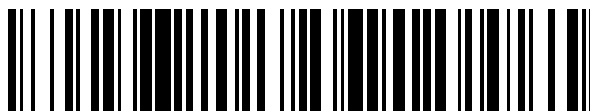


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 521**

51 Int. Cl.:

C07K 7/62 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 07803704 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2057185**

54 Título: **Derivados de polimixina y sus usos**

30 Prioridad:

11.08.2006 DK 200601055

11.08.2006 US 837426 P

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

29.06.2016

73 Titular/es:

NORTHERN ANTIBIOTICS OY (100.0%)

Tekniikantie 14 (INNOPOLI 2)

02150 ESPOO, FI

72 Inventor/es:

VAARA, MARTTI y

VAARA, TIMO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 575 521 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

Derivados de polimixina y sus usos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a derivados de polimixina y a dichos derivados de polimixina para uso en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram-negativas. Los derivados de polimixina pueden tener efectos antibacterianos o pueden sensibilizar bacterias para mejorar los efectos de otros agentes antibacterianos.

Antecedentes

10 La septicemia mata a más de 215.000 estadounidenses cada año. Se estima que 750.000 estadounidenses se infectan dos con septicemia grave y el 29% de ellos muere cada año por esta enfermedad. Las muertes por septicemia constituyen el 9% de todos los casos de muertes en EE.UU. La septicemia mata tantos estadounidenses como los infartos de miocardio, e incluso más que los accidentes de tráfico.

De dos a tres millones de estadounidenses adquieren una infección hospitalaria cada año y el 10% de estas infecciones evolucionan a septicemia. Más de 90.000 de estos pacientes mueren a causa de septicemia infectados en hospitales.

15 La septicemia grave y el choque séptico (septicemia grave combinada con presión arterial baja) se llevan hasta 135.000 vidas cada año en las unidades de cuidados intensivos (UCI) de la Unión Europea de acuerdo con el *OECD Health Report of 2000* (Informe sobre la salud de la OCDE el año 2000). En Gran Bretaña, 5.000 de cada 100.000 pacientes que adquirieron una infección hospitalaria murieron de septicemia cada año en los hospitales de cuidados intensivos pertenecientes a la organización NHS.

20 La tasa de mortalidad ha aumentado año tras año debido al hecho de que ha aumentado el número de pacientes predispuestos a septicemia, tales como ancianos, neonatos prematuros y pacientes con cáncer, no sólo debido a que muchas enfermedades graves son más tratables que antes. También ha aumentado el uso de dispositivos médicos invasivos y procedimientos agresivos.

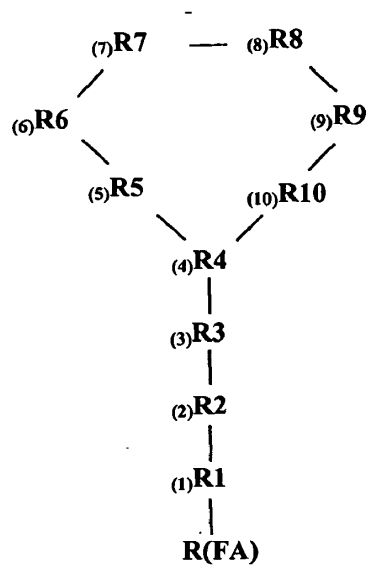
25 Las bacterias gram-negativas causan más de 40% de todas las infecciones septicémicas y muchas de las bacterias gram-negativas son extremadamente multirresistentes. Las bacterias gram-negativas proporcionan un reto más difícil en terapia que las gram-positivas, puesto que poseen una estructura única, la membrana externa, como su estructura más exterior. Las moléculas de lipopolisacáridos localizadas en la membrana externa inhiben la difusión de muchos agentes antibacterianos más profundamente en la célula, donde se encuentran sus dianas finales. Más del 95% de los nuevos agentes antibacterianos aislados de la naturaleza o sintetizados químicamente entre 1972 y 30 1991 carecían de actividad contra las bacterias gram-negativas (Vaara 1993).

Las polimixinas son un grupo de sustancias antibióticas estrechamente relacionadas, producidas por cepas de *Paenibacillus polymyxa* y organismos relacionados. Estos fármacos catiónicos son péptidos relativamente sencillos, con pesos moleculares de aproximadamente 1000. Las polimixinas, tal como la polimixina B, son antibióticos decapeptídicos, es decir, están constituidos de diez (10) residuos de aminoácido. Son bactericidas y especialmente eficaces contra las bacterias gram-negativas, tales como *Escherichia coli* y otras especies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter baumannii*, y otras. Sin embargo, las polimixinas tienen efectos adversos graves, incluyendo nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Por tanto, estos fármacos tienen un uso limitado como agentes terapéuticos debido a su alta toxicidad sistémica.

40 Las polimixinas se han utilizado en la terapia de infecciones graves causadas por dichas bacterias, pero debido a la toxicidad, su uso fue abandonado en gran medida en los años 70, cuando se desarrollaron nuevos antibióticos, mejor tolerados. La reciente aparición de cepas multirresistentes de bacterias gram-negativas ha hecho necesario el uso terapéutico de polimixinas como último recurso, a pesar de su toxicidad, y como muchos de los antibióticos menos tóxicos han perdido ya su eficacia contra cepas particulares de dichas bacterias de nuevo ha aumentado el uso de polimixinas.

45 En consecuencia, las polimixinas ahora han sido retiradas del arsenal terapéutico, aunque, debido a su toxicidad, en una escala muy limitada. Su uso sistémico (es decir, no tópico) está, sin embargo, en gran parte restringido a la terapia de infecciones con riesgo para la vida causadas por cepas multirresistentes de *Ps. aeruginosa* y *A. baumannii*, así como por bacterias entéricas resistentes a los carbapenemas.

50 Las polimixinas consisten en una parte heptapeptídica cíclica y una parte lineal que consiste en una porción tripeptídica y una cola de ácido graso hidrófoba unida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal del tripéptido y pueden ser representadas por la fórmula general:



5 en donde R1-R3 representan la porción de la cadena lateral tripeptídica; R4-R10 la porción de anillo heptapeptídico y R (FA) representa la cola de ácido graso hidrófoba unida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal del tripéptido.

10 El grupo de las polimixinas incluye las siguientes polimixinas: A1, A2, B1-B6, C, D1, D2, E1, E2, F, K1, K2, M, P1, P2, S y T (Storm *et al.* 1977; Srinivasa and Ramachandran, 1979). Todas las polimixinas son policatiónicas y poseen cinco (5) cargas positivas, con la excepción de las polimixinas D, F y S que poseen cuatro (4) cargas positivas. Debe advertirse que las polimixinas modificadas que carecen de la parte de ácido graso R(FA), pero llevan R1-R10 tienen una carga positiva adicional en comparación con las polimixinas naturales de las que proceden, debido al grupo α -amino libre en el extremo N del derivado. De acuerdo con ello, por ejemplo, dicho derivado de polimixina B o polimixina E lleva en total seis (6) cargas positivas.

Las polimixina B y polimixina E utilizadas clínicamente difieren entre sí sólo en el residuo R6, que es un residuo de D-fenilalanilo en la polimixina B y un residuo de D-leucilo en la polimixina E.

15 También se clasifican como polimixinas las circulinas A y B (Storm *et al.* 1977). Se diferencian de otras polimixinas sólo en que llevan el residuo isoleucilo en la posición R7, mientras que otras polimixinas tienen ya sea un residuo de treonilo o de leucilo en dicha posición. Para una visión general de las estructuras de algunos polimixinas, véase la Tabla 1.

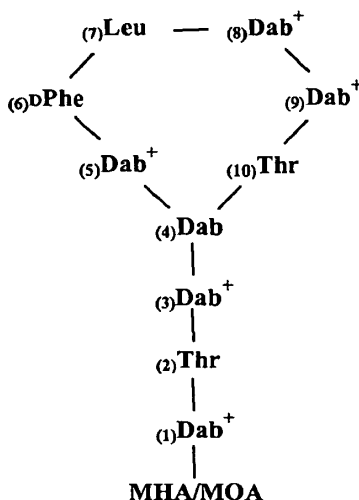
Tabla 1

Estructura de polimixinas y octapeptinas seleccionadas, así como de sus derivados seleccionados

Compuesto	R(FA)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Polimixina B	MO(H)A-	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Colistina (polimixina E)	MO(H)A-	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Sulfometato de colistina	MO(H)A-	sm-Dab-	Thr-	sm-Ab-	*Dab-	sm-Dab-	D Leu-	Leu-	sm-Dab-	sm-Dab-	*Thr
Polimixina A	MO(H)A-	Dab-	Thr-	D Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Thr-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina M	MOA	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Thr-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina D	MO(H)A-	Dab-	Thr-	D-Ser-	*Dab-	Dab-	D Leu	Thr-	Dab	Dab	*Thr
Circulina A	MOA	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu	Ile-	Dab	Dab	*Thr
Octapeptina A	OHMDA	-	-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu	Leu-	Dab	Dab	*Leu
Desacilcolistina (DAC)		Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina E nonapéptido (PMEN)			Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Desacilpolimixina B (DAPB)		Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina B nonapéptido (PMBN)			Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina B octapéptido (PMBO)				Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina B heptapéptido (PMHP)					*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr

La polimixina B está representada por la siguiente fórmula:

5



La polimixina B comercialmente disponible es una mezcla, en la que R-FA es predominantemente 6-metiloctanoilo (6-MOA, en la polimixina B1), pero también puede ser un acilo graso relacionado, tal como 6-metilheptanoilo (6-MHA, en la polimixina B2), octanoilo (en la polimixina B3) o heptanoilo (polimixina B4) (Sakura *et al.* 2004). Todas estas variantes son igualmente potentes contra bacterias gram-negativas, tales como *E. coli* (Sakura *et al.* 2004).

10

Bastante análogamente en la polimixina E1 (colistina A) y en la circlulina A, el grupo R-FA es 6-MOA y en la polimixina E2 (colistina B) y en la circlulina B el grupo R-FA es 6-MHA. Numerosos investigadores han unido varios restos hidrófobos que incluyen diversos residuos de acilo graso al extremo N de derivados y análogos de polimixina y han demostrado que los derivados resultantes tienen potente actividad antibacteriana (Chihara *et al.* 1973, Sakura *et al.* 2004 y en la publicación de patente de EE.UU. 2006004185). Incluso el derivado que lleva el residuo 9-fluorenilmetoxicarbonilo voluminoso e hidrófobo como el R-FA es casi tan potente como la polimixina B en la inhibición del crecimiento de *E. coli* y otras bacterias gram-negativas (Tsubery *et al.* 2001).

Para la actividad biológica es esencial la estructura del anillo heptapeptídico (Storm *et al.* 1997). Un derivado con un anillo octapeptídico es significativamente menos activo como antibiótico.

Se han preparado múltiples modificaciones de las polimixinas y múltiples moléculas sintéticas similares a polimixinas, y con ciertos límites han conservado su actividad biológica. Las modificaciones comprenden, aunque sin limitación, las de la cadena lateral, así como moléculas en las que un residuo de aminoácido hidrófobo inherente (tal como DPhe o Leu) ha sido reemplazado por otro residuo de aminoácido hidrófobo o en las que el Dab catiónico ha sido reemplazado por otro residuo de aminoácido catiónico, tal como Lys, Arg o un residuo de ornitina (Storm *et al.* 1997, Tsubery *et al.* 2000a, Tsubery *et al.* 2002, publicación de patente de EE.UU. 2004082505, Sakura *et al.* 2004, publicación de patente de EE.UU. 2006004185).

Otras modificaciones que den como resultado compuestos microbiológicamente al menos parcialmente activos comprenden, aunque sin limitación, ésteres de alcanilo, donde los grupos OH de los residuos de treonilo forman ésteres con alcanilos, tales como propionilo y butirilo (Patente de EE.UU. 3.450.687).

Las octapeptinas son por otra parte idénticas a las polimixinas, pero tienen un enlace covalente en lugar de los residuos R1-R2 (Tabla 1). En esta invención, las posiciones R están numeradas de acuerdo con las de las polimixinas naturales y por lo tanto el único residuo de aminoácido de la cadena lateral de octapeptinas se define como R3. En consecuencia, las octapeptinas son octapéptidos, mientras que todas las polimixinas naturales son decaapéptidos, y poseen sólo cuatro (4) cargas positivas. Los residuos R-FA entre varias octapeptinas (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1) incluyen los siguientes: ácido 3-OH-8-metildecanoico, ácido 3-OH-8-metilnonanoico y ácido β -OH-6-metiloctanoico. Los derivados que poseen un residuo de acilo graso con 6 a 18 átomos de carbono tienen una potente actividad antibacteriana contra *E. coli* (Storm *et al.* 1977).

La primera diana de las polimixinas en bacterias gram-negativas es su membrana externa (ME) que es una barrera de permeabilidad eficaz contra muchos agentes nocivos, incluyendo grandes (Peso molecular mayor de 700 daltons) antibióticos, así como antibióticos hidrófobos. Mediante la unión a moléculas de lipopolisacáridos (LPS) expuestas en la superficie exterior de la ME, las polimixinas dañan la estructura y función de la ME y, como resultado, permeabilizan (es decir, hacen permeable) la ME a la polimixina, así como a muchos otros agentes nocivos (Nikaido and Vaara 1985, 1992 Vaara, Nikaido 2003). Se cree que la diana final y letal (la diana bactericida) de las polimixinas es la membrana citoplasmática (la membrana interna) de las bacterias.

Se han hecho numerosos esfuerzos para reducir la toxicidad de las polimixinas. El tratamiento de polimixina E (colistina) con formaldehído y bisulfito de sodio produce sulfometato de colistina, en el que los grupos amino libres de los cinco residuos de ácido diaminobutírico han sido sustituidos parcialmente por grupos sulfometilo (Tabla 1). Las preparaciones consisten en mezclas indefinidas de los compuestos mono-, di-, tri-, tetra-, y penta-sustituidos. Las preparaciones sulfometiladas, cuando están recién disueltas en agua, carecen inicialmente tanto de la actividad antibacteriana como de toxicidad de la molécula precursora, pero cuando los compuestos comienzan a descomponerse en la solución, en sangre o en tejidos, para producir los derivados menos sustituidos y colistina libre, tanto la actividad antibacteriana como la toxicidad vuelven parcialmente a sus valores iniciales. Además, el grado de sulfometilación inicial varía aparentemente entre las preparaciones farmacéuticas comercialmente disponibles. Se han publicado muchas otras formas de bloquear todos los grupos amino libres. Los ejemplos comprenden, aunque sin limitación, la formación de bases de Schiff inestables con aminoácidos (Storm *et al.* 1977).

En 1973 se demostró que la polimixina E nonapéptido (PMEN, colistina nonapéptido, Tabla 1), obtenida tratando enzimáticamente polimixina E y que carece de R-FA y R1, que era menos tóxica que el compuesto precursor en el ensayo de toxicidad aguda (muerte inmediata debida presumiblemente a bloqueo neuromuscular directo) en ratones (Chihara *et al.* 1973). Sin embargo, también carecía de la actividad antibacteriana, medida como su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano (Chihara *et al.* 1973).

Vaara and Vaara, por otra parte, mostraron, que la polimixina B nonapéptido (PMBN, Tabla 1) conserva la capacidad de permeabilizar la ME de las bacterias gram-negativas (Vaara and Vaara 1983a,b,c; patente de EE.UU. 4.510.132; Vaara 1992). En consecuencia, a pesar de que carece de actividad antibacteriana directa (es decir, la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano), es capaz de sensibilizar (es decir, hacer sensible o, como también se denomina, hacer susceptible) las bacterias a muchos agentes antibacterianos, tales como antibióticos hidrófobos, así como antibióticos grandes y otros agentes nocivos.

La PMBN también sensibiliza las bacterias a la actividad bactericida del sistema complemento humano, presentes en el suero humano reciente como un sistema de primera línea de defensa contra los invasores (Vaara and Vaara 1983a, Vaara *et al.* 1984, Vaara 1992). Además, sensibiliza las bacterias a la actividad bactericida conjunta del complemento del suero y las leucocitos polimorfonucleares humanos (Rose *et al.* 1999).

- 5 La PMBN se asemeja a la PMEN en que es menos tóxica en el ensayo de toxicidad aguda en ratones, que las polimixinas no modificadas. En otros ensayos toxicológicos, varios criterios demostraron que la PMBN era menos tóxica que su compuesto precursor, pero este derivado de polimixina todavía se consideró demasiado nefrotóxico para uso clínico (Vaara 1992).

