

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 289**

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/EP2013/066551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013 E 13745848 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2882771**

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

30 Prioridad:

08.08.2012 EP 12005743

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

02.11.2017

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 2 640 289 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 permiten 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 actúa como antibiótico específico de patógeno que incorpora una cadena de 12 residuos α -aminoácido 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*.

15 El creciente problema de la resistencia microbiana a antibióticos establecidos ha estimulado un intenso interés en el desarrollo de 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. Eppard, H. J. Vogel, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 11-28). Estos incluyen péptidos de horquilla- β y lámina- β con puentes 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]), péptidos hélice- α anfipáticos (p. ej., *cecropinas*, *dermaseptinas*, *magaininas*, y *mellitinas* [A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Biopolymers 2000, 55, 4-30]), así como otros péptidos lineales y con estructura o en bucle. Aunque los mecanismos de acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos todavía no se comprenden completamente, su sitio principal de interacción es la membrana celular 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 una muerte celular rápida. Sin embargo, no se pueden descartar 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).

30 Las actividades antimicrobianas de muchos de estos péptidos catiónicos se correlacionan usualmente con sus estructuras secundarias preferidas, observadas ya sea en solución acuosa o en entornos similares a membranas (N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 29-54). Los estudios estructurales por espectroscopía 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. Despaux, 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 horquilla- β . Debido al efecto restrictivo de dos puentes disulfuro. Sin embargo, la elevada actividad hemolítica dificultó su uso generalizado como antibióticos. Recientes estudios estructurales por RMN han indicado que la elevada actividad hemolítica se correlaciona aparentemente con la naturaleza altamente anfipática de esta molécula cíclica de tipo horquilla- β , pero que es posible disociar las actividades antimicrobianas y hemolíticas modulando la conformación y el carácter anfífilo (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).

45 Recientemente se ha descrito una serie de compuestos antibióticos siguiendo estos criterios de diseño en el documento WO2007079605, respectivamente WO2007079597, que combinan una alta eficacia específicamente contra *Pseudomonas aeruginosa* con efectos hemotóxicos bajos. Esta serie sigue las descripciones anteriores que introducen estos conceptos en los documentos WO2002070547 y WO2004018503. Con los compuestos descritos en los mismos, se introdujo una nueva estrategia para estabilizar las conformaciones de horquilla- β en miméticos de péptidos catiónicos de esqueleto ciclado que muestran una elevada actividad antimicrobiana selectiva. Esto implica transferir la secuencia en horquilla catiónica e hidrófoba sobre una plantilla, cuya función consiste en restringir la cadena principal del bucle peptídico a una geometría en horquilla.

55 Se han descrito también en la bibliografía péptidos miméticos en horquilla unidos a plantillas 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 en horquilla- β utilizando métodos de síntesis combinatoria y paralela (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, Helv. Chim. Acta. 2000, 83, 3097-3112).

60 Un enfoque alternativo para contrarrestar la creciente prevalencia y propagación de bacterias resistentes a múltiples fármacos consiste en modificar y después desarrollar sustancias antibióticas a partir de clases comúnmente utilizadas, tales como, p. ej., aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas o macrólidos:

Los aminoglucósidos han jugado un papel importante como eficaces antibióticos de amplio espectro. Desde el

descubrimiento de la estreptomina, se han desarrollado varios otros aminoglucósidos semisintéticos derivados de productos naturales, , tales como neomicina, kanamicina, paromomicina, gentamicina, tobramicina, sisomicina, amikacina, isepamacina, netilmicina y arbekacina (I. R. Hooper, Aminoglycoside Antibiotics, editado por H. Umezawa, I. R. Hooper, Springer Verlag, Berlín, 1982; P. Dozzo, H. E. Moser, Expert Opin Ther. Patents, 2010, 20, 1321). La amikacina, por ejemplo, se utiliza a menudo para el tratamiento de infecciones adquiridas en el hospital con bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos tales como *Enterobacter* e incluso *Pseudomonas aeruginosa* (E. M. Scholar, W.B. Pratt, The Antimicrobial Drugs, 2ª edición, Oxford University Press, Inc. Nueva York, 2000, 150). Sin embargo, las bombas de eflujo bacterianas eficaces y/o las enzimas que inactivan los aminoglucósidos modificando la molécula por metilación, N-acetilación, O-fosforilación, u O-adenilación todavía constituyen dos mecanismos de resistencia principales (P. Dozzo, H.E. Moser, Expert Opin. Ther. Patents, 2010, 20, 1321).

