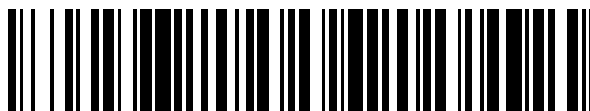


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 562**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/62** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2016 E 16151398 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3045469**

54 Título: **Derivado de polimixina y usos del mismo**

30 Prioridad:

**15.01.2015 FI 20155027**

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

**27.02.2018**

73 Titular/es:

**NORTHERN ANTIBIOTICS OY (100.0%)  
Tekniikantie 14 (INNOPOLI 2)  
02150 ESPOO, FI**

72 Inventor/es:

**VAARA, MARTTI y  
VAARA, TIMO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 656 562 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

**Derivado de polimixina y usos del mismo**5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de polimixina y a sus usos en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Las infecciones sépticas matan a más de 215.00 estadounidenses cada año. Se estima que 750.00 estadounidenses son infectados con sepsis grave y 29% de ellos muere cada año. Las muertes por sepsis representan el 9% de todos los casos de muerte en los EE.UU. La sepsis mata a tantos estadounidenses como las infecciones de miocardio, incluso más que los accidentes de tráfico.

De dos a tres millones de estadounidenses contraen una infección hospitalaria cada año y 10% de estas infecciones evolucionan a sepsis. Más de 90.000 de estos pacientes mueren de sepsis infectada en hospitales.

20 *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, ambas bacterias Gram-negativas causan casi 40% de todas las infecciones sépticas adquiridas en la comunidad y aproximadamente un tercio de todas las infecciones sépticas asociadas a la asistencia sanitaria. De todas las infecciones sépticas Gram-negativas, causan aproximadamente 60 - 75%. Otros agentes causantes Gram-negativos de infecciones sépticas incluyen *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. En total, las bacterias Gram negativas causan más de 40% de todas las infecciones sépticas, y muchas de estas bacterias son extremadamente multi-resistentes.

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

35 La pandemia de bacterias Gram-negativas extremadamente multirresistentes ha forzado a los médicos a restablecer las polimixinas como terapia de última línea para las infecciones graves, a pesar de que las polimixinas son notoriamente nefrotóxicas. La nefrotoxicidad de las polimixinas puede complicar la terapia o incluso puede requerir su interrupción. En consecuencia, el riesgo de nefrotoxicidad debe sopesarse frente a los efectos beneficiosos sobre la supervivencia del paciente. Según estudios recientes, la tasa de nefrotoxicidad de la polimixina B y la colistina (liberada del metanosulfonato de colistina) varía de 10% al 30%, pero en materiales seleccionados, la tasa de colistina puede ser tan alta como de 43 al 48% y la de la polimixina B tan alta como 55%. En consecuencia, la variación individual es alta (Vaara, M. 2013, New derivatives of polymyxins, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013, 68: 1213-9). La situación se hace aún más desafortunada por datos contemporáneos que indican que en 40 pacientes críticamente enfermos los regímenes de dosificación actuales son subóptimos y conducen a concentraciones séricas demasiado bajas. Por lo tanto, se aconseja a los médicos que usen dosis mayores, pero esto aumenta aún más la nefrotoxicidad.

50 **Breve descripción de la invención**

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado de polimixina eficaz contra bacterias Gram-negativas y que tenga una nefrotoxicidad reducida. Los objetos de la invención se logran mediante un derivado de polimixina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mediante sus usos que se caracterizan por lo que se establece en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la 55 invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

**Breve descripción de los dibujos**

60 A continuación, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos [acompañantes], en los que

La Figura 1 muestra S-BUN (mg/dL) antes (día -7/-8) y durante (días 2-8) el tratamiento con polimixina B

(PMB), NAB739 o NAB815 (3 animales por grupo, IV, TID) ;

La Figura 2 muestra S-Crea (mg/dL) antes (día -7/-8) y durante (días 2-8) el tratamiento con polimixina B (PMB), NAB739 o NAB815 (3 animales por grupo, IV, TID) ;

5 La Figura 3 muestra la razón U-NAG (U/L)/U-Crea (mg/dL) x 10 antes (día -7/-8) y durante (días 2-8) el tratamiento con polimixina B (PMB), NAB739, o NAB815 (3 animales por grupo, IV, TID);

La Figura 4 muestra la razón U-GGT (U/L) / U-Crea (mg/dL) antes (día -7/-8) y durante (días 2-8) el tratamiento con polimixina B (PMB), NAB739 o NAB815. (3 animales por grupo, IV, TID).

### Descripción detallada de la invención

10 Recientemente, se han realizado varios intentos para desarrollar derivados de polimixinas mejor tolerados. Anteriormente los autores de la presente invención han demostrado que los compuestos descritos en el documento PCT/FI2007/050441 (cuyos contenidos y descripciones completos se incorporan al presente documento como referencia) tienen una notable actividad antibacteriana y son útiles en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas. Además, los autores de la presente invención han sugerido que estos compuestos, que solo portan tres (3) cargas positivas, son menos nefrotóxicos que los compuestos que portan cinco (5) cargas positivas, y también han mostrado evidencia preliminar para ello Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. Antimicrob Agents Chemother 2008, 52: 3229-36; Vaara M. y Vaara T. Polymyxin derivatives and uses thereof. 2010. Patente de Estados Unidos Núm. 7.807.637; Vaara M. Polymyxins and their novel derivatives. Curr Opin Microbiol 2010; 13: 574-81; Mingeot-Leclercq M.P. Novel polymyxin derivatives are less cytotoxic than polymyxin B to renal proximal tubular cells. Peptides 2012; 35: 248-52; Vaara M. y Vaara T. The novel polymyxin derivative NAB739 is remarkably less cytotoxic than polymyxin B and colistin to human kidney proximal tubular cells. Int J Antimicrob Chemother 2013, 41:292-3; Vaara, M. 2013, New derivatives of polymyxins, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013, 68: 1213-9).

