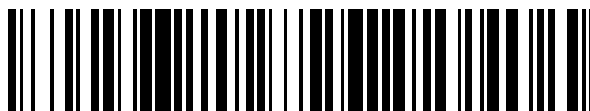


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 165**

51 Int. Cl.:

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2013 PCT/EP2013/066530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013 E 13745432 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2882770**

54 Título: **Combinaciones con un péptido de esqueleto ciclado**

30 Prioridad:

08.08.2012 EP 12005744

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

25.10.2017

73 Titular/es:

**POLYPHOR AG (100.0%)
Hegenheimermattweg 125
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**DALE, GLENN E.;
OBRECHT, DANIEL y
BERNARDINI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 639 165 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

Combinaciones con un péptido de esqueleto ciclado

5 La presente invención proporciona una combinación de compuestos que permite el control terapéutico de infecciones bacterianas específicas en seres humanos o animales a unas dosis de los compuestos individuales inferiores que cualquiera de los compuestos administrados por sí solos. Uno de los compuestos es un péptido de esqueleto ciclado que actúan como antibiótico específico de patógenos que incorpora una cadena de 12 residuos α -aminoácidos unida a una plantilla que proporciona restricciones estructurales específicas para una conformación de tipo horquilla- β que muestra una alta eficacia y biodisponibilidad y una semivida notablemente larga *in vivo*.

10 El creciente problema de la resistencia microbiana a antibióticos establecidos ha estimulado un intenso interés por desarrollar nuevos agentes antimicrobianos con nuevos modos de acción (H. Breithaupt, Nat. Biotechnol., 1999, 17, 1165-1169). Una clase emergente de antibióticos se basa en péptidos catiónicos naturales (T. Ganz, R. I. Lehrer, Mol. Medicine Today, 1999, 5, 292-297; R. M. Epand, H. J. Vogel, Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1462, 11-28). Estos incluyen péptidos de horquilla- β y lámina- β con puentes de disulfuro (tales como las protegrinas [O. V. Shamova, H. A. Korneva, R. I. Lehrer, FEBS Lett., 1993, 327, 231-236], las taquiplesinas [T. Nakamura, H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. J. Biol. Chem., 1988, 263, 16709-16713], y las defensinas [R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, Annu. Rev. Immunol., 1993, 11, 105-128], los péptidos hélice- α anfipáticos (por ejemplo, cecropinas, dermaseptinas, magaininas, y melitinas [A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Biopolymers, 2000, 55, 4-30]), así como otros péptidos lineales y con estructura de bucle. Aunque los mecanismos de acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos aún no se entienden por completo, su sitio de interacción principal es la membrana de la célula microbiana (H. W. Huang, Biochemistry, 2000, 39, 8347-8352). Tras la exposición a estos agentes, la membrana celular sufre una permeabilización, tras lo cual se produce la muerte celular rápida. Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos de acción más complejos, por ejemplo, que impliquen una señalización mediada por receptores (M. Wu, E. Maier, R. Benz, R. E. Hancock, Biochemistry, 1999, 38, 7235-7242; M. Scocchi, A. Tossi, R. Gennaro, Cell. Mol. Sci., 2011, 68, 2317-2330).

15 Las actividades antimicrobianas de muchos de estos péptidos catiónicos habitualmente se correlacionan con sus estructuras secundarias preferidas, observadas en disolución acuosa o en entornos similares a membranas (N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1462, 29-54). Los estudios estructurales con espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) han demostrado que los péptidos catiónicos, tales como la protegrina 1 (A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despau, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, A. Eur. J. Biochem., 1996, 237, 575-583; R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. L. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, J. Feigon, J. Chem. Biol., 1996, 3, 543-550) y la taquiplesina I (K. Kawano, T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada, S. J. Iwanaga, S. J. Biol. Chem., 1990, 265, 15365-15367) adoptan conformaciones de horquilla- β bien definidas, debido al efecto de restricción de dos puentes disulfuro. Sin embargo, la elevada actividad hemolítica impide su uso generalizado como antibióticos. Recientes estudios estructurales mediante RMN han indicado que la elevada actividad hemolítica parece correlacionarse con la naturaleza altamente anfipática de esta molécula de tipo horquilla- β cíclica, pero que también es posible disociar las actividades antimicrobiana y hemolítica modulando la conformación y la anfifilicidad (L. H. Kondejewski, M. Jelokhani-Niaraki, S. W. Farmer, B. Lix, M. Kay, B. D. Sykes, R. E. Hancock, R. S. Hodges, J. Biol. Chem., 1999, 274, 13181-13192; C. McInnes, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, B. D. Sykes, J. Biol. Chem., 2000, 275, 14287-14294).