Debido al amplio uso terapéutico de la penicilina G, se han diseñado y desarrollado muchos antibióticos β -lactámicos mejorados (K. Bush, M.J. Macielag, Expert Opin. Ther. Patents, 2010, 20, 1277). Los antibióticos β -lactámicos comprenden las subfamilias de penamo (penicilina), penemo, carbapenemo, cefemo (cefalosporinas), carbacefemo, y monobactama. El ertapenemo, un miembro de la subfamilia del carbapenemo, es eficaz contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (L.L. Estes, J.W. Wilson, Antimicrobials in Mayo Clinic Internal Medicine Board Review, editado por A.K. Gosh, Oxford University Press, Inc., 2010, 565) mientras se observa que la penicilina G posee eficacia principalmente contra organismos Gram positivos (L.L. Estes, J.W. Wilson, Antimicrobials in Mayo Clinic Internal Medicine Board Review, editado por A.K. Gosh, Oxford University Press, Inc., 2010, 560). Un importante mecanismo de resistencia a los β -lactámicos es la hidrólisis del anillo β -lactámico por medio de β -lactamasas. La emergencia de diversas clases de β -lactama se ha vuelto un asunto importante, especialmente en la lucha contra las bacterias Gram negativas. Entre los antibióticos β -lactámicos más recientes que están en la última fase de desarrollo clínico (Fase III) o comercializados se encuentran las dos cefalosporinas anti *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ceftobiprol y ceftarolina (K. Bush, M.J. Macielag, Expert Opin. Ther. Patents, 2010, 20, 1277). Sin embargo, no superan la resistencia de las bacterias Gram negativas productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) M.G.P. Page, Curr. Opin. Pharmacol., 2006, 6, 480; K.M. Amsler, T.A. Davies, W. Shang y otros, Antimicrob. Agents Chemother., 2008, 52, 3418).

La clase de las quinolonas es una de las clases más importantes de antibióticos identificados en los últimos 50 años. Debido a su excelente actividad de amplio espectro incluyendo patógenos Gram negativos, el descubrimiento de las fluoroquinolonas como antibióticos de segunda generación de las quinolonas constituyó un gran avance en la década de 1980. Ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina se han convertido en importantes productos farmacéuticos, a raíz de lo cual la ciprofloxacina sigue siendo la quinolona más potente contra las bacterias Gram negativas siendo eficaz contra muchas cepas susceptibles de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque la resistencia a las quinolonas sigue aumentando (J. A. Wiles, B. J. Bradbury, M. J. Pucci, Expert Opin. Ther. Patents, 2010, 20, 1295).

Uno de los antibióticos más vendidos en el mundo, la azitromicina, es una azalida que es una subclase de antibióticos macrólidos. Tiene un espectro similar al de la eritromicina y la claritromicina, pero es más eficaz contra ciertas bacterias Gram negativas (L.L. Estes, J.W. Wilson, Antimicrobials in Mayo Clinic Internal Medicine Board Review, editado por A.K. Gosh, Oxford University Press, Inc. 2010, 568-569). Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* se considera resistente a la azitromicina (T. Wagner, G. Soong, S. Sokol, L. Saiman, A. Prince, Chest, 2005, 128, 912).

Como se puede observar a partir de los ejemplos presentados anteriormente, el uso terapéutico incluso de algunos de los antibióticos de amplio espectro más extendidos está lejos de ser perfecto, dejando vacíos para patógenos de respuesta baja, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, el concepto de utilizar dos o más fármacos antibióticos, p. ej., de reducido y amplio espectro, combinados puede conducir a fármacos más eficaces y robustos que tienen, por ejemplo, menos incidencias de formación de resistencia bacteriana.

Históricamente se han empleado metodologías diferentes para caracterizar el efecto biológico por separado y en combinación de dos ingredientes farmacéuticamente activos (E. Jawetz, Antimicrob. Agents Chemother., 1967, 203-209; T. -C. Chou, P. Talalay, Adv. Enzyme Regul., 1984, 22, 27-55). Mientras, han alcanzado un amplio consenso sobre la clasificación de las interacciones entre fármacos observadas, especialmente en el caso de los antibióticos. De acuerdo con esta terminología, se determina que la cantidad del efecto combinado dosis-respuesta de la interacción entre fármacos es "aditiva" o "indiferente" si ambos componentes activos se comportan de manera independiente entre sí respectivamente tienen una acción conjunta similar. El término "antagonismo" está reservado para los casos en los que se puede observar un impacto negativo de los compuestos activos aplicados entre sí, básicamente cuando se contrarrestan mutuamente. Finalmente, se utiliza "sinergia" para los casos en los que la dosis-respuesta se potencia significativamente 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).

Las interacciones entre fármacos, especialmente entre los antibióticos, se puede evaluar en diferentes fases clínicas y preclínicas. Actualmente, los métodos *in vitro* más ampliamente utilizados para estudiar las combinaciones de antibióticos son la técnica del tablero de ajedrez que conduce a un índice de concentración inhibidora fraccionada y

al 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 (p. ej., 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 posibles combinaciones sinérgicas para la aplicación clínica o para evitar el uso de combinaciones antagónicas en la práctica clínica. Sin embargo, todas las técnicas *in vitro* se ven obstaculizadas, hasta ahora, por la deficiencia de estandarización y especialmente por la falta de poder predictivo para la situación *in vivo*. Por lo tanto, serían muy aconsejables unos experimentos *in vivo* que evalúen directamente la eficacia de los compuestos farmacéuticos administrados simultáneamente.

