

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 813**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/62**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2009 PCT/FI2009/050093**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO2009098357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2009 E 09707885 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2242765**

54 Título: **Derivados de Polimixina de ácido graso de cola corta y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**08.02.2008 FI 20085110**

**08.02.2008 US 65214**

**16.05.2008 FI 20085469**

**16.05.2008 US 127933**

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

**08.06.2017**

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, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 615 813 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 de ácido graso de cola corta y usos de los mismos

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a derivados de polimixina y a dicho derivado de polimixina para usos en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas. Los derivados de polimixina de la presente invención son especialmente útiles en la sensibilización de bacterias para potenciar los efectos de otros agentes antibacterianos.

**Antecedentes**

10 La sepsis mata a más de 215.000 estadounidenses cada año. Se estima que 750.000 estadounidenses están infectados con sepsis grave y el 29% de ellos mueren de ella cada año. Las muertes por sepsis representan el 9% de todos los casos de muerte en los Estados Unidos. La sepsis mata a tantos estadounidenses como las infecciones miocárdicas, incluso más que los accidentes de tráfico.

Dos a tres millones de estadounidenses adquieren una infección hospitalaria cada año y el 10% de estas infecciones progresan a sepsis. Más de 90.000 de estos pacientes mueren por sepsis infectada en hospitales.

15 La sepsis severa y el choqué séptico (sepsis severa combinada con presión sanguínea baja) llevaron a 135.000 vidas a unidades de cuidados intensivos (UCI) cada año en la Unión Europea según el Informe de Salud de la OCDE del 2.000. En Gran Bretaña, 5.000 de cada 100.000 pacientes que adquirieron una infección hospitalaria mueren de sepsis cada año en hospitales de atención de agudos pertenecientes a la organización del NHS.

20 La tasa de muertes ha aumentado año tras año debido al hecho de que el número de pacientes predispuestos a la sepsis, como los ancianos, los neonatos prematuros y los pacientes con cáncer, ha aumentado, sobre todo porque muchas enfermedades graves son más tratables que antes. También ha aumentado el uso de dispositivos médicos invasivos y procedimientos agresivos.

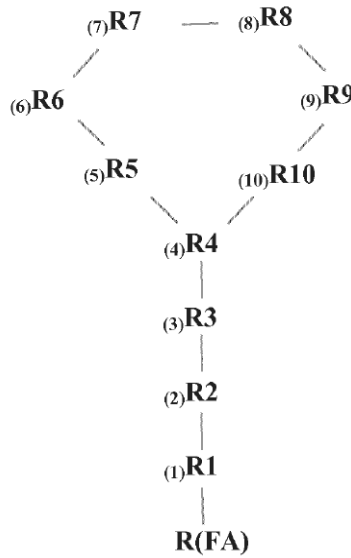
25 Las bacterias Gram-negativas causan más del 40% de todas las infecciones septicémicas y muchas de las bacterias Gram-negativas son extremadamente multirresistentes. Las bacterias Gram-negativas proporcionan un desafío difícil en la terapia que las Gram-positivas, ya que poseen una estructura única, la membrana externa, como su estructura más externa. Las moléculas de lipopolisacárido situadas en la membrana externa inhiben la difusión de muchos agentes antibacterianos de modo más profundo dentro de la célula, donde se localizan sus objetivos finales. Más del 95% de los agentes antibacterianos novedosos aislados de la naturaleza o sintetizados químicamente en 1.972-1.991 carecían de actividad contra las Gram-negativas (Vaara 1993).

30 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 simples con pesos moleculares de aproximadamente 1.000. Las polimixinas, como la polimixina B, son antibióticos deca péptidos, es decir, están hechos de diez (10) restos aminoácídicos. Son bactericidas y especialmente eficaces contra bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y otras especies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter baumannii*, y otras. Sin embargo, las polimixinas tienen efectos adversos graves, que incluyen nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Por lo tanto estos fármacos tienen un uso limitado como agentes terapéuticos debido a una alta toxicidad sistémica.

40 Las polimixinas se han utilizado en la terapia de infecciones graves causadas por esas bacterias, pero debido a la toxicidad, se abandonó su uso 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 requerido el uso terapéutico de las polimixinas como último recurso, a pesar de sus toxicidades, y como muchos de los antibióticos menos tóxicos ya han perdido su eficacia frente a cepas particulares de dichas bacterias ha aumentado nuevamente el uso de polimixinas.

45 Por consiguiente, se han reclutado ahora las polimixinas al arsenal terapéutico, aunque, debido a su toxicidad, a una escala muy limitada. Sin embargo, su uso sistémico (es decir, no tópico) se restringe en gran medida a la terapia de infecciones potencialmente mortales causadas por cepas de *Ps. aeruginosa* y *A. baumannii*, así como por bacterias entéricas resistentes a carbapenem.

50 Las polimixinas consisten en una parte de heptapéptido cíclico y una parte lineal que consiste en una porción de tripéptido y una cola de ácido graso hidrófobo unida al grupo  $\alpha$ -amino del resto de aminoácido N-terminal del tripéptido y puede representarse por la fórmula general:



en donde R1-R3 representan la porción de cadena lateral del tripéptido; R4-R10 la porción de anillo del heptapéptido y R(FA) representa la cola de ácido graso hidrófobo unida al grupo  $\alpha$ -amino del resto de aminoácido N-terminal del tripéptido.

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

La polimixina B y la polimixina E usadas clínicamente difieren entre sí solamente en el resto R6, que es el resto D-fenilalanilo en la polimixina B y resto D-leucilo en la polimixina E.

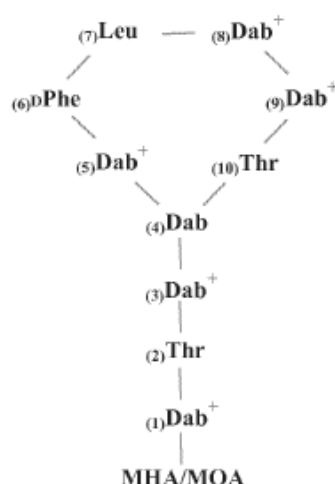
- 15 También se clasifican como polimixinas la circulina A y B (Storm *et al.* 1977). Se diferencian de otras polimixinas solamente en llevar el resto isoleucilo en la posición R7 mientras que otras polimixinas tienen un resto ya sea treonilo o leucilo en dicha posición. Para una revisión general de las estructuras de algunas polimixinas, véase la Tabla 1.

Tabla 1. La estructura de polimixinas y optapeptina seleccionadas así como derivados seleccionados de las mismas

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-Dab-	*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	*Thr

Deacilcolistina (DAC)	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina nonapéptido (PMEN)	E	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Deacilpolimixina B (DAPB)	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina nonapéptido (PMBN)	B	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina octapéptido (PMBO)	B		Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr
Polimixina heptapéptido (PMHP)	B			*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab	Dab	*Thr

La polimixina B se representa por la siguiente fórmula:



5 La polimixina B comercialmente disponible es una mezcla, donde R-FA es predominantemente 6-metiloctanoilo (6-MOA, en polimixina B1), pero también puede ser un acilo graso relacionado como 6-metilheptanoilo (6-MHA, en polimixina B2), octanoilo (en polimixina B3), o heptanoilo (polimixina B4) (Sakura *et al.* 2004). Todas estas variantes son igualmente potentes contra Gram-negativas como *E. Coli* (Sakura *et al.* 2004). De manera similar, en la polimixina E1 (colistina A) y circulina A el R-FA es 6-MOA y en la polimixina E2 (colistina B) y en circulina B el R-FA es 6-MHA. Numerosos investigadores han unido varias fracciones hidrófobas que incluyen varios restos de acilo graso al N-terminal de derivados y análogos de polimixina y han mostrado que los derivados resultantes tienen potente actividad antibacteriana (Chihara *et al.* 1973, Sakura *et al.* 2004 y publicación de Patente de E.E.U.U. 2006004185). Incluso el derivado que lleva el voluminoso resto hidrófobo 9-fluorenilmetoxicarbonilo como R-FA es casi tan potente como la polimixina B en inhibir el crecimiento de bacterias *E. Coli* y otras Gram-negativas (Tsubery *et al.* 2001).

15 La estructura de anillo del heptapéptido es esencial para la actividad biológica (Storm *et al.* 1997). Un derivado con un anillo de octapéptido es significativamente menos activo como un antibiótico.

20 Se han realizado múltiples modificaciones de polimixinas y múltiples moléculas sintéticas tipo polimixina, y con algunas restricciones conservaron su actividad biológica. Las modificaciones comprenden pero no se limitan a aquellas en la cadena lateral, así como moléculas en las que se ha sustituido un resto de aminoácido hidrófobo inherente (como DPhe o Leu) por otro resto de aminoácido hidrófobo o en las que se ha sustituido el Dab catiónico por otro resto aminoacilo catiónico, como resto de Lys, Arg, u ornitina (Storm *et al.* 1997, Tsubery *et al.* 2000a, Tsubery *et al.* 2002, publicación de Patente de E.E.U.U. 2004082505, Sakura *et al.* 2004, publicación de Patente de E.E.U.U. 2006004185).

Otras modificaciones que dan como resultado compuestos microbiológicamente activos al menos parcialmente comprenden pero no se limitan a ésteres de alcanóilo donde los grupos OH- de los restos treonilo forman ésteres con alcanóilos como propionilo y butirilo (Patente de E.E.U.U. 3.450.687).

5 Por otra parte, las octapeptinas son idénticas a las polimixinas pero tienen un enlace covalente en lugar de los restos R1-R2 (Tabla 1). En esta invención, las posiciones R se numeran según aquellas en las polimixinas naturales y, por tanto, el único resto aminoácido en la cadena lateral de las octapeptinas se define como R3. Por consiguiente, las octapeptinas son octapéptidos mientras que todas las polimixinas naturales son deca péptidos, y poseen solamente cuatro (4) cargas positivas. Los restos 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  $\beta$ -OH-6-metiloctanoico. Los derivados que poseen un resto acilo graso con 6 a 18 átomos de carbono tienen una potente actividad antibacteriana contra *E. coli* (Storm *et al.* 1977).

15 El primer objetivo de las polimixinas en bacterias Gram-negativas es su membrana externa (OM) que es una barrera de permeabilidad eficaz contra muchos agentes tóxicos que incluyen antibióticos de gran tamaño (peso molecular mayor de 700 d) así como antibióticos hidrófobos. Uniéndose a las moléculas de lipopolisacárido (LPS) expuestas en la superficie externa de la OM, las polimixinas dañan la estructura y función de la OM y, como resultado, permeabilizan (es decir, hacen permeable) la OM a la polimixina, además de a otros muchos agentes tóxicos (Nikaido y Vaara 1985, Vaara 1992, Nikaido 2003). El objetivo final y letal (el objetivo bactericida) de las polimixinas se cree que es la membrana citoplasmática (la membrana interna) de la bacteria.

20 Se han hecho numerosos esfuerzos para reducir la toxicidad de las polimixinas. El tratamiento de polimixina E (colistina) con formaldehído y bisulfito sódico produce sulfometato de colistina, en el que grupos amino libres de los cinco restos de ácido diaminobutírico se han sustituido parcialmente por grupos sulfometilo (Tabla 1). Las preparaciones consisten en mezclas indefinidas de compuestos mono-, di-, tri-, tetra-, y penta-sustituídos. Las preparaciones sulfometiladas, cuando están recientemente disueltas en agua, carecen inicialmente tanto de la actividad antibacteriana como de la toxicidad de la molécula parental, pero cuando estos compuestos empiezan a descomponerse en solución, en la sangre o en los tejidos formándose derivados menos sustituidos y colistina libre, se recupera parcialmente tanto la actividad bacteriana como la toxicidad. Además, el grado de sulfometilación inicial varía aparentemente entre preparaciones farmacéuticas comercialmente disponibles. Se han publicado muchas otras maneras de bloquear todos los grupos amino libres. Los ejemplos comprenden, pero no se limitan a, la formación de bases de Schiff inestables con aminoácidos (Storm *et al.* 1977).

30 La polimixina E nonapéptido (PMEN, colistina nonapéptido, Tabla 1), obtenida tratando enzimáticamente la polimixina E y careciendo del R-FA y R1, se demostró en 1973 que era menos tóxica que el compuesto parental en ensayo de toxicidad aguda (muerte inmediata debida presumiblemente a bloqueo neuromuscular directo) en ratones (Chirara *et al.* 1973). Sin embargo, carecía también de la actividad antibacteriana, medida como su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (Chirara *et al.* 1973). El papel de la parte lineal puede contribuir a la actividad antibacteriana de las polimixinas.

35 Por otro lado, Vaara y Vaara demostraron que la polimixina B nonapéptido (PMBN, Tabla 1) conserva la capacidad de permeabilizar la OM de bacterias Gram-negativas (Vaara y Vaara 1983a, b, c; Patente de E.E.U.U. 4.510.132; Vaara 1992). Por consiguiente, a pesar de que carece de la actividad antibacteriana directa (es decir, la capacidad de 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 como antibióticos hidrófobos así como antibióticos grandes y algunos otros agentes nocivos.

