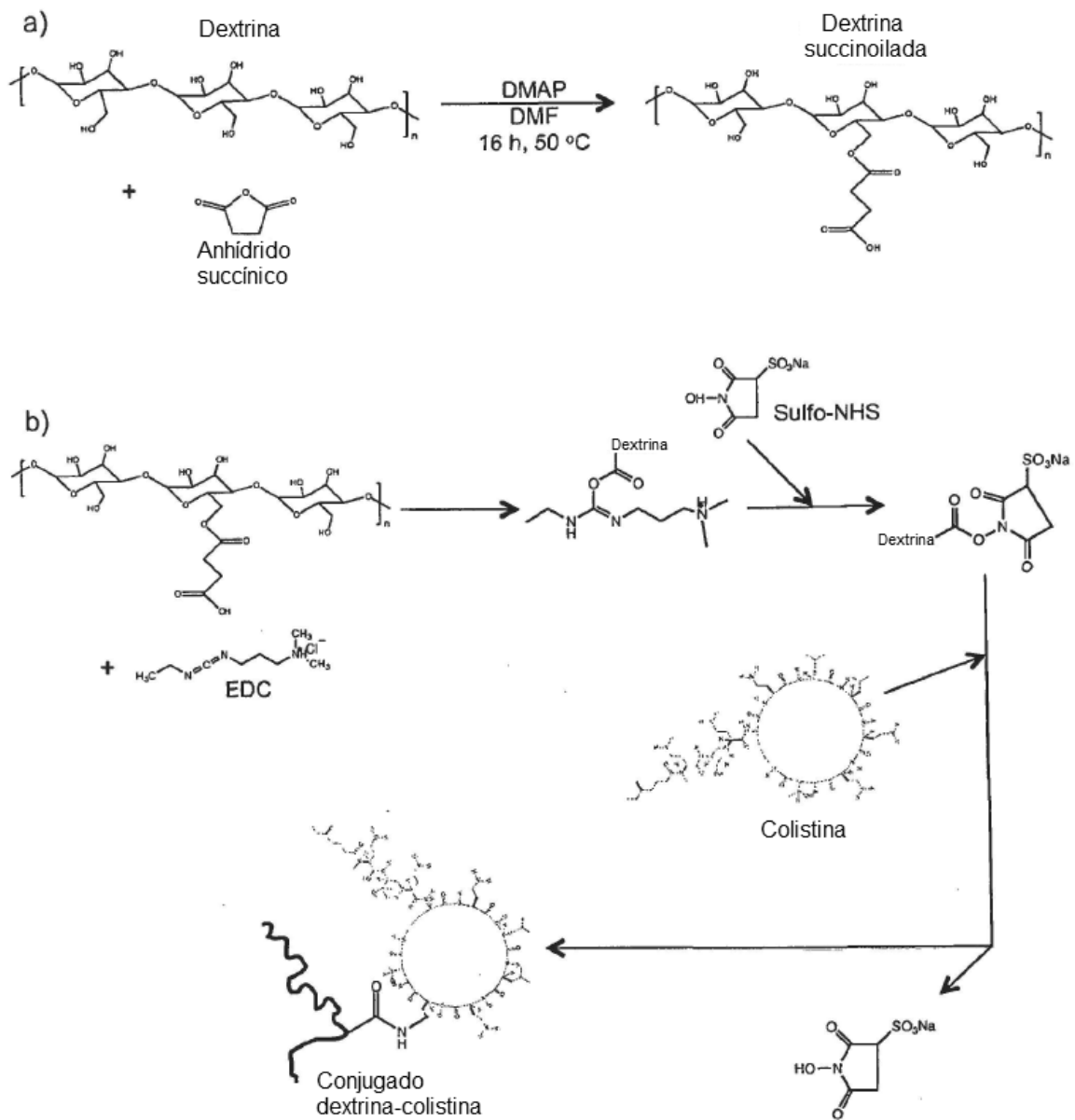


Figura 3

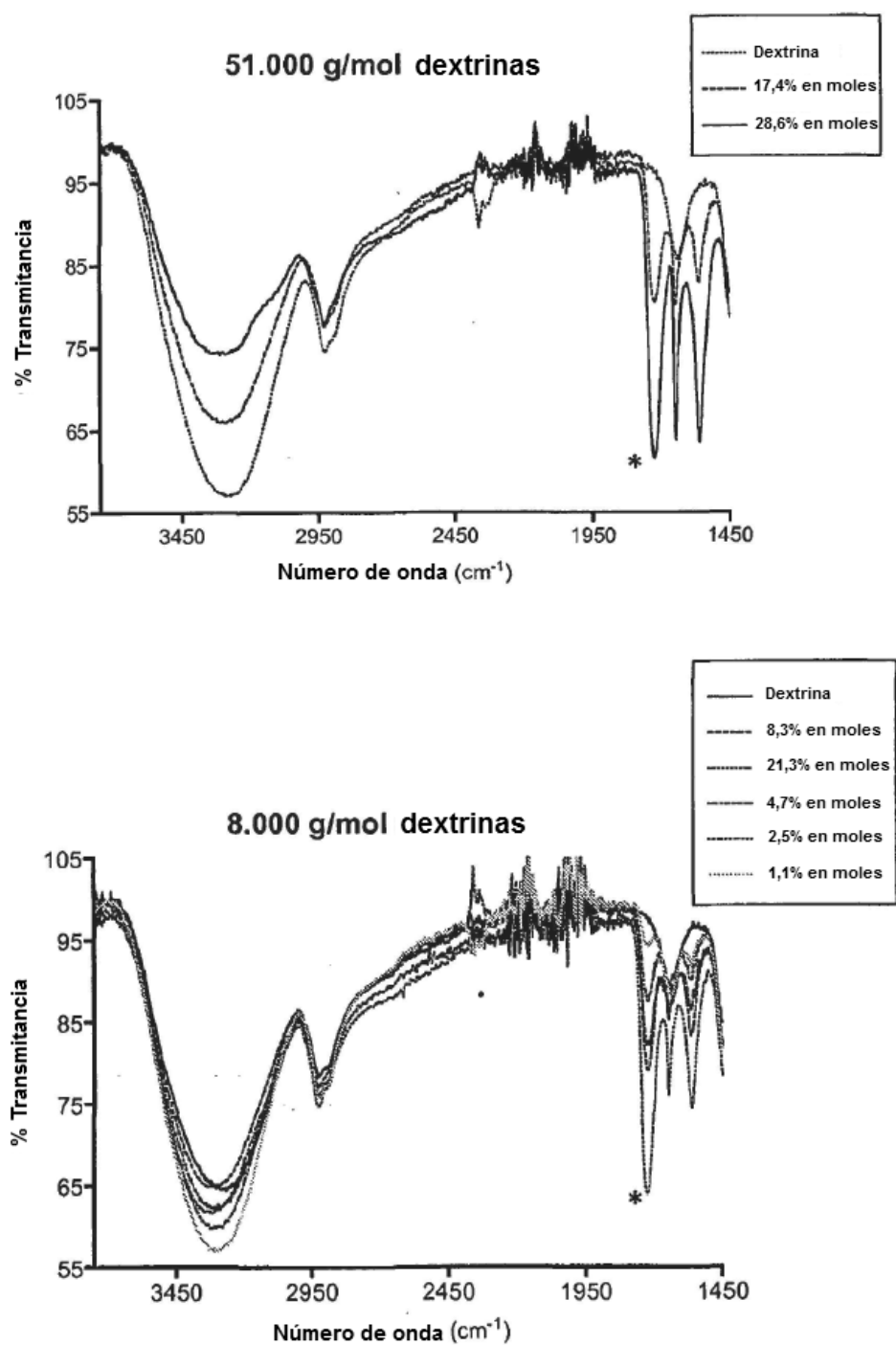


Figura 4