25 Si bien estos compuestos, tales como NAB739, tienen una buena actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas, es deseable tratar de desarrollar derivados que sean aún mejor tolerados de una manera confiable e inequívoca.

30 Ahora, se ha observado sorprendentemente que un derivado de polimixina específico como se define en la presente memoria muestra un alto efecto antibacteriano deseado contra bacterias Gram-negativas sin una nefrotoxicidad inaceptable.

35 El desarrollo de CB-182,804, una molécula que por otra parte sería idéntica a la polimixina B, pero que porta 2-clorofenilamino-carbonilo como radical acilo graso unido al extremo N-terminal, bajo la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006004185 (ver también Quale J. et al., Activity of polymyxin B and the novel polymyxin analogue CB-182,804 against contemporary Gram-negative pathogens in New York City, Microb Drug Resist 2012,13: 574-81) se suspendió en 2010. Un análogo de polimixina Dap-3 no difirió lo suficiente de la polimixina B en los estudios de nefrotoxicidad en perros (Magee T.V. et al., Discovery of Dap-3 Polymyxin Analogues for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Nosocomial Infections, J. Med. Chem. 2013, 56: 5079-5093). Ambos programas indujeron únicamente compuestos con cinco cargas positivas. Los intentos también incluyen los de Kern y colaboradores (Keirstead N, Early prediction of polymyxin-induced nephrotoxicity with next generation urinary kidney injury biomarkers, Toxicol Sci 2014, 137: 278-91); no se han publicado detalles ni ningún otro progreso.

45 La solicitud de patente WO/2013/072695 describe más de 30 nonapéptidos de polimixina, cada uno con al menos cuatro cargas positivas. Varios de ellos eran menos citotóxicos que la polimixina B y la colistina para la línea de células epiteliales del túbulo proximal renal humano (hRPTEC) HK-2. Además, en un estudio de ratas de 7 días, tres de ellos aumentaron los niveles de cistatina C, albúmina y NAG en orina en menor grado que la dosis equivalente de colistina.

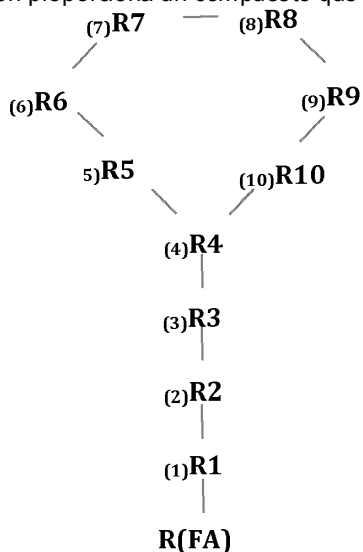
50 La solicitud de patente WO/2014/188178 continúa el trabajo descrito en el documento WO/2013/072695. Como indica el título "derivados de polimixina y su uso en terapia combinada junto con diferentes antibióticos", el énfasis principal es la potenciación de la actividad de otros antibióticos tales como la rifampina por los derivados de polimixina de la solicitud de patente anterior así como de varios nuevos derivados. Algunos de los nuevos derivados (por ejemplo, los derivados 44, 46 y 48) portan D-Ser en R3 (numeración de los residuos aminoácido de acuerdo con el esquema comúnmente utilizado para las polimixinas, es decir, el primer residuo del N-terminal de la polimixina B se numera como R1). Uno de ellos (el derivado 46) solo porta tres cargas positivas. Es un análogo de NAB739, por lo demás idéntico al mismo, pero contiene como radical terminal 2-ciclohexil-2-hidroxietanoilo (también conocido como 2-ciclohexil-2-hidroxiacetilo) mientras que NAB739 porta octanoilo. En total, la solicitud describe unos 100 derivados, que, con la excepción del ejemplo derivado 46 descrito anteriormente, portan 4-6 cargas positivas. Todos los derivados tenían su parte de heptapéptido cíclico idéntica a la polimixina B, con la excepción de los ejemplos de derivados 19, 30, 31 y 32 que tenían su parte de heptapéptido cíclico idéntica a la de la polimixina E y el ejemplo de