20 Recientemente, una serie de compuestos antibióticos que siguen estos criterios de diseño han sido descritos en los documentos WO2007079605 respectivamente WO2007079597, que combinan una alta eficacia específicamente contra *Pseudomonas aeruginosa* con unos efectos hemotóxicos bajos. Esta serie es posterior a descripciones más tempranas que introducen estos conceptos en los documentos WO2002070547 y WO2004018503. Con los compuestos descritos en estos documentos se introdujo una nueva estrategia para estabilizar las conformaciones de horquilla- β en miméticos de péptidos catiónicos con esqueleto cíclico que muestran una elevada actividad antimicrobiana selectiva. Esto implica transferir la secuencia de horquilla catiónica e hidrófoba a una plantilla, cuya función consiste en restringir el esqueleto de bucle del péptido a una geometría de horquilla.

25 En la bibliografía también se han descrito péptidos miméticos de horquilla unidos a moldes de este tipo (D. Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, Adv. Med. Chem., 1999, 4, 1-68; J. A. Robinson, Syn. Lett., 2000, 4, 429-441) y se ha establecido la capacidad de generar peptidomiméticos de horquilla- β empleando métodos de síntesis combinatoria y paralela (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, Helv. Chim. Acta, 2000, 83, 3097-3112).

30 Una estrategia alternativa para contrarrestar la prevalencia y dispersión cada vez mayor de bacterias resistentes a múltiples fármacos consiste en modificar y después desarrollar sustancias antibióticas a partir de las clases que se emplean habitualmente. En años recientes, un resultado importante ha sido el desarrollo de la tigeciclina, con lo que se ha creado una nueva clase de antibióticos muy potentes denominados gliciliclinas. Esta clase de nuevos antibióticos de amplio espectro ha mostrado, en ensayos *in vitro*, una alta actividad antimicrobiana contra bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas, así como contra organismos atípicos, pero es especialmente importante contra enterococos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y muchas especies de bacterias Gram-negativas

resistentes a múltiples fármacos (análisis: G. A. Pankey, J. Antimicrob. Chemother., 2005, 56, 470-480). Los estudios *in vivo* y los ensayos clínicos podrían confirmar la alta eficacia y establecer un perfil de seguridad favorable para una serie de indicaciones para las cuales ya ha sido concedida la autorización de comercialización (análisis: Y. Cai, R. Wang, B. Liang, N. Bai, Y. Liu, Antimicrob. Agents Chemother., 2011, 55, 1162-1172; D. Yahav, A. Lador, M. Paul, L. Leibovici, J. Antimicrob. Chemother., 2011, 66, 1963-1971; E. Tasina, A. B. Haidich, S. Kokkali, M. Arvanitidou, Lancet Infect. Dis., 2011, 11, 834-844).

No obstante, el uso terapéutico de la tigeciclina como antibiótico de amplio espectro está lejos de ser perfecto y deja resquicios para patógenos de respuesta baja, tales como, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*. Además, la tigeciclina también tiene un uso limitado en ciertas infecciones nosocomiales, por ejemplo, neumonía contraída en hospitales, debido a una proporción de riesgo-beneficio desfavorable. Por tanto, la extensión de la ventana terapéutica de la tigeciclina, como representante de la clase de antibióticos de gliciliciclina, sería extremadamente beneficiosa.