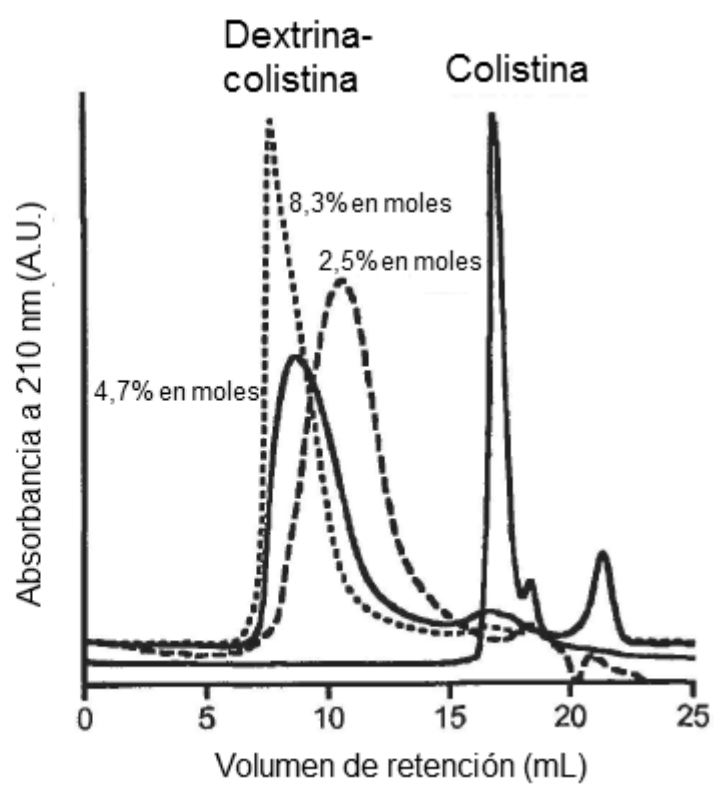


Figura 5

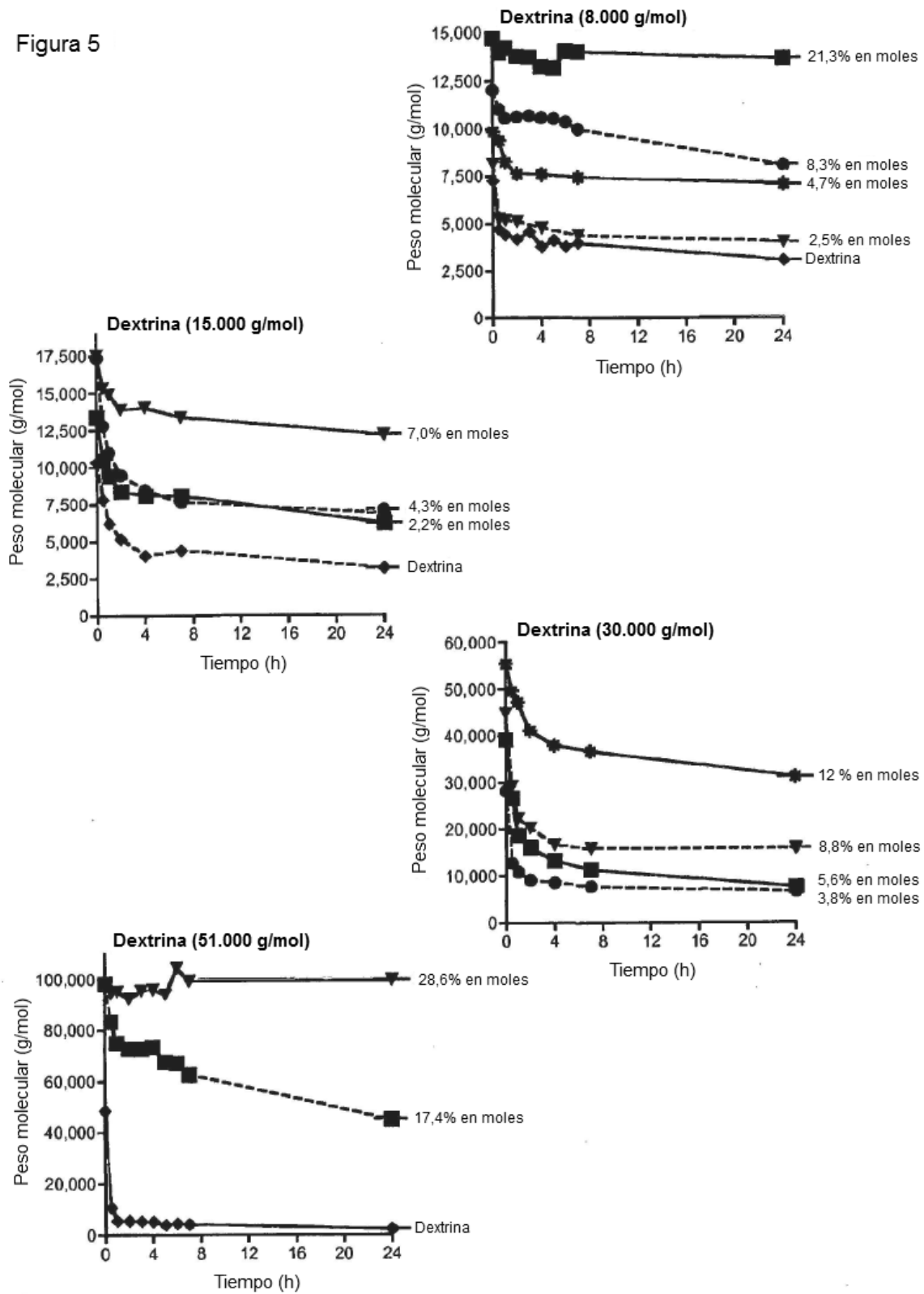


Figura 6A

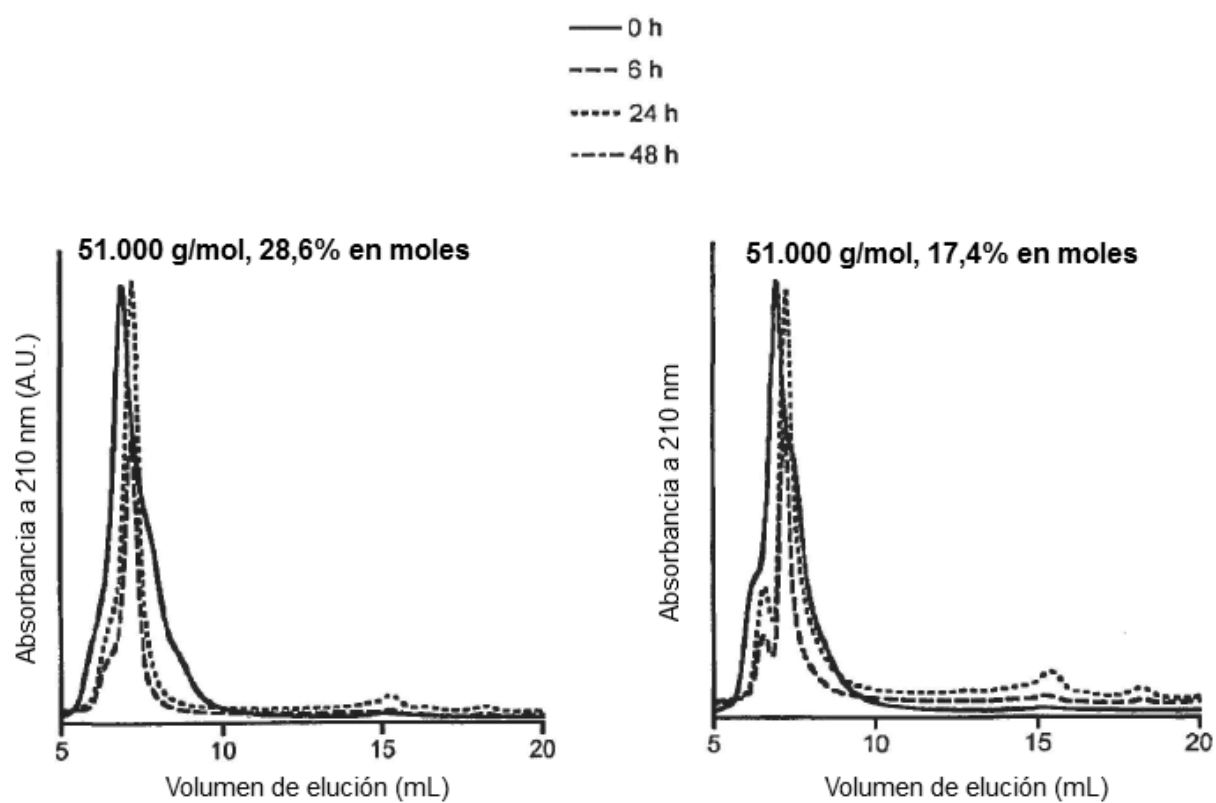