- derivado 50 que tenía su parte de heptapéptido cíclico idéntica a la de la polimixina S. Muchos de los derivados fueron menos citotóxicos que la polimixina B y la colistina para la línea de células epiteliales del túbulo proximal renal humano (hRPTEC) HK-2. Además, en un estudio de 7 días con ratas, se demostró que tres de ellos (derivados ilustrativos 1, 4 y 10) aumentan los niveles de cistatina C, albúmina y NAG en orina en menor medida que la dosis equivalente de colistina. En la solicitud, se sugiere que la presencia de una funcionalidad amino dentro del grupo N-terminal puede reducir la nefrotoxicidad. Sin embargo, en la polimixina B y la colistina notoriamente nefrotóxicas, R1 porta un grupo amino libre. La solicitud también sugiere que un grupo hidroxilo y/o un grupo heterocíclico en el extremo N puede tener un efecto de reducción de la toxicidad similar.
- 5
- 10 Encontrar un modelo de nefrotoxicidad clínicamente relevante es un desafío. Magee T. V. et al., 2013 (véase más arriba) mostraron que un derivado de polimixina 5x, donde R3 es diaminopropionilo (en lugar de diaminobutirilo) y un 6-oxo-1-fenil-1,6-dihidropiridina-3-carbonilo relativamente polar como remplazo del acilo graso, fue significativamente menos citotóxico para las células epiteliales del túbulo proximal renal humano (hRPTEC) que la polimixina B.
- 15 Además, en un estudio de ratas de 7 días, 5x fue menos nefrotóxico que la polimixina B. Animados por estos resultados, los autores realizaron un estudio de 7 días en perros. En este estudio, los resultados de nefrotoxicidad fueron solo ligeramente favorables a 5x. Los autores concluyeron que 5x se toleró mejor que la polimixina B en ratas con respecto a las lesiones renales, pero que esta ventaja fracasó en el perro, apuntando al fracaso del análisis hRPTEC para predecir la nefrotoxicidad en esa especie.
- 20 En otro estudio del mismo laboratorio (Burt D. et al. Application of emerging biomarkers of acute kidney injury in development of kidney-sparing polypeptide-based antibiotics. Drug Chem Toxicol. 2014; 37:204-12), la polimixina B provocó un inicio rápido de la respuesta de S-Crea y BUN en perros y monos, pero no en ratas. Los autores concluyeron que la falta de respuesta en ratas podría atribuirse a respuestas de polimixina B específicas de especie y a diferencias en la fisiología renal. El compuesto 5x no se incluyó en este estudio. Debido a que S-Crea y BUN son
- 25 marcadores muy relevantes de la nefrotoxicidad en la terapia clínica, se podría esperar que un modelo animal como el perro o el mono fuera mucho más fiable que los modelos de roedores para predecir la nefrotoxicidad en seres humanos.
- 30 Por lo tanto, en análisis hRPTEC *in vitro* y los estudios con ratas *in vivo*, por atractivos que sean, pueden dar resultados engañosos que no pueden duplicarse en modelos animales más cercanos a los seres humanos.
- NAB815 y su compuesto de referencia previamente descrito NAB739 entran en la categoría de polimixinas que portan solo tres (3) cargas positivas. Como se muestra ahora aquí, ambos son claramente menos nefrotóxicos que la polimixina B en monos *cynomolgus*. Además, NAB815 es incluso menos nefrotóxico que NAB739. Todos los animales lo toleraron. La heterogeneidad en la respuesta del paciente a la polimixina B y la colistina tiene importancia clínica, ya que algunos pacientes parecen ser más vulnerables al efecto nefrotóxico que los demás. La comparación histopatológica de los hallazgos morfológicos inducidos por dosis igualmente altas (36 mg/kg/d) de NAB739 y NAB815 muestra alteraciones nefróticas menos graves con NAB815. En consecuencia, NAB815 tiene una clara ventaja sobre NAB739. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, esto podría deberse a una
- 35 diferencia en la distribución de carga. Mientras que NAB739 porta sus tres cargas positivas en el anillo de heptapéptido, NAB815 porta solo dos cargas positivas en el anillo de heptapéptido. Por lo tanto, el anillo de heptapéptido de NAB815 no se parece a ninguna de las polimixinas conocidas.
- 40 En la solicitud de patente anterior de los mismos inventores (PCT/FI2007/050441) y publicaciones (Vaara M. et al. 2008. Novel Polymyxin Derivatives Carrying Only Three Positive Charges Are Effective Antibacterial Agents. Antimicrob Agents Chemother 52:3229-3236; Vaara, M., T. Vaara. 2010. Structure-activity studies on novel polymyxin derivatives that carry only three positive charges. Peptides 31:2318-2321), todas las moléculas que tienen dos cargas positivas en la porción del anillo y una carga positiva en la porción de cola (NAB715, NAB716 y NAB717), son variaciones de un tema. La única carga positiva en la cola estaba en la ubicación R3 y las dos cargas positivas en la parte cíclica se desplazaron entre tres posibles ubicaciones en R5, R8 y R9. De las tres combinaciones (cargas positivas en R5 y R8, en R5 y R9, y en R8 y R9), solo una (R5 y R9) mostró actividad, que, sin embargo, fue notablemente menor que la de los mejores compuestos (NAB739 y NAB737) que tenían las tres cargas positivas en la porción cíclica (en R5 y R8 y R9).
- 45
- 50 Al diseñar el compuesto según la presente solicitud de patente (NAB815), se adoptó un enfoque totalmente diferente. En la porción de cola, se conservaron los dos grupos hidroxilo (debido a Thr y DThr en R2 y R3, respectivamente), y la carga positiva se colocó en R1 (y no en R3). Como resultado sorprendente, se pudo conservar la alta actividad antibacteriana, mientras que una de las tres únicas cargas positivas se colocó en la porción de cola. La solicitud de patente anterior y las publicaciones posteriores no describen ningún compuesto que
- 55 tenga una cola completa (R1, R2 y R3) con una carga positiva en la misma.
- 60

Muy notablemente, como también se muestra aquí, NAB815 se excreta en la orina en monos *cynomolgus* en un

grado muy significativo, mientras que la excreción de polimixina B es casi nula. Esto puede ser una ventaja en la terapia de infecciones graves que se originan en el tracto urinario.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula (I):



5 en donde

(I)

- 10 R1 es Dab
- R2 es Thr
- R3 es DThr
- R4 es Dab
- R5 es Dab
- R6 es DPhe
- R7 es Leu
- 15 R8 es Abu
- R9 es Dab;
- R10 es Thr; y
- R (FA) es octanoilo;
- y sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 El compuesto de la presente invención comprende una porción de heptapéptido cíclico R4-R10 y una cadena lateral unida al residuo aminoácido N-terminal R4. La cadena lateral consiste en un residuo R(FA)-tripeptido(R1-R3). R(FA) es un residuo octanoilo (OA) unido al grupo α-amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena lateral del tripeptido.

25 Específicamente, R1-R10 representa una secuencia de aminoácidos Dab-Thr-DThr-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], es decir, SEQ ID NO. 1. Así, el compuesto de acuerdo con la presente invención es OA-Dab-Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], es decir, OA-SEQ ID NO. 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 Los compuestos de fórmula (1) exhiben una alta actividad antibacteriana y muestran solo un efecto nefrotóxico de menor importancia o no deseado en la administración, como se demostrará mediante resultados de ensayos farmacológicos ilustrativos comentados a continuación.

35 Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria: Dab se refiere a α,γ-diamino-n-butilo, es decir, 2,4-diaminobutilo; Abu se refiere a 2-aminobutilo; Thr se refiere a L-treonina; DThr se refiere a D-treonina; DPhe se refiere a D-fenilalanina; Leu se refiere a L-leucina; y OA se refiere a octanoilo.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable" representa que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y ni biológica ni de otro modo indeseable, e incluye que es útil tanto para uso veterinario como para uso farmacéutico humano.