Esto podría lograrse, de una forma, mediante opciones de tratamiento que extiendan la eficacia a bacterias que tienen altos puntos de corte de susceptibilidad para la tigeciclina o que sean capaces de disminuir la cantidad eficaz del fármaco terapéutico en casos clínicos considerados, hasta la fecha, asociados con una proporción de riesgo-beneficio desfavorable. La estrategia convencional en un entorno clínico para evitar los defectos de una monoterapia con tigeciclina consiste en combinar el fármaco con antibióticos complementarios.

Históricamente, se han empleado metodologías diferentes para caracterizar el efecto biológico de dos ingredientes farmacéuticamente activos por separado y en combinación (E. Jawetz, Antimicrob. Agents Chemother., 1967; 203-209; T.-C. Chou, P. Talalay, Adv. Enzyme Regul., 1984, 22, 27-55). Entretanto, se ha alcanzado un amplio acuerdo acerca de la clasificación de la interacción entre fármacos observada, en especial para los antibióticos. Según esta terminología, que básicamente depende en la cantidad del efecto dosis-respuesta combinado, se determina que la interacción entre fármacos es "aditiva" o "indiferente" si ambos componentes activos que se comportan independientemente entre sí presentan una acción conjunta similar. El término "antagonismo" se reserva para los casos en que puede observarse un impacto negativo de los compuestos activos aplicados sobre el otro, básicamente cuando se contrarrestan entre sí. Por último, se emplea la "sinergia" para los casos en que la dosis-respuesta se ve significativamente potenciada por encima del nivel intrínseco de cada fármaco individual empleado por sí solo (J. M. T. Hamilton-Miller, J. Antimicrob. Chemother., 1985, 15, 655-657; G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering Jr., "Antibiotics in laboratory medicine", 1991, 3ª ed., The William & Wilkins Co., 432-492).

La interacción entre fármacos, especialmente entre antibióticos, puede evaluarse en diferentes estadios clínicos y preclínicos. En la actualidad, los métodos *in vitro* más ampliamente utilizados para estudiar combinaciones de antibióticos son la técnica del tablero, que conduce a un índice de concentración inhibidora fraccionada, y el método de la curva de muerte (H. O. Hallender y otros, Antimicrob. Agents Chemother., 1982, 22, 743-752; M. J. Hall y otros, J. Antimicrob. Chemother., 1983, 11, 427-433). Complementados con algunas técnicas que aplican básicamente los mismos principios (por ejemplo, R. C. Li y otros, Antimicrob. Agents Chemother., 1993, 37, 523-531; Chr. C. Sanders y otros, Antimicrob. Agents Chemother., 1993, 37, 260-264), la intención de estos ensayos es, principalmente, la identificación de combinaciones sinérgicas potenciales para la aplicación clínica o para evitar el uso de combinaciones antagonistas en la práctica clínica. Sin embargo, todas las técnicas *in vitro* se ven dificultadas, hasta la fecha, por la deficiencia en la estandarización y, en especial, por la falta de poder predictivo para la situación *in vivo*. Por tanto, serían muy aconsejables unos experimentos *in vivo* que evalúen directamente la eficacia de compuestos farmacéuticos coadministrados.

En el caso de la tigeciclina, se han investigado las combinaciones con un gran conjunto de otros compuestos antibacterianos contra una amplia gama de bacterias Gram-positiva y Gram-negativas susceptibles y multirresistentes (análisis: J. M. Entenza, P. Morreillon, Int. J. Antimicrob. Agents, 2009, 34, 8.e1-8.e9). *In vitro*, la mayoría de las combinaciones producen, principalmente, una respuesta indiferente, es decir, no se observa sinergia ni antagonismo.

No obstante, solo unas pocas combinaciones muestran sinergia en algunos aislados de bacterias específicas.