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



en donde

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 de aminoácidos son residuos L-aminoácidos, si no se designan explícitamente como residuos D-aminoácidos, siguiendo la nomenclatura estándar de la IUPAC,

y un compuesto adicional con actividad antibiótica seleccionado entre ertapenemo, azitromicina, ciprofloxacina, o amikacina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Para evitar dudas, a continuación sigue una lista de abreviaturas, correspondientes a la práctica habitual generalmente adoptada, de aminoácidos, o sus residuos, que son adecuados para los fines de la presente invención y a los que se hace referencia en este documento. Los descriptores L, respectivamente D, p. ej., en ^DPro, se refieren a la estereoquímica en la posición α del α -aminoácido y se utilizan según la convención 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-pirrolidinocarboxílico
^D Pro	D-Prolina	Ácido (R)-2-pirrolidinocarboxílico
Ser	L-Serina	Ácido (S)-2-amino-3-hidroxiopropanoico
Thr	L-Treonina	Ácido (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-butanoico
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 una realización especialmente preferida de la invención, el compuesto antibiótico combinado con el peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I) es ertapenemo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización especialmente preferida de la invención, el compuesto antibiótico combinado con el peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I) es azitromicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización especialmente preferida de la invención, el compuesto antibiótico combinado con el peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I) es ciprofloxacina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización especialmente preferida de la invención, el compuesto antibiótico combinado con el peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I) es amikacina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

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 en horquilla- β de fórmula (I) menores que el mismo compuesto administrado solo.

Las combinaciones que comprenden un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I) con un compuesto de la clase de la glicilglicina, especialmente la tigeiglicina, son sujeto de la solicitud copendiente de los solicitantes, presentada simultáneamente.

5 La combinación de compuestos de la invención se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones para inhibir el crecimiento o para destruir microorganismos que conducen al efecto terapéutico deseado en el hombre, o debido a su etiología similar, en otros vertebrados. En particular la combinación reivindicada se puede utilizar para inhibir el crecimiento o para destruir microorganismos de un gran panel de bacterias aerobias o anaerobias, Gram positivas o Gram negativas, u organismos atípicos, pero especialmente *Pseudomonas aeruginosa*.

10 Cuando se utilizan para tratar o prevenir infecciones o enfermedades relacionadas con tales infecciones, en particular enfermedades relacionadas con infecciones nosocomiales, tales como neumonía asociada a ventilador (NAV), neumonía adquirida en el hospital (NAH), neumonía asociada a la asistencia sanitaria (NAAS); infecciones relacionadas con catéteres y no relacionadas con catéteres, tales como infecciones del tracto urinario (ITU);
15 relacionadas con enfermedades respiratorias tales como neumonía, fibrosis quística, enfisema y asma; infecciones relacionadas con enfermedades de la piel o de 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 enfermedades del oído tales como otitis; infecciones relacionadas con enfermedades del SNC tales como absceso cerebral y meningitis; infecciones relacionadas con enfermedades óseas tales como osteocondritis y osteomielitis; infecciones relacionadas con enfermedades cardiovasculares tales como endocarditis y pericarditis; infecciones del torrente sanguíneo (ITS) 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 sus composiciones
20 farmacéuticas respectivas como componentes de la combinación de la invención se pueden administrar simultáneamente como una entidad física única o separada así como secuencialmente, es decir, con un cierto desplazamiento en el tiempo de acuerdo con el régimen de dosificación.

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

30 En otra realización específica de la invención, el kit comprende una parte que contiene un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una parte que contiene un compuesto con actividad antibiótica seleccionada entre ertapenemo, azitromicina, ciprofloxacina, o amikacina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 En otra realización específica especialmente preferida de la invención, el kit comprende una parte que contiene un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una parte que contiene ertapenemo como compuesto con actividad antibiótica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En otra realización específica especialmente preferida de la invención, el kit comprende una parte que contiene un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una parte que contiene azitromicina como compuesto con actividad antibiótica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En otra realización específica especialmente preferida de la invención, el kit comprende una parte que contiene un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una parte que contiene ciprofloxacina como compuesto con actividad antibiótica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 En otra realización específica especialmente preferida de la invención, el kit comprende una parte que contiene un peptidomimético en horquilla- β de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una parte que contiene amikacina como compuesto con actividad antibiótica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención, individualmente o combinados, se pueden fabricar por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, elaboración de comprimidos recubiertos, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende del método de
60 administración seleccionado.

Para la administración tópica, los compuestos farmacéuticamente activos de la invención se pueden formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc., como es bien conocido en la técnica.

65 Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para la administración por inyección, p. ej., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas diseñadas para la

administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

5 Para las inyecciones, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones adecuadas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los ingredientes farmacéuticos activos de la invención pueden estar en forma de polvo para su combinación con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

10 Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que vaya a ser atravesada como es conocido en la técnica.