- El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales con ácidos y bases y que se sabe que no son tóxicas y se usan comúnmente en la literatura farmacéutica. Ejemplos de tales sales son sales de adición de ácido formadas por el uso de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido carbónico y similares. Un ácido utilizado típicamente para la formación de la sal farmacéuticamente aceptable es ácido sulfúrico.
- "Comprende" o "que comprende" según se utiliza en la presente memoria denota que el conjunto descrito posteriormente puede incluir, pero no es necesario que incluya, otros elementos.
- Los compuestos de la presente invención pueden inhibir el crecimiento o sensibilizar bacterias Gram-negativas clínicamente importantes frente a agentes antibacterianos. Dichas bacterias Gram-negativas pueden ser las pertenecientes al género *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Branhamella*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, y especies de *Yersinia*. La bacteria puede ser, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, otras especies de *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, otras especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter baumannii*, así como muchas otras especies de bacterias Gram negativas no fermentadoras. Las bacterias también incluyen *Helicobacter pylori*, así como otras bacterias Gram-negativas clínicamente importantes. En particular, dichas bacterias Gram-negativas se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*, preferiblemente dichas bacterias Gram-negativas se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*.
- Las infecciones bacterianas que se pueden tratar con los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, bacteriemia, septicemia, infección de piel y tejidos blandos, neumonía, meningitis, infecciones en la región pélvico-peritoneal, infección por cuerpo extraño, fiebre en pacientes hematológicos, infección asociada con una vía intravenosa u otro catéter, cánula y/o dispositivo, infección en el tracto gastrointestinal, en el ojo, o en el oído, infección superficial de la piel y colonización del tracto gastrointestinal, membranas mucosas y/o piel por bacterias potencialmente nocivas.
- Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de una infección bacteriana y/o enfermedades infecciosas bacterianas, en particular las causadas por bacterias Gram-negativas. Los ejemplos de enfermedades y afecciones inflamatorias incluyen, entre otras, infecciones graves adquiridas en el hospital, infecciones de pacientes inmunodeprimidos, infecciones de pacientes trasplantados de órganos, infecciones en las unidades de cuidados intensivos (UCI), infecciones graves de quemaduras, infecciones graves adquiridas en comunidad, infecciones de pacientes con fibrosis quística, así como infecciones causadas por bacterias Gram-negativas multirresistentes.
- Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para tratar una infección bacteriana, en particular infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, que comprende administrar un compuesto como se definen la presente memoria, o una composición farmacéutica como se define en la presente memoria, a un paciente que lo necesite.
- Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad eficaz dentro del intervalo de dosificación diario de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente entre 3 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.
- "Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de, o siente, un efecto). Tal tratamiento no necesita necesariamente mejorar por completo el estado de enfermedad. Adicionalmente, dicho tratamiento o prevención se puede usar junto con otros tratamientos tradicionales para reducir la afección conocida por los expertos en la técnica.
- Los compuestos de la presente invención se utilizan lo más preferiblemente solos o en otros ingredientes activos, en particular otros agentes antibacterianos. Dichos otros ingredientes activos pueden administrarse simultánea o secuencialmente en cualquier orden con los compuestos de la presente invención. Dichos agentes antibacterianos se pueden seleccionar del grupo que consiste en claritromicina, azitromicina, eritromicina y otros macrólidos, cetólidos, fluorocépolidos, clindamicina y otras lincosaminas, estreptograminas, rifampina, rifabutina, rifalazil y otras rifamicinas, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, vancomicina, dalbavancina, telavancina, oritavancina y otros antibióticos glicopeptídicos, fluoroquinolonas, bacitracina, derivados de tetraciclina y fluorocidina, antibióticos

betalactámicos, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folato, inhibidores de desformilasa e inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano. En particular, dichos agentes antibacterianos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: claritromicina, azitromicina, eritromicina, telitromicina, solitromicina, clindamicina, la combinación de estreptogramina quinupristina-dalfopristina, eravaciclina, minociclina, omadacidina, rifampina, rifabutina, rifalazil, ácido fusídico, mupirocina, las oxazolidinonas tedizolida y linezolid, vancomicina, dalbavancina, oritavancina, telavancina, las fluoroquinolonas moxifloxacin, delafloxacin y avarafloxacin, y el inhibidor de la síntesis de folato trimetoprim.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por diversas vías, por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intraarticular, intratecal, intramuscular, intraperitoneal e intradérmica, y por vía transdérmica, rectal, bucal, oromucosa, nasal, ocular y vía inhalación y vía implante.

Las composición farmacéutica que comprenden un compuesto de la presente invención como ingrediente activo puede incluir adicionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables tales como uno o varios portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Una composición farmacéutica adecuada puede comprender un compuesto de la presente invención combinado con uno o más ingredientes activos, en particular un agente antibacteriano como se comentó anteriormente. Los compuestos se pueden formular en una composición adecuada; formas de administración adecuadas incluyen, por ejemplo, soluciones, dispersiones, suspensiones, polvos, cápsulas, comprimidos, píldoras, cápsulas de liberación controlada, comprimidos de liberación controlada y píldoras de liberación controlada.

#### Métodos de preparación general

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica. El siguiente ejemplo ilustra la preparación de un compuesto de fórmula (I).

#### Ejemplo 1: Síntesis de NAB815

NAB815, que tiene la fórmula estructural de octanoil- $\alpha$ Dab-Thr-DThr- [ciclo- $\alpha,\gamma$ Dab -  $\alpha$ Dab - Dphe - Leu - Abu - Dab - Thr], donde la Thr carboxi-terminal en R10 está unida a través de su grupo carboxilo al grupo 4-amino del residuo de ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) en R4, y que tiene la masa molecular relativa de 1175.44, se puede sintetizar, por ejemplo, mediante química convencional en fase sólida utilizando la metodología descrita previamente para otros derivados de polimixina tales como NAB739 (Patente de Estados Unidos Núm. 7.807.637). El aminoácido en el extremo C terminal está disponible comercialmente como pre-anclado a la fase sólida y, cuando se escinde de la resina con ácido, produce un ácido carboxílico C-terminal.