45 El PMBN también sensibiliza las bacterias a la actividad bactericida del sistema del complemento humano, presente en suero humano fresco como un sistema de primera línea de defensa contra invasores (Vaara y Vaara 1983a, Vaara *et al.* 1984, Vaara 1992). Además, sensibiliza las bacterias a la actividad bactericida conjunta del complemento sérico y de los glóbulos blancos polimorfonucleares humanos (Rose *et al.* 1999).

El PMBN se asemeja a PMEN en ser menos tóxico en el ensayo de toxicidad aguda en ratones que las polimixinas no modificadas. En ensayos toxicológicos adicionales, varios criterios demostraron que PMBN era menos tóxico que su compuesto parental, pero este derivado de polimixina se consideró todavía demasiado nefrotóxico para uso clínico (Vaara 1992).

50 El PMBN lleva cinco (5) cargas positivas. Estudios posteriores revelaron, con bastante expectación, que PMEN, que también lleva cinco (5) cargas positivas, así como también la deacilpolimixina B y la deacilpolimixina E, que portan ambas seis (6) cargas positivas son potentes agentes para sensibilizar bacterias a otros antibióticos (Viljanen *et al.* 1991, Vaara 1992). Además, se ha demostrado que un derivado reducido adicional de polimixina B octapéptido (PMBO) conserva una actividad permeabilizante muy eficaz mientras que la polimixina B heptapéptido (PMBH) es menos activo (Kimura *et al.* 1992). PMBN, PMEN y PMBO tienen cinco (5) cargas positivas mientras que PMBH tiene solamente cuatro (4) cargas positivas. Esta diferencia puede explicar la actividad más débil de PMBH.

El grupo de Ofek, Tsubery y Friedkin describió recientemente péptidos de tipo polimixina que estaban unidos a péptidos quimiotácticos, como fMLF, que atraen leucocitos polimorfonucleares (Publicación de Patente de E.E.U.U.

2004082505, Tsubery *et al.* 2005). Describieron los péptidos fMLF-PMBN, MLF-PMBN, fMLF-PMEN, fMLF-PMBO y MLF-PMBO, que llevan todos cuatro (4) cargas positivas, que sensibilizan bacterias Gram-negativas a antibióticos, aunque no se han publicado estudios comparativos con concentraciones crecientes de los compuestos (Tsubery *et al.*, 2005).

- 5 Con el fin de estudiar las estructuras y propiedades funcionales de las polimixinas, algunos trabajos han descrito, entre otros compuestos, derivados de polimixina que tienen menos de cuatro (4) cargas positivas.

10 Teuber (1970) ha descrito el tratamiento de polimixina B con anhídrido acético que da lugar a una preparación que contiene polimixina B así como sus formas mono-, di-, tri-, tetra-, y penta-N-acetiladas. Teuber también separó cada grupo e informó de modo no cuantitativo que usa un ensayo de difusión en agar que las formas penta-acetiladas y tetra-acetiladas carecían de la capacidad de detener el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, mientras que las formas di- y mono-acetiladas tenían tal capacidad. La forma tri-acetilada tenía cierta capacidad.

15 Srinivasa y Ramachandran (1978) aislaron derivados de polimixina B parcialmente formilados y mostraron que un derivado diformilo así como un derivado triformilo inhibían el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. No describieron la capacidad de los compuestos para sensibilizar bacterias a los antibióticos. Además, en 1980 mostraron que los grupos amino libres de la diformilpolimixina B en los restos R1 y R3, así como los grupos amino libres de la diformilpolimixina B en los restos 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 y Ramachandran, 1980a).

20 Se ha descrito un derivado acortado de polimixina B, octanoil polimixina B heptapéptido por Sakura *et al.*, (2004). La unión del resto de octanoilo con el N-terminal del resto R4 de la polimixina B heptapéptido da como resultado un compuesto que tiene solamente tres (3) cargas positivas. Sakura *et al.* encontraron que la octanoil polimixina B heptapéptido inhibe el crecimiento de bacterias solamente a una concentración muy alta (128 µg/ml), mientras que los otros derivados como el octanoil polimixina B octapéptido y el octanoil polimixina B nonapéptido, ambos con cuatro (4) cargas eran agentes muy potentes para inhibir el crecimiento bacteriano.

25 La publicación de Patente de E.E.U.U. 2006004185 reveló recientemente ciertos derivados y productos intermedios de polimixina que pueden usarse para sintetizar nuevos antibióticos peptídicos. Los compuestos antibacterianos descritos poseían cuatro (4) o cinco (5) cargas positivas.

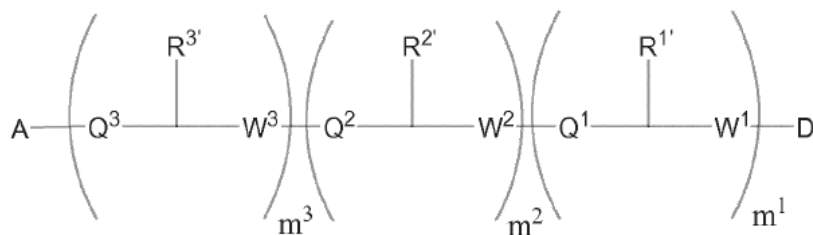
30 Además, se han descrito también compuestos de polimixina B y polimixina B<sub>1</sub> estrechamente relacionados por Okimura *et al.* (2007) y de Visser *et al.*, (2003). Okimura *et al.* ha estudiado la conversión química de la polimixina B y la colistina naturales a sus derivados N-terminales y de Visser *et al.* ha estudiado la síntesis en fase sólida de la polimixina B<sub>1</sub> y análogos a través de un enfoque de captura de seguridad. Los compuestos antibacterianos descritos en estos trabajos poseían cuatro (4) o cinco (5) cargas positivas.

Todavía hay una necesidad urgente de derivados de polimixina, que sensibilizan bacterias para potenciar los efectos de otros agentes antibacterianos, de tratamientos eficaces para las infecciones bacterianas, en particular para las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas multirresistentes.

35 **Compendio**

40 La presente invención se refiere a un derivado de polimixina en donde el número total de cargas positivas a pH fisiológico es tres y en donde el derivado tiene una cola de ácido graso (es decir, R(FA) o D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono. Se ha encontrado que ciertos derivados de polimixina de la invención que tienen colas de ácido graso de 1 a 5 átomos de carbono pueden haber mejorado las propiedades farmacocinéticas en comparación con polimixinas, octapeptinas y derivados de polimixina naturales con colas de ácido graso más largas. Ejemplos de estas propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, mayor vida media en suero, aumento de aclaramiento renal, y/o aumento de recuperación urinaria.

La presente invención atañe, al menos en parte, a los derivados de polimixina de fórmula (I):



(I)

45 en donde:

A es un resto de anillo de polimixina seleccionada de la de polimixina A, polimixina B, IL-polimixina B<sub>1</sub>, polimixina D, polimixina E, polimixina F, polimixina M, polimixina S, polimixina T, circulina A, octapeptina A, octapeptina B, octapeptina C, u octapeptina D;

D es acetilo, propionilo, butanoilo, o pentanoilo;

5 m<sup>1</sup> es 0 y m<sup>2</sup> y m<sup>3</sup> son cada uno 1;

Q<sup>2</sup> y Q<sup>3</sup> son cada uno C=O;

W<sup>2</sup> y W<sup>3</sup> son cada uno NH

R<sup>2</sup> es la cadena lateral de D-alanina, L-serina, o L-treonina;

R<sup>3</sup> es la cadena lateral de D-asparagina, L-serina, o D-serina;

10 en donde dicho derivado tiene tres cargas positivas a pH fisiológico, y profármacos farmacéuticamente aceptables y sales de los mismos.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un derivado seleccionado del grupo que consiste en Ac-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-] y Ac-Thr-DAsn-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-].

15 La invención también se refiere a un producto de combinación que comprende dos o más de los derivados de fórmula (I), y a una composición farmacéutica que comprende tal(es) derivado(s) o una combinación de los mismos y soportes y excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 La presente descripción describe un método para sensibilizar las bacteria Gram-negativas a un agente antibacteriano, que comprende administrar, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente antibacteriano y un derivado según la presente invención, en donde dicho agente antibacteriano se puede seleccionar del grupo que consiste en claritromicina, azitromicina, eritromicina y otros macrólidos, ketólidos, clindamicina y otras lincosaminas, estreptograminas, rifampicina, rifabutina, rifalazil y otros rifamicinas, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, vancomicina, dalbavancina, telavancina, oritavancina y otros antibióticos glicopeptídicos, fluoroquinolonas, bacitracina, derivados de tetraciclina, antibióticos betalactámicos, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folato, inhibidores de deformilasa, e inhibidores de la bomba de flujo de salida bacteriana.

25 También se proporcionan métodos para desarrollar nuevos antibióticos. También se describen métodos para sensibilizar bacterias Gram-negativas clínicamente importantes a un mecanismo de complemento de defensa del huésped presente en el suero.

30 La presente descripción también presenta los usos de un derivado de polimixina según la presente invención en la fabricación de medicamentos para sensibilizar bacterias Gram-negativas, como p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, y *Acinetobacter baumannii* frente agentes antibacterianos; y para sensibilizar bacterias Gram-negativas a un mecanismo de complemento de defensa del huésped presente en el suero.

35 La presente descripción también atañe a métodos de tratamiento de infecciones Gram-negativas en un sujeto que comprende administrar un derivado de la invención (p. ej., un derivado de fórmulas (I)-(V)) en combinación con un agente antibacteriano a un sujeto, de manera que el sujeto es tratado para la infección.

40 Finalmente, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un derivado de polimixina según la presente invención, que comprende (A) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintética o un derivado de la misma que lleva 4 a 5 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono sustituyendo 1 a 2 de dichos restos cargados positivamente por restos neutros o un enlace covalente, o convirtiendo 1 a 2 de dichos restos cargados positivamente en restos neutrales con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) que lleva tres restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono, o (B) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintética o un derivado de la misma que lleva 4 a 5 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende más de 5 átomos de carbono sustituyendo 1 a 2 de dichos restos cargados positivamente por restos neutros o un enlace covalente, o convirtiendo 1 a 2 de dichos restos cargados positivamente en restos neutrales, y sustituyendo dicho resto terminal (D) que tiene más de 5 átomos de carbono por un resto terminal (D) que comprende en total de 1 a 5 átomos de carbono con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (1) que lleva 3 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende en total de 1 a 5 átomos de carbono, o (C) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintética o un derivado de la misma que lleva 4 a 6 restos cargados positivamente y carece del resto terminal (D) sustituyendo 1 a 3 de dichos restos cargados positivamente por restos neutros, o por un enlace covalente, o convirtiendo 1 a 3 de dichos restos en restos neutrales, e introduciendo un resto terminal (D) que comprende en total 1 a 5 átomos de carbono, con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) según la reivindicación 1, que lleva 3 restos cargados positivamente y una R(FA) que tiene en total 1 a 5 átomos de

carbono. En una realización de la invención, el resto terminal D es  $R^{12}-C(=O)$ ,  $R^{12}-C(=S)$ , o  $R^{12}$ , en donde  $R^{12}$  y  $R^{12}$  se definen de aquí en adelante. En otra realización, el resto terminal (D) es  $R(FA)$ , que es un resto alcanoilo o alquilo opcionalmente sustituido que tiene un total de 1 a 5 átomos de carbono.

Definiciones

5 “pH fisiológico” como se emplea en esta memoria se refiere a un valor de pH de más de 7,0 y por debajo de 7,6, 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.

“Carga positiva” como se emplea en esta memoria indica cargas positivas en el pH fisiológico definido anteriormente.

Molécula “catiónica” como se emplea en esta memoria se refiere a una molécula que contiene una o más cargas positivas.

10 “Resto de aminoácido” como se emplea en esta memoria se refiere a cualquier resto de aminoácido natural, no natural o modificado, ya sea en configuración L- o D-.

“Restos equivalentes” como se emplea en esta memoria, pretende incluir modificaciones obvias a, por ejemplo, aminoácidos, que dan como resultado aminoácidos no naturales o derivados de los mismos, pero que conservan la capacidad estructural y/o funcional del resto sustituido.

15 “Polimixina(s) natural(es)” como se emplea en esta memoria, se refiere a polimixinas y circulinas.

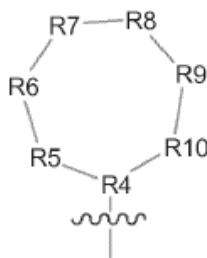
“Derivado de polimixina” se refiere, para el propósito de esta invención, a derivados sintéticos o semisintéticos de polimixinas u octapeptinas naturales, que tienen una porción heptapeptídica (o anillo de heptapéptido) cíclica R4-R10 y una cadena lateral unida al resto de aminoácido N-terminal R4. La cadena lateral puede consistir en un  $R(FA)$ -triaminoacil(R1-R3), un  $R(FA)$ -diaminoacil(R2-R3), un  $R(FA)$ -monoaminoacil(R3) o  $R(FA)$  en solitario.