15 Para la administración oral, los compuestos de la invención se pueden formular fácilmente combinándolos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones, etc., para la ingestión oral por un paciente que vaya a ser tratado. 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 tales 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, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar o ácido algínico o una de sus sales, tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden estar recubiertas de azúcar o recubiertas con un revestimiento entérico utilizando técnicas convencionales.

25 Para las preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para la administración bucal, la composición puede adoptar la forma de comprimidos, pastillas, etc. formulados como de costumbre.

30 Para la administración por inhalación, los compuestos de la invención se pueden suministrar convenientemente en forma de un aerosol pulverizado desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos p. ej., de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo de los compuestos de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35 Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como soluciones para enema o supositorios junto con bases para supositorio apropiadas tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

40 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos de la invención también se pueden formular como preparaciones de liberación lenta. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (p. ej., subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Para la fabricación de tales preparaciones de depósito, los compuestos de la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de sales poco solubles.

45 Además, se pueden emplear otros sistemas de transporte farmacéutico tales como liposomas y emulsiones bien conocidos en la técnica. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido. Adicionalmente, los compuestos farmacéuticamente activos de la invención se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación prolongada, tal como una matriz semipermeable de polímeros sólidos que contiene el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación prolongada y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación prolongada, dependiendo de su naturaleza química pueden liberar los compuestos, durante algunas semanas hasta más de 3 años. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

50 Puesto que los peptidomimético en horquilla- β , así como los compuestos de las otras clases de antibióticos de la invención, pueden contener residuos cargados respectivamente, pueden contener subestructuras cargadas, que pueden estar, independientemente, incluídas en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como tales o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

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

65

La combinación antibiótica de la invención, o las composiciones de la misma, se utilizarán en general en una cantidad y a una proporción eficaces para lograr el propósito previsto. Se entenderá que la cantidad utilizada dependerá de la aplicación concreta.

5 Para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con tales infecciones, los compuestos de la invención, o composiciones de los mismos, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por cantidad terapéuticamente eficaz se entiende una cantidad eficaz para mejorar los síntomas, o para mejorar, tratar o prevenir infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con las mismas. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

15 Para la administración sistémica, en un principio se puede estimar una dosis terapéuticamente eficaz a partir de análisis *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de ingrediente farmacéutico activo en circulación que incluye la CI_{50} determinada en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo que es letal para 50% de un cultivo de células), la CIM, determinada en cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo que evita el crecimiento visible de un microorganismo). Las dosificaciones iniciales también se pueden determinar a partir de datos *in vivo*, p. ej., modelos animales, utilizando mecanismos que son bien conocidos en la técnica, p. ej., como se describe a continuación en la sección de ejemplos. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

25 La dosificación eficaz de los ingredientes activos empleados puede variar dependiendo del compuesto o de la preparación farmacéutica concretos empleados, del modo de administración y de la gravedad y tipo de afección tratada. Por lo tanto, el régimen de dosificación se selecciona de acuerdo con factores que incluyen la vía de administración y la vía de eliminación, p. ej., la función renal y hepática del paciente. Un médico o veterinario experto en la técnica pueden determinar y recetar fácilmente la cantidad de ingrediente activo individual o combinación de los mismos requerida para prevenir, mejorar o detener el avance de la afección o enfermedad. La precisión óptima para conseguir la concentración de ingredientes activos sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos para los sitios diana. Esto implica considerar la distribución, el equilibrio, y la eliminación de los ingredientes activos.

35 En los casos de administración local o de absorción selectiva, la concentración local eficaz de los compuestos de la invención puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación indebida.

40 Se pueden evaluar previamente otros parámetros que determinan la eficacia, la dosis, el régimen de dosis y el índice terapéutico general como medicamento en un entorno clínico para la combinación o también para los compuestos individuales de la invención mediante diversos análisis *in vitro*. Algunos de estos parámetros clave son, p. ej., la concentración bactericida mínima, la concentración inhibidora mínima, las curvas de muerte antibacteriana, la citotoxicidad, la hemólisis, la estabilidad en plasma respectivamente, la semivida en el plasma, la estabilidad microsomal, el metabolismo de fármacos (incluyendo la interacción entre fármacos), la unión a proteínas, la permeabilidad de la membrana, la solubilidad, etc.

45 La invención se describirá a continuación en los ejemplos siguientes, que están destinados sólo a la ilustración y que no deben considerarse limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

50 Ensayo de eficacia *in vivo*:

Eficacia en un modelo de neumonía murino contra *Pseudomonas aeruginosa* PAX 11045 y estimación de la DE_{50}

55 Referencia 1:

Se determinaron la eficacia y la DE_{50} del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") frente al aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PAX11045 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en los pulmones y el bazo se determinaron a las 20 horas del tratamiento.

60 Infección de ratones

65 Colonias frescas cultivadas durante la noche de PAX11045 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10^8 UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 UFC/ml. Los ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 18-22 g, Charles River) se anestesiaron con 0,08 ml de Zoletil (tiletamina + zolazepam) y se les inoculó a través de la nariz una pipeta

con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10^6 UFC. A las 4 horas 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.