La estrategia en la protección es usar tres niveles de protección ortogonal, protección temporal Fmoc para las funciones alfa amino, protección del grupo  $\gamma$ -amino del residuo Dab implicado en la ciclación por grupos que se eliminan durante la etapa de escisión del ácido, y protección semi-permanente para cubrir las funciones reactivas de la cadena lateral mientras tiene lugar la reacción de ciclación. Después de la escisión del péptido de la resina, el ácido carboxílico C-terminal se hace reaccionar con el grupo  $\gamma$ -amino del residuo de ácido diaminobutírico (Dab) en R4 para formar un péptido cíclico. Después de la etapa de ciclación, los grupos de protección semipermanentes se eliminan para producir el péptido NAB.

En consecuencia, la función alfa amino del aminoácido está protegida por un grupo fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) y Fmoc se elimina con piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) en cada ciclo. El aminoácido que está implicado en la ciclación, es decir, Dab en R4, está protegido por un grupo terc-butoxicarbonilo (tBoc), un grupo ácido lábil que se elimina en la etapa de escisión. Los aminoácidos que tienen grupos funcionales de cadena lateral están protegidos por un grupo que es estable en la etapa de escisión del ácido, es decir, un grupo benciloxicarbonilo (Z). Los aminoácidos D-fenilalanina y leucina naturalmente no necesitan protección de la cadena lateral. El extremo amino no está protegido; esto permite la reacción directa en el procedimiento de acilación.

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

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

Los aminoácidos se adquirieron ya protegidos de proveedores convencionales. El péptido se eliminó de la resina mediante reacción con una solución de ácido trifluoroacético al 95% y agua al 5% durante 2 horas a temperatura

ambiente, para producir el producto parcialmente protegido. El péptido resultante se precipitó con éter dietílico.

La mezcla de ciclación utilizada fue hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBop), N-hidroxibenzotriazol (HoBt) y N-metilmorfolina (NMM) en el exceso molar de 2, 2 y 4, respectivamente. El péptido se disolvió en dimetilformamida, se añadió la mezcla de ciclación y se dejó reaccionar durante 2 horas. El péptido ciclado protegido se precipitó mediante la adición de dietil éter frío. Cualquier PyBop residual se eliminó lavando el péptido con agua.

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

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

NAB815 se convirtió en su sal de sulfato. El producto era un producto liofilizado de color blanco. Su apariencia en solución (1 mg/ml en agua) era clara e incolora. Cuando se identificó mediante ESI-MS, m fue 1175,4 u (masa promedio).

## Ensayos farmacológicos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar la presente invención de manera ilustrativa y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención. Adicionalmente, las concentraciones de los compuestos en los ensayos son ilustrativas y no deben tomarse como limitantes. Una persona experta en la técnica puede definir concentraciones farmacéuticamente relevantes con métodos conocidos en la técnica. Todos los experimentos con animales se realizan de acuerdo con las normas de conducta ética y las políticas institucionales apropiadas de cuidado y uso de animales.

### Ejemplo 2: Actividad antibacteriana de NAB815 y sus comparadores

Fuente de productos químicos: sulfato de NAB815 (lote 1051607; pureza, 98,8% por HPLC) y sulfato de NAB739 con fórmula estructural de octanoil-Thr-D-Ser- [ciclo- $\alpha$ ,  $\gamma$ Dab- $\alpha$ Dab-DPhe-Leu- $\alpha$ Dab-Dab-Thr], es decir OA-SEC ID 2 (lote 1049851, pureza, 97,3% por HPLC). El sulfato de polimixina B se obtuvo de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. (Número de catálogo P0972, lote BCBF8382V, pureza, 89,3%).

Los análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM) se completaron por triplicado utilizando la metodología convencional CLSI y el caldo Muller-Hinton II según lo descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012 (Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, Ninth edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.) El inóculo de inicio ( $5 \times 10^5$  CFU/ml) se preparó a partir de cultivos de una noche en tripticasa de agar de soja que contenía 5% de sangre de oveja. Las placas de microtitulación se incubaron a 35°C durante 20 horas, momento en el cual se leyeron visualmente. Los estudios de sinergia se realizaron utilizando derivados de polimixina combinados con rifampina, un compuesto modelo para agentes antibacterianos tales que la membrana externa intacta de bacterias Gram-negativas actúa como una barrera de permeabilidad.

La Tabla 1 muestra valores de CIM ( $\mu$ g/ml), es decir, la actividad antibacteriana de la polimixina B, un compuesto de referencia (NAB739) y un compuesto de acuerdo con la presente invención (NAB815), solo y combinado con una concentración fija de rifampicina (0,25  $\mu$ g/ml)\*; ambas cepas susceptibles a polimixina y polimixina no susceptibles incluidas.