20 “ $R(FA)$ ” o “cola de ácido graso” como se emplea en esta memoria se refiere a la parte de ácido graso, es decir, la parte alcanoilo de la estructura de polimixina, ligada al resto de aminoácido N-terminal de la parte peptídica lineal (cadena lateral) de la polimixina o, en ausencia de la parte peptídica lineal, al resto de aminoácido R4 (el aminoácido en posición 4 de la parte peptídica cíclica de la polimixina). Además, para el propósito de la presente invención,  $R(FA)$  también puede ser un grupo hidrófobo relacionado, como alquilo. En ciertas realizaciones de la invención, la cola de ácido graso puede, en ciertos casos, ser un resto terminal seleccionada del grupo que consiste en  $R^{12}-C(=O)$ ;  $R^{12}-SO_2-$ ;  $R^{12}-C(=NH)-$ ;  $R^{12}-NH-(C=S)-$ ;  $R^{12}-NH-(C=O)-$ ;  $R^{12}-NH-(C=NH)-$ ;  $R^{12}-O-(C=S)-$ ;  $R^{12}-O-(C=O)$ ;  $R^{12}-P(O)OH-$ ;  $R^{12}-C(=S)$ ; y  $R^{12}$ , en donde  $R^{12}$  y  $R^{12}$  son alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, o arilalquilo.

“Compuestos” como se emplean en esta memoria incluyen todos los isómeros estereoquímicos de dicho compuesto.

30 “Actividad de sensibilización” o “capacidad de sensibilizar” como se emplea en esta memoria se pretende que incluya cualquier capacidad para aumentar la sensibilidad, hacer sensible o hacer susceptible una bacteria a un agente antibacteriano.

35 “Resto del anillo de polimixina” o “A” incluye la porción del anillo de polimixina A, polimixina B, IL-polimixina B<sub>1</sub>, polimixina D, polimixina E, polimixina F, polimixina M, polimixina S, polimixina T, circulina A, octapeptina A, octapeptina B, octapeptina C, octapeptina D, y derivados de las mismas. Ejemplos de derivados incluyen fracciones con modificaciones que no afectan sustancialmente a la capacidad del resto del anillo para llevar a cabo su función pretendida, es decir, como un antibiótico y/o su capacidad para sensibilizar la bacteria a uno o más agentes antibacterianos. El término “resto de anillo de polimixina B” se refiere a la porción de anillo de polimixina B (es decir, cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-]). Otros ejemplos de fracciones de anillo de polimixina incluyen fracciones de la fórmula:



40 en donde:

R4 es un resto de aminoácido que comprende una cadena lateral funcional capaz de ciclar la molécula;

R5, R8, y R9 son restos de aminoácidos seleccionados independientemente;



R6 y R7 son restos de aminoácidos hidrófobos opcionalmente sustituidos; y

R10 es Leu o cualquier resto de aminoácido no hidrófobo. Otros ejemplos de R4-R10 se discuten más adelante con más detalle en la Fórmula (V).

5 El término "anillo de octapeptina" se refiere a la porción del anillo de la octapeptina A nativa (es decir, cy[Dab-Dab-DLeu-LLeu-Dab-Dab-Thr-], es decir, compuestos en donde R4, R5, R8 y R9 son Dab, R6 es DLeu, R7 es LLeu y R10 es Thr), octapeptina B (es decir, cy[Dab-Dab-DLeu-LPhe-Dab-Dab-Thr-], es decir, compuestos en donde R4, R5, R8 y R9 son Dab, R6 es DLeu, R7 es LPhe y R10 es Thr), una octapeptina C (es decir, cy[Dab-Dab-DPhe-LLeu-Dab-Dab-Thr-], es decir, compuestos en donde R4, R5, R8 y R9 son Dab, R6 es DPhe, R7 es LLeu, y R10 es Thr).

10 El término "profármaco" incluye fracciones que se escinden in vivo para producir un compuesto derivado de polimixina activo de la invención. Los profármacos incluyen fracciones que enmascaran o neutralizan de otro modo las cargas positivas (p. ej., el  $-NH_3^+$  u otras especies protonadas) a pH fisiológico. Una vez que el profármaco se administra al sujeto, las fracciones del profármaco o las fracciones que enmascaran la carga serán escindidas o eliminadas de otro modo para producir el derivado de polimixina activo de la invención, opcionalmente con tres cargas positivas a pH fisiológico.

15 El término "resto de enmascaramiento de carga" incluye fracciones que neutralizan reversiblemente cargas positivas en los derivados. Preferiblemente, las fracciones se escinden o se disocian de otro modo con las cargas positivas del compuesto de polimixina después de administrarse a un sujeto. Ejemplos de fracciones de enmascaramiento de carga incluyen sulfoalquilo (p. ej., derivados sulfometilados). Otras fracciones de enmascaramiento de carga positiva incluyen, pero no se limitan a, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

20

25 El término "sujeto" incluye organismos capaces de padecer infecciones bacterianas. Ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, p. ej., caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, gatos, perros, conejos, hurones, monos, y preferiblemente, seres humanos.

#### Abreviaturas

Ácidos grasos: FA, resto de acilo graso; 6-MOA y MOA, resto de 6-metiloctanoilo; 6-MHA y MHA, resto de 6-metilheptanoilo; MO(H)A, la mezcla de 6-metiloctanoilo, 6-metilheptanoilo y restos acilo grasos relacionados que se dan en la polimixina B; OHMDA, ácido 3-OH-8-metildecanoico; OA, octanoilo; DA, decanoilo; Ac, acetilo; Me, metilo.

30 Aminoácidos: Dab, resto de  $\alpha,\gamma$ -diamino-n-butililo; fDab, resto de N- $\gamma$ -formil diamino-n-butililo; acDab, resto de N- $\gamma$ -acetildiamino-n-butililo; Abu, resto de  $\alpha$ -aminobutililo; Asn, resto aspartilo; Thr, resto treonilo; Ser, resto serinilo; Phe, resto fenilalanilo; Leu, resto leucilo; Ile, resto isoleucilo; Ala, resto alanilo; sm-Dab, resto  $\gamma$ -sulfometilado de  $\alpha,\gamma$ -diamino-n-butililo. Códigos de una letra para restos amino acilo modificados: X, Dab; Z, Abu; B, N- $\gamma$ -fDab; J, N- $\gamma$ -acDab.

35 Péptidos: DAPB, deacilpolimixina B; DAC, deacilcolistina; PMBN, polimixina B nonapéptido; PMEN, polimixina E nonapéptido; PMBO, polimixina B octapéptido; PMHP, polimixina B heptapéptido.

Otros: cy, ciclo (para designar la parte cíclica del péptido, entre paréntesis); f, formilo; ac, acetilo; sm, sulfometilo; MS, metanosulfonato; LPS, lipopolisacárido; OM, membrana exterior; MIC, concentración inhibitoria mínima; CFU, unidad formadora de colonias. El símbolo \* se emplea en esta memoria para marcar los restos entre los que se cierra la parte del anillo de heptapéptido del compuesto que deja la parte restante de la molécula como una cadena lateral.

40

#### Descripción detallada de la invención

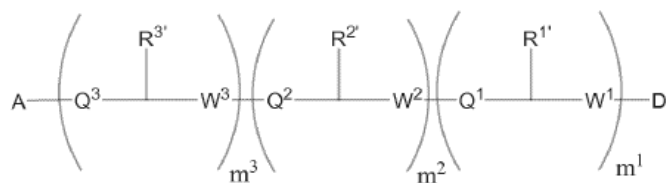
45 Recientemente se ha encontrado que ciertos compuestos de tipo polimixina que contienen solamente tres (3) cargas positivas y que tienen solamente una cola de acilo graso corta R(FA) o resto terminal (D) (no más de 5 átomos de carbono en total) poseen aún la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a agentes antibacterianos como antibióticos, antibióticos semi-sintéticos y agentes quimioterapéuticos, así como a factores de defensa del huésped como el sistema del complemento de suero humano fresco.

50 Debido a que estos nuevos compuestos no tienen más de tres (3) cargas positivas, ellos, en analogía con los derivados de polimixina descritos en la Solicitud de Patente de E.E.U.U. con número de serie 11/891.629, pueden ser menos tóxicos en general y menos nefrotóxicos en particular que las polimixinas y sus derivados conocidos. De manera similar, los compuestos ahora inventados pueden disminuir menos histamina de los tejidos del huésped que y tener propiedades farmacocinéticas ventajosas sobre la polimixina B, la colistina, y sus derivados descritos anteriormente. Además, la R(FA) corta o el resto terminal (D) puede hacer que los nuevos compuestos sean menos tóxicos en ensayos de citotoxicidad aguda, en analogía con polimixina B nonapéptido y colistina nonapéptido que carecen de toda la parte de acilo graso. Además, los nuevos compuestos pueden tener propiedades

55

farmacocinéticas que son ventajosas sobre derivados de polimixina que tienen un R(FA) largo o un resto terminal (D) con más de cinco átomos de carbono.

La presente invención proporciona derivados de polimixina de fórmula (I):



(I)

5 en donde:

A es un resto de anillo de polimixina seleccionada de las de polimixina A, polimixina B, IL-polimixina -B<sub>1</sub>, polimixina D, polimixina E, polimixina F, polimixina M, polimixina S, polimixina T, circulina A, octapeptina A, octapeptina B, octapeptina C, u octapeptina D;

D es acetilo, propionilo, butanoilo, o pentanoilo;

10 m<sup>1</sup> es 0 y m<sup>2</sup> y m<sup>3</sup> son cada uno 1;

Q<sup>2</sup> y Q<sup>3</sup> son cada uno C=O;

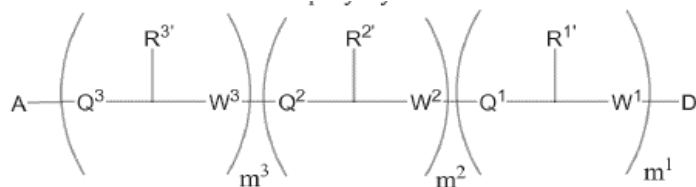
W<sup>2</sup> y W<sup>3</sup> son cada uno NH;

R<sup>2'</sup> es la cadena lateral de D-alanina, L-serina, o L-treonina;

R<sup>3'</sup> es la cadena lateral de D-asparagina, L-serina, o D-serina;

15 en donde dicho derivado tiene tres cargas positivas a pH fisiológico, y profármacos farmacéuticamente aceptables y sales de los mismos.

También se analizan en esta memoria derivados de polimixina de la fórmula (I):



(I)

en donde:

20 A es un resto de anillo de polimixina;

D es un resto terminal que comprende 1 a 5 átomos de carbono;

m<sup>1</sup>, m<sup>2</sup>, y m<sup>3</sup> son independientemente cada uno 0 o 1;

Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, y Q<sup>3</sup> son independientemente cada uno CH<sub>2</sub>, C=O, o C=S;

W<sup>1</sup>, W<sup>2</sup> y W<sup>3</sup> son independientemente cada uno NR<sup>4</sup>, O, o S;

25 R<sup>1'</sup>, R<sup>2'</sup> y R<sup>3'</sup> son independientemente cada uno cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales, alquilo, alquenilo, arilalquilo, arilo, alcoxilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilamino, o alquinilo; y

R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo;

y profármacos farmacéuticamente aceptables y sales de los mismos, siempre que (1) cuando A es un anillo de octapeptina, m<sup>1</sup> y m<sup>2</sup> son 0, m<sup>3</sup> es 1, W<sup>3</sup> es NH, Q<sup>3</sup> es C=O, y R<sup>3'</sup> es la cadena lateral del ácido diaminobutírico (Dab), entonces D no es C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> acilo, y (2) cuando D es acetilo, butanoilo, o pentanoilo, entonces R<sup>3'</sup> no es la cadena lateral de Dab.

30 Los compuestos tienen tres cargas positivas a pH fisiológico.

Ejemplos de profármacos de estos derivados incluyen aquellos con fracciones enmascaradoras de carga que neutralizan las tres cargas positivas cuando se administran a un sujeto que se eliminan *in vivo* para producir el compuesto con tres cargas positivas. Ejemplos de fracciones enmascaradoras de carga incluyen fracciones sulfoalquilo como sulfometilo.

- 5 En los compuestos de la presente invención,  $m^1$  es 0 y  $m^2$  y  $m^3$  son cada uno 1 y  $Q^2$  y  $Q^3$  son cada uno C=O y  $W^2$  y  $W^3$  son cada uno NH.