Sigue existiendo una necesidad cada vez mayor de complementar el arsenal actual para luchar contra patógenos difíciles de tratar con una proporción de riesgo-beneficio favorable para el paciente. Por tanto, unas combinaciones de fármacos que ofrezcan unos potentes efectos sinérgicos *in vivo* proporcionarían un importante avance.

La presente invención proporciona una nueva combinación que comprende un peptidomimético de horquilla- β de fórmula:



en la que

Dab es ácido (S)-2,4-diaminobutanoico;
^DDab es ácido (R)-2,4-diaminobutanoico;

Orn es ácido (S)-2,5-diaminopentanoico;

todos los demás residuos aminoácidos son residuos L-aminoácidos, si no se denominan explícitamente como residuos D-aminoácidos, siguiendo la nomenclatura convencional de la IUPAC,

y tigeclina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus hidratos o solvatos.

Para evitar dudas, a continuación se ofrece una lista de abreviaturas, que se corresponden con las que se adoptan generalmente en la práctica habitual, de aminoácidos o sus residuos que son adecuados para los objetivos de la presente invención y que se mencionan en este documento. Los descriptores L respectivamente D, por ejemplo en ^DPro, se refieren a la estereoquímica en la posición α del α-aminoácido y se emplean según la convención de Fischer-Rosanoff de la IUPAC.

Ala	L-alanina	ácido (S)-2-aminopropanoico
Ile	L-isoleucina	ácido (2S,3S)-2-amino-3-metilpentanoico
Orn	L-ornitina	ácido (S)-2,5-diaminopentanoico
Pro	L-prolina	ácido (S)-2-pirrolidincarboxílico
^D Pro	D-prolina	ácido (R)-2-pirrolidincarboxílico
Ser	L-serina	ácido (S)-2-amino-3-hidroxiopropanoico
Thr	L-treonina	ácido (2S,3R)-2-amino-3-hidroxiбутаноico
Trp	L-triptófano	ácido (S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoico
Dab		ácido (S)-2,4-diaminobutanoico
^D Dab		ácido (R)-2,4-diaminobutanoico

En otra realización, esta invención proporciona una combinación de compuestos que permiten el control terapéutico de infecciones bacterianas específicas en seres humanos o animales a unas dosis del peptidomimético de horquilla-β de fórmula (I) inferiores que el mismo compuesto administrado por sí solo.

La combinación de los compuestos de la invención puede emplearse en una amplia gama de aplicaciones para inhibir el crecimiento o para destruir microorganismos, que conducen al efecto terapéutico deseado en el ser humano o, debido a su etiología similar, en otros vertebrados. En particular, la combinación reivindicada puede emplearse para inhibir el crecimiento o para destruir microorganismos de un gran conjunto de bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas, u organismos atípicos, pero, en especial, de enterococos resistentes a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, así como *Pseudomonas aeruginosa*.

Cuando se emplean para tratar o prevenir infecciones o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, en particular, enfermedades relacionadas con infecciones nosocomiales, tales como la neumonía asociada a ventilación mecánica (VAP), la neumonía contraída en hospitales (HAP), la neumonía asociada al cuidado sanitario (HCAP); las infecciones relacionadas y no relacionadas con catéteres, tales como infecciones de tracto urinario (UTI); infecciones relacionadas con enfermedades respiratorias, tales como neumonía, fibrosis quística, enfisema y asma; infecciones relacionadas con la piel o con tejidos blandos, tales como heridas quirúrgicas, heridas traumáticas y heridas por quemaduras; infecciones relacionadas con enfermedades oculares, tales como queratitis y endoftalmitis; infecciones relacionadas con el oído, tal como otitis; infecciones relacionadas con enfermedades del SNC, tales como abscesos cerebrales y meningitis; infecciones relacionadas con enfermedades óseas, tales como osteocondritis y osteomielitis; infecciones relacionadas con enfermedades cardiovasculares, tales como endocarditis y pericarditis; infecciones de la corriente sanguínea (BSI), tales como septicemia; infecciones relacionadas con enfermedades genitourinarias, tales como epididimitis, prostatitis y uretritis; infecciones relacionadas con enfermedades gastrointestinales, tales como diarrea epidémica, enterocolitis necrotizante, tiflitis, gastroenteritis o pancreatitis; o infecciones intraabdominales, tales como peritonitis bacteriana; los compuestos o, respectivamente, sus composiciones farmacéuticas como componentes de la combinación de la invención pueden administrarse de modo simultáneo como una entidad física individual o separada, así como de manera secuencial, es decir, con cierto desplazamiento en el tiempo según un régimen de dosificación.