Tabla 1

Diana	Polimixina B		Ref, NAB739		NAB815	
	solo	Rifampina	solo	rifampina	solo	rifampina
E. coli ATCC 25922 (8)	2	0,5-1	2	1	2	1
E. coli JMI 3328 (8)	2	0,5-1	2	1	4	1
K. pneumoniae ATCC 43816 (16)	2	0,5-1	4	1-2	2-4	1
K. pneumoniae JMI 27072 (8)	2	1	2-4	1	2-4	1-2
A. baumannii ATCC 19606 (4)	2	0,5	4	0,5	4	0,5-2



Diana	Polimixina B		Ref, NAB739		NAB815	
	solo	Rifampina	solo	rifampina	solo	rifampina
A. baumannii JMI 48125 (4)	2	1	2-4	0,5	2	0,5-2
P. aeruginosa ATCC 27853 (32)	2	1	8 - >8	4-8	16	>8
P. aeruginosa JMI 7445 (32)	2	1	4	4	8	4
E. coli JMI 109 (16)	4-8	0,5-1	32	1	128	1
K. pneumoniae JMI 27068 (64)	64	1	128	2	128	4
A. baumannii CMI 417 (4)	32	1	128	2	256	2

\* Los valores de CIM en ausencia de rifampina son una sinopsis de los valores de CIM modales de determinaciones por triplicado y de las CIM de análisis de damero duplicados. Los valores CIM en presencia de rifampicina (0.25 µg/mL) provienen de ensayos en damero duplicados. Las CIM modales (µg/ml) de rifampicina para cada cepa diana (a partir de determinaciones por triplicado) se muestran entre paréntesis después del nombre de la cepa bacteriana diana.

Las CIM de NAB815 para cepas susceptibles a polimixina de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Acinetobacter* fueron idénticas o muy cercanas a las de NAB739 y polimixina B. La polimixina B mostró una actividad mejor que NAB815 y NAB739 contra *Pseudomonas aeruginosa* y contra dos (*K. pneumoniae* JM109 y *A. baumannii* CMI417) de las tres cepas que muestran una menor susceptibilidad a la polimixina B.

Las concentraciones subinhibitorias de los tres péptidos potenciaron notablemente la actividad de la rifampicina (Tabla 1). A 1 µg/ml, NAB815 disminuyó la CIM de la rifampicina para *K. pneumoniae* ATCC 43816 de 16 µg/ml a 0,25 µg/ml (es decir, por un factor de 64) y para *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JMI3328 de 8 µg/ml a 0,25 µg/ml (es decir, en un factor de 32). Lo que es más importante, también las cepas que mostraron reducción de susceptibilidad a las polimixinas eran susceptibles a la actividad combinada de NAB815 y rifampicina. Se obtuvieron resultados muy similares con NAB739. Contra *P. aeruginosa*, tanto NAB815 como NAB739 carecían de cualquier actividad sinérgica notable con la rifampina.

Para concluir, las actividades antibacterianas de NAB815 y NAB739 fueron idénticas o muy cercanas entre sí, no solo, sino también en presencia de rifampicina.

### Ejemplo 3: Toxicidad y estudios toxicocinéticos

La toxicidad in vivo y los estudios toxicocinéticos se realizaron mediante el uso de monos cynomolgus. El laboratorio que realizó los estudios en animales está acreditado por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC), tiene una Garantía de Bienestar Animal emitida por la Oficina de Bienestar Animal de Laboratorio (OLAW), está registrada en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. (USDA), y tiene un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC, por sus siglas en inglés) responsable del cumplimiento de las leyes y regulaciones aplicables concernientes al cuidado y uso humanitario de animales de laboratorio.

Los monos cynomolgus no sometidos a tratamiento previo se adaptaron a la sala de estudio durante 28 días durante los cuales a cada animal se le implantó un catéter femoral residente permanente para permitir infusiones intravenosas continuas. A los animales se les permitió un período de recuperación quirúrgica de al menos 2 semanas antes de iniciar la dosificación.

La fuente de productos químicos fue la siguiente: sulfato de NAB815 (lote 1051607, pureza 98,8% mediante HPLC y lote 1054308, pureza 98,4% mediante HPLC) y sulfato de NAB739 (lote 1049851, pureza 97,3 mediante HPLC). El sulfato de polimixina B era de Sigma-Aldrich (número de catálogo P0972, número de lote BCBF8382V). En cada día de uso, las cantidades apropiadas de NAB739, NAB815 o polimixina B se pesaron y se disolvieron en volúmenes apropiados de solución salina estéril para preparar una solución de partida para cada artículo de ensayo y control positivo. Se utilizó un factor de corrección en la preparación de la solución de partida para tener en cuenta tanto el contenido de pureza como el de sulfato en cada artículo de ensayo. Por consiguiente, la dosis (tal como 36 mg/kg/d) se refiere a la dosis del péptido puro como su forma de base libre, no como su sal sulfato.

Las dosis fueron las siguientes: polimixina B 18 mg/kg/día (Grupo 1), polimixina B 24 mg/kg/día (Grupo 2), NAB739

24 mg/kg/día (Grupo 3), NAB 739 36 mg/kg/d (Grupo 4), NAB815 24 mg/kg/d (Grupo 5), NAB815 36 mg/kg/d (Grupo 6). En cada grupo de estudio se incluyeron tres animales.

5 Durante siete días, a los animales se les administraron dosis por infusión intravenosa (IV) tres veces al día (TID) a un volumen de dosis de 10 mL/kg durante 1 hora ( $\pm$  10 minutos),  $8 \pm 0,5$  horas de diferencia. El día de la administración de la dosis inicial se designó el día 1 del estudio, numerando los días posteriores consecutivamente. Los días previos a la administración de la dosis inicial se numeraron consecutivamente al último día de aclimatación al que se hizo referencia como Día -1.

10 Los siguientes parámetros se evaluaron a intervalos diseñados: observaciones clínicas, pesos corporales, patología clínica (hematología, coagulación, química sérica, análisis de orina incluyendo sedimentos de orina y química de la orina), toxicocinética (plasma y orina) y patología anatómica (riñón). En los casos de animales sacrificados de forma no programada, las muestras se tomaron el día del sacrificio.

15 El día de la necropsia, los animales se sedaron con ketamina, se pesaron y se anestesiaron con una inyección intravenosa de una solución comercial de pentobarbital y fenitoína, seguido de exsanguinaciones.

20 La necropsia terminal para los animales supervivientes se realizó el Día 8. Se realizó una necropsia no programada en los grupos de polimixina B el Día 4 para un animal que recibió 18 mg/kg/d (grupo 1) y para dos animales que recibieron 24 mg/kg/d (Grupo 2), y el Día 5 para dos animales que recibieron 18 mg/kg/d (Grupo 1). La necropsia no programada también se realizó el Día 5 para un animal en el grupo NAB739 que recibió 36 mg/kg/d (Grupo 4).