- 10 La PMBN lleva cinco (5) cargas positivas. Estudios posteriores revelaron, como era de esperar, que la PMEN, que también lleva cinco (5) cargas positivas, así como la desacilpolimixina B y la desacilpolimixina E, que llevan ambas seis (6) cargas positivas son potentes agentes para sensibilizar las bacterias a otros antibióticos (Viljanen *et al.* 1991, Vaara 1992). Además, se ha demostrado que un derivado estructuralmente más reducido, la polimixina B octapéptido (PMBO) conserva una actividad permeabilizante muy eficaz mientras que la polimixina B heptapéptido (PMBH) es menos activa (Kimura *et al.* 1992). Las PMBN, PMEN y PMBO tienen cinco (5) cargas positivas, mientras que la PMBH tiene sólo cuatro (4) cargas positivas. Esta diferencia puede explicar la actividad más débil de la PMBH.

- 15 El grupo de Ofek, Tsubery y Friedkin describió recientemente péptidos similares a polimixinas que estaban unidos a péptidos quimiotácticos, tal como fMLF, que atraen leucocitos polimorfonucleares (publicación de patente de EE.UU. 2004082505, Tsubery *et al.* 2005). Estos autores describen los péptidos fMLF-PMBN, MLF-PMBN, fMLF-PMEN, fMLF-PMBO y MLF-PMBO, todos con cuatro (4) cargas positivas, que sensibilizan las bacterias gram-negativas a antibióticos, aun cuando no se publicaron estudios comparativos con concentraciones crecientes de los compuestos (Tsubery *et al.* 2005).

Con el fin de estudiar las estructuras y propiedades funcionales de las polimixinas, se han publicado unos cuantos trabajos, entre otros compuestos, derivados de la polimixina que tienen menos de cuatro (4) cargas positivas.

- 25 Teuber (1970) ha descrito el tratamiento de polimixina B con anhídrido acético que produce una preparación que contiene la polimixina B, así como sus formas mono-, di-, tri-, tetra-, y penta-N-acetiladas. Teuber también separó cada grupo e informó no cuantitativamente usando un ensayo de difusión en agar-agar de que las formas penta-acetilada y tetra-acetilada carecían de la capacidad para detener el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, mientras que las formas di- y monoacetiladas tenían dicha capacidad. La forma triacetilada tenía cierta capacidad.

- 30 Srinivasa and Ramachandran (1978) aislaron derivados de la polimixina B parcialmente formilados y mostraron que un derivado de diformilo, así como un derivado de triformilo inhibían el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Dichos autores no describieron la capacidad de los compuestos para sensibilizar las bacterias a antibióticos. Además, en 1980 demostraron que los grupos amino libres de triformilpolimixina B en los residuos R1 y R3, así como los grupos amino libres de diformilpolimixina B en los residuos R1, R3 y R5 son esenciales, mientras que los grupos amino libres en R8 y R9 no son esenciales para la inhibición del crecimiento (Srinivasa and Ramachandran, 1980a).

- 35 Sakura *et al.* (2004) han descrito un derivado de polimixina B acortado, la octanoil-polimixina B heptapéptido. La unión del residuo de octanoilo al extremo N del residuo R4 de la polimixina B heptapéptido da como resultado un compuesto que tiene sólo tres (3) cargas positivas. Sakura *et al.* encontraron que la octanoil-polimixina B heptapéptido inhibe el crecimiento de bacterias solamente en una concentración muy alta (128 µg/mL), mientras que los otros derivados, tales como la octanoil-polimixina B octapéptido y octanoil-polimixina B nonapéptido, que tienen ambos cuatro cargas (4) eran agentes muy potentes para inhibir el crecimiento bacteriano.

- 40 La publicación de patente de EE.UU. 2006004185 describió recientemente ciertos derivados y compuestos intermedios de polimixina que se pueden utilizar para sintetizar nuevos antibióticos peptídicos. Los compuestos antibacterianos descritos poseían cuatro (4) o cinco (5) cargas positivas.

Weinstein J. *et al.*, "Selective chemical modifications of Polymyxin B" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, 8 (23), 3391-3369, describen derivados de polimixina que tienen cuatro cargas (4) positivas o más. Se encontró que un compuesto que poseía seis (6) cargas positivas tenía el mejor perfil de toxicidad-actividad.

- 45 Clausella A. *et al.*, "Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes", *Talanta*, 2003, 60 (2-3), 225-234, describen compuestos que tienen un número total de cargas positivas de cinco (5) o ninguna.

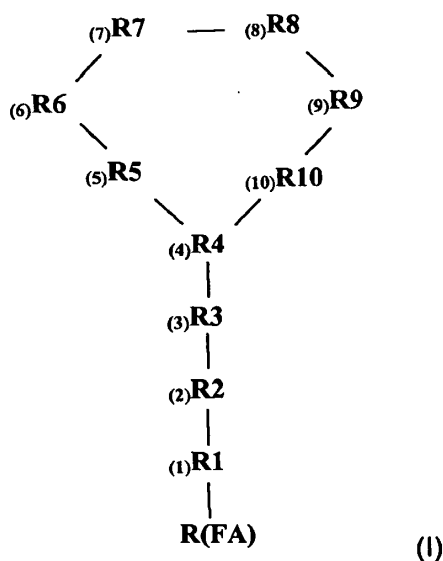
Tsubery H. *et al.*, "N-terminal modifications of Polymyxin B nonapeptides and their effect on antibacterial activity", *Peptides*, 2001, 22, 1675-1681, describen modificaciones de polimixina B y el efecto de estos nuevos análogos. La cantidad total de cargas positivas en estos derivados es cuatro (4) o cinco (5).

Vaara M. et al., "Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1996, 40 (8), 1801-1805, describen péptidos catiónicos totalmente sintéticos que contenían 4 a 7 cargas positivas.

5 Todavía hay una urgente necesidad de tratamientos eficaces para las infecciones bacterianas, en particular para las infecciones causadas por bacterias gram-negativas multirresistentes.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un derivado de polimixina de la fórmula general (I),



10

en donde R1 está ausente o es Abu;

R2 se selecciona del grupo que consiste en Ser, Thr, DThr y DAla; y

R3 se selecciona del grupo que consiste en Thr, DThr, Ser, DSer, DAla, Dab y Abu;

R4 es Dab;

15

R6 es DPhe o DLeu;

R7 es Leu, Thr o Ile;

R5, R8 y R9 son cada uno Dab o Abu;

R10 es Leu o Thr; y

R(FA) se selecciona del grupo que consiste en residuos de octanoilo, decanoilo y 6-metilheptanoilo;

20

en donde dichos residuos de aminoácidos se seleccionan de manera que el número total de cargas positivas a pH fisiológico sea al menos dos, pero no más que tres, y el número total de cargas positivas en la porción de la cadena lateral, R(FA)-R1-R2-R3, no exceda de dos, con lo cual dicho derivado de polimixina todavía posee actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas, y/o posee la capacidad de sensibilizar bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos;

25

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho derivado.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un derivado, en donde R1-R10 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-20 y 22.

30

La invención se refiere también a un producto de combinación que comprende dos o más de los derivados de fórmula (I), y a una composición farmacéutica que comprende dicho(s) derivado(s) o una de sus combinaciones y vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Además, la presente invención se refiere al uso de un derivado de polimixina de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para tratar, aliviar o mejorar una infección en un individuo causada por una bacteria gram-negativa, en donde dicha bacteria se puede seleccionar del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

- 5 La presente invención se refiere a también al uso de un derivado de polimixina de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para sensibilizar bacterias gram-negativas a un agente antibacteriano, en donde dicho agente antibacteriano se puede seleccionar del grupo que consiste de claritromicina, azitromicina, eritromicina y otros macrólidos, cetólidos, clindamicina y otras lincosaminas, estreptograminas, rifampina, rifabutina, rifalazil y otras rifamicinas, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, vancomicina, dalbavancina, telavancina, oritavancina y otros antibióticos glicopeptídicos, fluoroquinolonas, bacitracina, derivados de tetraciclinas, antibióticos de beta-lactama, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folato, inhibidores de desformilasa e inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano.

- 10 Además, la invención se refiere al uso de un derivado de polimixina de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para sensibilizar bacterias gram-negativas al complemento que es un mecanismo de defensa del hospedante presente en el suero.

- 15 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un derivado de polimixina de fórmula (I), que comprende modificar una polimixina natural o sintética o compuesto de octapeptina o uno de sus derivados que tiene de 4 a 6 residuos cargados positivamente reemplazando 1 a 4 de dichos residuos por residuos neutros, o por un enlace covalente, o convertir 1 a 4 de dichos residuos en residuos neutros para obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene 2 o 3 residuos cargados positivamente.

Definiciones

- "pH fisiológico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un valor del pH mayor de 7,0 y por debajo de 7,6, tal como un valor de pH en el intervalo de 7,1 a 7,5, por ejemplo en el intervalo de 7,2 a 7,4.

- 25 "Cargas positivas" como se utiliza en la presente memoria denota cargas positivas en el pH fisiológico definido anteriormente.

Molécula "catiónica" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula que contiene uno o más cargas positivas.

- "Residuo de aminoácido" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier residuo de aminoácido natural, no natural o modificado, en configuración L o D.

- 30 "Residuos equivalentes" como se usa en la presente memoria, pretende incluir modificaciones obvias a, por ejemplo, aminoácidos, lo que da como resultado aminoácidos no naturales o sus derivados, pero que retienen la capacidad estructural y/o funcional del residuo reemplazado.

"Polimixina(s) natural(es)", como se usa en la presente memoria, se refiere a polimixinas y circulinas.

- 35 "Derivado de polimixina" se refiere, para los fines de esta invención, a derivados sintéticos o semisintéticos de polimixinas u octapeptinas naturales, que tienen una porción de heptapéptido cíclico (o anillo heptapeptídico) R4-R10 y una cadena lateral unida al residuo de aminoácido N-terminal R4. La cadena lateral puede consistir en un R(FA)-triaminoacil(R1-R3), un R(FA)-diaminoacil(R2-R3), un R(FA)-monoamino-acil(R3) o R(FA) solo.

"Compuestos" como se usa en la presente memoria incluyen todos los isómeros estereoquímicos de dicho compuesto.

- 40 "Actividad sensibilizante" o "capacidad para sensibilizar" como se usa en la presente memoria está destinada a incluir cualquier capacidad para aumentar la sensibilidad, hacer sensible o hacer susceptible una bacteria a un agente antibacteriano.

Abreviaturas

- 45 Por ser internacionales se usan las correspondientes a las denominaciones en inglés. ácidos grasos: FA, residuos de acilo graso; 6-MOA y MOA, residuo de 6-metiloctanoilo; 6-MHA y MHA, residuo de 6-metilheptanoilo; MO(H)A, la mezcla de 6-metiloctanoilo, 6-metilheptanoilo y residuos de acilo graso relacionados que están presentes en la polimixina B; OHMDA, ácido 3-OH-8-metildecanoico; OA, residuo de octanoilo; DA, residuo de decanoilo.

- 50 Aminoácidos: Dab, residuo de α,γ -diamino-n-butililo; fDab, residuo de N- γ -formildiamino-n-butililo; acDab, residuo de N- γ -acetildiamino-n-butililo; Abu, residuo de α -aminobutililo; Thr, residuo de treonilo; Ser, residuo de serinilo; Phe, residuo de fenilalanilo; Leu, residuo de leucilo; Ile, residuo de isoleucilo; Ala, residuo de alanilo; sm-Dab, residuo de α,γ -diamino-n-butililo γ - sulfometilado. Códigos de una letra para los residuos de aminoácido modificados: X, Dab; Z, Abu; B, N- γ -fDab; J, N- γ -acDab.

Péptidos: DAPB, desacilpolimixina B; DAC, desacilcolistina; PMBN, polimixina B nonapéptido; PMEN, polimixina E nonapéptido; PMBO, polimixina B octapéptido; PMHP, polimixina B heptapéptido.

Otros: cy, ciclo (para denotar la parte cíclica del péptido, encerrado entre paréntesis); f, formilo; ac, acetilo; LPS, lipopolisacárido; ME, membrana externa; UFC, unidades formadoras de colonias. El símbolo * se utiliza en la presente memoria para marcar los residuos entre los que se cierra la porción de anillo heptapeptídico del compuesto dejando la parte restante de la molécula como una cadena lateral.

Descripción detallada de la invención

Ahora se ha encontrado que los derivados de polimixina que contienen al menos dos (2), pero no más de tres (3) cargas positivas todavía poseen actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas, y/o poseen la capacidad de sensibilizar las bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos, tales como antibióticos, antibióticos semisintéticos, agentes quimioterapéuticos y factores de defensa del hospedante, tal como el complemento.

Esta reducción de cargas positivas puede mejorar las propiedades farmacológicas de los derivados de acuerdo con la presente invención en comparación con las polimixinas naturales y sus derivados conocidos. Más específicamente, puede reducir la toxicidad, incluyendo la nefrotoxicidad, de los compuestos, y/o reducir la liberación de histamina del tejido hospedante, ejercida por los compuestos, y/o dar como resultado propiedades farmacocinéticas más adecuadas, tales como semivida en suero más larga o menor susceptibilidad a la inactivación por los constituyentes polianiónicos de tejidos y pus, en comparación con las polimixinas utilizadas clínicamente y sus derivados caracterizados y anteriormente descritos, tales como la polimixina B nonapéptido.

En las polimixinas y octapeptinas naturales, R(FA) es ácido 6-metiloctanoico (6-MOA), ácido 6-metilheptanoico (6-MHA), ácido octanoico, ácido heptanoico, ácido nonanoico, ácido 3-OH-6-metiloctanoico, ácido 3-OH-8-metildecanoico, ácido 3-OH-8-metilnonanoico, ácido 3-OH-8-decanoico y ácido 3-OH-6-metiloctanoico. Ejemplos de derivados conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R(FA) es el ácido γ -fenilbutírico, ácido isovalérico, ácido 9-fluorenil-metoxicarbónico, una serie de ácidos grasos no ramificados de C:9 a C:14, así como ácidos grasos iso C:9 e iso C:10.

En un derivado de acuerdo con la presente invención, R(FA) se selecciona del grupo que consiste en residuos de octanoilo, decanoilo y 6-MHA.

Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente equivalentes de estos residuos R(FA) hidrófobos preferidos, que se pueden seleccionar del grupo que consiste en, por ejemplo, residuos de acilo, tales como un residuo de alquilo opcionalmente sustituido, un residuo de isoalquilo opcionalmente sustituido, un residuo de cicloalquilo opcionalmente sustituido, un residuo de alquenoil opcionalmente sustituido, un residuo de cicloalquenoil opcionalmente sustituido, un residuo de arilo opcionalmente sustituido, un residuo de heteroarilo opcionalmente sustituido, un residuo heterocíclico opcionalmente sustituido, en donde dichos residuos tienen preferiblemente más de cinco (5) átomos de carbono y en donde las sustituciones pueden incluir también las opcionalmente diseñadas entre el residuo de acilo y el extremo N del péptido. R(FA) puede ser también un tramo de un oligopéptido hidrófobo. Ejemplos de residuos de R(FA) posibles incluyen, aunque sin limitación, residuos de octanoilo, nonanoilo, isononanoilo, decanoilo, isodecanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tetradecanoilo, ciclohexanoilo, cicloheptanoilo, ciclooctanoilo, ciclonoanoilo, cicloisononanoilo, ciclodecanoilo, cicloisodecanoilo, cicloundecanoilo, ciclododecanoilo, ciclotetradecanoilo, hexanoilo, heptanoilo y 9-fluorenilmetoxicarbonilo.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R1 es Dab o está ausente (es decir, reemplazado por un enlace covalente). Ejemplos de derivados conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R1 es Ala o un enlace covalente.

En un derivado de acuerdo con la presente invención R1, si está presente, puede ser Abu.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R2 es Thr o está ausente (es decir, reemplazado por un enlace covalente). Ejemplos de derivados conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R2 es O-acetil-Thr, O-propionil-Thr, O-butilil-Thr o un enlace covalente.

En un derivado de acuerdo con la presente invención, R2, se selecciona del grupo que consiste en Ser, Thr, DThr, y DAla.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R3 es Dab, DDab o DSer. Ejemplos de numerosos derivados sintéticos conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R3 es Lys o ácido 2-amino-4-guanidino-butírico.

En un derivado de acuerdo con la presente invención, R3, se selecciona del grupo constituido por Thr, DThr, Ser, DSer, DAla, Dab y Abu.

Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente los residuos equivalentes de estos residuos preferidos R1, R2 y R3, y puede seleccionarlo de un grupo que consiste en, por ejemplo, un enlace covalente, alanina, ácido 2-aminoadípico, ácido α -n-butírico, N-(4-aminobutil)glicina, ácido α -aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido α -amino-caproico, aminociclopropanocarboxilato, ácido aminoisobutírico, aminonornbornilcarboxilato, ácido α -amino-n-valérico, arginina, N_{ω} -metilarginina, asparagina, α -aspartato de metilo, ácido aspártico, N-bencilglicina, N-(2-carbamiletil)glicina, N-(carbamiletil)glicina, 1-carboxi-1(2,2-difenil-etilamino)ciclopropano, cisteína, ácido N_{α} -metildiamino-n-butírico, ácido N_{γ} -acetildiamino-n-butírico, ácido N_{γ} -formildiamino-n-butírico, ácido N_{γ} -metil-diamino-n-butírico, N-(N-2,2-difeniletil)carbamilmetil-glicina, N-(N-3,3-difenilpropil)carbamilmetil(1)glicina, N-(3,3-difenilpropil)glicina, ácido glutámico, glutamina, glicina, t-butilglicina, ácido 2-amino-4-guanidinobutírico, N-(3-guanidinopropil)glicina, histidina, homofenilalanina, isodesmosina, isoleucina, leucina, norleucina, hidroxilisina, N_{α} -metillisina, lisina, N_{α} -metilhidroxilisina, N_{α} -metillisina, N_{ϵ} -acetilhidroxilisina, N_{ϵ} -acetillisina, N_{ϵ} -formilhidroxilisina, N_{ϵ} -formillisina, N_{ϵ} -metilhidroxilisina, N_{ϵ} -metillisina, metionina, α -metil- γ -aminobutirato, α -metil-aminoisobutirato, α -metilciclohexilalanina, α -naftilalanina, norleucina, norvalina, α -metilornitina, N_{α} -metilornitina, N_{δ} -acetilornitina, N_{δ} -formil-ornitina, N_{δ} -metilornitina, ornitina, penicilamina, fenilalanina, hidroxiprolina, prolina, ácido N_{α} -metildiamino-n-propiónico, ácido N_{β} -acetildiamino-n-propiónico, ácido N_{β} -formildiamino-n-propiónico, ácido N_{β} -metildiamino-n-propiónico, fosfoserina, serina, fosfotreonina, treonina, triptófano, tirosina, norvalina y valina.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R4 es Dab. Ejemplos de derivados sintéticos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R4 es Lys.

En un derivado de acuerdo con la presente invención R4 es Dab.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R5, R8 y R9 son Dab. Ejemplos de derivados sintéticos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R5, R8, y R9 puede ser Lys o ácido 2-amino-4-guanidino-butírico.

En un derivado de acuerdo con la presente invención R5, R8 y R9 son cada uno Dab o Abu.

Una experto en la técnica puede reconocer fácilmente los residuos equivalentes a estos residuos preferidos, y puede seleccionarlos de un grupo que consiste en, por ejemplo, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, lisina, hidroxilisina, ornitina, ácido 2-amino-4-guanidinobutírico, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, D-fenilalanina, metionina, treonina, serina, ácido α -amino-n-butírico, ácido α -amino-n-valérico, ácido α -amino-caproico, N_{ϵ} -formil-lisina, N_{ϵ} -acetillisina, N_{ϵ} -metillisina, N_{ϵ} -formilhidroxilisina, N_{ϵ} -acetil-hidroxilisina, N_{ϵ} -metilhidroxilisina, L- N_{α} -metilhidroxilisina, ácido N_{γ} -formil-diamino-n-butírico, ácido N_{γ} -acetildiamino-n-butírico, ácido N_{γ} -metildiamino-n-butírico, ácido N_{β} -formildiamino-n-propiónico, ácido D- N_{β} -formildiamino-n-propiónico, ácido N_{β} -acetildiamino-n-propiónico, ácido N_{β} -metildiamino-n-propiónico, N_{δ} -formilornitina, N_{δ} -acetilornitina y N_{δ} -metilornitina.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R6 es DPhe o DLeu y R7 es Leu, Ile, Phe o Thr. Los derivados sintéticos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R6 es DTrp y en los que R7 es Ala.

En un derivado de acuerdo con la presente invención, R6 es DPhe o DLeu, y R7 es Leu o Ile; o Thr.

Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente los residuos equivalentes a estos residuos hidrófobos preferidos, y puede seleccionarlos de un grupo que consiste en, por ejemplo, fenilalanina, ácido α -amino-n-butírico, triptófano, leucina, metionina, valina, norvalina, norleucina, isoleucina y tirosina. Un experto en la técnica también puede reconocer que el residuo equivalente a treonina será serina.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R10 es Thr y Leu. Ejemplos de derivados conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en los que R10 es O-acetil-Thr, O-propionil-Thr u O-butiril-Thr.

En un derivado de acuerdo con la presente invención, R10 es Thr o Leu.

Un experto en la técnica también puede reconocer que el residuo equivalente a treonina será serina.

Más específicamente, los residuos preferidos se eligen de tal manera que R8 y R9 no se formilen ambos cuando R(FA)-R1-R2-R3 constituya la cadena lateral de polimixina B natural; y cuando R(FA) esté directamente unido a R4, entonces R(FA) es decanoilo.

Las posiciones específicas de las como máximo tres (3) cargas positivas a las que se ha hecho referencia anteriormente en la presente memoria, pueden estar situadas en la porción del anillo heptapeptídico y/o en la cadena lateral, si está presente. Cuando en los derivados de acuerdo con la invención están presentes tres (3) cargas positivas, dichas tres (3) cargas positivas pueden estar situadas en la porción del anillo heptapeptídico; o dos (2) cargas positivas pueden estar situadas en la porción de anillo heptapeptídico, mientras que la carga positiva restante se encuentra en la cadena lateral; o una (1) carga positiva puede estar situada en la porción del anillo heptapeptídico, mientras que las otras dos (2) cargas positivas se encuentran en la cadena lateral. Preferiblemente, al menos dos (2) cargas positivas están situadas en la porción del anillo heptapeptídico.

En una realización, los derivados de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar del grupo de derivados en donde R1-R10 se seleccionan del grupo que consiste en: Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 10; Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 11; Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 12; Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 13; Abu-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 14; Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 15; Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu-], es decir, SEQ ID NO. 16; Thr-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 17; Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 18; Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 19; DAla-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 20; y Thr-Dab-cy[Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 22.

En otras realizaciones, los derivados de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en: OA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 10; DA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, DA-SEQ ID NO. 10; OA-Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 11; OA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 12; DA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, DA-SEQ ID NO. 13; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 13; MHA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, MHA-SEQ ID NO. 13; MHA-Abu-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, MHA-SEQ ID NO. 14; OA-Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 15; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu], es decir, OA-SEQ ID NO. 16; OA-Thr-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 17; OA-Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 18; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 19; OA-DAla-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 20; OA-Thr-Dab-cy[Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 22.

Preferiblemente, los derivados de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en: OA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 10; DA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, DA-SEQ ID NO. 10; OA-Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 11; OA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 12; DA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, DA-SEQ ID NO. 13; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 13; MHA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, MHA-SEQ ID NO. 13; MHA-Abu-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, MHA-SEQ ID NO. 14; OA-Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 15; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu], es decir, OA-SEQ ID NO. 16; OA-Thr-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 17; OA-Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 18; OA-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 19; y OA-DAla-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 20.

Como se muestra en la presente memoria en el apartado de ejemplos, los compuestos de acuerdo con la presente invención que llevan sólo tres (3) cargas positivas pueden ser agentes muy potentes para inhibir el crecimiento de bacterias gram-negativas o para sensibilizarlas a los agentes antibacterianos, e incluso a derivados que llevan solamente dos (2) cargas positivas pueden tener el mismo efecto, aunque a un nivel más moderado.

Para la actividad antibacteriana directa al menos dos (2) y más preferiblemente tres (3) cargas positivas están situadas en la porción del anillo heptapeptídico, y para la actividad sensibilizante al menos una (1) y más preferiblemente dos (2) o tres (3) cargas positivas están situadas en la parte del anillo heptapeptídico. Además, la presencia de dos grupos hidroxilo en la parte de la cadena lateral mejora significativamente la actividad antibacteriana directa.

Los trabajos de Teuber (1970), Srinivasa and Ramachandran (1980a), y Sakura *et al.* (2004) describen, entre otros derivados de polimixinas, derivados que tienen sólo dos (2) o tres (3) cargas positivas. Sin embargo, la actividad antibacteriana de los derivados descritos es muy débil y clínicamente irrelevante (Sakura *et al.* 1980), atribuida a residuos de aminoácidos en total contradicción con los hallazgos de la presente invención (Srinivasa and Ramachandran, 1980a) o atribuida a no atribuida en absoluto a residuos de aminoácidos específicos, debido a una purificación incompleta (Teuber 1970). Además, ninguno de los trabajos citados anteriormente describe, sugiere o incita a estudiar la capacidad de dichos derivados para sensibilizar bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos. Como muestran claramente los ejemplos de la presente invención, no se puede predecir la capacidad de un derivado de polimixina para sensibilizar bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos sobre la base de su capacidad para inhibir su crecimiento. Por ejemplo, mientras que se necesita una concentración clínicamente irrelevante de la octanoil-polimixina B heptapéptido tan alta como 128 µg/mL para inhibir el crecimiento de *E. coli* (Sakura *et al.* 2004), una cantidad tan baja como 4 µg es suficiente para una sensibilización moderada de la bacteria a la rifampina, como se muestra en la presente memoria en el apartado de ejemplos.

Los derivados acetilados de polimixina descritos por Teuber (1970) son mezclas de derivados diferentemente acetilados. El anhídrido acético puede reaccionar con cualquiera de los cinco grupos amino libres de la molécula de polimixina B para producir un polimixina monoacetilada. Por lo tanto, una polimixina monoacetilada de acuerdo con

Teuber es una mezcla de cinco derivados de polimixina monoacetilados, cada uno acetilado en un grupo amino diferente. Una polimixina diacetilada de acuerdo con Teuber es una mezcla de diez derivados diferentemente diacetilados y la polimixina triacetilada es también una mezcla de diez derivados diferentemente triacetilados. Teuber no intentó aislar estos derivados de las mezclas. El problema con tales polimixinas modificadas es que la modificación parcial puede como resultado una especificidad reducida. Por lo tanto, algunos de los grupos amino que son importantes para la actividad antibacteriana están parcialmente sustituidos (y por lo tanto inactivados), mientras que algunos de los grupos amino no importantes permanecen parcialmente no sustituidos. Por otra parte, el grado de sustitución puede dar lugar a variaciones de lote a lote.

Los derivados de polimixina de acuerdo con la presente invención, por otra parte, son compuestos aislados y estructuralmente claramente definidos e identificados.

Srinivasa y Ramachandran (1980a) propusieron que son esenciales para la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* los grupos amino libres de la cadena lateral de la triformil-polimixina B en los residuos R1 y R3, así como los grupos amino libres de la diformil-polimixina B en los residuos R1, R3, y R5, mientras que no son esenciales los grupos amino libres en R8 y R9. Como contraste con sus conclusiones, los compuestos de la presente invención incluyen aquellos que carecen de los grupos amino libres en R1 y R3, los llevan en R5, R8 y R9, y sin embargo son agentes potentes contra *Ps. Aeruginosa*, así como otras bacterias gram-negativas.

Sakura *et al.*, (2004) han descrito un derivado acortado de la polimixina B, octanoil-polimixina B heptapéptido. La unión del residuo octanoilo al extremo N del residuo R4 de la polimixina B heptapéptido da como resultado un compuesto que tiene sólo tres (3) cargas positivas. Sakura *et al.*, encontraron que octanoil-polimixina B heptapéptido inhibe el crecimiento de bacterias sólo a una concentración muy alta (128 µg/mL) (y clínicamente irrelevante), mientras que los otros derivados tales como octanoil-polimixina B octapéptido y octanoil-polimixina B nonapéptido, ambos con cuatro cargas (4) son agentes muy potentes para inhibir el crecimiento bacteriano. Sakura *et al.*, no describieron ni sugirieron la capacidad de octanoil-polimixina B heptapéptido para sensibilizar bacterias a agentes antibacterianos, ni enseñaron que una cola más larga de ácidos grasos aumenta su actividad antibacteriana, como se muestra en la presente memoria en el apartado de ejemplos.

La presente invención proporciona en un aspecto nuevos derivados de polimixina que tienen solamente dos (2) o tres (3) cargas positivas y siguen siendo capaces de inhibir el crecimiento de una o más especies bacterianas gram-negativas y/o sensibilizar una o más especies de bacterias gram-negativas a un agente antibiótico o antibacteriano.

La susceptibilidad de las bacterias a un agente antibacteriano se puede determinar por dos métodos microbiológicos. Un procedimiento rápido, pero rudimentario, utiliza discos de papel de filtro comercialmente disponibles que han sido impregnados con una cantidad específica del agente antibacteriano. Estos discos se colocan en la superficie de placas de agar-agar que han sido inoculadas con una suspensión del organismo que se analiza, y se observan en las placas zonas de inhibición del crecimiento. Una técnica más precisa, el ensayo de susceptibilidad a dilución del caldo, implica preparar tubos de ensayo que contienen diluciones seriadas del fármaco en medios de cultivo líquidos, inoculando a continuación el organismo de ensayo en los tubos. La concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento de las bacterias después de un período de incubación adecuado se describe como la concentración inhibidora mínima (CIM).

Los derivados de acuerdo con la presente invención pueden inhibir el crecimiento, o sensibilizar a agentes antibacterianos, bacterias gram-negativas clínicamente importantes, tales como las que pertenecen a los géneros de las especies *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Branhamella*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* y *Yersinia*. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, otras especies de *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, otras especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter baumannii*, así como muchas otras especies de bacterias gram-negativas no fermentativas. Las bacterias también incluyen *Helicobacter pylori*, así como otras bacterias gram-negativas clínicamente importantes.

Las infecciones bacterianas que se han tratar incluyen, por ejemplo, bacteriemia, septicemia, infecciones de la piel y tejidos blandos, neumonía, meningitis, infecciones de la región pelveoperitoneal, infección por cuerpos extraños, fiebre en pacientes hematológicos, infección asociada a un conducto intravenoso u otro catéter, cánula y/o dispositivo, infección en el tracto gastrointestinal, en ojos, o en oídos, infección superficial de la piel, y colonización del tracto gastrointestinal, membranas, mucosas y/o piel por bacterias potencialmente nocivas.

Las enfermedades infecciosas bacterianas incluyen, aunque sin limitación, infecciones graves intrahospitalarias, infecciones de pacientes inmunocomprometidos, infecciones de pacientes con trasplantes de órganos, infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI), infecciones graves de heridas por quemaduras, infecciones graves extrahospitalarias, infecciones en pacientes con fibrosis quística, así como infecciones causadas por bacterias gram-negativas multirresistentes.

La presente invención se refiere también a combinaciones de dos o más derivados de acuerdo con la presente invención para tratamiento de combinación. Las combinaciones pueden incluir derivados que tienen diferentes espectros de actividad antibacteriana o una capacidad para sensibilizar diferentes especies o cepas de bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de polimixina de acuerdo con la presente invención, sus formas de sales, sus combinaciones seleccionadas y opcionalmente, un agente antibacteriano formulado junto con vehículos y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas combinaciones facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente e incluyen, por ejemplo, agentes diluyentes, de cargas, tamponadores, 10 espesantes, humectantes, dispersantes, solubilizantes, de puesta en suspensión, emulsionantes, aglutinantes, estabilizantes, disgregantes, encapsulantes, de recubrimiento, de incrustación, lubricantes, colorantes, y aromatizantes, así como absorbentes, potenciadores de la absorción, humectantes y conservantes bien conocidos por los expertos en la técnica.

15 Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para tratar, prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la patología o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata en una relación razonable de beneficio-riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien conocida por los expertos en la técnica de la medicina.

20 Las composiciones se pueden producir por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, encapsulación, atrapamiento, liofilización, emulsionamiento y granulación. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida, y la composición farmacéutica se puede formular para liberación inmediata o liberación lenta (por ejemplo, con el fin de prolongar el efecto terapéutico y/o mejorar la tolerabilidad). Además, las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma 25 de dosificación unitaria por métodos conocidos en la técnica farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, las destinadas a administración intravenosa, intramuscular, oral o tópica, así como las que se administran como un supositorio o como un aerosol inhalable. Las composiciones incluyen preparaciones inyectables intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal o intraocular, 30 aerosoles inhalables, así como las destinadas a las vías rectal, oral, intravaginal, transmucosal o transdérmica.