Figura 6B

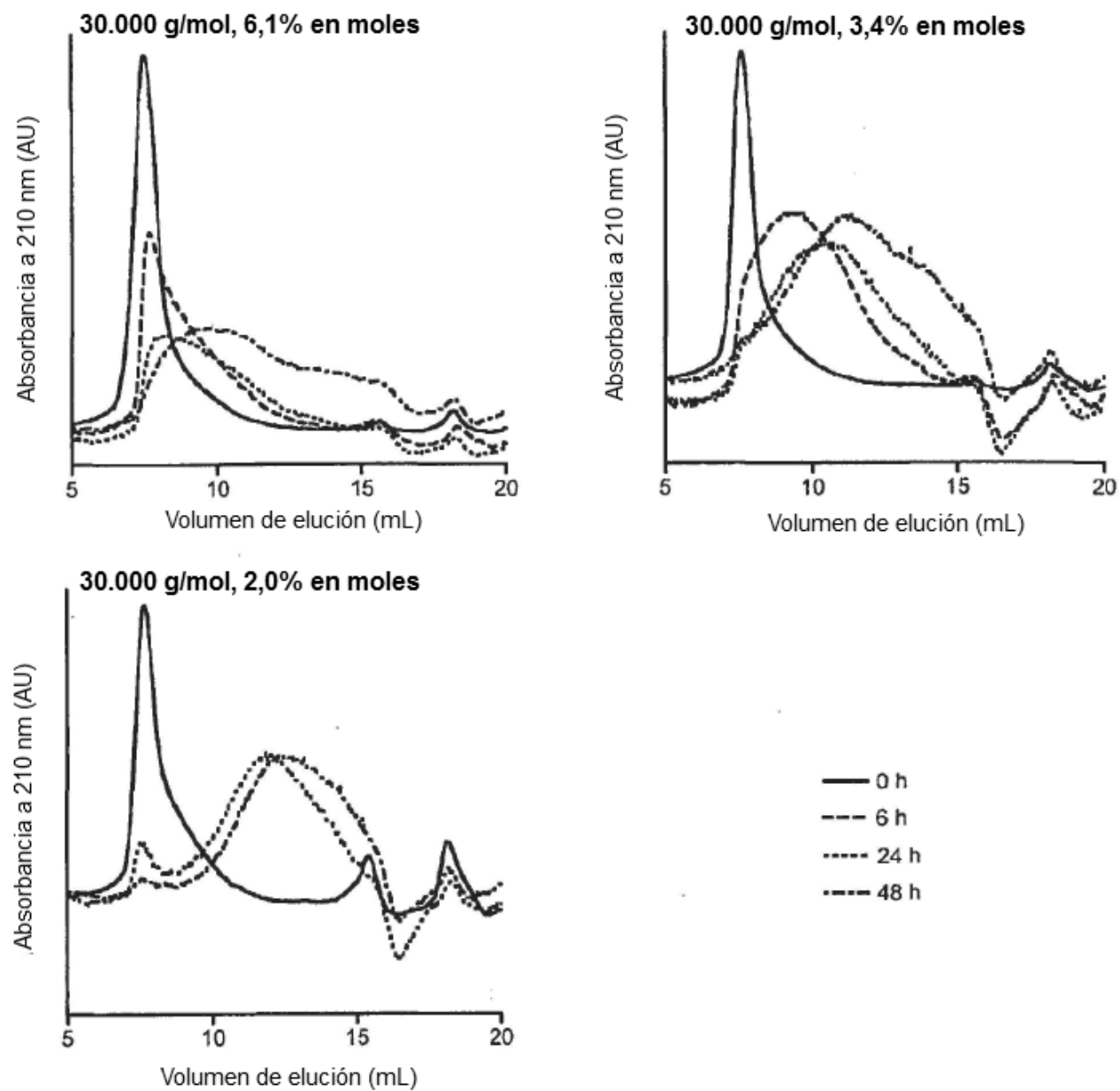


Figura 6C

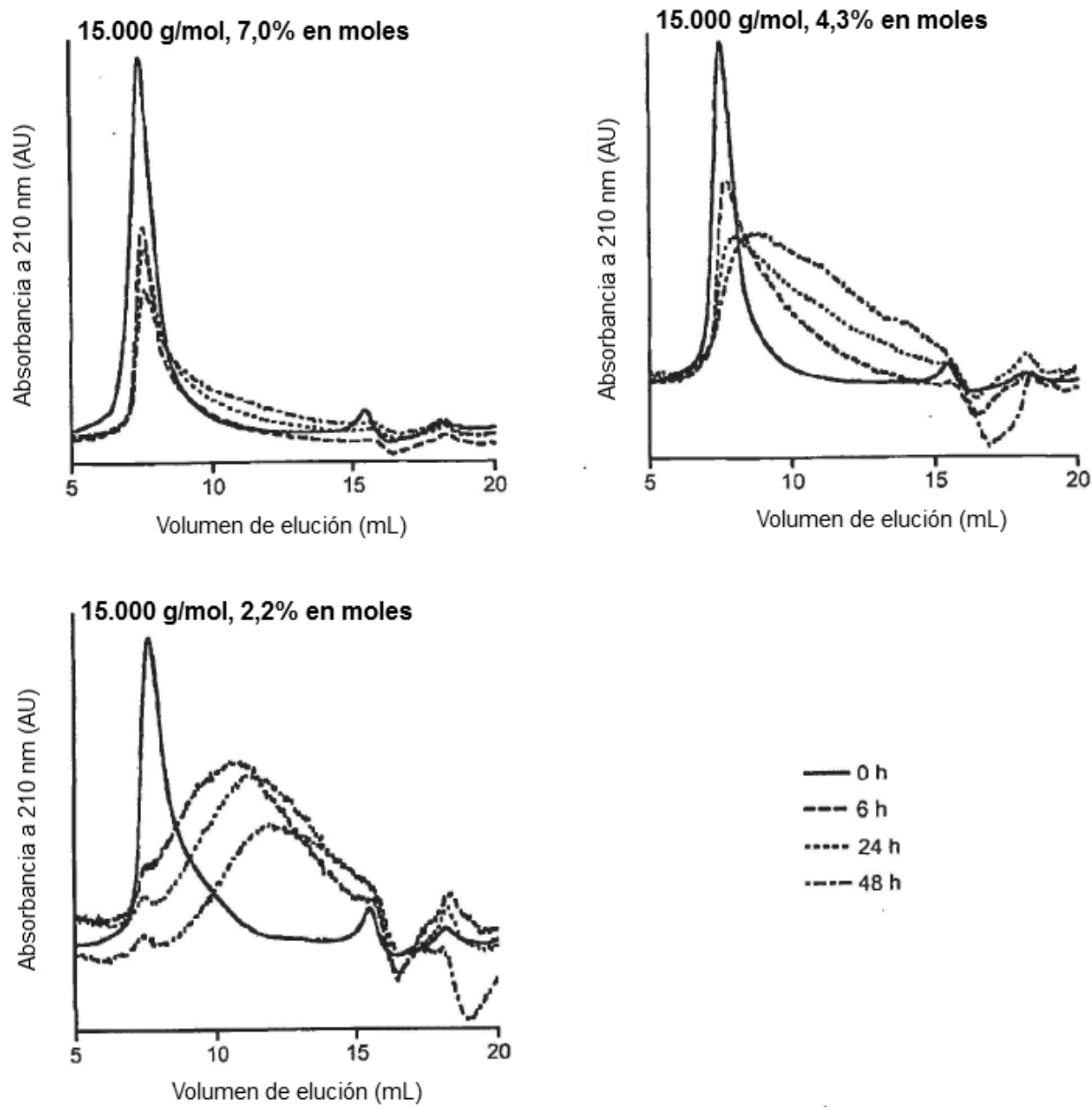


Figura 6D