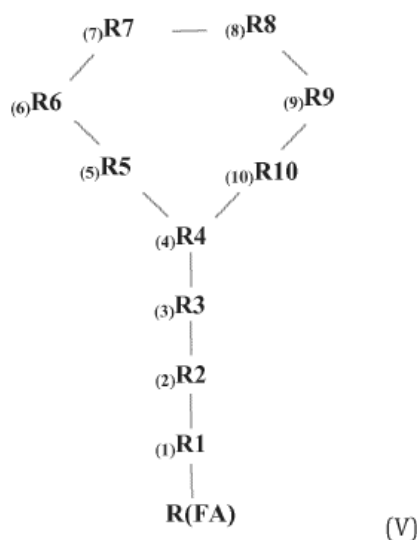
En los compuestos de la presente invención,  $R^{2'}$  es la cadena lateral de D-alanina, L-serina, o L-treonina.

En los compuestos de la presente invención,  $R^{3'}$  es la cadena lateral de D-asparagina, L- o D-serina.

- 10 Ejemplos de A incluyen el resto de anillo de polimixina B (es decir, cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-]) y polimixina E (es decir, cy[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-]).

En los compuestos de la presente invención D es acetilo, propionilo, butanoilo, o pentanoilo.

Un derivado de polimixina tratado en esta memoria se puede representar mediante la fórmula general (V):



en donde:

- 15 R4 es un resto de aminoácido que comprende una cadena lateral funcional capaz de ciclar la molécula;  
 R6 y R7 son restos de aminoácidos hidrófobos opcionalmente sustituidos;  
 R10 es Leu o cualquier resto de aminoácido no hidrófobo; y  
 en donde R1 puede estar ausente; y  
 en donde R1, R2, R3, R5, R8 y R9 son cada uno aminoácidos independientemente seleccionados; y
- 20 en donde R(FA) es un resto alcanoilo o alquilo opcionalmente sustituido, que tienen en total 1 a 5 átomos de carbono;  
 o un profármaco farmacéuticamente aceptable o sal del mismo siempre y cuando (1) cuando R1 y R2 están ausentes, R3, R4, R5, R8, y R9 son Dab, R6 es D-Leu, R7 es L-Leu o L-Phe, y R10 es Thr o cuando R1 y R2 están ausentes, R3, R4, R5, R8, y R9 son Dab, R6 es D-Phe, R7 es L-Leu, y R10 es Thr, entonces
- 25 R(FA) no es un resto alcanoilo no sustituido y (2) cuando R(FA) es acetilo, butanoilo o pentanoilo, entonces  $R^3$  no es Dab.

Los compuestos de la invención de fórmula (V) tienen tres cargas positivas a pH fisiológico.

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

En polimixinas y octapeptinas naturales, R2 es Thr o ausente (es decir, sustituida por un enlace covalente). Ejemplos de derivados conocidos incluyen aquellos en donde R2 es O-acetil-Thr, O-propionil-Thr, O-butilil-Thr o un

enlace covalente.

En polimixinas y octapeptinas naturales, R3 es Dab, DDab o DSer.

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

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

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

- 10 En polimixinas y octapeptinas naturales, R10 es Thr y Leu. Ejemplos de derivados conocidos que tienen actividad antibacteriana incluyen aquellos en donde R10 es O-acetil-Thr, O-propionil-Thr o O-butilil-Thr.

Las tres (3) cargas positivas presentes en los derivados según la invención se pueden localizar en la porción del anillo heptapeptídico; o dos (2) cargas positivas se pueden localizar en la porción del anillo heptapeptídico mientras la carga positiva restante se localiza en la cadena lateral.

- 15 Los derivados según la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en: acetil-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir Ac-SEQ ID NO: 10; y acetil-Thr-DAsn-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], es decir Ac-SEQ ID NO: 39.

Como se muestra en la sección de ejemplos en esta memoria, los compuestos según la presente invención que llevan solamente tres (3) cargas positivas y que tienen un R(FA) que contiene 1 a 5 átomos de carbono pueden ser agentes muy potentes para sensibilizar bacterias Gram-negativas a agentes antibacterianos.

- 20 Para la actividad sensibilizadora, al menos dos (2) y más preferiblemente tres (3) cargas positivas están localizadas en la parte del anillo heptapeptídico.

- 25 Los trabajos de Teuber (1970), Srinivasa y Ramachandran (1980a), y Sakura *et al.* (2004) describen, entre otros derivados de polimixina, derivados que tienen solamente dos (2) o tres (3) cargas positivas. Sin embargo, los compuestos llevan una parte de ácido graso R(FA) más larga que 5 átomos de carbono. Por otro lado, la polimixina B nonapéptido y la colistina nonapéptido, ambos previamente conocidos agentes eficaces de sensibilizar bacterias Gram-negativas a antibióticos, carecen de toda la parte R(FA) pero llevan cinco (5) cargas positivas.

Los derivados de polimixina de fórmulas I-V se pueden administrar a un sujeto en forma de profármaco. El profármaco puede comprender una o más fracciones enmascaradoras de carga que enmascaran las cargas positivas del compuesto hasta que se administra al sujeto.

- 30 La presente invención proporciona en un aspecto nuevos derivados de polimixina que llevan tres (3) cargas positivas solamente y un R(FA) que contiene 1 a 5 átomos de carbono solamente y que es capaz de sensibilizar una o más especies de bacterias Gram-negativas a un antibiótico o agente antibacteriano.

- 35 La susceptibilidad de bacterias a un agente antibacteriano se puede determinar mediante dos métodos microbiológicos. Un procedimiento rápido pero aproximado usa 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 que han sido inoculadas con una suspensión del organismo que se está ensayando, y se observan las placas por zonas de inhibición de crecimiento. Una técnica más precisa, la prueba de susceptibilidad de dilución de caldo, implica preparar tubos de ensayo que contienen diluciones seriadas del fármaco en medio de cultivo líquido, e inocular después el organismo que se está ensayando dentro de los tubos. Se informa la menor concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de la bacteria después de un periodo de incubación adecuado como la concentración inhibidora mínima (MIC).

- 40 Los derivados según la presente invención pueden sensibilizar bacterias Gram-negativas clínicamente importantes a agentes antibacterianos, donde dichas bacterias Gram-negativas pueden ser aquellas que pertenecen al género of especies de *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*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* 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 a tratar incluyen, por ejemplo, bacteriemia, septicemia, infección de piel y tejidos blandos, neumonía, meningitis, infecciones en la región peritoneal pélvica, infección de cuerpo extraño, fiebre en el paciente hematológico, infección asociada con una vía intravenosa u otro catéter, cánula y/o dispositivo, infección en

el tracto gastrointestinal, en el ojo, o en el oído, infección superficial de la piel, y colonización del tracto gastrointestinal, membranas mucosas y/o piel por bacterias potencialmente nocivas.

5 Las enfermedades bacterianas infecciosas incluyen (pero no se limitan a) infecciones graves adquiridas en el hospital, infecciones de los pacientes inmunocomprometidos, infecciones de los pacientes de trasplante de órgano, infecciones en las unidades de cuidados intensivos (UCI), infecciones graves de heridas por quemaduras, infecciones graves adquiridas en la comunidad, infecciones de pacientes con fibrosis quística, así como infecciones causadas por bacterias Gram-negativas multirresistentes.

10 La presente invención también está dirigida a combinaciones de dos o más derivados según la presente invención para tratamiento combinado. Las combinaciones pueden incluir derivados que tienen la capacidad de sensibilizar diferentes especies o cepas de bacterias Gram-negativas a agentes antibacterianos.

15 Otro aspecto de la presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de polimixina según la presente invención, sus profármacos y formas de sales, combinaciones seleccionadas de los mismos, y opcionalmente un agente antibacteriano formulado junto con uno o más soportes y excipientes farmacéuticamente aceptables. Ellos facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente e incluyen p. ej. agentes diluyentes, de relleno, tamponadores, espesantes, humectantes, dispersantes, solubilizadores, de suspensión, emulsionantes, de unión, estabilizantes, desintegrantes, de encapsulación, de recubrimiento, de incrustación, lubricantes, colorantes, y aromatizantes así como absorbentes, potenciadores de absorción, humectantes, conservantes y similares, bien conocidos por un experto en la técnica.

20 Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz en relación con la presente invención significa una cantidad de compuesto eficaz para sensibilizar bacterias Gram-negativas a agentes antibacterianos. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica de la medicina.

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

30 Las composiciones farmacéuticas según la presente invención incluyen (pero no se limitan a) aquellas destinadas a administración intravenosa, intramuscular, oral o tópica, así como aquellas que se administran como un supositorio o como un aerosol inhalable. Las composiciones incluyen inyecciones intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, subcutáneas, intramedulares, intratecales, intraventriculares, intranasales o intraoculares, aerosoles inhalables así como aquellas destinadas a administración rectal, oral, intravaginal, transmucosal o transdérmica.

35 Para administración parenteral (p. ej. por inyección de bolo, infusiones rápidas, o infusiones lentas), los compuestos según esta invención así como las combinaciones descritas anteriormente pueden formularse como sus formas de sales o ésteres adecuadas en soluciones acuosas estériles, preferiblemente fluidos fisiológicamente compatibles como solución salina, dextrosa al 5%, solución de Ringer, y solución de Hank. La formulación también puede incluir disolventes orgánicos como propilénglicol, polietilénglicol, propilénglicol o compuestos relacionados así como conservantes y tensioactivos.

45 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen 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-toluen-sulfónico, ácido salicílico, y similares.

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

55 Las composiciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados uni-dosis o multi-dosis, como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado liofilizado que requiere solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes del uso.

Para la administración oral, las preparaciones en forma sólida incluyen, p. ej. polvos, comprimidos, píldoras,

- grageas, pastillas, cápsulas, sellos y preparaciones microgranulares. Las preparaciones farmacéuticas se pueden preparar usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o de grageas. Un soporte/excipientes sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, solubilizadores, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes aromatizantes, agentes humectantes, agentes desintegradores de tabletas, un material encapsulante. Los soportes adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, dextrosa, lactosa, pectina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares.
- Las preparaciones líquidas adecuadas para administración oral incluyen p. ej. 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 sabores. Las suspensiones acuosas se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, como gomas naturales y/o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones acuosas de polipropilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes como lecitina, monooleato de sorbitán o acacia.
- Los compuestos según la invención o combinaciones anteriormente descritas también pueden formularse para administración tópica. Los compuestos activos se mezclan en condiciones estériles con soportes/excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo cualquier agente tamponador y conservantes necesarios. Los ungüentos, cremas y lociones pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes emulsionantes, dispersantes, de suspensión, espesantes, estabilizantes o colorantes adecuados. Los excipientes comúnmente usados incluyen grasas y aceites animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, derivados de celulosa, tragacanto, y polietilenglicol.
- Otras formulaciones tópicas incluyen, pero no se limitan a, gotas para los oídos, gotas oculares y parches transdérmicos.
- Para la administración transdérmica así como transmucosal pueden usarse en la formulación penetrantes generalmente conocidos en la técnica.
- Para la administración por inhalación, los compuestos según esta invención y las combinaciones anteriormente descritas se suministran en la forma de una presentación en spray aerosol desde un ventilador, un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., 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. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej. gelatina para usar en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.
- Los compuestos según esta invención y las combinaciones anteriormente descritas también pueden formularse en composiciones rectales como enemas de retención o supositorios, que usan bases de supositorio convencionales como manteca de cacao, otros glicéridos, polietilenglicol o una cera de supositorio.
- También se describe en esta memoria un método para usar los presentes derivados de polimixina o una combinación de tales derivados como parte del tratamiento clínico de (o para un régimen profiláctico preventivo) sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad infecciosa (es decir, una infección bacteriana Gram-negativa), y comprende administrar a dicho sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un derivado según la presente invención, en combinación con un agente antibacteriano.
- También se describe en esta memoria un método para sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano, en donde el derivado según la presente invención se administra simultáneamente, 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 vías diferentes. 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. Alternativamente, el derivado puede administrarse 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 forma de aerosol o nebulizada mientras se administra el agente antibacteriano, p. ej., intravenosamente. El derivado y los agentes antibacterianos se pueden administrar simultánea o secuencialmente, siempre que se administren de una manera suficiente para permitir que ambos logren concentraciones eficaces en el sitio de infección.
- La "efectividad terapéutica" se basa en un resultado clínico exitoso y no requiere que un derivado según la presente invención, en combinación con un agente antibacteriano, mate al 100% de las bacterias implicadas en una infección. El éxito del tratamiento depende de lograr un nivel de actividad antibacteriana en el sitio de la infección, suficiente

para inhibir las bacterias de una manera que inclina el equilibrio a favor del huésped. Cuando las defensas del huésped son máximamente eficaces, el efecto antibacteriano requerido puede ser modesto. La reducción de la carga del organismo incluso de un logaritmo (un factor de 10) puede permitir que las propias defensas del huésped controlen la infección. Además, el aumento de un efecto bactericida/bacteriostático temprano puede ser más importante que el efecto bactericida/bacteriostático a largo plazo. Estos eventos tempranos son una parte significativamente y crítica del éxito terapéutico, ya que dejan tiempo para que los mecanismos de defensa del huésped se activen. El aumento de la tasa bactericida puede ser particularmente importante para infecciones como meningitis, infecciones óseas o articulares.