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

10 Se disolvieron dos viales que contenían 10 mg de compuesto **1** activo en 2,25 ml de una solución salina estéril al 0,9% cada uno, hasta una concentración de 4,5 mg/ml. Un vial se diluyó 2 veces más con solución 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 con una dosis única a las 4 horas de la infección, calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como control positivo se utilizó ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 19 mg/kg.

Toma de muestras

15 Los recuentos de colonias se determinaron después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y a las 24 horas (ratones tratados y tratados solo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, se recogieron los pulmones y el bazo y se congelaron a -20°C . Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó a continuación 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 μ l en placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-48
20 horas a 35°C en aire ambiente.

Recuentos de UFC

25 Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran $7,92 \log_{10}$ UFC/ml que se corresponden con $6,62 \log_{10}$ UFC/ratón. A las 4 horas de la infección, el \log_{10} UFC/pulmón medio fue de 5,28 y el nivel de UFC se mantuvo a un nivel similar después de 24 horas en el grupo al que se le había administrado sólo vehículo. Se recogieron datos de referencia análogos para el bazo con un \log_{10} UFC/bazo medio de 1,96 a las 4 horas, que aumentó hasta 2,60 después de 24 horas en el grupo al que se había administrado sólo vehículo.

30 El tratamiento con el compuesto **1** dio como resultado en ambos órganos una reducción significativa de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo ($p < 0,001$ para las concentraciones más altas) dependiente de la concentración. También la ciprofloxacina (19 mg/kg) tuvo un efecto significativo sobre la reducción de las cargas bacterianas ($p < 0,001$).

35 La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE_{50} del compuesto **1** contra PAX11045 en pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 4,33 mg/kg. La siguiente Tabla 1 resume los valores de eficacia relevantes.

Ejemplo 1:

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

45 Infección de ratones

50 Colonias frescas cultivadas durante la noche de PAX11045 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10^8 UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 UFC/ml. Se anestesiaron ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 18-22 g, Charles River) con 0,1 ml de Zoletil y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10^6 UFC. A las 4 horas 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.

55 Tratamiento de ratones con ertapenemo

Se disolvió 1 g de ertapenemo (InvanzTM, MSD Denmark Aps) en 10 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 100 mg/ml y se diluyó adicionalmente con solución salina hasta 5 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml con una dosis única a las 3 horas de la infección correspondiente a 50 mg/kg sobre la base de un peso medio del animal de 20 g.

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

65 Se disolvió un vial que contenía 10 mg del compuesto activo **1** en 2 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 5 mg/ml y se diluyó adicionalmente con solución salina hasta 2, 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 con una dosis única a las 4 horas de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como control positivo se utilizó

ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

5 Los recuentos de colonias se determinaron después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, los pulmones se recogieron y se congelaron a -20°C . Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó 10 veces en solución salina y se realizaron 20 aplicaciones de 20 μl en placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-24 horas a 35°C en aire ambiente.

10

Recuentos de UFC

Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran $7,65 \log_{10}$ UFC/ml que se corresponden con $6,35 \log_{10}$ UFC/ratón. A las 4 horas de la infección, el \log_{10} UFC/pulmón medio fue de 5,14 y el nivel de UFC se mantuvo a un nivel similar después de 24 horas en el grupo al que se le había administrado sólo vehículo.

15

El tratamiento con una combinación de compuesto 1 y ertapenemo dio lugar a una reducción significativa de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo ($p < 0,01$ - $p < 0,001$). Dependiente de la concentración los tratamientos con ciprofloxacina (20 mg/kg), el compuesto 1 solo (2,75 mg/kg) y ertapenemo solo (50 mg/kg) también tuvieron un efecto significativo en la reducción de las cargas bacterianas ($p < 0,001$).

20

La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE_{50} del compuesto 1 en presencia de una dosis fija de ertapenemo (50 mg/kg) contra PAX11045 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 1,24 mg/kg. La Tabla 1 siguiente resume los valores de eficacia relevantes.

25

Tabla 1: Valores de eficacia del compuesto 1

	Compuesto 1	Compuesto 1 en presencia de 50 mg/kg de ertapenemo
Nivel superior	$1,3 \log_{10}$ UFC/ml	$-0,34 \log_{10}$ UFC/ml
Nivel inferior	$-2,2 \log_{10}$ UFC/ml	$-2,32 \log_{10}$ UFC/ml
E_{max}	$3,5 \log_{10}$ UFC/ml	$1,98 \log_{10}$ UFC/ml
DE_{50}	4,33 mg/kg	1,24 mg/kg
Dosis estática	1,55 mg/kg	0,63 mg/kg
1 log dosis destrucción	8,1 mg/kg	1,14 mg/kg
2 log dosis destrucción	20 mg/kg	1,48 mg/kg
R^2	0,55 - 0,75	0,54

Ejemplo 2:

30 Se determinaron la eficacia y la DE_{50} del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") combinado con azitromicina contra el aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PAX11045 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en el pulmón se determinaron 20 horas después del tratamiento.