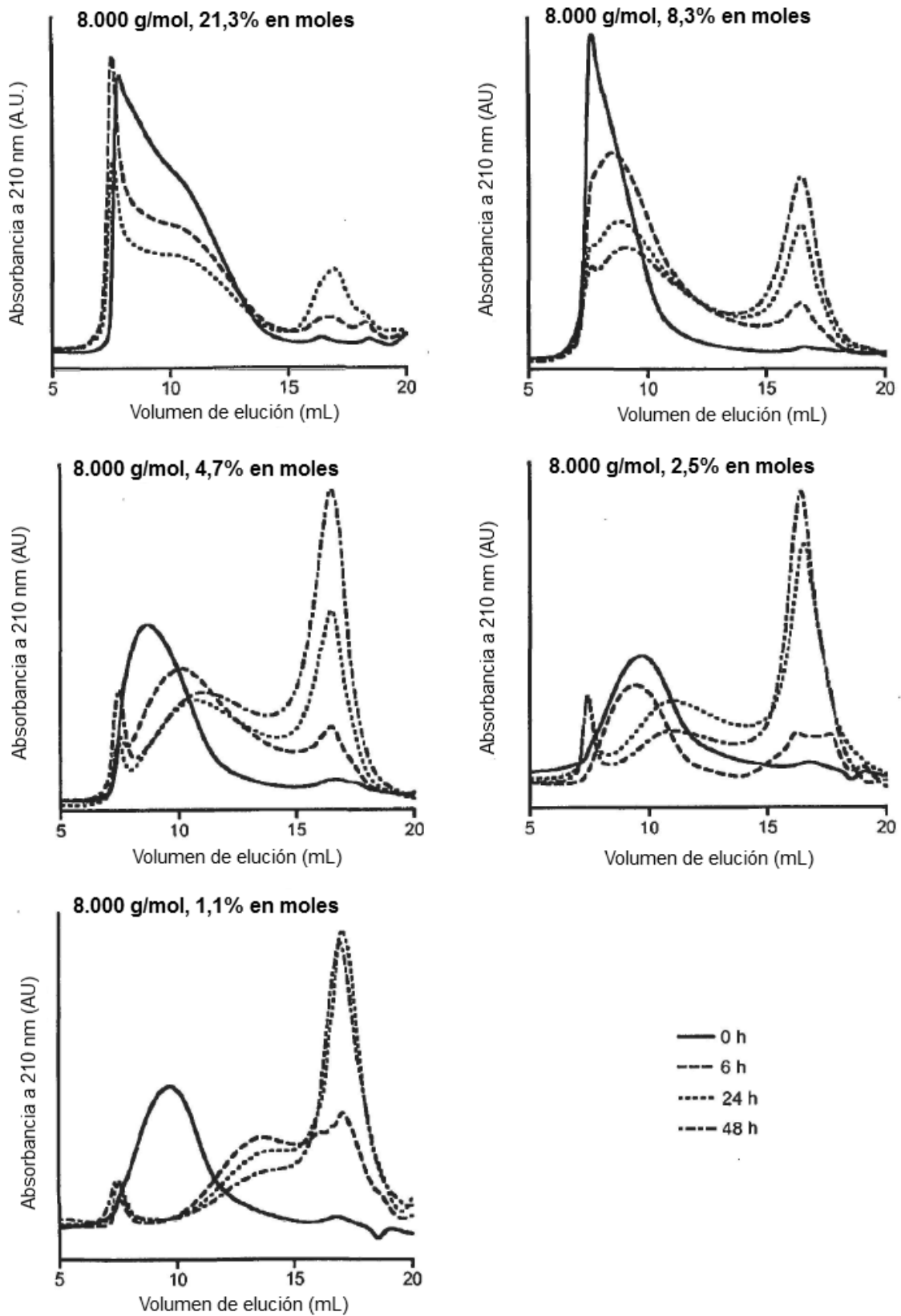


Figura 7

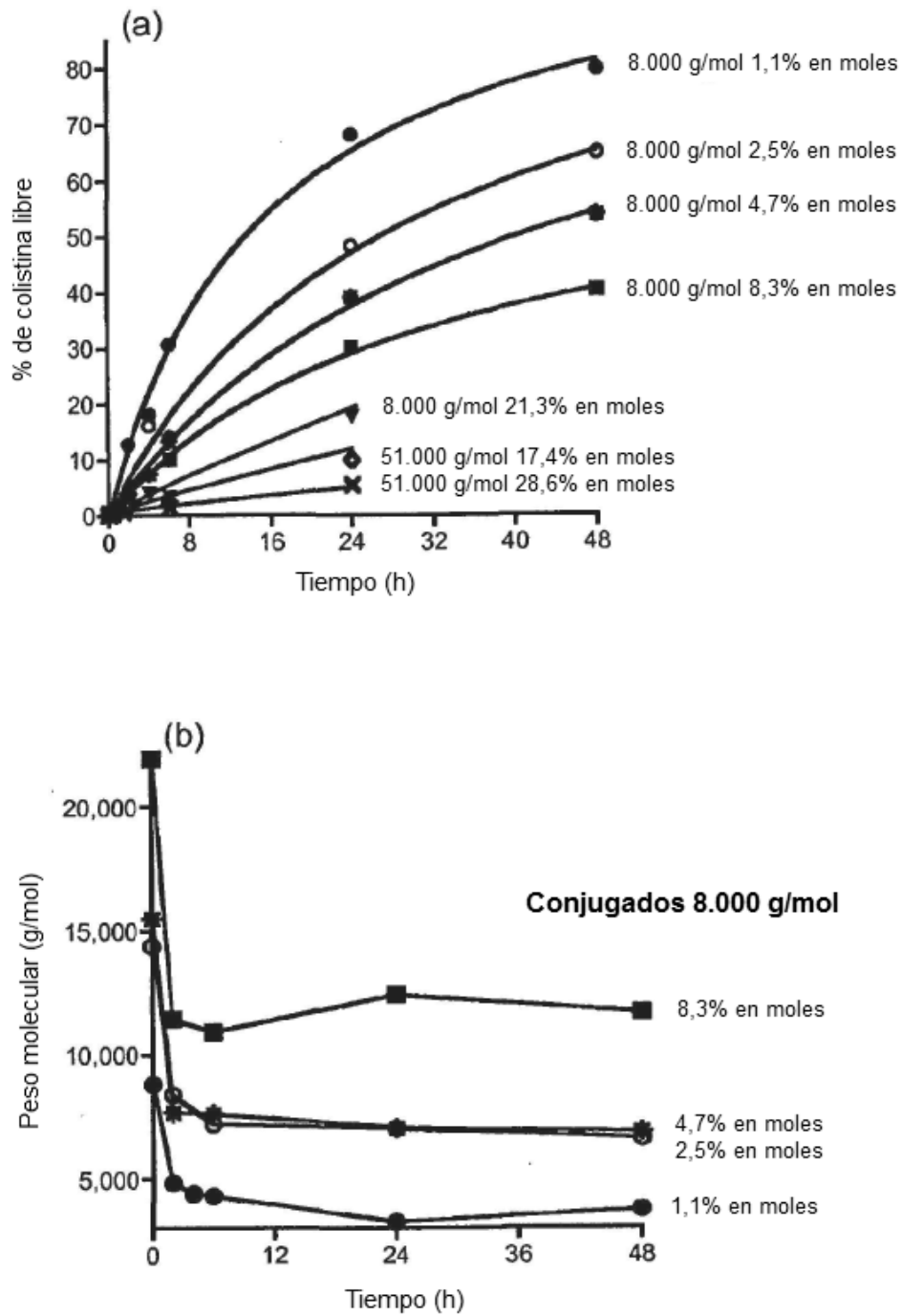


Figura 8