La eficacia terapéutica de un agente antibacteriano depende de la susceptibilidad de la especie bacteriana a dicho agente antibacteriano en la concentración clínicamente relevante del derivado según esta invención. El efecto de los compuestos según la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica de agentes antibacterianos puede demostrarse en modelos animales in vivo, como ensayos con peritonitis de ratón o bacteriemia de conejo, y puede predecirse sobre la base de una variedad de pruebas in vitro, incluyendo (1) determinaciones de la concentración inhibidora mínima (MIC) 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 de crecimiento cinético de una bacteria Gram-negativa, y (3) ensayos de tablero de la MIC de diluciones seriadas de agente antibacteriano en solitario o en combinación con diluciones seriadas de compuesto(s). Son bien conocidos en la técnica ejemplos de modelos o ensayos.

Usando determinaciones in vitro de MIC a 24 horas, se puede demostrar que un derivado según la presente invención reduce la MIC del agente antibacteriano. Con este resultado, se espera que la administración simultánea del compuesto in vivo aumentará la susceptibilidad de una bacteria Gram-negativa al agente antibacteriano. Se puede mostrar un compuesto según la presente invención para reducir la MIC de un agente antibacteriano del intervalo en el que se considera el organismo clínicamente resistente a 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 según la presente invención con el agente antibacteriano revertirá la resistencia y convertirá eficazmente al organismo resistente a los antibióticos en un organismo susceptible a antibiótico.

Midiendo el efecto de agentes antibacterianos en las curvas de crecimiento in vitro de bacterias Gram-negativas, en presencia o ausencia de un compuesto según la presente invención, se puede mostrar el compuesto para mejorar el efecto antibacteriano temprano de agentes antibacterianos dentro de un periodo de preferiblemente menos de 24 horas. La mejora de los efectos inhibidores/bactericidas en el crecimiento temprano es importante para determinar el resultado terapéutico.

En un ensayo de tablero, la combinación de un compuesto según la presente invención con agentes antibacterianos puede dar como resultado un índice de concentración inhibidora fraccionario "sinérgico" (FICI). El método de tablero se basa en la adición, que asume que el resultado observado con múltiples fármacos es la suma de los efectos separados de los fármacos que se ensayan; según este sistema un FICI menor de 0,5 se registra como sinérgico, 1 se registra como aditivo, y mayor que 1 pero menor que 2 se registra como indiferente.

Agentes antibacterianos adecuados para usar en combinación con derivados según la presente invención incluyen p. ej. macrólidos, como claritromicina, azitromicina, y eritromicina, cetóridos, lincosaminas, como clindamicina, estreptograminas, rifamicinas, como rifampicina, rifabutina y rifalazil, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, antibióticos glicopéptidos, como vancomicina, dalbavancina, telavancina y oritavancina, fluoroquinolonas, derivados de tetraciclina, derivados hidrófobos de penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems, penems y otros antibióticos betalactámicos, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folato, inhibidores de deformilasa, e inhibidores de la bomba de flujo de salida bacteriana. Una persona experta en la técnica de tratar infecciones por bacterias Gram-negativas puede fácilmente reconocer agentes antibacterianos adicionales clínicamente relevantes que pueden ser útiles. Preferiblemente dichos agentes antibacterianos se seleccionan de un grupo de agentes antibacterianos hidrófobos o moderadamente hidrófobos frente a los que la membrana externa de bacterias Gram-negativas actúa como una barrera de permeabilidad eficaz.

La descripción también incluye el uso de los presentes compuestos o combinaciones de los mismos para sensibilizar bacterias clínicamente importantes enumeradas en esta memoria al mecanismo de defensa del huésped del complemento (presente en el suero animal y humano fresco) sometiendo dicha bacteria a la acción de tales compuestos durante una infección clínica o una sospecha de infección. Se puede ejercer la defensa del huésped, p. ej., mediante la acción combinada del complemento y de leucocitos polimorfonucleares.

Aquellos expertos en la técnica de la medicina pueden optimizar fácilmente dosis eficaces y regímenes de administración para los compuestos según la presente invención, así como para los antibióticos en administración simultánea, teniendo en cuenta factores bien conocidos en la técnica que incluyen el tipo de sujeto que está siendo dosificado, edad, peso, sexo y estado médico del sujeto, la ruta de administración, las funciones renal y hepática del sujeto, el efecto deseado, el compuesto particular según la presente invención empleado y la tolerancia del sujeto al mismo. Las dosis de los agentes antimicrobianos se deben ajustar en pacientes con disfunción renal o insuficiencia hepática, debido al reducido metabolismo y/o excreción de los fármacos en pacientes con estas afecciones. Las dosis en los niños también deben reducirse, generalmente según el peso corporal.

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

5 También se reconocerá por un experto en la técnica que el curso óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis administradas por día para un número de días definido, se determinará por la naturaleza y extensión de la afección a tratar, la forma, ruta y sitio de administración, y el paciente particular a tratar, y que tales óptimos pueden determinarse mediante técnicas convencionales.

10 También hay una descripción de un método para ensayar un compuesto según la presente invención, dicho compuesto que es un derivado de una polimixina u octapeptina natural, en donde dicho derivado tiene solamente tres cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono, a diferencia del compuesto de origen natural del que se deriva, para la capacidad de sensibilizar una Gram-negativa perjudicial a agentes antibacterianos y/o el complemento presente en el suero, dicho método que comprende la etapa de poner en contacto la bacteria con dicho derivado de una polimixina u octapeptina natural, e identificar derivados que poseen actividad de sensibilización hacia dicha bacteria.

15 En un aspecto adicional, se proporciona un método para desarrollar nuevos antibióticos que comprende las etapas de

- (a) proporcionar un compuesto de polimixina u octapeptina natural que lleva un total de 4 a 6 cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono,
- 20 (b) sustituir de 1 a 3 restos que llevan una o más cargas positivas por un resto que no tiene una carga positiva, o por un enlace covalente, generando de este modo un derivado de polimixina de la presente invención como se define en esta memoria que lleva tres cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono,
- (c) ensayar dicho derivado de polimixina para la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas al agente antibacteriano; y
- 25 (d) seleccionar compuestos que tienen la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano.

Se describe también en esta memoria un método para desarrollar nuevos antibióticos que comprende las etapas de

- 30 (a) proporcionar un compuesto de polimixina u octapeptina natural, o un derivado del mismo, que lleva un total de 4 o 5 cargas positivas, o un total de 6 cargas positivas, como en las deacilpolimixinas, y un resto terminal (D) que comprende más de 5 átomos de carbono,
- (b) sustituir de 1 a 3 restos que llevan una o más cargas positivas por un resto que no tiene una carga positiva, o por un enlace covalente, generando de este modo un derivado de un compuesto de polimixina que tiene tres cargas positivas,
- 35 (c) sustituir un resto terminal (D) que comprende más de 5 átomos de carbono por un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono, generando de este modo un derivado de un compuesto de polimixina que lleva 3 cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono,
- (d) ensayar dicho derivado de polimixina para la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas al agente antibacteriano; y
- 40 (e) seleccionar compuestos que tienen la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano.

En un ejemplo del método, el resto terminal (D) es  $R^{12}-C(=O)$ ,  $R^{12}-(C=S)$ , o  $R^{12}$ , en donde  $R^{12}$  y  $R^{12}$  son como anteriormente se definen. En otra realización de la invención, el resto terminal (D) es R(FA), que es un resto alcanoílo o alquilo opcionalmente sustituido que tiene un total de 1 a 5 átomos de carbono.

45 En un aspecto adicional más de la descripción se proporciona un método para desarrollar nuevos antibióticos que comprende las etapas de

- a) proporcionar un compuesto de polimixina u octapeptina, o un derivado del mismo, que tiene un total de 4 a 6 cargas positivas y carece del resto terminal (D),
- 50 b) sustituir de 1 a 3 restos que llevan una o más cargas positivas por un resto que no tiene una carga positiva, o por un enlace covalente, generando de este modo un derivado de un compuesto de polimixina que lleva 3 cargas positivas;



c) introducir un resto terminal (D) que comprende 1 a 5 átomos de carbono, generando de este modo un compuesto de polimixina que lleva 3 cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende de 1 a 5 átomos de carbono;

5 e) ensayar dicho derivado de polimixina para la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas al agente antibacteriano; y

f) seleccionar compuestos que tienen la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano.

10 En un ejemplo del método, el resto terminal (D) es  $R^{12}-C(=O)$ ,  $R^{12}-(C=S)$ , o  $R^{12}$ , en donde  $R^{12}$  y  $R^{12}$  son como anteriormente se definen. En otra realización de la invención, el resto terminal (D) es R(FA), que es un resto alcanoilo o alquilo opcionalmente sustituido que tiene un total de 1 a 5 átomos de carbono.

15 También se describe un derivado de polimixina semisintético que se puede obtener tratando química o enzimáticamente polimixinas u octapeptinas que se dan en la naturaleza, respectivamente, o aquellas variantes de las mismas que son fabricadas por organismos modificados genéticamente. Los tratamientos químicos incluyen, pero no se limitan a, aquellos con anhídrido acético, ácido fórmico, hidracina, y ácido oxálico. Los tratamientos enzimáticos incluyen, pero no se limitan a, con enzimas como polimixina deacilasa, ficina, papaína, bromelina, subtilopeptidasas, subtilisina, colistina hidrolasa, y Nagarse.

Los compuestos preferidos son menos catiónicos que las polimixinas u octapeptinas naturales, llevan tres (3) cargas positivas solamente y un R(FA) que tiene 1 a 5 átomos de carbono, y son:

20 (a) capaces de sensibilizar bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, y *Acinetobacter baumannii* a antibióticos, y/o

(b) menos tóxicos que las polimixinas usadas clínicamente, como se evidencia en el modelo animal in vivo, y/o

25 (c) menos nefrotóxicos que las polimixinas usadas clínicamente, como se evidencia en un modelo animal y/o en una prueba in vitro que mide la afinidad de los compuestos con las estructuras del riñón, y/o

(d) capaces de causar menos liberación de histamina de los tejidos que las polimixinas usadas clínicamente cuando se administran tópicamente o cuando se inhalan como un aerosol, y/o

30 (e) farmacocinéticamente más favorables, como tener una vida media en suero más larga, aclaramiento renal aumentado, recuperación urinaria incrementada y/o por ser menos inactivados por tejido polianiónico y constituyentes del pus que las polimixinas usadas clínicamente.

35 En una realización adicional, los compuestos de la invención tienen una o más propiedades farmacocinéticamente más favorables en comparación con polimixinas u octapeptinas nativas (p. ej., polimixina A, polimixina B, IL-polimixina-B<sub>1</sub>, polimixina D, polimixina E, polimixina F, polimixina M, polimixina S, polimixina T, circulina A, octapeptina A, octapeptina B, octapeptina C, u octapeptina D). Ejemplos de tales propiedades farmacocinéticamente favorables incluyen una vida media en suero más larga, aclaramiento renal aumentado, o recuperación urinaria aumentada en comparación con polimixinas u octapeptinas nativas (como polimixina E).

40 En una realización adicional, los compuestos de la invención pueden tener un mayor porcentaje de recuperación urinaria de una dosis administrada durante 24 horas que la polimixina E (colistina). En otra realización adicional, la recuperación urinaria, basada en experimentos con ratas es aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 15% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 25% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 35% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 45% o más, o aproximadamente 50% o más. Por el contrario, se determinó que la recuperación urinaria de polimixina E (colistina) era aproximadamente  $0,18 \pm 0,14$  % de la dosis en 24 horas (Li *et al.*, 2003), que usa la misma dosis y procedimiento.

45 En otra realización adicional, los compuestos de la invención pueden tener un mayor aclaramiento renal que la polimixina E (colistina) cuando se administran usando la misma ruta y dosificación. En una realización adicional, los compuestos de la invención tienen un aclaramiento renal, basado en experimentos con ratas, mayor que aproximadamente 0,1 ml/min/kg, mayor que aproximadamente 0,5 ml/min/kg, mayor que aproximadamente 1,0 ml/min/kg, mayor que aproximadamente 2,0 ml/min/kg, mayor que aproximadamente 2,5 ml/min/kg, mayor que aproximadamente 3,0 ml/min/kg, o mayor que aproximadamente 3,5 ml/min/kg. En otra realización adicional, el aclaramiento renal de los compuestos de la invención puede ser al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 150 veces, al menos 200 veces, al menos 250 veces, o al menos 300 veces la de la polimixina E, cuando se administra a la misma dosis y ruta de administración.

En otra realización adicional, los compuestos de la invención pueden tener también una o más propiedades farmacocinéticamente favorables en comparación con compuestos similares con colas de ácidos grasos más largas (es decir, un resto terminal o R(FA) que tiene más de 5 átomos de carbono). Como se muestra en el Ejemplo 8, NAB741 ha aumentado el aclaramiento renal y aumentado la recuperación urinaria en comparación con NAB739.

5 Los compuestos son químicamente idénticos excepto que NAB741 tiene un resto acetilo terminal y NAB739 tiene un resto octanoílo terminal.