Para la administración parenteral (por ejemplo, por inyección en bolo, infusiones de administración rápida o infusiones lentas), los compuestos de acuerdo con esta invención, así como las combinaciones descritas anteriormente se pueden formular en sus formas de sal o éster adecuadas, en soluciones acuosas estériles, preferiblemente líquidos fisiológicamente compatibles, tal como en solución salina, dextrosa al 5%, solución de Ringer y solución de Hank. La formulación también puede incluir disolventes orgánicos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol o compuestos relacionados, así como conservantes y agentes tensioactivos. 35

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen las de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen las de ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido salicílico. 40

Además, las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden ser suspensiones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de puesta 45 suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Vehículos y disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como ésteres de ácidos grasos naturales y/o sintéticos, tales como oleato de etilo y triglicéridos o liposomas. Las suspensiones pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano.

Las composiciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados en dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden conservarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. 50

Para administración oral, las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo polvos, comprimidos, píldoras, grageas, pastillas para chupar, cápsulas, sellos, y preparaciones microgranulares. Las preparaciones farmacéuticas se pueden obtener usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la 55 mezcla de gránulos, después de añadir, si se desea, agentes auxiliares adecuados, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Un vehículo/excipiente sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, solubilizantes, lubricantes, agentes de puesta en suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes

aromatizantes, agentes humectantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material encapsulante. Los vehículos adecuados incluyen, aunque sin limitación, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, dextrosa, lactosa, pectina, almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión y manteca de cacao.

- 5 Las preparaciones líquidas adecuadas para la administración oral incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas, jarabes, elixires, suspensiones acuosas, emulsiones y geles. Las soluciones acuosas se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo agentes estabilizantes y espesantes adecuados, así como colorantes y aromas. Las suspensiones acuosas se pueden preparar dispersando el componente activo finamente
- 10 dividido en agua con material viscoso, tales como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de puesta en suspensión bien conocidos. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábiga.

- 15 Los compuestos de acuerdo con la invención o las combinaciones descritas anteriormente también se pueden formular para la administración tópica. Los compuestos activos se mezclan en condiciones estériles con vehículos/excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo cualesquiera agentes tamponantes y conservantes necesarios. Las pomadas, cremas y lociones se pueden formular, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes emulsionantes, dispersantes, de puesta en suspensión, espesantes, estabilizantes o colorantes adecuados. Los excipientes usados comúnmente incluyen grasas y aceites animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, derivados de celulosa, goma de tragacanto y polietilenglicol.

- 20 Otras formulaciones tópicas incluyen, aunque sin limitación, gotas para los oídos, gotas para los ojos y parches transdérmicos.

Para la administración transdérmica, así como transmucosal, se pueden utilizar en la formulación agentes penetrantes generalmente conocidos en la técnica.

- 25 Para administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con esta invención y las combinaciones descritas anteriormente se suministran en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un ventilador, envase presurizado o un nebulizador con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular de modo que
- 30 contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos de acuerdo con esta invención y las combinaciones descritas anteriormente también se pueden formular en composiciones rectales, tales como enemas o supositorios de retención, utilizando bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao, otros glicéridos, polietilenglicol o una cera para supositorios.

- 35 La presente invención también se refiere a un método para uso de los presentes derivados de polimixina o una combinación de dichos derivados, como parte del tratamiento clínico de (o de un régimen profiláctico preventivo para) sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad infecciosa, y comprende administrar a dicho sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un derivado de acuerdo con la presente invención, opcionalmente en combinación con un agente antibacteriano.

- 40 La presente invención también se refiere a un método de sensibilización de bacterias gram-negativas a un agente antibacteriano, en donde el derivado de acuerdo con la presente invención se administra simultánea o secuencialmente en cualquier orden, con una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente antibacteriano.

- El derivado de la presente invención y el agente antibacteriano se pueden administrar juntos como una formulación o por diferentes vías. Por ejemplo, el derivado de polimixina se puede administrar por vía intravenosa, mientras que el agente antibacteriano se administra por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, oral o intraperitoneal.
- 45 Alternativamente, el derivado se puede administrar por vía intramuscular o intraperitoneal, mientras que el agente antibacteriano se administra por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, o el derivado se puede administrar en una forma de aerosol o nebulizada, mientras que el agente antibacteriano se administra, por ejemplo, por vía intravenosa. El derivado y los agentes antibacterianos se pueden administrar simultánea o secuencialmente, siempre y cuando se suministren de forma suficiente para permitir que ambos alcancen las concentraciones eficaces en el
- 50 sitio de la infección.

- La "eficacia terapéutica" se basa en un resultado clínico satisfactorio, y no requiere que un derivado de acuerdo con la presente invención, opcionalmente en combinación con un agente antibacteriano, elimine el 100% de las bacterias implicadas en una infección. El éxito del tratamiento depende de la consecución de un nivel de actividad antibacteriana en el sitio de la infección, suficiente para inhibir las bacterias de una manera que incline la balanza a
- 55 favor del hospedante. Cuando las defensas del hospedante son de máxima eficacia, el efecto antibacteriano requerido puede ser modesto. La reducción de la carga de organismo, incluso en solo una unidad logarítmica (un factor de 10) puede permitir que las propias defensas del hospedante controlen la infección. Además, el aumento de

un efecto bactericida/bacteriostático temprano puede ser más importante que un efecto bactericida/bacteriostático a largo plazo. Estos primeros episodios son una parte significativa y crítica del éxito terapéutico, puesto dan tiempo a que se activen los mecanismos de defensa del hospedante. El aumento de la tasa bactericida puede ser particularmente importante para infecciones, tales como meningitis, infecciones de huesos o articulaciones.

5 La eficacia terapéutica de un agente antibacteriano depende de la susceptibilidad de las especies bacterianas a dicho agente antibacteriano, a la concentración clínicamente relevante del derivado de acuerdo con esta invención. El efecto de los compuestos de acuerdo con la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica de los agentes antibacterianos *in vivo* se puede demostrar en modelos animales *in vivo*, tales como ensayos de peritonitis en ratones o de bacteriemia en conejos, y se puede predecir basándose en una variedad de ensayos *in vitro*, que incluyen: (1) determinaciones de la concentración inhibidora mínima (CIM) de un agente antibacteriano requerida para inhibir el crecimiento de una bacteria gram-negativa durante 24 horas, (2) determinaciones del efecto de un agente antibacteriano sobre la curva cinética de crecimiento de una bacteria gram-negativa, y (3) ensayos de tablero de ajedrez de la CIM de diluciones en serie de agente antibacteriano solo o en combinación con diluciones en serie de compuesto(s). Los ejemplos de modelos o ensayos son bien conocidos en la técnica.

10 Usando determinaciones *in vitro* de la CIM a las 24 horas, se puede demostrar que un derivado de acuerdo con la presente invención reduce la CIM del agente antibacteriano. Con este resultado, se espera que la administración simultánea del compuesto *in vivo* aumente la susceptibilidad de una bacteria gram-negativa al agente antibacteriano. También se puede demostrar que un compuesto de acuerdo con la presente invención reduce la CIM de un agente antibacteriano desde el intervalo en el que el organismo se considera clínicamente resistente hasta un intervalo en el que el organismo se considera clínicamente susceptible. Con este resultado, se espera que la administración simultánea *in vivo* de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención con el agente antibacteriano revierta la resistencia y convierta eficazmente el organismo resistente a los antibióticos en un organismo susceptible a los antibióticos.

15 Midiendo el efecto de los agentes antibacterianos en las curvas de crecimiento *in vitro* de las bacterias gram-negativas, en presencia o ausencia de un compuesto de acuerdo con la presente invención, se puede demostrar que el compuesto mejora el efecto antibacteriano temprano de los agentes antibacterianos en un periodo preferiblemente menor de 24 horas. La mejora de los efectos bactericida/inhibidores del crecimiento tempranos es importante para determinar el resultado terapéutico.

20 Un derivado de polimixina de acuerdo con la presente invención y un agente antibacteriano pueden tener también efectos sinérgicos o potenciadores más allá de los efectos individuales de cada agente por sí solo o los efectos aditivos de los agentes juntos. En un ensayo de tablero de ajedrez, la combinación de un compuesto de acuerdo con la presente invención con agentes antibacterianos puede dar como resultado un índice de concentración inhibidora fraccional "sinérgico" (CIF). El método de tablero de ajedrez se basa en la aditividad, lo que supone que el resultado observado con múltiples fármacos es la suma de los efectos separados de los fármacos que se analizan; de acuerdo con este sistema se califica como sinergia una CIF menor que 0,5, se califica como aditivo un valor de 1, y como indiferente un valor mayor que 1 pero menor que 2.

25 Los agentes antibacterianos adecuados para uso en combinación con derivados de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo macrólidos, tales como claritromicina, azitromicina y eritromicina, cetólidos, lincosaminas, tal como clindamicina, estreptograminas, rifamicinas, tales como rifampina, rifabutina y rifalazilo, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, antibióticos glicopeptídicos, tales como vancomicina, dalbavancina, telavancina y oritavancina, fluoroquinolonas, derivados de tetraciclina, derivados hidrófobos de penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenemas, penems y otros antibióticos de beta-lactama, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folatos, inhibidores de la desformilasa e inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano. Un experto en la técnica del tratamiento de las infecciones gram-negativas puede reconocer fácilmente otros agentes antibacterianos clínicamente relevantes que pueden ser útiles. Preferiblemente, dichos agentes antibacterianos se seleccionan de un grupo de agentes antibacterianos hidrófobos o moderadamente hidrófobos contra los cuales la membrana externa de las bacterias gram-negativas actúa como una barrera de permeabilidad eficaz.

30 La invención también incluye el uso de los presentes compuestos o sus combinaciones para sensibilizar las bacterias clínicamente importantes enumeradas en esta memoria al complemento que es un mecanismo de defensa del hospedante (presente en el suero humano y animal reciente obtenido) sometiendo dichas bacterias a la acción de dichos compuestos durante una infección clínica o una sospecha de infección. La defensa del hospedante se puede ejercer, por ejemplo, por la acción combinada del complemento y los leucocitos polimorfonucleares.

35 Los expertos en la técnica médica pueden optimizar fácilmente dosificaciones y regímenes de administración eficaces para los compuestos de acuerdo con la presente invención, así como para los antibióticos en la administración simultánea, teniendo en cuenta factores bien conocidos en la técnica, que incluyen el sujeto que se dosifica, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto, la vía de administración, las funciones renal y hepática del sujeto, el efecto deseado, el compuesto particular empleado de acuerdo con la presente invención y la tolerancia del sujeto al mismo. Las dosificaciones de todos los agentes antimicrobianos deben ajustarse en pacientes con insuficiencia renal o insuficiencia hepática, debido al metabolismo y/o excreción reducidos de los

fármacos en pacientes con estos estados. Las dosis en los niños también deben reducirse, en general, de acuerdo con el peso.

La dosis diaria total de un derivado, de acuerdo con la presente invención, administrada a un ser humano o un animal puede variar, por ejemplo, en cantidades de 0,1 a 100 mg por kg de peso, preferiblemente 0,25 a 25 mg por kg de peso.

Un experto en la técnica reconocerá también que el curso óptimo del tratamiento, es decir, el número de dosis administradas por día para un número definido de días, será determinado por la naturaleza y extensión de la afección que se ha de tratar, la forma, vía y sitio de administración, y el paciente particular que se ha de tratar, y que tales parámetros óptimos pueden determinarse por técnicas convencionales.

También se proporciona un método para analizar un compuesto de acuerdo con la presente invención, siendo dicho compuesto un derivado de un polimixina u octapeptina natural, en donde dicho derivado tiene solamente 2-3 cargas positivas, en contraste con el compuesto de origen natural, del que se deriva, para la actividad antibacteriana contra una bacteria gram-negativa dañina y/o para la capacidad de sensibilizarla a agentes antibacterianos y/o al complemento presente en el suero, comprendiendo dicho método la etapa de puesta en contacto la bacteria con dicho derivado de una polimixina u octapeptina natural e identificación de los derivados que posean actividad antibacteriana y/o actividad sensibilizante hacia dicha bacteria.

También se proporciona un método para cribar derivados de polimixina y octapeptina con unión reducida al tejido renal o sus constituyentes en, o de animales de ensayo o de origen humano, midiendo su capacidad reducida para bloquear competitivamente la unión de los aminoglicósidos a dichos derivados o bloquear la unión de otras sustancias conocidas que se unen a dichos derivados.

[En un aspecto adicional, se proporciona un método para desarrollar nuevos antibióticos, que comprende las etapas de proporcionar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o uno de sus derivados, que tienen un total de 4 o 5 cargas positivas o un total de 6 cargas positivas, tal como desacilpolimixinas, sustituyendo de 1 a 4 residuos que llevan una o más cargas positivas por un residuo que carece de carga positiva o por un enlace covalente, generando de este modo un derivado de polimixina que tiene 2 o 3 cargas positivas, analizar dicho compuesto derivado respecto a su actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas y/o respecto a su capacidad de sensibilizar bacterias gram-negativas a un agente antibacteriano, y seleccionar los compuestos que tengan actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas o la capacidad de sensibilizar bacterias gram-negativas a un agente antibacteriano.

También se proporciona de acuerdo con la presente invención un derivado semisintético de polimixina obtenible tratando química o enzimáticamente polimixinas u octapeptinas de origen natural, respectivamente, o sus variantes que son producidas por organismos modificados genéticamente. Los tratamientos químicos incluyen, aunque sin limitación, los realizados con anhídrido acético, ácido fórmico, hidrazina y ácido oxálico. Los tratamientos enzimáticos incluyen, aunque sin limitación, los realizados con enzimas, tales como polimixina-desacilasa, ficina, papaína, bromelaina, subtilopectidasas, subtilisina, colistina-hidrolasa y Nagarse.

Los compuestos preferidos de acuerdo con una realización son menos catiónicos que las polimixinas u octapeptinas naturales, tienen solamente dos (2) o tres (3) cargas positivas, y son:

(a) capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* y/o sensibilizar cualquiera de ellos a los antibióticos, y/o

(b) menos tóxicos que las polimixinas utilizadas clínicamente, como se pone de manifiesto en un modelo animal *in vivo*, y/o

(c) menos nefrotóxicos que las polimixinas utilizadas clínicamente, como se pone de manifiesto en un modelo animal y/o en un ensayo *in vitro* que mide la afinidad de los compuestos a las estructuras renales, y/o

(d) capaces de causar de menos liberación de histamina desde los tejidos que las polimixinas utilizadas clínicamente cuando se administran por vía tópica o cuando se inhalan en forma de aerosol, y/o

(e) farmacocinéticamente más favorables, por tener una semivida en suero más larga y/o por ser menos inactivados por los componentes polianiónicos de tejidos y pus que las polimixinas utilizadas clínicamente.

Los métodos para sintetizar compuestos de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, los siguientes descritos a continuación. Para un compuesto específico que se ha de sintetizar, un experto en la técnica es capaz de elegir el método adecuado.

1. Los derivados semisintéticos de polimixinas y octapeptinas que llevan una porción heptapeptídica sin cambios y una cadena lateral de acil-aminoacilo modificado se pueden preparar por los procedimientos descritos como sigue:

Protección de los grupos amino libres en el material de partida (polimixina u octapeptina, o sus modificaciones) por métodos conocidos por los expertos en la técnica. La protección puede lograrse por el uso de residuos tales como t-butoxicarbonilo (tBoc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (CBZ, Z), aliloxicarbonilo (ALOC), 3-piridil-N-óxido-metoxicarbonilo (como se describe en la publicación de patente de GB 1323962), usando bases de Schiff, tales como benzaldehído, por el método descrito en la publicación de patente japonesa 7115630/1971 o similares, que se pueden eliminar por condiciones convencionales compatibles con la naturaleza del producto.

En condiciones en las que la escasa solubilidad en agua plantea ocasionalmente un problema en las etapas subsiguientes, la protección se puede hacer usando grupos de bloqueo cargados negativamente, tal como un derivado de ácido sulfónico de Fmoc o un derivado de ácido carboxílico de Fmoc, estando descrito el método en la publicación de patente de EE.UU. 2006004185. La solubilidad en agua también se puede mejorar asociando una grupo bloqueante muy hidrófilo, cargado negativamente eliminable y adecuado al grupo OH de la treonina.

A continuación, el compuesto se somete a un tratamiento enzimático con enzimas tales, como polimixina-desacilasa, polimixina-hidrolasa, papaína, ficina, bromelaina, subtilopectidasa, Nagarse u otras enzimas que eliminan una parte terminal de la cadena lateral o incluso toda la cadena lateral de los compuestos de polimixina u octapeptina. Este tratamiento puede ir seguido opcionalmente por el procedimiento de degradación de Edman. El compuesto resultante carece de la cadena lateral completa y se compone de sólo la parte heptapeptídica cíclica, pero tiene un grupo alfa-amino libre N-terminal.