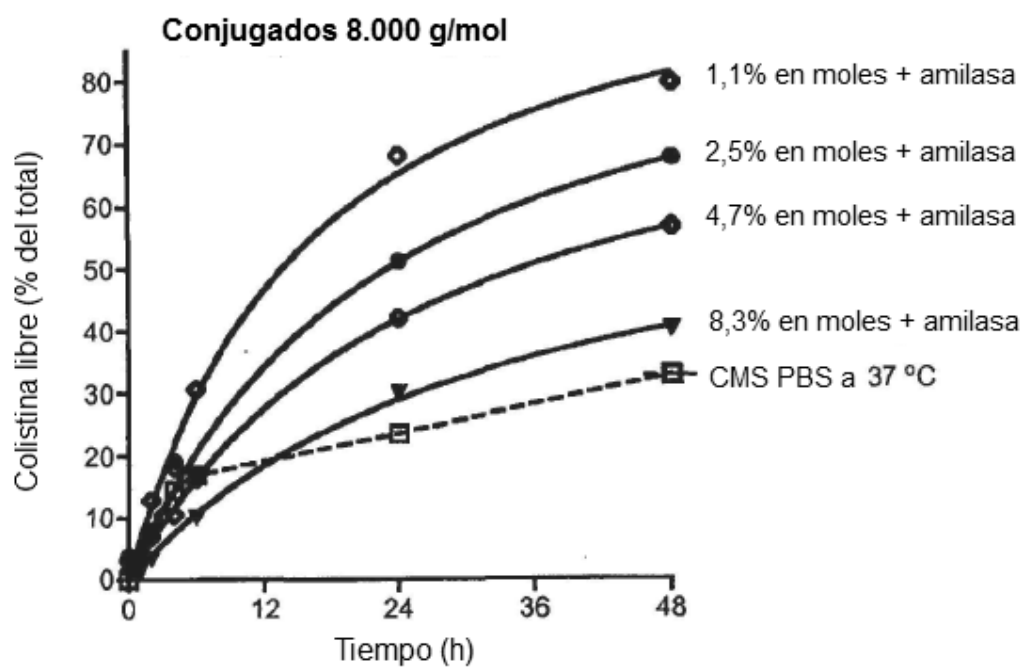


Figura 9

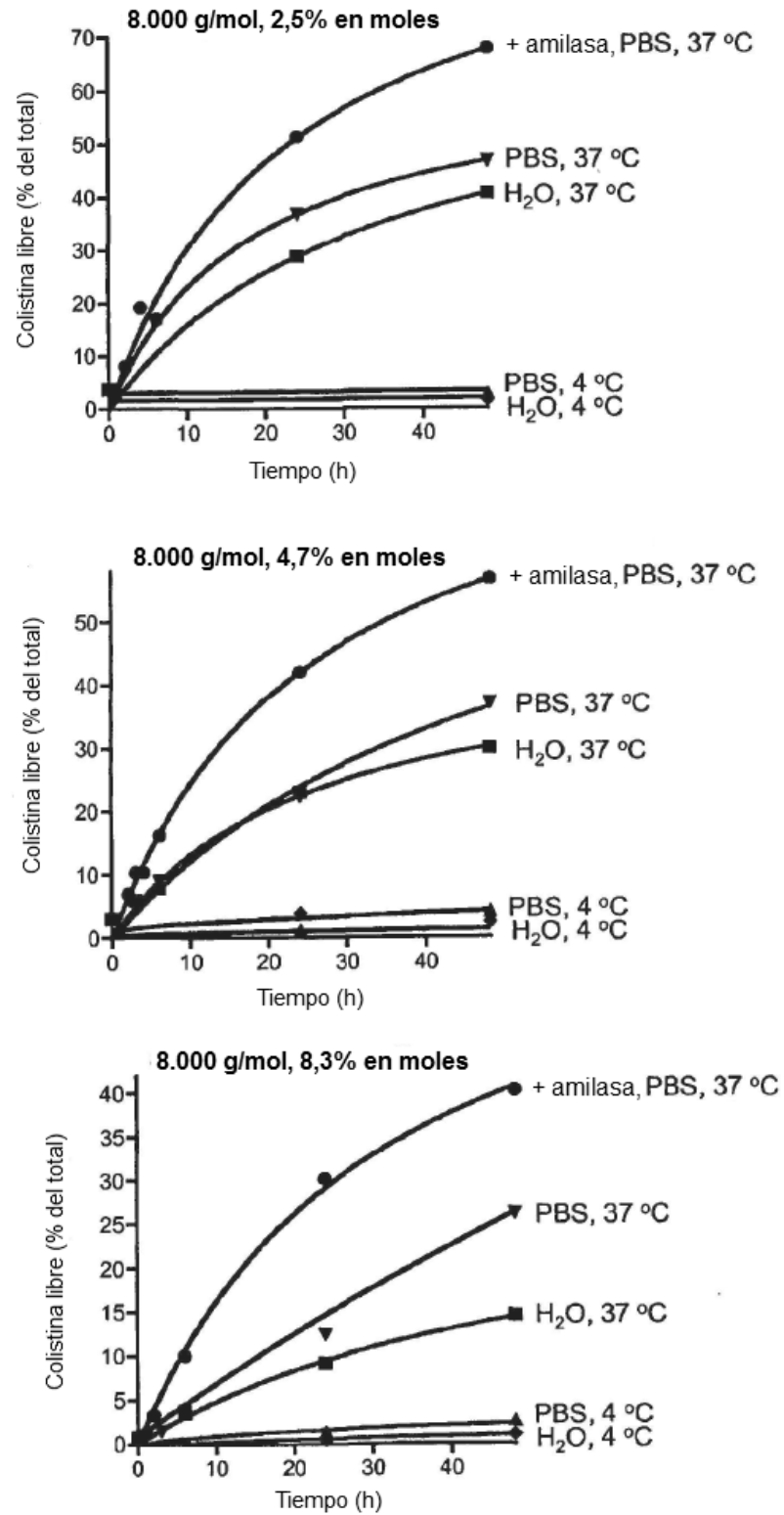


Figura 10

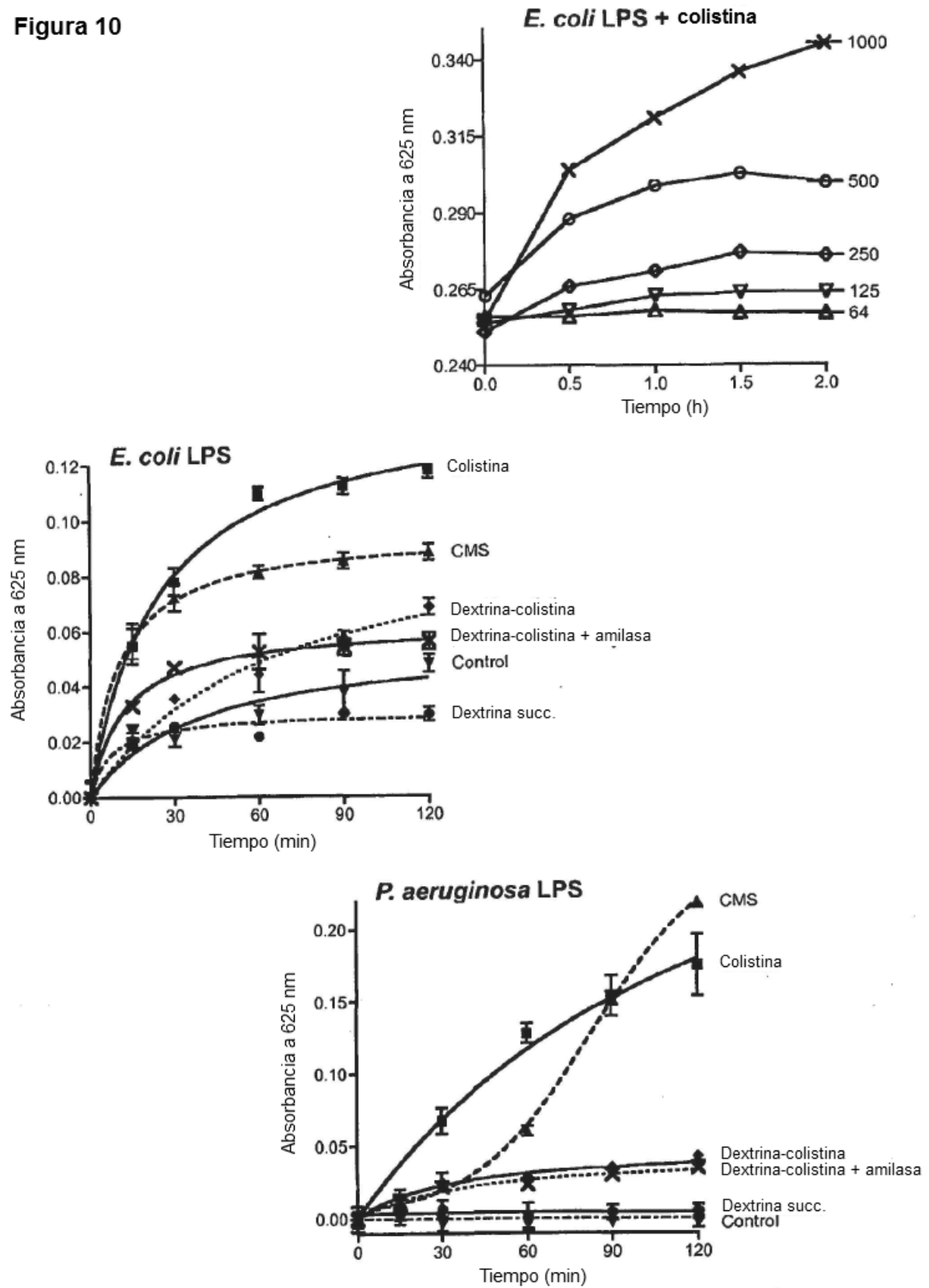