35

Infección de ratones

Colonias frescas cultivadas durante la noche de PAX11045 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10^8 UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 5×10^7 UFC/ml. Los ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 17 - 23 g, Charles River) se anestesiaron con 0,1 ml de Zoletil y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10^6 UFC. A las 4 horas de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 μl de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml que se corresponde con aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

40

Tratamiento de ratones con azitromicina

45

Se disolvieron 480 mg de azitromicina (ZitromaxTM, Pfizer) en 4,8 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 100 mg/ml y se diluyeron adicionalmente con solución salina hasta 5 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml con una dosis única a las 3 horas de la infección correspondiente a 50 mg/kg sobre la base de un peso medio del animal de 20 g.

50

Tratamiento de ratones con el compuesto 1

Se disolvió un vial que contenía 10 mg del compuesto 1 activo en 2 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 5 mg/ml y se diluyó adicionalmente con solución salina a 2, 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 con una dosis única a las 4 horas de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como control positivo se utilizó ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

Los recuentos de colonias se determinaron después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, los pulmones se recogieron y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 µl en placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-24 horas a 35°C en aire ambiente.

Recuento de UFC

Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran 7,3 log₁₀ UFC/ml que se corresponde con 6,0 log₁₀ UFC/ratón.

A las 4 horas de la infección, el log₁₀ UFC/pulmón medio fue de 5,84 y el nivel de UFC se mantuvo en un nivel similar después de 24 horas en el grupo sólo con vehículo.

El tratamiento con una combinación de compuesto 1 y azitromicina dio como resultado una reducción significativa de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo ($p < 0,01$ - $p < 0,001$) dependiente de la concentración. El tratamiento con ciprofloxacina (20 mg/kg) y el tratamiento con el compuesto 1 solo (5,5 mg/kg) también tuvieron un efecto significativo sobre la reducción de las cargas bacterianas ($p < 0,001$). El tratamiento solo con azitromicina (50 mg/kg) no tuvo ningún efecto sobre las cargas bacterianas.

La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE₅₀ del compuesto 1 en presencia de una dosis fija de azitromicina (50 mg/kg) contra PAX11045 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 1,74 mg/kg. La Tabla 2 resume los valores de eficacia relevantes.

Tabla 2: Valores de eficacia del compuesto 1

	Compuesto 1	Compuesto 1 en presencia de 50 mg/kg de azitromicina
Nivel superior	1,3 log ₁₀ UFC/ml	-0,10 log ₁₀ UFC/ml
Nivel inferior	-2,2 log ₁₀ UFC/ml	-2,59 log ₁₀ UFC/ml
E _{max}	3,5 log ₁₀ UFC/ml	2,49 log ₁₀ UFC/ml
DE ₅₀	4,33 mg/kg	1,74 mg/kg
Dosis estática	1,55 mg/kg	0,63 mg/kg
1 log dosis de destrucción	8,1 mg/kg	1,2 mg/kg
2 log dosis de destrucción	20 mg/kg	2,4 mg/kg
R ²	0,55 - 0,75	0,52

Eficacia en el modelo de neumonía murina contra *Pseudomonas aeruginosa* PA9349 y estimación de la DE₅₀

Referencia 2:

Se determinaron la eficacia y la DE₅₀ del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") frente al aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PA9349 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en los pulmones se determinaron a las 18 - 20 horas del tratamiento.

Infección de ratones

Colonias frescas cultivadas durante la noche de PA9349 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10⁸ UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 5x10⁶ UFC/ml. Se anestesiaron ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 18-22 g, Charles River) con 0,1 ml de Zoletil (tiletamina + zolazepam) y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 5x10⁵ UFC. A las 4 horas de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 µl de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml que se corresponden con aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

Tratamiento de ratones con el compuesto 1

5 Se disolvió un vial que contenía 10 mg de compuesto 1 activo en 5 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 2 mg/ml y se diluyó adicionalmente 2 veces con solución salina hasta 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,06 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml con una dosis única a las 4 horas de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como control positivo se utilizó colistina de la misma manera con una dosis fija de 40 mg/kg.

Toma de muestras

10 Se determinaron los recuentos de colonias después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, los pulmones se recogieron y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 µl sobre placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-48 horas a 35°C en aire ambiente.

Recuentos de UFC

20 Se determinaron las UFC/ml en el inóculo a 7,29 log₁₀ UFC/ml que se corresponden con 5,98 log₁₀ UFC/ratón. A las 4 horas de la infección el log₁₀ UFC/pulmón medio fue de 3,47 y el nivel de UFC aumentó a 4,92 a las 20 horas de la inoculación en el grupo solo con vehículo.

25 Se observó una reducción del nivel medio de UFC en el grupo de tratamiento con 10 mg/kg de compuesto 1 en comparación con el grupo con vehículo, después de lo cual se observó una reducción significativa en el grupo de tratamiento con 20 mg/kg de compuesto 1.

La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE₅₀ de compuesto 1 contra PA9349 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 7,35 mg/kg. La Tabla 3 siguiente resume los valores de eficacia relevantes.