Alternativamente, las polimixinas y octapeptinas que tienen grupos amino protegidos por benciloxicarbonilo pueden ser tratadas por ácido oxálico o ácido fórmico para producir desacil-derivados protegidos, estando el método descrito por Kurihara *et al.*, (1974). El procedimiento va seguido por más tratamiento enzimático como antes y/o por la degradación de Edman para producir un heptapéptido.

A continuación, un residuo adecuado se une a la posición alfa-amino libre de la porción de anillo heptapeptídica. El residuo podría contener un residuo de acilo o relacionado, así como opcionalmente residuos de aminoácidos, preferiblemente hasta tres residuos. Por ejemplo, se puede preparar un compuesto semisintético con un grupo acilo y dos residuos de aminoácidos añadiendo al heptapéptido antes descrito un residuo de N-(acil)-treonil-D-treonilo sintético. Esto se puede lograr por técnicas generales convencionales conocidas por los expertos en química orgánica, incluyendo estas técnicas el uso de residuos unidos a N-hidroxisuccinimida como se describe en la patente de EE.UU. 2006004185. En esta síntesis particular, el procedimiento puede implicar el uso de 2-N-(n-octanilo)-treonil-D-treonil-N-hidroxisuccinimida.

2. Polimixinas nonapéptidos aciladas que llevan tres (3) grupos amino libres. La polimixina D posee sólo cuatro (4) cargas positivas. Los grupos amino libres de la polimixina D pueden ser protegidos por los medios descritos anteriormente. Esto va seguido por un tratamiento enzimático y una etapa opcional de degradación de Edman, para dar un nonapéptido, que luego se puede acilar por isotiocianato de acilo (por el método bien conocido por un experto en la técnica y descrito en la publicación patente de EE.UU. 2006004185, por cloruro de acilo (por el método bien conocido por un experto en la técnica y descrito en Chihara *et al.*, 1974), o usando residuos unidos a N-hidroxisuccinimida (por el método bien conocido para un experto en la técnica y descrito en la publicación de patente de EE.UU. 2006004185). Por último, se eliminan los grupos protectores.

De manera análoga, se pueden preparar la polimixina S nonapéptido acilada y polimixina F nonapéptido acilada. Ambas llevan sólo tres (3) grupos amino libres.

3. Polimixina y octapeptina heptapéptidos aciladas. Los heptapéptidos se puede preparar por tratamiento con Nagarse de los compuestos naturales, como ha sido descrito por Kimura *et al.*, 1992. Alternativamente, se pueden preparar por tratamientos con otras enzimas, tales como polimixina-acilasa, polimixina-hidrolasa, ficina, papaína, bromelaina y subtilopectidasa, seguidos por etapas opcionales de degradación de Edman. También se pueden preparar por desacilación de los compuestos naturales por hidrazina o por ácidos, tales como ácido fórmico y ácido oxálico, seguido por etapas de degradación de Edman. El heptapéptido se puede acilar luego, por ejemplo, usando la técnica del cloruro de acilo muy conocida por un experto en la técnica y descrita por Chihara *et al.* (1974). La polimixina heptapéptido acilada lleva sólo tres (3) grupos amino libres.

4. Los derivados de polimixina y octapeptina totalmente sintéticos se pueden preparar por métodos muy convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen los procedimientos de síntesis en fase líquida, así como los procedimientos de síntesis en fase sólida descritos, por ejemplo, por Sakura *et al.*, (2004), Tsubery *et al.*, (2000a, 2000b, 2002, 2005), y Ofek *et al.*, (2004). Los métodos incluyen, por ejemplo, el uso de agentes protectores tales como Fmoc, tBoc y CBZ en posiciones estratégicas, así como la etapa de ciclización, donde se usa DPPA (difenil-fosforazidato) o una mezcla de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBop), N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-metilmorfolina (NMM). Los derivados de Fmoc de muchos aminoácidos no triviales, así como D-aminoácidos están disponibles comercialmente.

5. Las reacciones ilustrativas relacionadas con la conversión de los grupos amino libres para generar compuestos de acuerdo con la presente invención que tiene 3 cargas positivas pueden incluir, aunque sin limitación, las siguientes reacciones:

- 5 (A) Reacción del un grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un grupo epóxido reactivo, generando de este modo un enlace β -hidroxiamina;
- (B) Reacción del grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un haluro de sulfonilo reactivo, generando de este modo una enlace de sulfonamida;
- (C) Reacción del grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un ácido carboxílico reactivo, generando de este modo un enlace de amina;
- 10 (D) Reacción del grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un grupo aldehído reactivo (en condiciones reductoras), generando de este modo un enlace de amina;
- (E) Reacción de grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un grupo cetona reactivo (en condiciones reductoras), generando de este modo un enlace de amina; y
- 15 (F) Reacción del grupo amino libre del compuesto con un resto de conjugación que comprende un grupo isocianato reactivo, generando de este modo un enlace de urea.

LISTA DE REFERENCIAS

Chihara S, Tobita T, Yahata M, Ito A, Koyama Y. 1973. Enzymatic degradation of colistin. Isolation and identification of α -N-Acyl α,γ -diaminobutyric acid and colistin nonapeptide. *Agr Biol Chem* 37:2455-2463.

Chihara S, Ito A, Yahata M, Tobita T, Koyama Y. 1974. Chemical synthesis, isolation and characterization of α -N-fattyacyl colistin nonapeptide with special reference to the correlation between antimicrobial activity and carbon number of fattyacyl moiety. *Agric Biol Chem* 38:521-529.

Kimura Y, Matsunaga H, Vaara M. 1992. Polymyxin B octapeptide and polymyxin B heptapeptide are potent outer membrane permeability-increasing agents. *J Antibiot* 45:742-749.

Kurihara T, Takeda H, Ito H, Sato H, Shimizu M, Kurosawa A. 1974. Studies on the compounds related to colistin. IX. On the chemical deacylation of colistin and colistin derivatives. *Yakugaku Zasshi* 94:1491-1494.

Nagai J, Saito M, Adachi Y, Yumoto R, Takano M. 2006. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J Control Release* 112:43-50.

Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Molec Biol Rev* 67:593-656.

Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1-32.

Rose F, Heuer KU, Sibelius U, Hombach-Klonisch S, Ladislau K, Seeger W, Grimminger F. 1999. Targeting lipopolysaccharides by the non-toxic polymyxin B nonapeptide sensitizes resistant *E. coli* to the bactericidal effect of human neutrophils. *J Infect Dis* 182:191-199.

Sakura N, Itoh T, Uchida Y, Ohki K, Okimura K, Chiba K, Sato Y, Sawanishi H. 2004. The contribution of the N-terminal structure of polymyxin B peptides to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity. *Bull Chem Soc Jpn* 77:1915-1924.

Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1978. Chemical modification of peptide antibiotics: Part VI - Biological activity of derivatives of polymyxin B. *Ind J Biochem Biophys* 14:54-58.

Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1979. The polymyxins. *J Scient Industr Res* 38:695-709.

Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1980. Essential amino groups of polymyxin B. *Ind J Biochem Biophys* 17:112-118.

Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 46:723-63.

Teuber M. 1970. Preparation of biologically active mono-N-acetyl(14C)-derivatives of the membrane-specific polypeptide antibiotic polymyxin B. *Z Naturforsch* 25b:117.

Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2000a. Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: Implications to sensitization of Gram-negative bacteria. *J. Med Chem* 43:3085-3092.

Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2000b. The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: Studies on polymyxin B nonapeptide. *Biochemistry* 39:11837-11844.

Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2001. N-terminal modifications of polymyxin B nonapeptide and their effect on antibacterial activity. *Peptides* 22:1675-1681.

Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Eisenstein M, Fridkin M. 2002. Modulation of the hydro-phobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. *Molecular Pharmacology* 62:1036-42. §

Tsubery H, Yaakov H, Cohen S, Giterman T, Matityahou A, Fridkin M, Ofek I. 2005. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3122-3128.

Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395-411.

Vaara M. 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:2255-2260.

Vaara M, Vaara T. 1983a. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature (London)* 303:526-528.

Vaara M, Vaara T. 1983b. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 24:107-113.

Vaara M, Vaara T. 1983c. Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob Agents Chemother* 24:114-122.

Vaara M, Viljanen P, Vaara T, Mäkelä P. 1984. An outer membrane disorganizing peptide PMBN sensitizes *E. coli* strains to serum bactericidal action. *J Immunol* 132:2582-2589.

Viljanen P, Matsunaga H, Kimura Y, Vaara M. 1991. The outer membrane permeability-increasing action of deacylpolymyxins. *J Antibiotics*

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1.

5 Síntesis de péptidos

Se sintetizaron derivados de polimixina ("péptidos NAB" o "compuestos NAB") por química en fase sólida convencional, utilizando la estrategia estándar de protección con Fmoc. El aminoácido en el extremo C está disponible comercialmente como pre-unido a la fase sólida y cuando se escinde de la resina con ácido, produce un ácido carboxílico C-terminal.

10 La estrategia en la protección fue utilizar tres niveles de protección ortogonal, la protección temporal con Fmoc para las funciones alfa-amino, grupos que se eliminan durante la etapa de escisión con ácido y la protección semipermanente para cubrir las funciones de las cadenas laterales reactivas, mientras tiene lugar la reacción de ciclización. Después de la escisión del péptido de la resina, el ácido carboxílico C-terminal se hace reaccionar con una función amino en la cadena lateral de uno de los aminoácidos formando un péptido cíclico. Después de la etapa
15 de ciclización, se eliminan los grupos de protección semipermanentes obteniéndose el péptido NAB.

Por consiguiente, la función alfa-amino del aminoácido se protegió con fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) y en cada ciclo se eliminó el Fmoc con piperidina al 20% en DMF. El aminoácido que está implicado en la ciclización, por ejemplo, ácido diaminobutírico, se protegió con t-butoxicarbonilo (tBoc), un grupo lábil ácido que se eliminó en la
20 etapa de escisión. Los demás aminoácidos que tenían grupos funcionales en las cadenas laterales se protegieron con un grupo que es estable en la etapa de escisión ácida, es decir, benciloxicarbonilo (Z). Los aminoácidos fenilalanina y leucina, naturalmente no necesitaban protección de la cadena lateral. El extremo amino no se protegió; esto permitió una reacción directa en el procedimiento de acilación.

Las etapas de síntesis se realizaron en un sintetizador automatizado comercial que empleaba como activador hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HCTU).

25 El ácido 6-metilheptanoico (6-MHA) era de Ultra Scientific Inc., North Kingstown, RI, USA (número de producto, FLBA 002). Otros ácidos grasos eran de un proveedor estándar.

La acilación se realizó usando un exceso cuatro veces molar de cada aminoácido o del ácido graso, un exceso cuatro veces molar del activador HCTU (véase antes) y un exceso ocho veces molar de N-metilmorfolina. El tiempo de reacción fue 30 minutos.

30 Los aminoácidos se adquirieron ya protegidos a un proveedor estándar. El péptido se separó de la resina por reacción con una solución al 95% de ácido trifluoroacético y 5% de agua durante 2 horas a temperatura ambiente, obteniéndose el producto parcialmente protegido. El péptido resultante se precipitó con éter dietílico.

La mezcla de ciclización utilizada fue hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBop), N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-metilmorfolina (NMM) en un exceso molar de 2, 2 y 4, respectivamente. El péptido se
35 disolvió en dimetilformamida, se añadió la mezcla de ciclización y se dejó reaccionar durante 2 horas. El péptido protegido y ciclizado se precipitó por la adición de éter dietílico frío. Se eliminó cualquier PyBop residual lavando el péptido con agua.

Los grupos de protección de las cadenas laterales restantes (Z) se eliminaron por deshidrogenación catalítica. El péptido se disolvió en ácido acético-metanol-agua (5:4:1), bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un
40 catalizador de paladio/carbón.

El péptido se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando gradientes convencionales de acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético. El producto se secó por liofilización.

El rendimiento fue 20-40 mg que representa aproximadamente 20%-40% del teórico, calculado a partir de la cantidad molar (aproximadamente 100 micromoles) del primer residuo de aminoácido unido a la resina.

45 La pureza, según se estimó por HPLC en fase inversa, fue mayor del 95%. Para los péptidos acilados, el producto de degradación de Edman no reveló ningún residuo de aminoácidos, lo que indicaba que el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal estaba bloqueado, como se esperaba, debido a la N-acilación lograda. Dentro del error experimental, las masas obtenidas fueron las esperadas a partir de los valores teóricos.

Ejemplo 2.

50 Actividad antibacteriana directa de los compuestos contra *Escherichia coli*

Se estudiaron en los péptidos sintetizados en el Ejemplo 1, que llevaban todos al menos dos (2), pero no más de tres (3), cargas positivas, su capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Este ensayo se realizó empleando placas de agar-agar con LB (LB Agar Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, U.S.A.). El organismo indicador *E. coli* IH3080 (K1:O18) era una cepa encapsulada aislada originalmente de un recién nacido que padecía meningitis (Vaara *et al.*, 1984) y obtenida del Instituto Nacional de Salud Pública, Helsinki, Finlandia.

De un cultivo desarrollado durante una noche de IH3080 en agar-agar con LB, se preparó una suspensión de aproximadamente 10^8 células/mL en NaCl al 0,9%. A continuación se pipetearon partes alícuotas de esta suspensión sobre las placas de agar-agar y estas se agitaron suavemente para extender la suspensión uniformemente sobre toda la superficie de la placa. A continuación, se retiró la parte no absorbida de la suspensión usando una pipeta Pasteur. Después de que la superficie se hubo secado, se perforaron en las placas pocillos pequeños (2 mm de diámetro) (cinco pocillos por placa) usando un tubo metálico estrecho con bordes afilados estéril, punta de pipeta de un solo uso y succión a vacío. A continuación se pipetearon en los pocillos muestras (4 μ L y 10 μ L) de la solución peptídica en NaCl al 0,9% (a concentraciones de 1 μ g/mL y 0,1 μ g/mL) y se dejaron que absorbieran los fluidos de muestra. Los controles incluían solución al 0,9% de NaCl sin el compuesto de ensayo. Luego se incubaron las placas durante 18 horas a 37°C, después de lo cual se midieron los diámetros de zonas de inhibición del crecimiento alrededor de cada pocillo; no se redujo el diámetro del pocillo propiamente dicho. Por último, los diámetros se convirtieron en áreas de superficie de inhibición del crecimiento (en mm cuadrados).

La Tabla 2 muestra la actividad antibacteriana de los derivados contra *E. coli* IH3080 en comparación con la de una cantidad igual de polimixina B, así como de algunos derivados de polimixina no relacionados con la presente invención. Los compuestos NAB 734, NAB 737, NAB 739 y NAB 740 eran los compuestos más antibacterianos contra *E. coli* IH3080 e incluso más antibacterianos que la polimixina B. Un pocillo que contenía 4 μ g de NAB 739 produjo un área de inhibición del crecimiento tan amplia como 133 mm cuadrados. En los cuatro compuestos de NAB, la cadena lateral consistía en dos residuos de aminoácido que llevaban grupos hidroxilo.

Contrariamente, los compuestos NAB 739 y NAB 7061 no eran antibacterianos a 4 μ g. Sin embargo, presentaban una actividad antibacteriana notable a 10 μ g. El compuesto NAB 7061 difiere del compuesto NAB 739 solamente por llevar Abu (en lugar de DSer) en R3. La prolongación de la longitud de la parte de ácido graso desde C8 en NAB 7061 hasta C10 en NAB 7062 dio como resultado la manifestación de una actividad antibacteriana notablemente mejorada a 4 μ g. Además, otros tres péptidos (NAB 738, NAB 716 y NAB 719) mostraron actividad antibacteriana notable, aunque claramente más débil que el péptido NAB 739 y los otros compuestos más antibacterianos.

Una propiedad común de los compuestos directamente antibacterianos para *E. coli* era la presencia de tres cargas positivas, de las cuales las tres o al menos dos estaban situadas en posiciones adecuadas en la parte cíclica. En el último caso, las posiciones relativas de dichas cargas afectaban significativamente a la potencia de la actividad antibacteriana contra *E. coli*.