Los métodos para sintetizar compuestos según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes descritos a continuación. Un experto en la técnica es capaz de elegir el método apropiado para que un compuesto específico se sintetice.

10 1. Los derivados semisintéticos de polimixinas y octapeptinas que llevan una parte heptapeptídica no modificada y una cadena lateral acil-aminoacilo modificada se pueden preparar mediante los procedimientos descritos a continuación:

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

20 En condiciones donde la pobre solubilidad en agua plantea ocasionalmente un problema en las etapas subsiguientes, se puede hacer la protección usando grupos de bloqueo cargados negativamente como un derivado de ácido sulfónico de Fmoc o un derivado de ácido carboxílico de Fmoc, describiéndose el método en la publicación de la Patente de E.E.U.U. 2006004185. También se puede mejorar la solubilidad en agua uniendo un grupo de bloqueo muy hidrófilo adecuado, cargado negativamente, que se puede eliminar, al grupo OH de la treonina.

25 A continuación, el compuesto se somete a un tratamiento enzimático con enzimas como polimixina deacilasa, polimixina hidrolasa, papaína, ficina, bromelina, subtilopectidasa, Nagarse u otras enzimas que eliminan una parte terminal de la cadena lateral o incluso toda la cadena lateral de compuestos de polimixina u octapeptina. Este tratamiento se puede continuar opcionalmente por el procedimiento de la degradación de Edman. El compuesto resultante carece de toda la cadena lateral y consiste únicamente en la parte heptapeptídica cíclica, pero tiene un grupo alfa amino N-terminal.

30 Alternativamente, las polimixinas y octapeptinas que tienen grupos amino protegidos por grupos estables a ácidos como benciloxicarbonilo pueden tratarse con ácido oxálico o ácido fórmico para producir derivados desacilados protegidos, el método descrito por Kurihara *et al.* (1974). El procedimiento es seguido por un tratamiento enzimático adicional como el anterior y/o por degradación de Edman para producir un heptapéptido.

35 A partir de ahí, está unido un resto adecuado a la posición alfa-amino libre de la porción del anillo heptapéptido. El resto puede contener un resto acilo o relacionado (R(FA) que tiene en total 1 a 5 átomos de carbono), como resto metilo, acetilo, propionilo, butanoílo, isobutanoílo, valeroílo, o isovaleroílo, así como restos de aminoácido, hasta tres y preferiblemente dos restos. Por ejemplo, se puede preparar un compuesto semisintético con un grupo acilo y dos restos de aminoácidos añadiendo al heptapéptido anteriormente descrito un resto de N-(acil)-treonil-Dtreonilo sintético. Esto se puede conseguir mediante técnicas generales convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica de la química orgánica, estas técnicas que incluyen el uso de restos unidos a N-hidrosuccinimida como se describe en el documento de E.E.U.U. 2006004185. En esta síntesis particular el procedimiento puede implicar el uso de N-aciltreonil-Dserinil-N-hidrosuccinimida.

40 2. Nonapéptidos de polimixina acilados que llevan tres (3) grupos amino libres. La polimixina D posee solamente cuatro (4) cargas positivas y tiene DSer en la posición R3. Los grupos amino libres de la polimixina D se pueden proteger por los medios anteriormente descritos. Esto se continúa con un tratamiento enzimático y una etapa de degradación de Edman opcional, para producir un nonapéptido, que puede ser entonces acilado por acil-isotiocianato (mediante el método bien conocido por una persona experta en la técnica y descrito en el documento de E.E.U.U. 2006004185), por cloruro de acilo (mediante el método bien conocido por una persona experta en la técnica y descrito en Chihara *et al.* 1974), o usando restos unidos a N-hidroxisuccinimida (mediante el método bien conocido por una persona experta en la técnica y descrito en el documento de E.E.U.U. 2006004185). Finalmente, se eliminan los grupos protectores. La polimixina D nonapéptido acilada lleva solamente tres (3) grupos amino libres, todos en la porción del anillo heptapeptídico.

45 De una manera análoga, se puede preparar una polimixina S nonapéptido acilada. Lleva solamente tres (3) grupos amino libres.

50 3. Los derivados de polimixina y octapeptina totalmente sintéticos se pueden fabricar por métodos convencionales muy conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales métodos incluyen los procedimientos de síntesis en fase líquida así como procedimientos de síntesis en fase sólida descritos por ejemplo por Sakura *et al.* (2004), Tsubery *et*

5 *al.* (2000a, 2000b, 2002, 2005), y Ofek *et al.* (2004). Los métodos incluyen, por ejemplo, el uso de agentes protectores como Fmoc, tBoc, y CBZ en posiciones estratégicas, así como la etapa de ciclación donde se usa DPPA (difencil fosforazidato) o una mezcla de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-Bop), N-hidroxibenzotriazol (HoBt), y N-metilmorfolina (NMM). Los derivados Fmoc de muchos aminoácidos no-triviales así como D-aminoácidos están comercialmente disponibles. El amino terminal del último resto de aminoácido se deja desprotegido para permitir la reacción directa en el procedimiento de acilación con ácidos como ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico y ácido isovalérico.

10 4. También puede realizarse la acilación del grupo alfa-amino N-terminal libre de los compuestos intermedios descritos anteriormente (párrafos 1-3) usando anhídridos como anhídrido acético (véase Ejemplo 1), anhídrido propiónico, anhídrido butírico, y anhídrido valérico usando condiciones bien conocidas por una persona experta en la técnica. La N-formilación se puede realizar usando p-nitrofenil formato en N-metil pirrolidina y condiciones bien conocidas por una persona experta en la técnica. La N-metilación se puede realizar usando una mezcla de ácido fórmico y anhídrido acético en dimetilformamida y condiciones bien conocidas por una persona experta en la técnica.

#### Listado de referencias

15 Todas las referencias citadas en la presente solicitud se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

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

20 Chihara S, Ito A, Yahata M, Tobita T, Koyama Y. 1974. Chemical synthesis, isolation and characterization of  $\alpha$ -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.

de Viser PC, Kriek NMAJ, van Hooft PAV, Van Schepdael A, Filippov DV, van der Marel GA, Overkleeft HS, van Boom JH, Noort D. 2003. Solid-phase synthesis of polymyxin B<sub>1</sub> and analogues via a safety-catch approach. *J. Peptide Res.* 61: 298-306.

25 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.

30 Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JB, Smeaton TC, and Coulthard K. 2003. Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulphate in rats following intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1766-1770.

Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JB, Smeaton TC, and Coulthard K. 2004. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J Antimicrob Chemother* 53: 837-840.

35 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.

40 Okimura K, Ohki K, Sato Y, Ohnishi K, Uchida Y, Sakura N. 2007. Chemical conversión of natural polymyxin B and colistin to their N-terminal derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 80 (Nº 3): 543-552.

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.

45 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.

50 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.
- 5 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.
- 10 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 hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. *Molecular Pharmacology* 62: 1036-42.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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* 44: 517-523.

### 30 Ejemplos

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

#### Ejemplo 1

##### Síntesis de péptidos

- 35 Los derivados de polimixina ("péptidos NAB" o "compuestos NAB") se sintetizaron mediante química en fase sólida convencional, usando la estrategia de protección Fmoc convencional. El aminoácido en el extremo C-terminal está comercialmente disponible como pre-anclado a la fase sólida y cuando se escinde de la resina con ácido, produce un ácido carboxílico C-terminal.
- 40 La estrategia en la protección fue usar tres niveles de protección ortogonal, protección temporal Fmoc para las funciones alfa-amino, grupos que se eliminan durante la etapa de escisión con ácido, y protección semi-permanente para cubrir las funciones reactivas de la cadena lateral mientras se produce la reacción de ciclación. Después de la escisión del péptido de la resina, el ácido carboxílico C-terminal se hace reaccionar con una función amino de la cadena lateral de uno de los aminoácidos para formar un péptido cíclico. Después de la etapa de ciclación, los grupos de protección semi-permanente se eliminan para producir el péptido NAB.
- 45 Por consiguiente, la función alfa-amino del aminoácido estaba protegida por fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) y se eliminó Fmoc por piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) en cada ciclo. El aminoácido que está implicado en la ciclación, es decir, ácido diaminobutírico, estaba protegido por t-butoxicarbonilo (t-Boc), un grupo lábil ácido que se eliminó en la etapa de escisión. El grupo funcional de asparagina estaba protegido por tritilación. Todos los otros aminoácidos que tienen grupos funcionales de cadena lateral estaban protegidos por un grupo que es estable a la
- 50 etapa de escisión por ácido, es decir, benziloxicarbonilo (Z). Naturalmente los aminoácidos fenilalanina y leucina no

necesitaron protección de la cadena lateral. El amino terminal no estaba protegido; esto permitió la reacción directa en el procedimiento de acilación.

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

- 5 La acilación se realizó usando un exceso molar de cuatro veces de cada uno, aminoácido o el ácido graso, un exceso molar de cuatro veces del activador HCTU (véase anteriormente) y un exceso molar de ocho veces de N-metil morfolina. El tiempo de reacción fue de 30 min.

Los aminoácidos se compraron ya protegidos de proveedores estándar.

- 10 El péptido se retiró de la resina mediante reacción con una solución de ácido trifluoroacético al 95% y agua al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente, para producir el producto parcialmente protegido. El péptido resultante se precipitó con éter dietílico.

- 15 La mezcla de ciclación usada fue hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBop), N-hidroxibenzotriazol (HoBt), y N-metil morfolina (NMM) al exceso molar de 2, 2 y 4, respectivamente. El péptido se disolvió en dimetilformamida, se añadió la mezcla de ciclación y se dejó reaccionar durante 2 horas. El péptido protegido y ciclado se precipitó por adición de éter dietílico frío. Se eliminó cualquier PyBop residual lavando el péptido con agua.

La acetilación se realizó usando anhídrido acético-diisopropiletilamina-DMF (1:1:18 en vol.).

- 20 Los restantes grupos de protección de cadena lateral (Z) se eliminaron mediante deshidrogenación catalítica. El péptido se disolvió en ácido acético-metanol-agua (5:4:1), en una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador de carbón paladio.

El péptido se purificó mediante cromatografía en fase reversa que usan gradientes convencionales de acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético. El producto se secó por liofilización.

El rendimiento fue de 10-20 mg, lo que representa aprox. 10%-20% del teórico, calculado a partir de la cantidad molar (aprox. 100 micromoles) del primer resto aminoácido unido a la resina.

- 25 La pureza, como se estimó mediante HPLC en fase reversa fue más del 90%. Las masas obtenidas fueron las esperadas a partir de los valores teóricos, dentro del error experimental.

#### Ejemplo 2

##### Actividad de los compuestos frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

- 30 Los péptidos sintetizados en el Ejemplo 1, que llevaban ambos solamente tres (3) cargas positivas, se estudiaron por su capacidad de sensibilizar *E. coli* al antibiótico de rifampicina modelo. Esto se ensayó empleando placas de agar LB (LB Agar Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, E.E.U.U.) que contienen concentraciones crecientes (0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml) de rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U.) así como usando placas control de agar LB que no contienen rifampicina.

- 35 El organismo indicador *E. coli* IH3080 (K1:O18) era una cepa encapsulada aislada originalmente de un neonato que padecía meningitis (Vaara *et al.* 1984) y obtenida del National Public Health Institute de Helsinki, Finlandia.

- 40 A partir de un cultivo de toda la noche de IH3080 sobre agar LB, se preparó una suspensión de aprox.  $10^8$  células/ml en NaCl al 0,9%. Se pipetearon entonces alícuotas de esta suspensión en las placas de agar y se agitaron las placas suavemente para extender uniformemente la suspensión sobre toda la superficie de la placa. A partir de ahí, se eliminó la parte no absorbida de la suspensión usando una pipeta Pasteur. Después de secar la superficie, se perforaron pequeños pocillos (diámetro, 2 mm) en las placas (cinco pocillos por placa) usando un tubo de metal estrecho, de punta afilada estéril, una punta de pipeta de un solo uso, y succión a vacío. Alternativamente, se usó un hisopo para extender el inóculo. Después se pipetearon las muestras (4 µl y 10 µl) de la solución de péptido en NaCl al 0,9% (a concentraciones de 1 µg/ml y 0,1 µg/ml) a los pocillos y se dejaron absorber los fluidos de muestra. Los controles incluyeron solución de NaCl al 0,9% sin el compuesto a ensayar. Las placas se incubaron entonces durante 18 h a 37°C, después de lo que se midieron los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de cada pocillo; el diámetro del propio pocillo no se redujo. Finalmente, los diámetros se convirtieron en áreas de superficie de inhibición del crecimiento (en mm cuadrados).

- 50 La Tabla 2 muestra la actividad de los nuevos compuestos frente a *E. coli* IH3080 en comparación con la de los compuestos de control. Aunque ambos carecían de la actividad antibacteriana directa de NAB739, sensibilizaron el objetivo a una concentración de 4 µg/ml hasta una concentración de rifampicina tan baja como 0,1 µg/ml. Curiosamente, el NAB747 era antibacteriano directamente frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. En un pocillo que contenía 10 µg del péptido, provocó una zona de inhibición con un área superficial de 50 mm<sup>2</sup>. A 4 µg, el valor correspondiente era de 20 mm<sup>2</sup>.