Figura 11

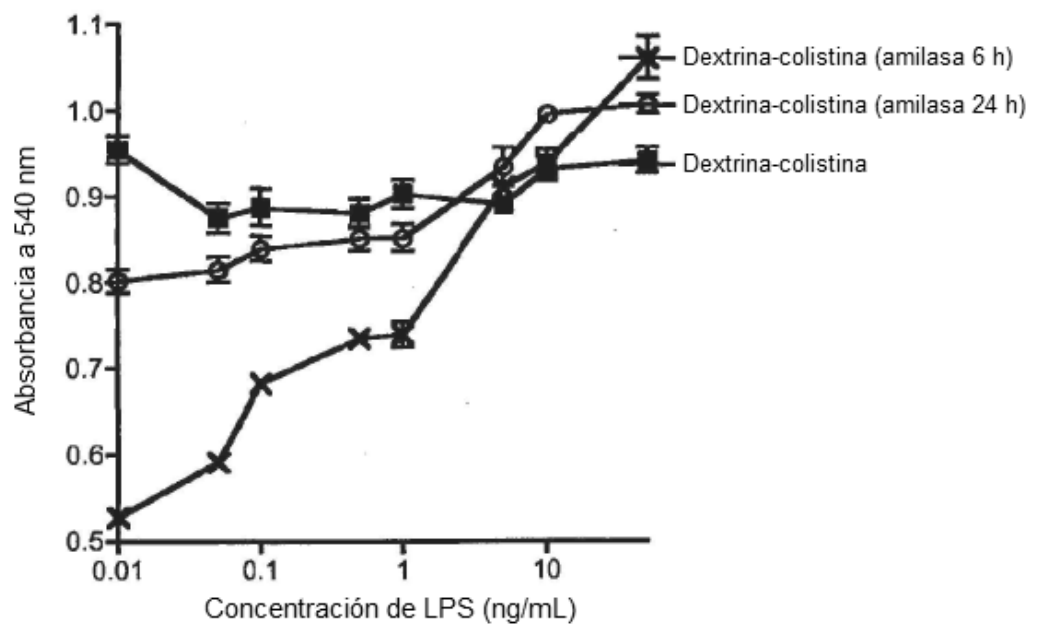
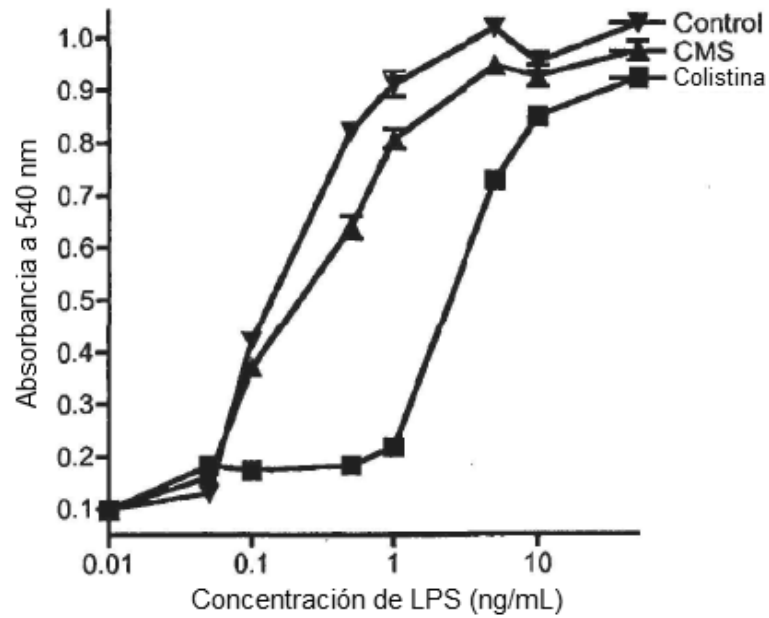