Además, como se muestra en la Tabla 2, también la estructura y longitud de la cadena lateral tiene influencia significativa sobre la potencia de la actividad antibacteriana. La presencia de una cadena lateral que conste de al menos dos residuos de aminoácido parece ser importante para los compuestos antibacterianos contra *E. coli*, puesto que los compuestos que carecían bien de R2 (NAB 713) o tanto de R2 como de R3 (octanoil-PBHP) también carecían de la actividad antibacteriana directa en las condiciones utilizadas en el ensayo. Sin embargo, se puede anticipar, que la falta de estos residuos puede ser compensada utilizando en lugar de residuo de octanoilo, un residuo más prolongado como el R(FA).

Tabla 2

Estructura de los compuestos y su actividad antibacteriana* contra *Escherichia coli* IH3080

	Estructura**				Cargas positivas en		Actividad antibacteriana a	
	Parte FA	Secuencia peptídica***			Parte cíclica	Total	4 μ g	10 μ g
		Cadena lateral	Parte cíclica	SEQ ID No.				
<i>Compuestos de referencia</i>								
Polimixina B	MO (H) A	XTX	cy [XXFLXXT]	1	3	5	79	133

ES 2 575 521 T3

	Estructura**				Cargas positivas en		Actividad antibacteriana	
	Parte FA	Secuencia peptídica***						
		Cadena lateral	Parte cíclica	SEQ ID No.	Parte cíclica	Total	4 µg	10 µg
Colistina (polimixina E)	MO (H) A	XTX	cy [XXLLXXT]	2	3	5	ND	ND
Desacilpolimixina B	-	+XTX	cy [XXFLXXT]	3	3	6	57	113
Desacilcolistina	-	+XTX	cy [XXLLXXT]	4	3	6	79	95
Polimixina B nonapéptido	-	+TX	cy [XXFLXXT]	5	3	5	0	0
Polimixina B heptapéptido	-	-	+cy [XXFLXXT]	6	4	4	0	0
NAB 704	-	+TZ	cy [XXFLXXT]	7	3	4	0	0
NAB 705	-	+ZTZ	cy [XXFLXXT]	8	3	4	0	0
Octanoil-PMBH	OA	-	cy [XXFLXXT]	9	3	3	0	0
<i>Compuestos de la presente invención</i>								
NAB 739	OA	<u>TS</u>	cy [XXFLXXT]	10	3	3	133	177
NAB 740	DA	<u>TS</u>	cy [XXFLXXT]	10	3	3	95	133
NAB 737	OA	<u>TI</u>	cy [XXFTXXT]	11	3	3	133	201
NAB 734	OA	<u>TS</u>	cy [XXFTXXT]	12	3	3	113	177
NAB 7062	DA	TZ	cy [XXFLXXT]	13	3	3	50	99
NAB 7061	OA	TZ	Cy [XXFLXXT]	13	3	3	0	50
NAB 706	MHA	TZ	cy [XXFLXXT]	13	3	3	5	7
NAB 707	MHA	ZTZ	cy [XXFLXXT]	14	3	3	5	7
NAB 716	OA	TX	cy [XXFLZXT]	15	2	3	13	64
NAB 719	OA	TZ	cy [XXFLXXL]	16	3	3	7	50
NAB 738	OA	<u>TA</u>	cy [XXFTXXT]	17	3	3	0	64
NAB 717	OA	TX	cy [XXFLXZT]	18	2	3	0	0
NAB 718	OA	TZ	cy [XXLLXXT]	19	3	3	0	0
NAB 733	OA	<u>AA</u>	cy [XXFLXXT]	20	3	3	0	0

	Estructura**				Cargas positivas en		Actividad antibacteriana	
	Parte FA	Secuencia peptídica***			Parte cíclica	Total	4 µg	10 µg
		Cadena lateral	Parte cíclica	SEQ ID No.				
NAB 736	DA	-	cy [XXFLXXT]	9	3	3	0	0
NAB 713	OA	Z	cy [XXFLXXT]	21	3	3	0	0
NAB 715	OA	TX	cy [XZFLXXT]	22	2	3	0	0
NAB 721	MHA	XTX	cy [XXFLZZT]	23	1	3	0	0
NAB 731	OA	TZ	cy [XKFLXXT]	24	3	3	0	0
NAB 710	OA	TZ	cy [XZFLXXT]	25	2	2	0	7
NAB 709	OA	TZ	cy [XXFLXZT]	26	2	2	0	0
NAB 708	OA	TZ	cy [XXFLZXT]	27	2	2	0	0
NAB 725	OA	XTX	cy [XZFLXZT]	28	1	3	0	0
NAB 726	OA	XTX	cy [XZFLZXT]	29	1	3	0	0
NAB 722	MHA	XTX	cy [XZFLZZT]	30	0	2	0	0
NAB 735	OA	XXX	cy [XZFLZZT]	31	0	3	0	0
NAB 701	-	+TX	cy [XXFLZZT]	32	1	3	0	0
NAB 702	-	+TX	cy [XXFLBBT]	33	1	3	0	0
NAB 703	-	+TX	cy [XXFLJJT]	34	1	3	0	0

* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contenía 4 o 10 microgramos de un compuesto sobre placas con LB

** Códigos de una letra para los residuos de aminoácido: A, Ala; F, Phe; K, Lys; L, Leu; S, Ser; T, Thr; X, Dab; Z, Abu; B, N-γ-formil-Dab; J, N-γ-acetil-Dab. Las letras subrayadas indican residuos que se encuentran en configuración D. Las letras en negrita indican residuos que llevan una carga positiva. Negrita + indica la carga positiva del grupo α-amino en el extremo N libre del péptido. Abreviatura: cy, ciclo.

*** En la lista de secuencias X, Z, B, J y aminoácidos de configuración D se designan Xaa, y se definen como residuos modificados (MOD_RES).

Ejemplo 3.

Actividad antibacteriana directa de los compuestos NAB seleccionados contra *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*

- 5 Se analizó la actividad antibacteriana directa de doce compuestos NAB contra *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 utilizando el método de determinación de susceptibilidad descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Cinco compuestos (NAB 7062, NAB 734, NAB 737, NAB 739 y NAB 740) tenían una notable actividad contra *A. baumannii*. En el Ejemplo 2, los mismos compuestos

demonstraron que eran muy potentes contra *E. coli*. La actividad antibacteriana de los compuestos NAB 739 y NAB 740 era tan fuerte o incluso más fuerte que la de la polimixina B.

5 Contra *P. aeruginosa*, los compuestos NAB más activos fueron NAB 739, NAB 740, así como NAB 736 que es bastante inactivo contra *E. coli* y *Acinetobacter baumannii*. El compuesto NAB 740 era el compuesto más activo y su actividad era tan fuerte como la de la polimixina B. Los tres compuestos NAB carecen de cargas positivas en la cadena lateral y eran todavía activos contra *P. aeruginosa*. Este hallazgo está en contra de la conclusión de Srinivasa y Ramachandran (1980a) de que los grupos amino libres en R1 y R3 son esenciales para la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*.

10 Sorprendentemente, el compuesto NAB 736 es bastante eficaz contra *P. aeruginosa* mientras que octanoil-PMBH es mucho menos eficaz. En consecuencia, el alargamiento de la parte R(FA) desde C8 hasta C10 tiene un marcado efecto sobre la actividad.

Tabla 3

Actividad antibacteriana* de doce (12) nuevos compuestos contra *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*

	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	4 µg	10 µg	4 µg	10 µg
NAB 7061	0	0	0	0
NAB 7062	13	38	0	0
NAB 716	0	0	0	0
NAB 717	0	0	0	0
NAB 718	0	0	0	0
NAB 719	0	0	0	0
NAB 736	0	0	38	79
NAB 734	38	95	13	50
NAB 737	38	79	0	28
NAB 738	0	0	0	0
NAB 739	113	177	38	79
NAB 740	133	201	64	133
Polimixina B	113	154	95	133
PMBN	0	0	113	177
Octanoil-PMBH	nd	nd	0	13

* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contenía 4 o 10 µg del compuesto sobre placas con LB

Ejemplo 4.**Actividad antibacteriana directa del compuesto NAB 734 contra las bacterias gram-negativas seleccionadas**

La susceptibilidad de once cepas bacterianas gram-negativas (nueve especies diferentes) al compuesto NAB 734 y a la polimixina B se comparó con el método de determinación de susceptibilidad descrito en el Ejemplo 2. Las cepas incluían las que pertenecían a las especies *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis*, ambas especies conocidas generalmente por ser resistentes a las polimixinas. Además, la determinación de la sensibilidad también se realizó utilizando la bacteria gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, también conocida generalmente por ser resistente a las polimixinas. Diez de las cepas procedían de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) y una de CCUG (Culture Collection of University of Gothenburg, Suecia). La fuente de *E. coli* IH3080 se ha descrito en el Ejemplo 2. El sulfato de polimixina B era de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los resultados de la Tabla 4 muestran que el compuesto NAB 734 puede ser considerado en general como aproximadamente tan potente como la polimixina B contra *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*. Parece ser algo menos potente que la polimixina B contra *Acinetobacter baumannii* y claramente menos potente que la polimixina B contra *Pseudomonas aeruginosa*. Las representantes de las especies bacterianas resistentes a las polimixinas conocidas eran también resistentes al compuesto NAB 734. Esto sugiere que el compuesto NAB 734 tiene una acción antibacteriana muy específica y que su modo de acción es bastante similar al de la polimixina B.

Tabla 4**Actividad antibacteriana* del compuesto NAB 734 contra las bacterias gram-negativas seleccionadas y *Staphylococcus aureus***

Cepa	NAB 734		Sulfato de polimixina B	
	4 µg	10 µg	4 µg	10 µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	133	177	95	133
<i>E. coli</i> IH 3080	113	154	95	133
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	64	113	79	113
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 45421	64	104	95	133
<i>K. oxytoca</i> ATCC 13182	95	143	79	104
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	133	177	95	143
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	133	177	95	154
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	57	79	113	154
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13	50	95	133
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0

* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de pocillos que contenían 4 o 10 µg del compuesto sobre placas con LB

Ejemplo 5.

La capacidad de los compuestos NAB para sensibilizar *E. coli* IH3080 a un antibiótico modelo, rifampina

5 También se estudió la capacidad para sensibilizar *E. coli* IH3080 a la rifampina de nuevos péptidos NAB de acuerdo con la presente invención y compuestos de referencia que llevan todos al menos dos (2), pero no más de tres (3) cargas positivas. Este ensayo se realizó en paralelo con las determinaciones de susceptibilidad descritas en el Ejemplo 2 y empleando placas con LB que contenían concentraciones crecientes (0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL) de rifampina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

10 La Tabla 5 muestra la actividad de los compuestos NAB (4 µg) contra *E. coli* IH3080 en presencia de rifampina (0,1 y 1 µg/mL) en comparación con la actividad de una cantidad igual de las sustancias antes descritas conocidas por sensibilizar las bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos, es decir, la polimixina B heptapéptido, desacilpolimixina B, desacilcolistina, polimixina B nonapéptido, así como con polimixina B. Los compuestos también incluían octanoil-PMBH, un agente del que no se ha informado previamente que sea capaz de sensibilizar bacterias a los antibióticos.

15 Varios compuestos NAB sensibilizaron *E. coli* IH3080 al efecto antibacteriano de una concentración tan baja de rifampina como 0,1 µg/mL. En ausencia de los compuestos de ensayo, se necesitó una concentración cien veces (10 µg/mL) de rifampina para el efecto inhibitor. Varios compuestos que carecían de una actividad antibacteriana directa notable a 4 µg fueron capaces de sensibilizar la bacteria diana a la rifampina. Dichos compuestos incluían NAB 7061, NAB 717, NAB 718 y NAB 733.

20 Además, la mayoría de los compuestos NAB que tenían actividad antibacteriana directa, es decir, actividad antibacteriana en ausencia de rifampina (véase el Ejemplo 2), inhibían la bacteria diana incluso más eficazmente en presencia de rifampina. La capacidad de los compuestos NAB 734, NAB 737, NAB 738 y NAB 739 más activos era incluso claramente mejor que la de PMBN, el permeabilizador eficaz muy conocido de la membrana externa.

25 Los compuestos NAB más activos llevan tres (3) cargas positivas y tienen al menos dos (2) cargas positivas situadas adecuadamente en la parte cíclica, afectando su situación relativa a la potencia de la actividad sensibilizadora. En realidad se debe observar, que el compuesto NAB 716, que sólo lleva dos cargas positivas en la parte cíclica y tiene la tercera carga positiva en forma de un residuo Dab en R3, es notablemente capaz de sensibilizar *E. coli* a rifampina.

30 Entre la serie de compuestos todos los que tienen residuo de octanoilo, como R(FA), octanoil-PMHP, y que carecen tanto de R2 como de R3, poseían la actividad de sensibilización más débil, el compuesto NAB 713, que carece de R2, poseía una actividad algo mejor y el compuesto NAB 7061, que posee tanto R2 como R3, tenía una actividad notable. Esto indica que la presencia de R2 y R3 es ventajosa. Sin embargo, su ausencia puede ser compensada al menos parcialmente por el alargamiento de la parte R(FA) como en el compuesto NAB 736. Dicho compuesto lleva un residuo de decanoilo como la parte R(FA), carece tanto de R2 como de R3, y es bastante activo como sensibilizador.

35 Los compuestos NAB que llevan ambas de sus dos (2) cargas positivas en la parte cíclica eran menos activos que los compuestos NAB análogos estructuralmente diferentes que llevan sus tres (3) cargas positivas en la parte cíclica, o para un compuesto (NAB 708), inactivo en las condiciones de estudio empleadas.

40 Los compuestos NAB que llevan dos (2) cargas positivas en la cadena lateral y una (1) carga positiva en la parte cíclica tienen una actividad muy modesta, si la tienen, en las condiciones de estudio empleadas. El compuesto NAB 735, que lleva sus tres (3) cargas positivas en la cadena lateral es inactivo en las condiciones de estudio empleadas. Una vez más las posiciones relativas de dichas cargas en la parte cíclica afectaron la potencia de la actividad de sensibilización.

Tabla 5

Actividad antibacteriana de los compuestos (4 µg) contra *E. coli* IH3080 en presencia de rifampina*

	Actividad antibacteriana en presencia de la concentración (µg/mL) de rifampina de		
	0	0,1	1,0
<i>Compuestos de referencia y otros</i>			
Polimixina B	79	95	104

ES 2 575 521 T3

	Actividad antibacteriana en presencia de la concentración (µg/mL) de rifampina de		
	0	0,1	1,0
Colistina (polimixina E)	ND	ND	ND
Desacilpolimixina B	57	79	127
Desacilcolistina	79	87	127
Polimixina B nonapéptido	0	20	113
Polimixina B heptapéptido	0	0	38
NAB 704	0	0	24
NAB 705	0	0	5
Octanoil-PMBH	0	0	38
<i>Nuevos compuestos de la presente invención</i>			
NAB 739	133	177	201
NAB 740	95	95	95
NAB 737	133	177	201
NAB 734	113	154	201
NAB 7062	50	104	104
NAB 7061	0	113	155
NAB 706	5	79	133
NAB 707	5	87	113
NAB 716	13	133	165
NAB 719	7	79	95
NAB 738	0	133	177
NAB 717	0	71	95
NAB 718	0	13	133
NAB 733	0	95	113
NAB 736	0	113	133
NAB 713	0	20	38

	Actividad antibacteriana en presencia de la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de rifampina de		
	0	0,1	1,0
NAB 715	0	0	33
NAB 721	0	13	28
NAB 731	0	0	5 (22**)
NAB 710	0	7	13
NAB 709	0	0	13
NAB 708	0	0	0
NAB 725	0	0	0
NAB 726	0	0	0
NAB 722	0	0	0
NAB 735	0	0	0
NAB 701	0	0	0
NAB 702	0	0	0
NAB 703	0	0	0
* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contenía 4 μg de un compuesto sobre placas sin rifampina o con rifampina (0,1 o 1,0 $\mu\text{g/mL}$)			
** El valor entre paréntesis se obtuvo utilizando un pocillo que contenía 10 μg del compuesto			

Ejemplo 6.**La capacidad de los compuestos NAB para sensibilizar *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* a un antibiótico modelo, rifampina**

- 5 También se estudiaron péptidos NAB relacionados con la presente invención para determinar su capacidad para sensibilizar *A. baumannii* y *P. aeruginosa* a rifampina (Tabla 6). Esta se analizó en paralelo con las determinaciones de susceptibilidad descritas en el Ejemplo 3 y empleando placas con LB que contenían concentraciones crecientes (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$) de rifampina.

- 10 Varios compuestos NAB poseían una capacidad muy marcada para sensibilizar *A. baumannii* a rifampina. La capacidad de los compuestos NAB 734, NAB 737 y NAB 739 más activos fue claramente incluso mejor que la de PMBN, el permeabilizador eficaz muy conocido de la membrana externa. El compuesto NAB 739 inhibía el crecimiento de *P. aeruginosa* algo mejor en presencia de rifampina que en su ausencia.