Por tanto, se entiende explícitamente que estos componentes actúan como una unidad funcional de una manera sinérgica y forman una realización específica de la invención en forma de un "kit de partes".

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, de modo individual o en combinación, pueden fabricarse mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de comprimidos revestidos, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de una manera convencional empleando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos para lograr preparaciones que puedan utilizarse de modo farmacéutico. La formulación adecuada depende del método de administración elegido.

Para la administración tópica, los compuestos farmacéuticamente activos de la invención pueden formularse como disoluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc., tal como se conoce en la técnica.

5 Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para la administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para la administración transdérmica, transmucósica, oral o pulmonar.

10 Para las inyecciones, los compuestos de la invención pueden formularse en disoluciones adecuadas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la disolución de Hink, la disolución de Ringer o el tampón de disolución salina fisiológica. La disolución puede contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los ingredientes farmacéuticos activos de la invención pueden estar en forma de polvo para su combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

15 Para la administración transmucósica, en la formulación se emplean penetrantes apropiados para la barrera que va a ser permeada, tal como se conoce en la técnica.

20 Para la administración oral, los compuestos de la invención pueden formularse con facilidad combinándolos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten formular los compuestos de la invención en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones, etc., para la ingestión oral por parte del paciente que se va a tratar. Para las formulaciones orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas, tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa, tal como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes ligantes. Si se desea pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar o ácido algínico, o sus sales, tales como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden estar revestidas con azúcar o tener un revestimiento entérico empleando técnicas convencionales.

30 Para las preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, pueden añadirse agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

35 Para la administración bucal, la composición puede tomar la forma de comprimidos, comprimido para chupar, etc., formulados de la manera habitual.

40 Para la administración mediante inhalación, los compuestos de la invención pueden administrarse de modo conveniente en forma de un pulverizado en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosimétrica. Las cápsulas y cartuchos fabricados, por ejemplo, con gelatina para su uso en un inhalador o un insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo de los compuestos de la invención y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

45 Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales, tales como disoluciones para enemas o supositorios, junto con bases para supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

50 Además de las formulaciones previamente descritas, los compuestos de la invención también pueden formularse como una preparación de liberación lenta. Estas formulaciones de acción a largo plazo pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante una inyección intramuscular. Para la fabricación de estas preparaciones de liberación lenta, los compuestos de la invención pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como sales poco solubles.

55 Además, pueden emplearse otros sistemas de transporte farmacéuticos, tales como liposomas y emulsiones, muy conocidos en la técnica. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos, tales como sulfóxido de dimetilo. Además, los compuestos farmacéuticamente activos de la invención pueden administrarse empleando un sistema de liberación prolongada, tales como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Diversos materiales de liberación prolongada han sido establecidos y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación prolongada, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante unos pocos días hasta más de 3 años. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente terapéutico, pueden emplearse otras estrategias análogas a la estabilización de proteínas.

65 Puesto que los peptidomiméticos de horquilla- β , así como la tigeciclina de la invención, contienen residuos cargados,

respectivamente, pueden contener subestructuras cargadas que pueden estar independientemente incluidas en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como tales o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que sus correspondientes formas de base libre.

Además, los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden emplearse *per se* o en cualquier formulación apropiada en formas en estado sólido morfológicamente diferentes, que pueden contener o no diferentes cantidades de disolvente, por ejemplo, hidratos que permanecen tras el proceso de cristalización.