ES 2 615 813 T3

Tabla 2. Estructura de nuevos compuestos y sus actividades frente a *E. Coli* IH3080

Grupo de compuesto	Nombre del compuesto	SEQ ID NO	Estructura*			Cargas positivas totales (cíclicas)	Actividad directa **	Actividad p. de rifampicina***	
			Parte-FA	Secuencia peptídica					
				Cadena lateral	Parte cíclica				
Compuestos control					cy[XXfLXXT]				
		Polimixina B	MO(H)A	XTX		5 (3)	79	95	
						cy[XXfLXXT]			
		Deacilpolimixina B	-	+XTX		6 (3)	57	79	
						cy[XX1LXXT]			
		Deacilcolistina	-	+XTX		6 (3)	79	87	
						cy[XXfLXXT]			
		Polimixina B nonapéptido	-	+TX		5 (3)	0	20	
						cy[XXfLXXT]			
		Polimixina B heptapéptido	-	+		4 (4)	0	0	
						cy[XXfLXXT]			
		NAB 704	-	+TZ		4 (3)	0	0	
						cy[XXfLXXT]			
		NAB 705	-	+ZTZ		4 (3)	0	0	
						cy[XXfLZZT]			
		NAB 701	-	+TX		3 (1)	0	0	
					cy[XXfLBBT]				
	NAB 702	-	+TX		3 (1)	0	0		
					cy[XXfLJJT]				
	NAB 703	-	+TX		3 (1)	0	0		
					cy[XXfLXXT]				
	Octanoil PMBH	OA	-		3 (3)	0	0		
	NAB 736	DA	-	[XXfLXXT]	3 (3)	0	113		
					cy[XXfLXXT]				
	NAB 739	OA	Ts		3 (3)	133	177		
					cy[XXfLXXT]				
	NAB 740	DA	Ts		3 (3)	95	95		
					cy[XXfLXXT]				
Compuestos nuevos	NAB 7061	OA	TZ		3 (3)	0	113		
					cy[XXfLXXT]				

NAB 741	10	Ac	Ts	cy[XXfLXXT]	3 (3)	0	95
NAB 745	39	Ac	Tn	cy[XXfLXXT]	3 (3)	0	50
NAB 747	10	Me	Ts		4 (3)	0	28

\* Códigos de una letra para los restos de aminoácido: F, Phe; L, Leu; N, Asn; S, Ser; T, Thr; X, Dab; Z, Abu; B, N-gammaformil-Dab; J, N-gamma-acetil-Dab. Las letras pequeñas indican restos que están en configuración D.

+ indica la carga positiva del grupo alfa-amino en el N-terminal libre del péptido. Abreviaturas: MO(H)A, la mezcla de 6-metiloctanoil, 6-metilheptanoil y restos de ácidos grasos relacionados que aparecen en la polimixina B; OA, octanoil; DA, decanoil; Ac, acetilo; Me, metilo.

\*\*Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contiene 4 microgramos del compuesto en placas LB.

\*\*\* Actividad antibacteriana medida como la inhibición del crecimiento (en milímetros cuadrados) alrededor de un pocillo que contiene 4 microgramos del compuesto en una placa LB que contiene rifampicina (0,1 microgramos/ml).

10 Ejemplo 3

NAB741 sensibiliza *E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter cloacae* a una amplia gama de agentes antibacterianos

15 Se determinaron las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) de un conjunto representativo de agentes antimicrobianos usados clínicamente para dos cepas *E. Coli* (ATCC25922 e IH3080), *K. Pneumoniae* ATCC13883, y *E. Cloacae* ATCC23355 usando medio de agar Mueller-Hinton (nº de producto Lab039; LabM Ltd., Bury, Lancs, U.K.) en presencia de NAB741 (4 µg/ml) así como en su ausencia. Se determinaron las MICs usando tiras-E (Biodisk Ltd., Solna, Suecia) según las instrucciones del fabricante. La concentración de NAB741 usada no inhibía por sí misma el crecimiento de las bacterias diana. La MIC de NAB741 para todas estas cepas fue > 16 µg/ml.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 3. NAB741 a una concentración de 4 µg/ml era capaz de sensibilizar las cepas ensayadas a rifampicina por un factor que va de >64 a >2000. Se define factor de sensibilización como la relación entre la MIC de un antibiótico en ausencia de NAB741 y aquella en la presencia de 4 µg/ml de NAB741. También se observaron extremadamente altos factores de sensibilización a claritromicina (24-340), mupirocina (8-192), azitromicina (16-32), para algunas de las cepas a ácido fusídico (128-170), y para *E. cloacae* a vancomicina (170). Todos estos agentes antibacterianos son notablemente hidrófobos o grandes (vancomicina) y se sabe que  
25 son excluidos por la OM intacta de las bacterias Gram-negativas, aunque penetran en la OM dañada.

Tabla 3. Factores de sensibilización\* a agentes antibacterianos seleccionados a una concentración de NAB741 de 4 µg/ml

	E. coli	E. coli	K. pneum.	E. cloacae
	ATCC	IH 3080	ATCC	ATCC
	25922		13883	23355
Rifampicina	750	250	>64	>2000
Claritromicina	340	96	24	96
Mupirocina	128	64	8	190
Azitromicina	24	32	32	16
Ácido fusídico	170	130	>5	>130
Vancomicina	>16	16	>2	170

\* El factor de sensibilización es la relación entre la MIC del antibiótico en ausencia de NAB741 y aquella en presencia de 4 µg/ml de NAB741.

Ejemplo 4

Susceptibilidad de siete cepas diferentes de bacterias Gram-negativas a rifampicina y claritromicina en presencia de NAB741 (4 µg/ml)

- 5 Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitoras (MIC) de rifampicina y claritromicina para un conjunto representativo de diferentes cepas de bacterias Gram-negativas clínicamente relevantes por el método de E-prueba como en el Ejemplo 3 y usando agar Mueller-Hinton con o sin NAB741 (4 µg/ml). Esta concentración de NAB741 no inhibía por sí misma el crecimiento de las bacterias diana. Cinco de las cepas provenían de la ATCC. *Acinetobacter baumannii* F264 se adquirió de Mobidiag Ltd., Helsinki, Finlandia. La fuente de *E. coli* IH3080 se ha dado en el Ejemplo 2.
- 10 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se muestra que NAB741 es extraordinariamente activo incluso contra *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 4. La capacidad de NAB741 para sensibilizar bacterias Gram-negativas a antibióticos modelo (rifampicina y claritromicina)

Cepa bacteriana	MIC (µg/ml) de rifampicina en presencia de 4 µg/ml de NAB741*	Factor de sensibilización* de rifampicina	de a claritromicina	MIC (µg/ml) de claritromicina en presencia de 4 µg/ml de NAB741*	Factor de sensibilización** de claritromicina a
<i>E. coli</i> ATCC25922	0,016	750		0,125	340
<i>E. coli</i> IH3080	0,047	250		0,125	96
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	0,5	>64		1	24
<i>E. cloacae</i> ATCC23355	0,016	2000		0,5	96
<i>Ac. baumannii</i> ATCC19606	0,19	16		0,5	32
<i>Ac. baumannii</i> F264	0,125	64		0,5	32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	16	2		64	2

\* La relación entre MIC de rifampicina en ausencia de NAB741 y aquella en presencia de NAB741 (4 µg/ml).

- 15 \*\* La relación entre MIC de claritromicina en ausencia de NAB741 y aquella en presencia de NAB741 (4 µg/ml).

Ejemplo 5.

NAB471 sensibiliza una cepa resistente a meropenem de *Acinetobacter baumannii* a meropenem

- 20 Se determinaron las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) de meropenem para dos cepas de *A. baumannii* mediante el método de E-prueba como en el Ejemplo 4 y usando agar Mueller-Hinton con o sin NAB741 (4µg/ml). Esta concentración de NAB741 no inhibía por sí misma el crecimiento de las bacterias diana. Se define el factor de sensibilización como en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 5. El NAB7061 sensibilizó la cepa F264 resistente a meropenem a meropenem por un factor >4.

Tabla 5. Sensibilización de la cepa resistente a meropenem de *Acinetobacter baumannii* a meropenem en presencia de NAB741 (4 µg/ml)

Cepa	MIC (µg/ml) de meropenem a la conc. indicada (µg/ml) de NAB741	
	0	4
<i>A. baumannii</i> ATCC19606	0,75	0,5
<i>A. baumannii</i> F264	>32	8



Ejemplo 6.

NAB741 sensibiliza *E. Coli* al complemento en suero normal fresco

- 5 La capacidad de NAB741 de sensibilizar la cepa lisa y encapsulada de *E. coli* a la acción bactericida del suero de cobaya normal (GPS) se estudió por el método descrito por Vaara *et al.* (1984). Se creció *E. coli* IH3080 (018:K1) en caldo LB (caldo LB Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, E.E.U.U.) a 37°C en un agitador rotatorio en la fase de crecimiento logarítmico temprano, se lavaron con PBS (solución salina tamponada de fosfato, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O y 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por litro) y se resuspendieron en PBS, a aprox. 10<sup>9</sup> células/ml). Se utilizó GPS como fuente de complemento. Se almacenó a -70°C antes de su uso. Para inactivar el complemento se incubó el suero a 56°C durante 30 min.
- 10 El procedimiento experimental se realizó de la siguiente forma. Se inoculó GPS al 10% en PBS con aprox. 500 CFU (unidades formadoras de colonia) de bacterias por ml y se pipeteó en alícuotas de 0,2 ml en los pocillos de placas de microtitulación. Los pocillos contenían ya cantidades crecientes de NAB7061 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 en placas LB. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y se contaron las colonias desarrolladas.
- 15 Los resultados se muestran en la Tabla 6. El NAB741 no redujo en sí significativamente el recuento de CFU en ausencia de GPS o en presencia de GPS al 10% inactivado por calor. Sin embargo, fue suficiente una concentración tan baja de NAB741 como 2 µg/ml para reducir el recuento en un factor de aprox. 100 en presencia de GPS fresco al 10%. Por consiguiente, NAB741 actúa sinérgicamente con la maquinaria bactericida del complemento presente en suero fresco, como lo hace PMBN, el agente bien conocido por tener esta propiedad.
- 20 Tabla 6. La actividad bactericida sinérgica de NAB741 y suero de cobaya (GPS) al 10% frente a *E. Coli* IH3080 (018:K1)\*

	Concentración de NAB741 (µg/ml)			
	0	1	2	4
Nada (PBS)	100	71	86	58
GPS al 10%	>200	5	7	0
GPS al 10%, inactivado por calor	>200	>200	>200	125

\* medida como % de supervivencia después de 2 horas tratamiento a 37°C

Ejemplo 7.

Preparación y actividad biológica de la sal de sodio de NAB 739 metanosulfonato

- 25 Se disolvió acetato de NAB 739 (100 mg) en agua (2 ml) y se añadió solución de formaldehído neutra (400 microlitros de formaldehído acuoso al 30% [llevado a pH 7,2 con Na-HCO<sub>3</sub> 1 N]). Después, se añadió solución NaHCO<sub>3</sub> 1 N (2 ml), y el derivado de formaldehído NAB 739 precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido húmedo se suspendió en agua (5 ml), y se añadió metabisulfito de sodio (100 mg). Se obtuvo una solución clara después de unos pocos minutos y se secó por congelación. El floculante blanco sólido se extrajo con acetona
- 30 caliente (7,5 ml) y se secó al vacío. El rendimiento fue de 56 mg. El análisis del producto mediante espectrometría de masas ESI reveló un único pico predominante con la masa molecular de 1075,3 que indicaba que la mayor parte del derivado se sulfometiló en cada uno de los tres restos Dab del compuesto NAB 739. También era visible un pico menor que representaba el NAB 739 bloqueado al azar en dos de los tres restos de Dab.
- 35 Para la medición de la actividad antibacteriana de las soluciones acuosas de NAB 739 metanosulfonato de sodio, se hicieron tres soluciones diferentes: 1) Una solución (1 mg/ml) hecha en NaCl al 0,9% inmediatamente antes del experimento, 2) una solución (1 mg/ml) hecha en NaCl al 0,9% 24 h antes del experimento y mantenida a 37°C, 3) una solución (1 mg/ml) hecha en NaCl al 0,9% 48 h antes del experimento y mantenida a 37°C. Una solución recién hecha de acetato de NAB 739 sirvió como el compuesto control.

Tabla 7. La actividad bactericida del NAB 739 metanosulfonato comparado con el de NAB 739 frente a *E. Coli* IH3080\*

Compuesto	Antigüedad de la solución	0	1	2	4
NAB 739 MS**	fresca	100	70	62	16
NAB 739 MS**	24 h		55	34	6
NAB 739 MS**	48 h		35	11	0
NAB 739	fresca		21	2	0

\*medida como % de supervivencia después de 2 horas de tratamiento a 37 grados centígrados.