Tabla 6

- 15 **Actividad antibacteriana* de doce (12) compuestos nuevos (4 μg) contra *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de rifampina (0,1 o 0,3 $\mu\text{g/mL}$)**

	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606			<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853		
	0	0,1	0,3	0	0,1	0,3
NAB 7061	0	28	50	0	0	0
NAB 7062	13	50	95	0	0	7
NAB 716	0	0	64	0	0	0
NAB 717	0	0	50	0	0	0
NAB 718	0	0	38	0	0	0
NAB 719	0	154	133	0	0	7
NAB 736	0	95	154	38	38	38
NAB 734	38	201	283	13	20	20
NAB 737	38	201	283	0	20	20
NAB 738	0	95	154	0	13	13
NAB 739	113	177	314	38	64	64
NAB 740	133	154	154	64	64	64
PMBN	0	133	154	113	113	154
Octanoil-PMBH	ND	ND	ND	0	13	13

* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contenía 4 µg de un compuesto sobre placas sin rifampina (control) o con rifampina (0,1 o 0,3 µg/mL)

Ejemplo 7.

El compuesto NAB 7061 sensibiliza *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* a una amplia gama de agentes antibacterianos

- 5 Las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de un conjunto representativo de agentes antimicrobianos utilizados clínicamente se determinaron para dos cepas de *E. coli* (ATCC 25922 e IH 3080), *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *E. cloacae* ATCC 23355 utilizando el medio agar-agar de Mueller-Hinton (número de producto LabO39; LABM Ltd., Bury, Lancs, Reino Unido) en presencia del compuesto NAB 7061 (4 µg/mL), así como en su ausencia. Las CIM se determinaron utilizando tiras E (Biodisk Ltd., Solna, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La
- 10 concentración del compuesto NAB 7061 utilizada no inhibía por sí sola el crecimiento de las bacterias diana. La CIM del compuesto NAB 7061 para *E. coli* IH 3080 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 fue >16 µg/mL, para *E. coli* ATCC 25922 16 µg/mL y para *E. cloacae* ATCC 23355 8 µg/mL.

Los resultados se muestran en la Tabla 7. El compuesto NAB 7061 a una concentración de 4 µg/mL era capaz de

15 sensibilizar las cepas de ensayo a rifampina por un factor que variaba desde 170 hasta 1500. El factor de sensibilización se define como la relación entre la CIM de un antibiótico en ausencia del compuesto NAB 7061 y la de un antibiótico en presencia de 4 µg/mL del compuesto NAB 7061. También se observaron factores de sensibilización extremadamente altos a la claritromicina (63-380), mupirocina (24-512), azitromicina (31-94), eritromicina (21-48) y para algunas de las cepas, a ácido fusídico, quinupristina-dalfopristina, clindamicina, linezolid y vancomicina. Todos estos agentes antibacterianos son notablemente hidrófobos o grandes (vancomicina) y se sabe

20 que son excluidos por la membrana externa intacta de las bacterias gram-negativas, pero penetran en la membrana

externa dañada. No se encontró una sensibilización importante (factor de sensibilización <2, ensayada utilizando *E. coli* ATCC 25922) a piperacilina, ceftazidima, cefotaxima, levofloxacina, ciprofloxacina, meropenem y tobramicina, todos agentes que son hidrófilos o relativamente hidrófilos y contra los cuales la membrana externa intacta no es una barrera de permeabilidad eficaz.

5 **Tabla 7**

Factores de sensibilización* a los agentes antibacterianos seleccionados a una concentración de 4 µg/mL de NAB 7061

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> IH 3080	<i>K. pneum.</i> ATCC 13883	<i>E. cloacae</i> ATCC 23355
Rifampina**	250 - 750	170 - 350	250 - 500	750 - 1500
Claritromicina***	170 - 380	190 - 260	63	85 - 380
Mupirocina***	64 - 170	64 - 85	24 - 32	250 - 512
Azitromicina***	24 - 64	31 - 94	31 - 43	32
Eritromicina***	32 - 48	32 - 42	24 - 48	21 - 43
Acido fusídico	> 43	> 43	> 4	> 8
Quinupristina-dalfopristina	> 21	> 21	1	> 5
Clindamicina	6	12	43	32
Linezolid	> 11	> 8	> 4	> 8
Vancomicina	5	2,5	1	32
Polimixina B	5	2	1	4
Trimetoprima	4	3	2	3
Moxifloxacina	2,5	4	1,4	4
* El factor de sensibilización es la relación entre la CIM del antibiótico en ausencia del compuesto NAB 7061 y la del antibiótico en presencia de 4 µg/mL del compuesto NAB 7061				
** Resultados de cinco determinaciones independientes				
*** Resultados de dos determinaciones independientes				

Ejemplo 8.10 **Susceptibilidad de 33 cepas diferentes de bacterias gram-negativas a rifampina y claritromicina en presencia del compuesto NAB 7061 (4 µg/mL)**

Las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de rifampina y claritromicina para un conjunto representativo de diferentes cepas de bacterias gram-negativas clínicamente relevantes se determinaron por el método E-test como en el Ejemplo 7 y utilizando agar-agar de Mueller-Hinton con o sin el compuesto NAB 7061 (4 µg/mL). Esta concentración del compuesto NAB 7061 no inhibía ella sola el crecimiento de las bacterias diana. Las cepas precedentes de ATCC (11 cepas), CCUG (11 cepas) y NCTC (The National Collection of Type Cultures, Colindale, Reino Unido; 2 cepas). Ocho cepas (las cepas F) fueron adquiridas a Mobidiag Ltd., Helsinki, Finlandia. La fuente de *E. coli* IH 3080 se ha dado en el Ejemplo 2. El factor de sensibilización se definió en el Ejemplo 7.

15

Los resultados se muestran en la Tabla 8. Para todas las cepas (17) que pertenecían al grupo que consistía en *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *C. freundii*, la CIM de rifampina era tan baja como $\leq 0,125$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia del compuesto NAB 7061 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el factor de sensibilización variaba desde 85 hasta 2000. Se obtuvieron resultados muy similares con claritromicina. Para quince de las diecisiete cepas pertenecientes al grupo que consistía en *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *C. freundii*, la CIM de claritromicina era tan baja como $\leq 0,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia del compuesto NAB 7061 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y para las 17 cepas el factor de sensibilización variaba desde 90 hasta 1000. Las cepas de *K. pneumoniae* fueron algo más resistentes a ambos antibióticos y los factores de sensibilización variaron entre 10 y 500. Para las tres cepas de *A. baumannii*, los factores de sensibilización variaron entre 24 y 125, y los valores de la CIM resultantes eran bastante bajos (a rifampina $\leq 0,125$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a claritromicina $\leq 0,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5

10

Tabla 8

La capacidad de NAB 7061 para sensibilizar bacterias gram-negativas a antibióticos modelo (rifampina y claritromicina)

Cepa bacteriana	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de rifampina en presencia de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NAB 7061*	Factor de sensibilización a rifampina**	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de claritromicina en presencia de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NAB 7061	Factor de sensibilización*** a claritromicina
<i>E. coli</i> ATCC 25922****	0,016 - 0,047	250 - 750	0,094 - 0,125	170 - 400
<i>E. coli</i> IH 3080****	0,023 - 0,047	170 - 350	0,047 - 0,064	190 - 260
<i>E. coli</i> CCUG 41421	0,032 - 0,064	125	0,125	400
<i>E. coli</i> CCUG 41422	0,094 - 0,125	170 - 256	0,25	100
<i>E. coli</i> CCUG 41424	0,064 - 0,094	85 - 94	0,125	130
<i>E. coli</i> CCUG 41425	0,016 - 0,023	200 - 260	0,047	340
<i>E. coli</i> CCUG 41427	0,032 - 0,064	100 - 250	0,064	250
<i>E. coli</i> CCUG 41429	0,032	125 - 250	0,064	250
<i>E. coli</i> CCUG 41432	0,032	160 - 250	0,064	90
<i>E. coli</i> NCTC 13351	0,032 - 0,047	340 - 500	0,032	750
<i>E. coli</i> NCTC 13353	0,064	125 - 250	1	260
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883****	0,064 - 0,125	250 - 500	0,19	60
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 45421	2-3	10 - 20	24	10
<i>K. pneumoniae</i> F145	0,19 - 0,25	170	0,25	170
<i>K. pneumoniae</i> F144	0,19	>170	0,75	64
<i>K. pneumoniae</i> F136	0,75	> 43	2	24
<i>K. oxytoca</i> ATCC 13182	0,032 - 0,047	680 - 750	0,25	260
<i>K. oxytoca</i> CCUG 51683	0,012 - 0,023	700 - 2000	0,19	250

Cepa bacteriana	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de rifampina en presencia de 4 $\mu\text{g/mL}$ de NAB 7061*	Factor de sensibilización a rifampina**	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de claritromicina en presencia de 4 $\mu\text{g/mL}$ de NAB 7061	Factor de sensibilización*** a claritromicina
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355****	0,008 - 0,016	750 - 1500	0,25 - 0,75	90 - 400
<i>E. cloacae</i> CCUG 52947	0,032 - 0,047	500 - 1000	0,38	350
<i>E. cloacae</i> F230	0,016 - 0,032	1500	0,047	1000
<i>E. cloacae</i> F232	0,023	1400	0,094	500
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	0,023 - 0,032	500 - 1000	0,125	250
<i>Ac. baumannii</i> ATCC 19606	0,094 - 0,125	24 - 32	0,5	50
<i>Ac. baumannii</i> F263*****	0,032 - 0,19	21 - 125	0,38	40
<i>Ac. baumannii</i> F264	0,125	32	0,25	100
<i>S. maltophilia</i> ATCC 17444	2	4 - 8	64	4
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	16	<2	96	<2
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	1- 6	<2	24	<2
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	1 - 1,5	<2	24	<2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12 - 16	2	32	<2
<i>P. aeruginosa</i> CCUG 51971	>32	<2	64	<2
<i>P. aeruginosa</i> F58	>32	<2	256	<2
* Resultados de dos determinaciones independientes				
** El factor de entre la CIM sensibilización es la relación de la rifampina en ausencia de compuesto NAB 7061 y la CIM en presencia de 4 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto NAB 7061				
*** El factor de sensibilización es la relación entre la CIM de la claritromicina en ausencia del compuesto NAB 7061 y la CIM en presencia de 4 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto NAB 7061				
**** Resultados de cinco (rifampina) y dos (claritromicina) determinaciones independientes				
***** Resultados de tres determinaciones independientes (rifampina)				

Ejemplo 9.

El compuesto NAB 7061 sensibiliza las cepas resistentes a carbapenemas de *Acinetobacter* a carbapenemas

5 Las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de dos carbapenemas, imipenema y meropenema, para tres cepas de *A. baumannii* se determinaron por el método de E-test como en el Ejemplo 7 y utilizando agar-agar de Mueller-Hinton con o sin el compuesto NAB 7061 (4 $\mu\text{g/mL}$). Esta concentración del compuesto NAB 7061 no inhibió el solo el crecimiento de las bacterias diana. El factor de sensibilización fue definido en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Tabla 9. El compuesto NAB 7061 sensibilizó ambas cepas resistentes a carbapenemas (F263, F264) a ambas carbapenemas en un factor ≥ 4 .

Tabla 9

Actividad antibacteriana de imipenema y meropenema contra cepas de *Acinetobacter baumannii* en ausencia del compuesto NAB 7061 y en presencia del compuesto NAB 7061 (4 µg/mL)

Cepa	CIM (µg/mL) de imipenema a la concentración indicada (µg/mL) de NAB 7061		CIM (µg/mL) de meropenema a la concentración indicada (µg/mL) de NAB 7061	
	0	4	0	4
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0,38	0,38	1,5	0,75
<i>A. baumannii</i> F263	>32	8	>32	6
<i>A. baumannii</i> F264	24	6	32	4

5 Ejemplo 10.

El compuesto NAB 7061 sensibiliza *E. coli* al complemento en suero normal reciente

La capacidad del compuesto NAB 7061 para sensibilizar una cepa lisa encapsulada de *E. coli* a la acción bactericida de suero de cobaya (SC) normal fue estudiada por el método descrito por Vaara *et al.* (1984). Se cultivó *E. coli* IH 3080 (O18,K1) en caldo LB (LB broth Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, USA) a 37°C en un agitador giratorio en fase de crecimiento logarítmico temprana, se lavó con PBS (solución salina tamponada con fosfato, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ x 2H₂O y 0,2 g de KH₂PO₄ por litro) y se volvió a poner en suspensión en PBS, hasta aproximadamente 10⁹ células/mL. El suero de cobaya se utilizó como fuente del complemento. Se conservó a -70°C antes de su uso. Para inactivar el complemento, el suero se incubó a 56°C durante 30 minutos.

El procedimiento experimental fue el siguiente. Se inoculó 10% de SC en PBS con aproximadamente 500 UFC (unidades formadoras de colonias) de bacterias por mL y se pipeteó en partes alícuotas de 0,2 mL en pocillos de placas de microtitulación. Los pocillos contenían ya cantidades crecientes del compuesto NAB 7061 en 0,020 mL de NaCl al 0,9%. La placa se incubó a 37°C durante 2 h después de lo cual se vació cada pocillo sobre placas con LB. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C y se contaron las colonias desarrolladas.

Los resultados se muestran en la Tabla 10. El compuesto NAB 7061 él solo no redujo significativamente el recuento de UFC en ausencia del suero de cobaya ni en presencia de SC al 10% inactivado por calor. Sin embargo, una concentración de NAB 7061 tan baja como 2 µg/mL fue suficiente para reducir el recuento de UFC en un factor de aproximadamente 100 en presencia de SC reciente al 10%. En consecuencia, el compuesto NAB 7061 actúa sinérgicamente con la maquinaria del complemento bactericida presente en el suero reciente, como lo hace PMBN, el agente muy conocido por tener esta propiedad.

25 Tabla 10

La actividad bactericida sinérgica del compuesto NAB 7061 y suero de cobaya (SC) al 10% contra *E. coli* IH 3080 (O18:K1)*

	Concentración del compuesto NAB 7061 (µg/mL)			
	0	1	2	4
Ninguno (PBS)	100	97	97	79
SC al 10%	270	230	2	0
SC al 10%, inactivado por calor	500	500	500	250
* Medida como % de supervivencia después de tratamiento de 2 horas a 37°C				

Ejemplo 11.**Afinidad reducida del compuesto NAB 7061 a la membrana de borde en cepillo (abreviadamente BBM por sus siglas en inglés *Brush-Border Membrane*) de la corteza renal**

5 La unión de los compuestos de acuerdo con esta invención a la membrana de borde en cepillo (BBM) aislada de la corteza renal se puede medir indirectamente midiendo su capacidad para inhibir la unión de gentamicina radiomarcada a la BBM. Por consiguiente, los compuestos de acuerdo con esta invención que tienen menos afinidad a la BBM que por ejemplo la polimixina B inhiben la unión de gentamicina radiomarcada en menor grado que lo hace la polimixina B.

10 La BBM se aisló de la corteza renal de ratas albinas machos utilizando la técnica de precipitación con Mg^{2+} /EGTA como ha sido descrito por Nagai *et al.*, (2006). La unión de gentamicina se midió, según el método descrito por Nagai *et al.*, (2006), incubando vesículas de la BBM (20 μ L) en HEPES 10 mM (pH 7,5) con manitol 300 mM en presencia de [3 H]-gentamicina 20 μ M (American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA)) con o sin el compuesto de ensayo o un control positivo. Después de incubación de 60 minutos a 4°C, se añadió 1 mL del tampón enfriado con hielo antes descrito y la mezcla se filtró a través de un filtro Millipore (0,45 μ m; HAWP). El filtro se lavó con el tampón y se midió la radiactividad remanente en el filtro usando un contador de centelleo líquido. Los valores de la Cl_{50} se determinaron como en Nagai *et al.*, (2006) usando la ecuación de Hill.

15 Los valores de la Cl_{50} (μ M) para el compuesto NAB estudiado y los controles fueron los siguientes: 187,3 + 24,3 para el compuesto NAB 7061 (valor medio de dos experimentos independientes, cada uno con tres determinaciones paralelas), 39,3 + 5,5 para polimixina B (valor medio de dos experimentos independientes, cada uno con tres determinaciones paralelas) y 90,2 + 9,7 para la gentamicina sin marcar (tres determinaciones paralelas). Por consiguiente, la afinidad del compuesto NAB 7061 a la BBM es sólo aproximadamente la mitad de la afinidad de gentamicina a la BBM y aproximadamente un quinto de la afinidad de la polimixina B a la BBM.