Ejemplo 3:

30 Se determinaron la eficacia y la DE₅₀ del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") combinado con ciprofloxacina contra el aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PA9349 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en el pulmón se determinaron 20 horas después del tratamiento.

Infección de ratones

40 Colonias frescas cultivadas durante la noche de PA9349 procedentes de una placa de agar de sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10⁸ UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 10⁷ UFC/ml. Los ratones hembra (C57BL/6 macho, no consanguíneos, 20 - 25 g, Hellenic Pasteur Institute) se anestesiaron con éter y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10⁶ UFC. Después de la inoculación, los ratones fueron tratados con supositorios de paracetamol como analgésico.

Tratamiento de ratones con ciprofloxacina

50 Se disolvieron 400 mg de ciprofloxacina (Sigma) en solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 10 mg/ml y se diluyeron adicionalmente con solución salina hasta 2 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml con una dosis única a las 3 horas de la infección correspondiente a 20 mg/kg sobre la base de un peso medio del animal de 20 g.

Tratamiento de ratones con el compuesto 1

55 Se disolvió un vial que contenía 5 mg del compuesto 1 activo en 2,5 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 2 mg/ml. Se diluyó adicionalmente 1 vial con solución salina hasta 1, 0,8 y 0,4 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,25 ml (dosis de 25 mg/kg) o 0,2 ml (para todas las demás dosis), con una dosis única a las 4 horas de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como controles se utilizaron colistina y ciprofloxacina de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

65 Se determinaron los recuentos de colonias después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, los pulmones se recogieron y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó a continuación 10 veces en solución salina y se realizaron

aplicaciones de 20 µl sobre placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-24 horas a 35°C en aire ambiente.

Recuentos de UFC

5 Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran 7,0 log₁₀ UFC/ml que se corresponden con 5,8 log₁₀ UFC/ratón. A las 4 horas de la infección, el log₁₀ medio de UFC/pulmón fue de 5,63 y el nivel de UFC se mantuvo en un nivel similar después de 24 horas en el grupo solo con vehículo.

10 El tratamiento con una combinación del compuesto 1 a 1,88-25 mg/kg y ciprofloxacina dio como resultado una reducción significativa de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo (p <0,001). El tratamiento con el compuesto 1 solo (5,5 mg/kg) tuvo un efecto significativo sobre la reducción de las cargas bacterianas (p <0,001), después de lo cual el tratamiento con colistina sola (20 mg/kg) y el tratamiento con ciprofloxacina sola (20 mg/kg) no tuvieron efecto o tuvieron solo ligeros efectos sobre las cargas bacterianas.

15 La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE₅₀ del compuesto 1 en presencia de una dosis fija de ciprofloxacina (20 mg/kg) contra PA9349 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 1,55 mg/kg. La Tabla 3 a continuación resume los valores de eficacia relevantes.

20 **Tabla 3: Valores de eficacia del compuesto 1**

	Compuesto 1	Compuesto 1 en presencia de 20 mg/kg de ciprofloxacina
Nivel superior	1,59 log ₁₀ UFC/ml	-0,21 log ₁₀ UFC/ml
Nivel inferior	-0,80 log ₁₀ UFC/ml	-4,17 log ₁₀ UFC/ml
E _{max}	-2,4 log ₁₀ UFC/ml	3,96 log ₁₀ UFC/ml
DE ₅₀	7,35 mg/kg	1,55 mg/kg
Dosis estática	9,15 mg/kg	nd
1 log dosis de destrucción	nd	0,45 mg/kg
2 log dosis de destrucción	nd	1,00 mg/kg
3 log dosis de destrucción	nd	1,82 mg/kg
R ²	0,67	0,54
nd: no determinado		

Eficacia en el modelo de neumonía murina contra *Pseudomonas aeruginosa* PA18298 y estimación de la DE₅₀

25 **Referencia 3:**

Se determinaron la eficacia y la DE₅₀ del compuesto de fórmula (I) ("compuesto 1") frente al aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PA18298 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en los pulmones se determinaron a las 18 - 20 horas del tratamiento.

30 Infección de ratones

35 Colonias frescas cultivadas durante la noche de PA18298 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10⁸ UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 4x10⁷ UFC/ml. Los ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 18-22 g, Charles River) se anestesiaron con 0,1 ml de Zoletil (tiletamina + zolazepam) y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 1x10⁶ UFC. A las 4 horas de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 µl de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml correspondiente a aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

40 Tratamiento de ratones con el compuesto 1

45 Se disolvió un vial que contenía 10 mg del compuesto 1 activo en 2 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 5 mg/ml y se diluyó adicionalmente con solución salina hasta 2, 1, 0,75, 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 con una dosis única a las 4 horas después de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Como control positivo se utilizó colistina de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

5 Se determinaron los recuentos de colonias después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, se recogieron los pulmones y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó a continuación 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 µl sobre placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-48 horas a 35°C en aire ambiente.