25 En la necropsia, se registraron observaciones generales y los pesos de los órganos, y se recogieron tejidos específicos. La histopatología se realizó en secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina (H&E).

30 Las concentraciones plasmáticas y urinarias para los estudios toxicocinéticos (TK) se determinaron mediante el uso de un cromatógrafo líquido interconectado con un espectrómetro de masas después de la precipitación de las proteínas. Se mezcló una muestra (100  $\mu$ L) con solución de patrón interno en agua:ácido fórmico (99:1 v/v, 50 mL). A continuación, se agregaron 600  $\mu$ L de acetonitrilo:ácido fórmico 100:1. Las placas se centrifugaron a 3200 rpm durante 5 minutos. Utilizando un Tomtec Quadra96, se transfirió una alícuota de 450  $\mu$ L a una nueva placa de 96 pocillos y se secó en nitrógeno a 40°C. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de agua: metanol: ácido fórmico (85:15:1 v/v) y la placa se selló para la inyección de LC-MS/MS. El sistema LC-MS consistió en el cromatógrafo de líquidos Waters Acquity interconectado con un MS Thermo Scientific TSQ Quantitative triple cuadrupolo con ionización en el modo de iones positivos. Cada muestra (20  $\mu$ L) se inyectó en una columna Waters Acquity BEH Shield RP18 (2,1 x 50 mm; 1,7  $\mu$ m) equilibrada a 50°C. La Fase Móvil A fue agua:metanol:ácido fórmico 85:15:1 v/v. La Fase Móvil B fue acetonitrilo:metanol:ácido fórmico 50:50:1 v/v.

El gradiente que era adecuado para cuantificar todos los compuestos se muestra en la Tabla 2.

40

**Tabla 2**

Tiempo (min)	Caudal (mL/min)	%A	B
0,00	0,400	100,0	0,0
1,00	0,400	100,0	0,0
1,10	0,400	88,0	2,0
3,00	0,400	88,0	2,0
3,10	0,400	84,0	6,0
6,00	0,400	84,0	6,0
6,10	0,400	50,0	0,0
7,90	0,400	50,0	0,0
8,00	0,400	100,0	0,0
10,0	0,400	100,0	0,0

Las transiciones de masa y los tiempos de retención para cada compuesto se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3**

Compuesto	Tiempo de retención	Q1 m/z	Q3 m/z
Polimixina B	2,97	602,67	101,123
NAB739	5,08	539,11	120,77
NAB815	5,32	588,67	101,121
Colistina	2,78	585,67	86,206

5 Se realizaron regresiones de razones de área máxima de las respuestas del patrón de calibración utilizando un ajuste lineal ( $1/\text{concentración}^2$ ) para la polimixina B utilizando colistina como patrón interno. Para NAB739 y NAB815, se realizaron regresiones de las áreas de los picos de las respuestas del patrón de calibración utilizando un ajuste cuadrático ( $1/\text{concentración}^2$ ) (sin el uso de un patrón interno).

Los modelos de regresión se eligieron en función del comportamiento de los analitos en todo el intervalo de concentración utilizado durante el desarrollo.

10 El análisis toxicocinético se realizó utilizando el soporte lógico WinNonlin Phoenix versión 6.3 (Pharsight, Cary, NC). Para TK plasmático, se utilizó el modelo de infusión IV no compartimental. Las figuras muestran los niveles de Nitrógeno de Urea en Sangre (S-BUN, Fig. 1) y Creatinina en Sangre (S-Crea; Fig. 2), ambos marcadores sanguíneos para lesión renal, en los animales antes del tratamiento y en los mismos animales que reciben posteriormente polimixina B, NAB739 o NAB815. Las figuras también muestran la razón de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa/orina en creatinina (U-NAG/Crea, Fig. 3) y la razón de Gamma Glutamyltransferasa/orina en creatinina (U-GGT/Crea, Fig. 4), ambos biomarcadores de orina para la lesión renal, en esos animales. S-Crea y U-Crea se midieron utilizando un Analizador Olympus (OA) y el método Jaffe modificado, S-BUN utilizando OA y ureasa/L-glutamato deshidrogenasa. U-NAG se midió utilizando OA/enzimático, y U-GGT utilizando OA y glutamil-carboxi-p-nitroanilida IFCC. En las Figuras 1 a 4, "\*" indica que el animal tuvo que ser sacrificado debido a efectos nefrotóxicos graves.

25 Se puede concluir que NAB815 fue significativamente mejor tolerado que NAB739. Un animal que recibió NAB739 a 36 mg/kg/d tuvo que ser sacrificado debido a efectos nefrotóxicos graves. En este animal, los cuatro marcadores fueron significativamente elevados. En otro animal que recibió NAB739 a 36 mg/kg/d, ambos biomarcadores de orina estaban notablemente elevados. Por el contrario, los animales NAB815 mostraron elevaciones mínimas, si las hubiera, de los cuatro parámetros, y no se sometieron a una necropsia preestablecida.

30 A la dosis de 24 mg/kg/d, un animal que recibió NAB739 mostró un incremento marcado de S-Crea. Ninguno de los parámetros fue elevado en los animales que recibieron una dosis equivalente de NAB815.

35 Como se esperaba, la polimixina B fue marcadamente tóxica. Dos animales que recibieron polimixina B a 24 mg/kg/día y los tres animales que recibieron polimixina B a 18 mg/kg/d tuvieron que ser sacrificados. En los seis animales, S-BUN, S-Crea y U-GGT/Crea aumentaron notablemente. U-NAG/Crea aumentó notablemente en cinco de los animales.