\*\*MS, metanosulfonato

5 La bacteria de prueba era *E. coli* IH3080. Se cultivó en caldo LB (caldo LB Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, E.E.U.U.) a 37°C en un agitador rotatorio en fase de crecimiento logarítmico temprano, se lavaron con PBS, y se resuspendieron en PBS a aprox.  $10^9$  células/ml. Se inoculó PBS con aprox. 500 CFU (unidades formadoras de colonias) de bacterias por ml y se pipetearon en alícuotas de 0,2 ml en pocillos de una placa de microtitulación. Las placas ya contenían concentraciones crecientes de NAB 739 metanosulfonato o el compuesto de control en 0,020 ml de NaCl al 0,9%. La placa se incubó a 37°C durante 1 h después de lo cual se vació cada pocillo en placas LB. La placa se incubó durante la noche a 37°C y se contaron las colonias desarrolladas.

10 Los resultados se muestran en la Tabla 7. La solución fresca de NAB 739 metanosulfonato era mucho menos antibacteriano que el compuesto de control NAB 739. Mantener la solución de NAB 739 metanosulfonato a 37°C durante 24 h antes de su uso aumentó ligeramente la actividad, mientras que mantenerla 48 h dio como resultado una actividad casi igual a la observada con el compuesto control. Estos resultados indican que NAB 739 metanosulfonato, en analogía con colistina metanosulfonato, se descompone lentamente en soluciones acuosas para producir sustancias antibacterianas más activas, es decir, sustancias menos sulfometiladas y finalmente NAB 739 libre.

15 Del mismo modo, se prepararon derivados metanosulfonato de NAB 741, NAB 745, NAB 747 y otros compuestos descritos en esta memoria. Estos profármacos se descomponen in vivo para producir compuestos que poseen la capacidad de sensibilizar bacterias diana a otros agentes antibacterianos y complementos del suero

Ejemplo 8.

Comparación de propiedades farmacocinéticas básicas de NAB 741 y NAB 739

25 Los estudios se realizaron principalmente usando los métodos descritos por Li et al. (2003, 2004). Cada rata (n=4 para ambos compuestos, Sprague-Dawley, macho) se anestesió usando isoflurano, y se insertó una cánula de polietileno en la vena yugular. Se colocó cada rata en una jaula metabólica y se la dejó recuperar del procedimiento durante la noche. Se administró el compuesto de ensayo (acetato, 1 mg/kg) en forma de bolo (en 200 µl de solución salina estéril al 0,9%) a través de la cánula, seguido de lavado con 0,8 ml de solución salina. Se recogieron manualmente nueve muestras de sangre cada una de 200 µl (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 min) a través de la cánula. Cuando se recogieron las muestras, se retiraron los primeros 100 µl de sangre y se mantuvieron en la jeringa. Después de recoger la muestra real con otra jeringa, el contenido de la primera jeringa se devolvió a la rata junto con 400 µl de solución salina heparinizada. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener plasma. Se recogieron muestras de orina en intervalos de 0-4 h, 4-6 h y 6-24 h. Las muestras de plasma y orina se almacenaron a -80°C.

35 Las muestras se analizaron usando cromatografía líquida y espectrometría de masas con interfaz de ionización por electrospray (LC/ionización por electrospray MS). Se añadieron a 100 µl de muestra, 10 µl de patrón interno (NAB 739, 80 µg/ml) y 200 µl (muestras de plasma) o 100 µl (muestras de orina) de acetonitrilo, la mezcla se mezcló en vortex durante 1 min, y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min. La cromatografía empleó la columna de HPLC C18 (50 x 2 mm), ácido fórmico al 0,1% como disolvente A, acetonitrilo al 0,1% como disolvente B, flujo de 0,2 ml/min y el siguiente gradiente: 5%-30% de B en 6 min, 30%-90% de B en 0,5 min, 90% de B mantenido durante 2,5 min, 90%-5% de B en 1 min. El eluyente entre 5,90-7,00 min y 9,00-10,1 min se dirigió al sistema MS que usa una válvula de conmutación. Se monitorizaron los iones moleculares protonados positivos de NAB 741 a m/z de 496,7 y 331,4 y de NAB 739 a m/z igual a 538,8 y 359,6. Se eluyó NAB 741 a  $6,65 \pm 0,05$  min y se eluyó NAB 739 a  $9,45 \pm 0,05$  min. El análisis no compartimentado de los compuestos en plasma se realizó usando el software WinNonlin (versión 4.0, Mountain View, CA, E.E.U.U.), con el modelo de NA201 (entrada de bolo intravenoso para datos de plasma).

Los parámetros farmacocinéticos básicos determinados para NAB 741, fueron los siguientes: vida media (min), 32,7

$\pm 2,41$ ; volumen de distribución (ml/kg),  $243 \pm 24,0$ ; aclaramiento (ml/min/kg),  $7,39 \pm 0,85$ ; recuperación urinaria (% de dosis en 24 h),  $50,9 \pm 13,6$ ; y aclaramiento renal (ml/min/kg),  $3,78 \pm 1,11$ .

5 Los parámetros farmacocinéticos básicos determinados para NAB 739, un compuesto por lo demás idéntico a NAB 741 pero que tiene un resto octanoilo en lugar de un resto acetilo como su resto terminal, fueron los siguientes: vida media (min),  $69,0 \pm 21,9$ ; volumen de distribución (ml/kg),  $222 \pm 20,5$ ; aclaramiento (ml/min/kg),  $2,63 \pm 0,54$ ; recuperación urinaria (% de dosis en 24 h),  $19,4 \pm 7,38$ ; y aclaramiento renal (ml/min/kg),  $0,53 \pm 0,30$ .

10 Los parámetros correspondientes para la colistina, determinados por Li et al. (2003) usando un procedimiento idéntico de dosificación y administración, fueron los siguientes: vida media (min),  $74,6 \pm 13,2$ ; volumen de distribución (ml/kg),  $496 \pm 60$ ; aclaramiento (ml/min/kg),  $5,2 \pm 0,4$ ; recuperación urinaria (% de dosis en 24 h),  $0,18 \pm 0,14$ ; y aclaramiento renal (ml/min/kg),  $0,010 \pm 0,008$ .

**Lista de secuencias**

- <110> Northern Antibiotics Ltd Vaara, Martti vaara, Timo
- 5 <120> Derivados de Polimixina de ácido graso de cola corta y usos de los mismos
- <130> 2071882PC
- <160> 2
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 9
- 15 <212> PRT
- <213> bacteriano
- <220>
- <221> MOD\_RES
- 20 <222> (2)..(2)
- <223> D-Ser
- <220>
- <221> MOD\_RES
- 25 <222> (3)..(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)..(8)
- <223> Dab
- <400> 1
- Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
- 1 5
- 45 <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> bacteriano
- 50 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (2)..(2)
- <223> D-Asn
- 55 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (3)..(4)
- <223> Dab
- 60 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (3)..(9)
- <223> circular
- 65

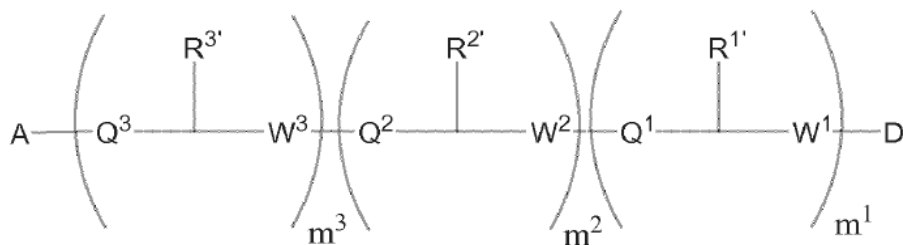
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
5 <223> D-Phe

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(8)  
10 <223> Dab

<400> 2  
Thr xaa xaa xaa Xaa Leu xaa xaa Thr  
15 1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un derivado de polimixina de fórmula (I):



(I)

en donde:

5 A es un resto de anillo de polimixina seleccionado de las de polimixina A, polimixina B, IL-polimixina-B<sub>1</sub>, polimixina D, polimixina E, polimixina F, polimixina M, polimixina S, polimixina T, circulina A, octapeptina A, octapeptina B, octapeptina C, u octapeptina D;

D es acetilo, propionilo, butanoilo, o pentanoilo;

m<sup>1</sup> es 0 y m<sup>2</sup> y m<sup>3</sup> son cada uno 1;

10 Q<sup>2</sup> y Q<sup>3</sup> son cada uno C=O;

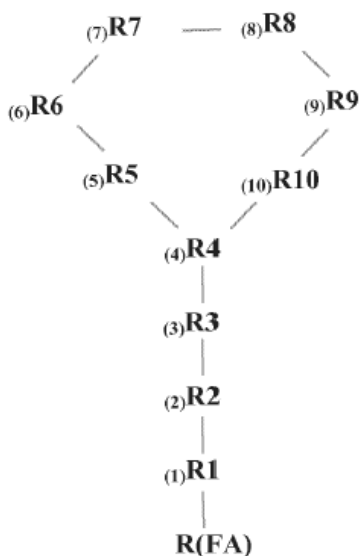
W<sup>2</sup> y W<sup>3</sup> son cada uno NH;

R<sup>2'</sup> es la cadena lateral de D-alanina, L-serina, o L-treonina;

R<sup>3'</sup> es la cadena lateral de D-asparagina, L-serina, o D-serina;

15 en donde dicho derivado tiene tres cargas positivas a pH fisiológico, y profármacos farmacéuticamente aceptables y sales de los mismos.

2. Un derivado de polimixina de la fórmula general (V),



(V)

seleccionado del grupo que consiste en Ac-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-] y Ac-Thr-DAsn-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-].

20 3. El derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho derivado es un profármaco que comprende uno o más restos que enmascaran las cargas positivas.

4. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho derivado tiene menor toxicidad que la polimixina B.
5. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho derivado aumenta la sensibilidad bacteriana a un segundo agente antibacteriano o complemento sérico.
- 5 6. El derivado la reivindicación 5, en donde dicho segundo agente antibacteriano es rifampicina, claritromicina, mupirocina, azitromicina, ácido fusídico, o vancomicina.
7. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho derivado tiene una o más propiedades farmacocinéticamente favorables seleccionadas de una vida media más larga, aclaramiento renal aumentado, o recuperación urinaria aumentada comparadas con las polimixinas nativas, octapeptinas, o derivados de polimixina con restos terminales con más de cinco átomos de carbono.
- 10 8. Un producto de combinación que comprende dos o más de los derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 15 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además un segundo agente antibacteriano.
11. Un método in vitro para desarrollar nuevos antibióticos que comprende las etapas de
- a) proporcionar un compuesto de polimixina u octapeptina natural que tiene un total de 4 a 6 cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono;
- 20 b) sustituir de 1 a 3 restos que llevan una o más cargas positivas por un resto que no tiene una carga positiva, o por un enlace covalente, generando así un derivado de un compuesto de polimixina como se reivindica en la reivindicación 1 que tiene 3 cargas positivas y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono;
- 25 c) ensayar dicho derivado de polimixina para la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano; y
- d) seleccionar compuestos que tienen la capacidad de sensibilizar bacterias Gram-negativas a un agente antibacteriano.
12. Un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para sensibilizar bacterias Gram-negativas frente agentes antibacterianos.
- 30 13. Un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para sensibilizar bacterias Gram-negativas a un mecanismo de complemento de defensa del huésped presente en el suero.
14. Un proceso para preparar un derivado de polimixina de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1 que comprende
- 35 a) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintético o un derivado del mismo que tiene 4 a 5 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono sustituyendo 1 o 2 de dichos restos por restos neutros, o por un enlace covalente, o convertir 1 a 2 de dichos restos en restos neutros con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) según la reivindicación 1, que tiene 3 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono; o
- 40 b) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintético o un derivado del mismo que tiene 4 a 5 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que tiene más de 5 átomos de carbono sustituyendo 1 o 2 de dichos restos por restos neutros, o por un enlace covalente, o convertir 1 a 3 de dichos restos en restos neutros, y sustituyendo dicho resto terminal (D) que comprende más de 5 átomos de carbono por un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono, con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) según la reivindicación 1, que tiene un total de 3 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono; o
- 45 c) modificar un compuesto de polimixina u octapeptina natural o sintético o un derivado del mismo que tiene 4 a 6 restos cargados positivamente y que carecen del resto terminal (D) sustituyendo 1 o 3 de dichos restos por restos neutros, o por un enlace covalente, o convertir 1 a 3 de dichos restos en restos neutros, e introduciendo un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono, con el fin de obtener un derivado de polimixina de fórmula (I) según la
- 50

reivindicación 1, que tiene 3 restos cargados positivamente y un resto terminal (D) que comprende un total de 1 a 5 átomos de carbono.

**15.** Una combinación de un derivado de la reivindicación 1 o 2 y un segundo agente antibacteriano para tratar una infección bacteriana Gram-negativa en un sujeto.