10 Recuentos de UFC

Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran 7,49 log₁₀ UFC/ml que se corresponden con 6,20 log₁₀ UFC/ratón. A las 4 horas de la infección, el log₁₀ UFC/pulmón medio fue de 5,05 y el nivel de UFC disminuyó hasta 2,62 a las 24 horas de la inoculación en el grupo al que se le había administrado sólo vehículo.

15 El tratamiento con POL7080 a 11-20 mg/kg dio como resultado una reducción significativa de los niveles de UFC en comparación con el tratamiento con vehículo (p <0,01 - p <0,001). También el tratamiento con colistina (20 mg/kg) tuvo algún efecto sobre la reducción de las cargas bacterianas (p <0,001).

20 La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE₅₀ del compuesto **1** contra PA18298 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 26,6 mg/kg. La tabla 4 a continuación resume los valores de eficacia relevantes.

Ejemplo 4

25 Se determinaron la eficacia y la DE₅₀ del compuesto de fórmula (I) ("compuesto **1**") combinado con amikacina contra el aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* PA18298 en un modelo de neumonía en ratones. Los recuentos de colonias en el pulmón se determinaron 20 horas después del tratamiento.

Infección de ratones

30 Colonias frescas cultivadas durante la noche de PA18298 procedentes de una placa de agar sangre de caballo al 5% fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,9% hasta aproximadamente 10⁸ UFC/ml y posteriormente se diluyeron hasta aproximadamente 5x10⁷ UFC/ml. Los ratones hembra (DBA/2, no consanguíneos, 18-22 g, Charles River) se anestesiaron con 0,1 ml de Zoletil y se les inoculó a través de la nariz una pipeta con 0,05 ml de la suspensión de bacterias que contenía aproximadamente 10⁶ UFC. A las 4 horas de la inoculación, los ratones se trataron por vía oral con 45 µl de neurofeno (20 mg de ibuprofeno/ml que se corresponde con aproximadamente 30 mg/kg) como analgésico.

Tratamiento de ratones con amikacina

40 Se disolvieron 175 mg de amikacina (Sigma) en 5 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 35 mg/ml y se diluyeron adicionalmente con solución salina hasta 3 mg/ml. Los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml con una dosis única a las 3 horas de la infección correspondiente a 30 mg/kg sobre la base de un peso medio del animal de 20 g.

Tratamiento de ratones con el compuesto **1**

50 Se disolvió un vial que contenía 10 mg del compuesto **1** activo en 2 ml de solución salina estéril al 0,9% hasta una concentración de 5 mg/ml y se diluyó adicionalmente con solución salina hasta 2, 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 con una dosis única a las 4 horas de la infección calculándose la dosis en base a un peso medio del animal de 20 g. Se utilizó colistina como un control de la misma manera con una dosis fija de 20 mg/kg.

Toma de muestras

55 Los recuentos de colonias se determinaron después de la inoculación a las 4 horas (ratones no tratados) y 24 horas (ratones tratados y tratados sólo con vehículo). Inmediatamente después de sacrificar los ratones, los pulmones se recogieron y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, los órganos se homogeneizaron en 1 ml de solución salina al 0,9%. Cada muestra se diluyó a continuación 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 µl sobre placas de agar sangre. Todas las placas de agar se incubaron 18-24 horas a 35°C en aire ambiente.

Recuentos de UFC

65 Se determinó que las UFC/ml en el inóculo eran 7,4 log₁₀ UFC/ml que se corresponde con 6,17 log₁₀ UFC/ratón. A las 4 horas de la inoculación, el log₁₀ UFC/pulmón medio fue de 5,06 y el nivel de UFC disminuyó a 1,55 log₁₀

UFC/pulmón medio después de 24 horas en el grupo con vehículo. El tratamiento con colistina (20 mg/kg) y el tratamiento sólo con amikacina (30 mg/kg) tuvieron algún efecto sobre la reducción de las cargas bacterianas.

- 5 La evaluación de la curva de dosis-respuesta para la DE_{50} del compuesto 1 en presencia de una dosis fija de amikacina (30 mg/kg) contra PA18298 en los pulmones murinos utilizando un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (pendiente variable) reveló una estimación de 9,1 mg/kg. La tabla 4 a continuación resume los valores de eficacia relevantes.

Tabla 4: Valores de eficacia del compuesto 1

	Compuesto 1	Compuesto 1 en presencia de 30 mg/kg de amikacina
Nivel superior	-3,60 \log_{10} UFC/ml	-3,03 \log_{10} UFC/ml
Nivel inferior	-2,48 \log_{10} UFC/ml	-3,82 \log_{10} UFC/ml
E_{max}	1,12 \log_{10} UFC/ml	0,79 \log_{10} UFC/ml
DE_{50}	26,6 mg/kg	9,1 mg/kg
Dosis estática	9,15 mg/kg	nd
1 log dosis de destrucción	nd	nd
2 log dosis de destrucción	nd	nd
R^2	0,26	0,05
nd: no determinado		

18. Un kit, según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana o enfermedad relacionada con tal infección en seres humanos o animales.