El peptidomimético horquilla- β , así como la tigeciclina de la invención, o sus composiciones, se emplearán en general en una cantidad eficaz para lograr el objetivo previsto. Se entenderá que la cantidad empleada dependerá de la aplicación concreta.

Para su uso para tratar o prevenir infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, los compuestos de la invención, o sus composiciones, se administran o se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad eficaz para mejorar los síntomas o para mejorar, tratar o prevenir infecciones microbianas o las enfermedades relacionadas con estas. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Para la administración sistémica, en un principio puede calcularse una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración del ingrediente farmacéutico activo en circulación que incluye la CI50 determinada en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo que es letal para 50% de un cultivo celular), la CMI determinada en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo que evita el crecimiento visible de un microorganismo). Las dosificaciones iniciales también pueden ser determinadas a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, empleando técnicas que son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe a continuación en la parte de los ejemplos. Los expertos en la técnica pueden optimizar con facilidad la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La dosificación eficaz de los ingredientes activos empleados puede variar dependiendo del compuesto o preparación farmacéutica concretos empleados, del modo de administración y de la gravedad y el tipo de trastorno tratado. Así, el régimen de dosificación se selecciona dependiendo de factores que incluyen la vía de administración y la vía de eliminación, por ejemplo, la función renal y hepática del paciente. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y recetar con facilidad la cantidad de ingrediente activo individual, o sus combinaciones, necesaria para prevenir, mejorar o detener el avance del trastorno o la enfermedad. La precisión óptima para lograr la concentración de los ingredientes activos sin que aparezca toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos hacia los sitios diana. Esto implica considerar la distribución, el equilibrio y la eliminación de los ingredientes activos.

En los casos de una administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de los compuestos de la invención puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Los expertos en la técnica serán capaces de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentos indebidos.

Otros parámetros que determinan la eficacia, la dosis, el régimen de dosis y el índice terapéutico general como medicamento en un entorno clínico para su combinación, o también para los compuestos individuales de la invención, pueden preevaluarse mediante diversos ensayos *in vitro*. Algunos de estos parámetros clave son, por ejemplo, la concentración bactericida mínima, la concentración inhibidora mínima, las curvas de muerte antibacterianas, la citotoxicidad, la hemólisis, la estabilidad plasmática o respectivamente la semivida plasmática, la estabilidad microsómica, el metabolismo del fármaco (que incluye la interacción entre fármacos), la unión de proteínas, la permeabilidad de membrana, la solubilidad, etc.

La invención se describirá a continuación en los siguientes ejemplos, que son solo ilustrativos y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna forma.

Ejemplos

Ensayo de eficacia *in vivo*:

Eficacia en un modelo de neumonía murino contra *Pseudomonas aeruginosa* PAX11045 y cálculo de la DE₅₀

Ejemplo de referencia 1:

Se determinó la eficacia y la DE₅₀ del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") contra el aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PAX11045 en un modelo de neumonía en ratones. Se determinaron los recuentos de las colonias en pulmón y bazo a las 20 horas después del tratamiento.

Infección de los ratones

Colonias frescas cultivadas durante la noche de PAX11045 de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en disolución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10^8 CFU/ml y después se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 CFU/ml. Se anestesiaron ratones hembra (DBA/2, exogámicos, 18-22 g, Charles River) con 0,08 ml de zoletil (tiletamina + zolazepam) y se inocularon a través de la nariz con una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10^6 CFU. A las 4 horas después de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 μ l de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml que se corresponde con aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

Tratamiento de los ratones con el compuesto **1**

Dos viales que contenían 10 mg del compuesto activo **1** se disolvieron en 2,25 ml de disolución salina estéril al 0,9%, cada uno hasta una concentración de 4,5 mg/ml. Un vial después se diluyó en 2 veces con disolución salina hasta 2,25, 1,125, 0,56 y 0,28 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml de una dosis única a las 4 horas después de la infección, calculándose la dosis en base a un peso promedio del animal de 20 g. Se empleó un control positivo de ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 19 mg/kg.