Ejemplo 12.**La actividad del compuesto NAB 7061 en un modelo de peritonitis experimental por *E. coli* en ratones**

25 Una suspensión de *E. coli* IH 3080 (K1:O18) en solución salina (NaCl al 0,9%) se preparó a partir de un cultivo de una noche sobre una placa de agar-agar con sangre (Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca). A todos los ratones (hembra NMR1 de Harlan Scandinavia, Allerød, Dinamarca; peso, 25-30 g) se les inoculó por vía intraperitoneal 0,5 mL de la suspensión que contenía $0,96 \times 10^6$ UFC por mL en el cuadrante inferior lateral del abdomen. Transcurrida 1 h, se determinó el recuento de UFC de tres ratones y los ratones restantes (cuatro ratones por grupo) se trataron con una inyección subcutánea de 0,2 mL de solución de eritromicina en solución salina (correspondiente a 5 mg/kg de peso) o una solución del compuesto NAB 7061 en solución salina (correspondiente a 5 mg/kg de peso) o tanto con eritromicina como con el compuesto NAB 7061 (correspondiente a 5 mg/kg de peso de ambos fármacos; administrados en dos sitios separados). El grupo de control recibió dos inyecciones de 0,2 mL de solución salina. 4,5 horas después de la infección, todos los ratones fueron anestesiado con CO_2 y sacrificados. Se inyectó intraperitonealmente solución salina estéril (2 mL) y el abdomen se masajeó suavemente antes de abrirlo y se tomaron muestras de fluido. Diluciones apropiadas del fluido se extendieron sobre placas de agar-agar con sangre, se incubaron las placas durante una noche y se contaron las colonias.

35 Una hora después de la infección, el recuento de UFC fue $0,74 (+ 0,7) \times 10^6$ por mL. 4,5 horas después de la infección (correspondiente a 3,5 horas después del tratamiento), los recuentos de UFC (por mL) fueron $11,1 (\pm 6,2) \times 10^6$ (grupo de control), $8,9 (\pm 6,4) \times 10^6$ (grupo de eritromicina), $1,1 (\pm 0,6) \times 10^6$ (grupo del compuesto NAB 7061) y $2,1 (\pm 1,2) \times 10^6$ (grupo del compuesto NAB más eritromicina). Por consiguiente, en ausencia del compuesto NAB 7061, el recuento bacteriano aumentó en un factor de 15 (grupo de solución salina) o en un factor de 12 (grupo de eritromicina), mientras que en presencia del compuesto NAB 7061, los factores correspondientes variaron desde 1,5 hasta 3.

Ejemplo 13.**Estudios de toxicidad del compuesto NAB 7061**

50 Se determinó la toxicidad en ratas jóvenes (con un peso aproximado de 150 g al comienzo del estudio) administrando dosis (1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/kg al día) del compuesto NAB 7061, así como el compuesto de control polimixina B, intravenosamente dos veces (2) al día durante dos semanas. Se estudió un grupo de diez (10) ratas para cada régimen de dosis. Las observaciones clínicas se realizaron diariamente, el peso se midió dos veces por semana y el consumo de alimentos dos veces por semana. Al final de la semana 2, se sacrificaron todos los animales.

55 El compuesto de control, polimixina B, influyó negativamente sobre la ganancia de peso a una dosis tan baja como 1 mg/kg al día, mientras que la dosis más baja del compuesto NAB 7061 que tenía este efecto fue 8 mg/kg. La polimixina B causó mortalidad a 32 mg/kg al día (mortalidad del 100%), mientras que todas las ratas que recibieron

5 el compuesto NAB 7061 permanecieron vivas durante el estudio. Al final del estudio, el nitrógeno ureico en sangre (NUS) era 15% mayor en el grupo que recibió 16 mg/kg de polimixina al día que en el grupo de control o grupo de dosis bajas de polimixina (1 mg/kg al día). En el grupo que recibió el compuesto NAB 7061 a la dosis de 16 mg/kg al día, no se encontró dicho aumento y en el grupo que recibió el compuesto NAB 7061 a la dosis de 32 mg/kg al día, el aumento fue 7%.

10 Se realizaron una histopatología de riñones de cada animal y una histopatología de todos los tejidos en tres grupos que habían recibido altas dosis del compuesto NAB 7061. No se encontraron pruebas patológicas relacionadas con el compuesto NAB 7061 en la patología general ni en la histopatología de ningún órgano ni en la histopatología de los riñones en ningún animal que había recibido el compuesto NAB 7061.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Northern Antibiotics Ltd Vaara,
Martti Vaara,
Timo
- <120> Derivados de polimixina y sus usos
- 10 <130> 2070627PC / NAB-1
- <150> US 60/837,426
<151> 11-08-2006
- 15 <150> DK 200601055
<151> 11-08-2006
- <160> 34
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 10
<212> PRT
- 25 <213> bacteriano
- <220>
<221> MOD_RES
30 <222> (1)..(1)
<223> Dab
- <220>
35 <221> MOD_RES
<222> (3)..(5)
<223> Dab
- <220>
40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(10)
<223> circular
- <220>
45 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Phe
- <220>
50 <221> MOD_RES
<222> (8)..(9)
<223> Dab
- <400> 1
55 **Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr**
1 5 10
- <210> 2
<211> 10
<212> PRT
- 60 <213> bacteriano
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> Dab
 <220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (3)..(5)
 <223> Dab
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 10 <222> (4)..(10)
 <223> circular
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (6)..(6)
 <223> D-Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (8)..(9)
 <223> Dab
 <400> 2
 Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 25 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Dab
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(5)
 <223> Dab
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 <223> circular
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> D-Phe
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Dab
 55 <400> 3
 Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5 10
 <210> 4
 60 <211> 10
 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Dab
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(5)
 <223> Dab
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 <223> circular
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> D-Leu
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Dab
 25
 <400> 4
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10
 30
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(4)
 <223> Dab
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 55
 <400> 5
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
 60
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (1)..(2)
 <223> Dab

<220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(7)
 <223> circular

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> D-Phe

<220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Dab

<400> 6
 20 **Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr**
1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 30 <223> Abu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 35 <223> Dab

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 40 <223> circular

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 45 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 50 <223> Dab

<400> 7
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 60 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Abu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Abu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(5)
 10 <223> Dab

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 15 <223> circular

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 20 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 25 <223> Dab

<400> 8
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

30 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> bacteriano

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(2)
 <223> Dab

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(7)
 <223> circular

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> D-Phe

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Dab

55 <400> 9
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

60 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ser
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 25
 <400> 10
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
 30
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Thr
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 60
 <400> 11
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr
1 5
 <210> 12
 <211> 9

<212> PRT
 <213> bacteriano

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ser

 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab

 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular

 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab

 <400> 12
 30 Thr Xaa Xaa xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr
 1 5

 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> bacteriano

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 40 <223> Abu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 45 <223> Dab

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 50 <223> circular

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 55 <223> D-Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 60 <223> Dab

 <400> 13
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> bacteriano

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Abu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 15 <223> Abu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(5)
 20 <223> Dab

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 <223> circular
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> D-Phe
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Dab
 40
 <400> 14
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(4)
 <223> Dab
 50

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 55

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Abu
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Dab
 10
 <400> 15
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Abu
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 40
 <400> 16
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu
1 5
 45
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ala
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 60
 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab

15 <400> 17
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 18
 <211> 9

20 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (2)..(4)
 <223> Dab

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 30 <222> (3)..(9)
 <223> circular

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (7)..(7)
 <223> Dab

<220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (8)..(8)
 <223> Abu

<400> 18
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

50 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Abu

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)

<223> Dab
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 5 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (5)..(5)
 <223> D-Leu
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 <400> 19
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
 20 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(2)
 <223> D-Ala
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 50 <400> 20
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
 55 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> bacteriano
 <220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (1)..(1)
 <223> Abu

- 5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> Dab
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(8)
<223> circular
- 15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Phe
- 20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> Dab
- 25 <400> 21
Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
- 30 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> bacteriano
- 35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> Dab
- 40 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(9)
<223> circular
- 45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Abu
- 50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Phe
- 55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> Dab
- 60 <400> 22
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5
- <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> bacteriano
- <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Dab

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(5)
 <223> Dab

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 <223> circular

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> D-Phe

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Abu

25 <400> 23
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 24
 <211> 9

30 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Abu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Dab

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Dab

<400> 24
Thr Xaa Xaa Lys Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

60 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT

<213> bacteriano
 <220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (2)..(2)
 <223> Abu
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (3)..(3)
 <223> Dab
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 15 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (4)..(4)
 <223> Abu
 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (7)..(8)
 <223> Dab
 <400> 25
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5
 35 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano 1
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Abu
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Dab

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 5 <223> Abu

 <400> 26
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5

 10 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano

 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Abu

 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab

 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular

 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Abu

 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Dab

 45 <400> 27
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 1 5

 <210> 28
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> bacteriano

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Dab

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Dab

 60 <220>

- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (4)..(10)
- <223> circular

- 5 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5)..(5)
- <223> Abu

- 10 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (6)..(6)
- <223> D-Phe

- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (8)..(8)
- <223> Dab

- 20 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (9)..(9)
- <223> Abu

- 25 <400> 28
- Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr**
- 1 5 10**

- <210> 29
- <211> 10
- 30 <212> PRT
- <213> bacteriano

- <220>
- <221> MOD_RES
- 35 <222> (1)..(1)
- <223> Dab

- <220>
- <221> MOD_RES
- 40 <222> (3)..(4)
- <223> Dab

- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 45 <222> (4)..(10)
- <223> circular

- <220>
- <221> MOD_RES
- 50 <222> (5)..(5)
- <223> Abu

- <220>
- <221> MOD_RES
- 55 <222> (6)..(6)
- <223> D-Phe

- <220>
- <221> MOD_RES
- 60 <222> (8)..(8)
- <223> Abu

- <220>
- <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)
 <223> Dab

 <400> 29
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
 5 **1 5 10**

 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> bacteriano

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 15 <223> DAb

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 20 <223> DAb

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 25 <223> circular

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 30 <223> Abu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 35 <223> D-Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 40 <223> Abu

 <400> 30
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10
 45 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> bacteriano

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(4)
 <223> Dab

 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(10)
 <223> circular

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Abu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 5 <223> D-Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 10 <223> Abu

<400> 31
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

15 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> bacteriano

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(4)
 <223> Dab

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(9)
 <223> circular

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Abu

40 <400> 32
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 33
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> bacteriano

<220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (2)..(4)
 <223> Dab

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 55 <222> (3)..(9)
 <223> circular

<220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (5)..(5)
 <223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> N-gamma-formil-Dab

5 <400> 33
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 34
<211> 9

10 <212> PRT
<213> bacteriano

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (2)..(4)
<223> Dab

<220>
20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(9)
<223> circular

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> D-Phe

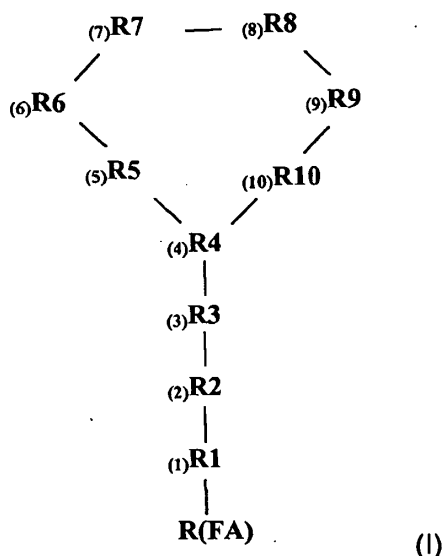
<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> N-gamma-acetil-Dab

<400> 34
Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

35

REIVINDICACIONES

1.- Un derivado de polimixina de la fórmula general (I),



en donde R1 está ausente o es Abu;

5 R2 se selecciona del grupo que consiste en Ser, Thr, DThr y DAla;

R3 se selecciona del grupo que consiste en Thr, DThr, Ser, DSer, DAla, Dab y Abu;

R4 es Dab;

R6 es DPhe o DLeu;

R7 es Leu, Thr o Ile;

10 R5, R8 y R9 son cada uno Dab o Abu;

R10 es Leu o Thr; y

R(FA) se selecciona del grupo que consiste en residuos de octanoilo (OA), decanoilo (DA) y 6-metilheptanoilo (6-MHA);

15 en donde dichos residuos de aminoácidos se seleccionan de manera que el número total de cargas positivas a pH fisiológico sea tres y el número total de cargas positivas en la porción del anillo heptapeptídico R4-R10 sea al menos dos, por lo que dicho derivado de polimixina posee todavía actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas y/o posee la capacidad de sensibilizar las bacterias gram-negativas a agentes antibacterianos;

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho derivado.

20 2.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R1-R10 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-20 y 22.

3.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R1-R10 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10-20.

25 4.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 3, seleccionado del grupo que consiste en OA-SEQ ID NO. 10, DA-SEQ ID NO. 10, OA-SEQ ID NO. 11, OA-SEQ ID NO. 12, DA-SEQ ID NO. 13, OA-SEQ ID NO. 13, MHA-SEQ ID NO. 13, MHA-SEQ ID NO. 14, OA-SEQ ID NO. 15, OA-SEQ ID NO. 16, OA-SEQ ID NO. 17, OA-SEQ ID NO. 18, OA-SEQ ID NO. 19 y OA-SEQ ID NO. 20.

5.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 4, seleccionado del grupo que consiste en OA-SEQ ID NO. 13, OA-SEQ ID NO. 17, OA-SEQ ID NO. 18, OA-SEQ ID NO. 19 y OA-SEQ ID NO. 20.

6.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 5, seleccionado del grupo que consiste en OA-SEQ ID NO. 13.

- 7.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 4, seleccionado del grupo que consiste en OA-SEQ ID NO. 10, DA-SEQ ID NO. 10, OA-SEQ ID NO. 11 y OA-SEQ ID NO. 12.
- 8.- El derivado de acuerdo con la reivindicación 7, seleccionado del grupo que consiste en OA-SEQ ID NO. 10.
- 5 9.- Un producto de combinación que comprende dos o más de los derivados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10.- Una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y al menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 11.- La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un agente antibacteriano.
- 10 12.- Uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de un medicamento para tratar infecciones causadas por bacterias gram-negativas.
- 13.- El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dichas bacterias se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- 15 14.- Uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para sensibilizar bacterias gram-negativas contra agentes antibacterianos.
- 15.- El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichas bacterias se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- 20 16.- El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en claritromicina, azitromicina, eritromicina y otros macrólidos, cetólidos, clindamicina y otras lincosaminas, estreptograminas, rifampina, rifabutina, rifalazilo y otras rifamicinas, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, vancomicina, dalbavancina, telavancina, oritavancina y otros antibióticos glicopeptídicos, fluoroquinolonas, bacitracina, derivados de tetraciclinas, antibióticos de beta-lactama, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folatos, inhibidores de desformilasa e inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano.
- 25 17.- El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en: claritromicina, azitromicina, eritromicina, clindamicina, la combinación de las estreptograminas quinupristina-dalfopristina, rifampina, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinona-linezolid, vancomicina, fluoroquinolona-moxifloxacina y el inhibidor de la síntesis de folatos trimetoprima.
- 30 18.- Uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para sensibilizar bacterias gram-negativas al complemento que es un mecanismo de defensa del hospedante presente en el suero.
- 19.- El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dichas bacterias se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- 35 20.- Un procedimiento para preparar un derivado de polimixina de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, que comprende modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintético o uno de sus derivados que tienen de 4 a 6 residuos cargados positivamente sustituyendo 1 a 4 de dichos residuos por residuos neutros, o por un enlace covalente, o convirtiendo 1 a 4 de dichos residuos en residuos neutros con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene 2 o 3 residuos cargados positivamente.
- 40 21.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende realizar dicho procedimiento como un procedimiento de síntesis total.
- 22.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende realizar dicho procedimiento como un procedimiento semisintético.
- 45 23.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende las etapas de:
- a) someter un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintético, o uno de sus derivados, a escisión con el fin de eliminar la cadena lateral de dicho compuesto de polimixina y recuperar la parte cíclica de dicho compuesto, y
- b) acoplar a la parte cíclica obtenida en la etapa a) una cadena lateral preparada sintéticamente con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1.
- 50

- 24.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende realizar la escisión en la etapa a) enzimáticamente.
- 25.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende realizar la escisión en la etapa a) químicamente.
- 5 26.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende realizar la escisión en la etapa a) utilizando una combinación de ambos tratamientos químicos y enzimáticos.