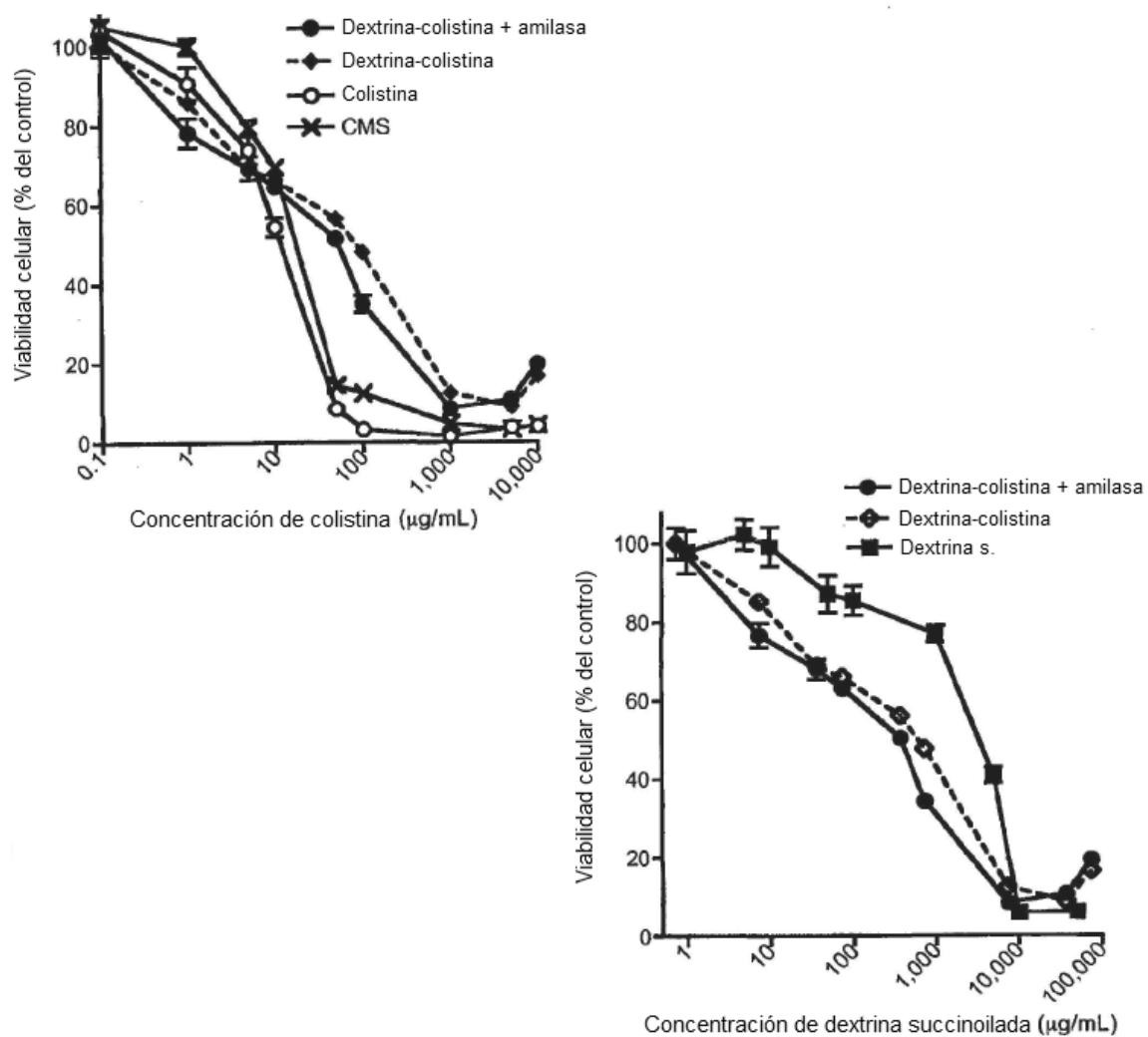


Figura 12



	CI ₅₀ (μg/mL eq. de colistina)	CI ₅₀ (μg/mL eq. de dextrina s.)
Colistina	20	-
CMS	25	-
Dextrina succinilada	-	4,200
Dextrina-colistina (1,1% en moles)	90	650
Dextrina-colistina+ amilasa	60	400

Figura 13