Toma de muestras

Se determinaron los recuentos de las colonias después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados solo con vehículo). Inmediatamente después los ratones se sacrificaron y se recogieron los pulmones y el bazo y se congelaron a -20 °C. Después de descongelar, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de disolución salina al 0,9%. Cada muestra después se diluyó en 10 veces en disolución salina y se aplicaron gotas de 20 μ l a placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron durante 18-48 horas a 35 °C al aire.

Recuentos de CFU

Se determinó que las CFU/ml en el inóculo eran de $7,92 \log_{10}$ CFU/ml, que se corresponden con $6,62 \log_{10}$ CFU/ratón. A las 4 horas después de la infección, el promedio de $\log_{10}$ CFU/pulmón era de 5,28 y el nivel de CFU permaneció a un nivel similar después de 24 horas en el grupo que solo recibió vehículo. Se recogieron datos de referencia análogos para el bazo con un promedio de $\log_{10}$ CFU/bazo de 1,96 a las 4 horas, que aumentó hasta 2,60 después de 24 horas en el grupo que solo recibió vehículo.

El tratamiento con el compuesto **1** dio como resultado, en ambos órganos, una reducción significativa dependiente de la concentración de los niveles de CFU, comparado con el tratamiento con vehículo ($p < 0,001$ para las concentraciones más altas). La ciprofloxacina (19 mg/kg) también tuvo un efecto potente sobre la reducción de la carga bacteriana ($p < 0,001$).

La evaluación de la curva de dosis-respuesta para DE_{50} del compuesto **1** contra PAX11045 en pulmones murinos empleando un modelo de dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) condujo a un cálculo de 4,33 mg/kg. La siguiente tabla 1 resume los valores de eficacia pertinentes.

Ejemplo 1:

Se determinó la eficacia y la DE_{50} del compuesto de fórmula **(I)** ("compuesto **1**") en combinación con tigeciclina contra el aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PAX11045 en un modelo de neumonía en ratones. Se determinaron los recuentos de las colonias en pulmón a las 20 horas después del tratamiento.

Infección de los ratones

Colonias frescas cultivadas durante la noche de PAX11045 de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en disolución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10^8 CFU/ml y después se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 CFU/ml. Se anestesiaron ratones hembra (DBA/2, exogámicos, 18-22 g, Charles River) con 0,08 ml de zoletil y se inocularon a través de la nariz con una pipeta con 0,1 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10^6 CFU. A las 4 horas después de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 μ l de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml que se corresponde con aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

Tratamiento de los ratones con tigeciclina

Se disolvieron 53 mg de tigeciclina (Tygacil, Wyeth) en 5,3 ml de disolución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 10 mg/ml y después se diluyeron con disolución salina hasta 1,25 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml de una dosis única a las 3 horas después de la infección, que se corresponde con 12,5 mg/kg en base a un peso promedio del animal de 20 g.

Tratamiento de los ratones con el compuesto **1**

Dos viales que contenían 5 mg del compuesto activo **1** se disolvieron en 2,5 ml de disolución salina estéril al 0,9%, cada uno hasta una concentración de 2 mg/ml. Un vial después se diluyó en 2 veces con disolución salina hasta 1,1, 0,55, 0,275 y 0,137 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml de una dosis única a las 4 horas después de la infección, calculándose la dosis en base a un peso promedio del animal de 20 g. Se empleó un control positivo de ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

Se determinaron los recuentos de las colonias después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados solo con vehículo). Inmediatamente después los ratones se sacrificaron y se recogieron los pulmones y se congelaron a -20 °C. Después de descongelar, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de disolución salina al 0,9%. Cada muestra después se diluyó en 10 veces en disolución salina y se aplicaron gotas de 20 µl a placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron durante 18-24 horas a 35 °C al aire.

Recuentos de CFU

Se determinó que las CFU/ml en el inóculo eran de $7,6 \log_{10}$ CFU/ml, que se corresponden con $6,3 \log_{10}$ CFU/ratón. A las 4 horas después de la infección, el promedio de $\log_{10}$ CFU/pulmón era de 6,13 y el nivel de CFU permaneció a un nivel similar después de 24 horas en el grupo que solo recibió vehículo.

El tratamiento con una combinación del compuesto **1** y tigeciclina dio como resultado una reducción significativa dependiente de la concentración de los niveles de CFU, comparado con el tratamiento con vehículo ($p < 0,001$). La ciprofloxacina (20 mg/kg) también tuvo un efecto potente sobre la reducción de la carga bacteriana ($p < 0,001$). El tratamiento solo con tigeciclina (12,5 mg/kg) no tuvo efecto sobre las cargas bacterianas.

La evaluación de la curva de dosis-respuesta para DE_{50} del compuesto **1** en presencia de una dosis fija de tigeciclina (12,5 mg/kg) contra PAX11045 en pulmones murinos empleando un modelo de dosis-respuesta sigmoideal (pendiente variable) condujo a un cálculo de 1,33 mg/kg. La siguiente tabla resume los valores de eficacia pertinentes.

Tabla 1 - Valores de eficacia del compuesto **1**

	Compuesto 1	Compuesto 1 en presencia de tigeciclina 12,5 mg/kg
Nivel superior	$1,3 \log_{10}$ CFU/ml	$0,13 \log_{10}$ CFU/ml
Nivel inferior	$-2,2 \log_{10}$ CFU/ml	$-2,37 \log_{10}$ CFU/ml
E_{max}	$3,5 \log_{10}$ CFU/ml	$2,5 \log_{10}$ CFU/ml
DE_{50}	4,33 mg/kg	1,33 mg/kg
Dosis estática	1,55 mg/kg	0,74 mg/kg
1 log dosis de muerte	8,1 mg/kg	1,2 mg/kg
2 log dosis de muerte	20 mg/kg	2,1 mg/kg
R^2	0,55-0,75	0,77

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende un peptidomimético de horquilla- β de fórmula:

5 ciclo(-Thr-Trp-Ile-Dab-Orn-^DDab-Dab-Trp-Dab-Dab-Ala-Ser-^DPro-Pro) (I),

en la que

10 Dab es ácido (S)-2,4-diaminobutanoico;
^DDab es ácido (R)-2,4-diaminobutanoico;
 Orn es ácido (S)-2,5-diaminopentanoico;

y
 tigeciclina,
 o sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus hidratos o solvatos.

15 2. Una combinación, según la reivindicación 1, para su uso en medicina.

3. Una combinación, según la reivindicación 1, para su uso en un método para el tratamiento de infecciones bacterianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones en seres humanos o animales.

20 4. Una combinación, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones en seres humanos o animales.

25 5. El uso de una combinación, según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones en seres humanos o animales.

30 6. Una composición farmacéutica que contiene una combinación, según la reivindicación 1, y al menos un vehículo farmacéuticamente inerte.

35 7. Una composición farmacéutica, según la reivindicación 6, en una forma adecuada para la administración oral, tópica, transdérmica, por inyección, por infusión, bucal, transmucósica, rectal, vaginal, pulmonar o por inhalación, en especial en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, disoluciones, líquidos, geles, escayolas, cremas, ungüentos, jarabes, suspensiones espesas, polvos, suspensiones, pulverizados, nebulizados o supositorios.

8. Una composición farmacéutica, según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones en seres humanos o animales.

40 9. Un kit que comprende una parte que contiene un peptidomimético de horquilla- β de fórmula (I), según la reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y una parte que contiene tigeciclina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 10. Un kit, según la reivindicación 9, para su uso para tratar una infección bacteriana o una enfermedad relacionada con dicha infección en seres humanos o animales.