40 La comparación histopatológica de los hallazgos morfológicos inducidos por dosis igualmente altas (36 mg/kg/d) de NAB739 y NAB815 mostraron alteraciones nefróticas menos graves con NAB815. Se registró la presencia de los siguientes parámetros nefropatológicos en cada animal: basofilia tubular (regeneración), degeneración/necrosis tubular, infiltración (por células inflamatorias mononucleares y/o mixtas), dilatación tubular y cilindros tubulares. Cada parámetro se calificó de la siguiente manera: Código de grado = 0: sin hallazgos significativos; 1: mínimo; 2: leve; 3: moderado; 4: marcado. Los hallazgos marcados se registraron solo en el animal tratado con NAB739 euanizado, y fueron los siguientes: marcada degeneración/necrosis tubular así como presencia marcada de cilindros tubulares. Los animales tratados con NAB739 que sobrevivieron al tratamiento tuvieron hallazgos moderados, ambos en dos parámetros. Dos de los animales tratados con NAB815 tuvieron hallazgos moderados, ambos en un solo parámetro. El tercer animal tratado con NAB815 no tuvo más que hallazgos mínimos o leves. Por consiguiente, los animales tratados con NAB815 tenían alteraciones tisulares menos graves en relación con las observadas en los animales tratados con NAB739.

50 El área bajo el tiempo de concentración de 0 h a 8 h (AUC 0-8h, hr\* $\mu$ g/mL) de NAB815 después de la infusión de 8 mg/kg fue 102 (DT = 5), cuando se determinó el día 1, y 110 (DT = 12), cuando se determinó el día 7. Después de la dosis equivalente (8 mg/kg) de NAB739, los valores correspondientes fueron 108 (DT = 2) y 137 (DT = 2). Después de la dosis equivalente de polimixina B (8 mg/ml), el valor fue 112 (DT = 5), cuando se determinó el día 1. En consecuencia, los valores de AUC para cada uno de los tres compuestos fueron muy próximos entre sí.

Muy notablemente, una porción muy importante de la dosis de NAB815 se excretó en la orina en el plazo de las 8 horas posteriores a la infusión (recuperación de 0-8 h). Después de la infusión de 8 mg/kg de NAB815, la recuperación de 0-8 h fue de hasta 38%, 55% y 88% de la dosis (porcentajes dados para cada animal). Las tasas de recuperación correspondientes para NAB739 fueron de hasta 20%, 91% y 92% y las de polimixina B 1%, 2% y 2%.

5 Las concentraciones resultantes de NAB815 y NAB739 en la orina fueron muy altas. Después de la infusión de NAB815 a 8 mg/kg, se encontraron concentraciones tan altas como 175, 225 y 260 µg/ml en la muestra de 0-4 o 4-8 h (concentraciones dadas para cada animal). Las concentraciones correspondientes para NAB739 fueron 80, 140 y 155 µg/ml y las de polimixina B 7, 9 y 15 µg/ml.

10 En conclusión, NAB815 fue significativamente menos nefrotóxico que NAB739. El AUC para ambos compuestos fue muy cercano el uno al otro. Ambos se excretaron en la orina en un grado muy significativo, dando como resultado concentraciones muy altas en la orina.

#### 15 **Ejemplo 4: Datos farmacocinéticos adicionales**

Los datos son de los estudios de monos cynomolgus descritos en el Ejemplo 3, donde los péptidos se administraron como una infusión intravenosa de 1 hora tres veces al día. Los niveles en plasma y orina de los péptidos se determinaron como en el Ejemplo 3.

20 Cuando los péptidos se dosificaron a 36 mg/kg/d, las AUC (hr\*µg/ml) de NAB815 fueron 153 (SD, 32) y 205 (SD, 56) los días 1 y 7, respectivamente. Los valores correspondientes para NAB739 fueron 239 (SD, 9) y 302 (sin SD, número de animales, 2). A esta dosificación, las recuperaciones urinarias (recolección de orina de 0-8 h) de NAB815 fueron 14,3%, 20,9% y 36,3% para los tres animales el día 1 y 33,9%, 40,5% y 41,9% el día 7, respectivamente. Los valores correspondientes para NAB739 fueron 15,4%, 20,4% y 26,4% en el día 1 y 30,6% y 55,8% el día 7 (solo dos animales). Además, las concentraciones en orina (µg/ml, en la recolección de orina de 0-8 h) de NAB815 fueron 114, 173 y 265 para los tres animales el día 1 y 17, 62 y 149 el día 7, respectivamente. Los valores correspondientes para NAB739 fueron 33, 82 y 92 el día 1 y 268 y 348 el día 7 (solo dos animales).

#### 30 **Ejemplo 5: Eficacia comparativa de NAB815 y polimixina B en la infección urinaria murina**

El estudio utilizó 64 ratones hembra OF-1 exogámicos (Charles River, Francia) que pesaban entre 28 y 32 gramos. *Escherichia coli* C175-94 (serotipo O8: K48: H4), un producto aislado clínico que elabora fimbrias tipo 1. Los péptidos fueron NAB815 (lote 1054308) y polimixina B (Sigma-Aldrich, lote BCBF8382V). El estudio fue realizado por Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca.

35 Tres días antes del inicio del estudio y durante el estudio, los ratones tenían acceso libre a glucosa al 5% como agua potable.

40 El día 0, se extrajo la orina de la vejiga presionando suavemente el abdomen. A continuación, se anestesió el ratón con aproximadamente 0,15 mL de mezcla de Zoletil s.c. Se insertó una jeringa con catéter de polietileno (Becton Dickinson) que contenía la suspensión bacteriana a través de la uretra en la vejiga y se inyectaron lentamente 50 µL del inóculo bacteriano en la vejiga. Después de eso, el ratón se dejó en la jaula. Los ratones fueron mantenidos en una cabina de calentamiento y estuvieron bajo vigilancia hasta que estuvieron completamente despiertos.

45 Después de medir las unidades formadoras de colonias (UFC), se determinó que el inóculo contenía 9,38 log<sub>10</sub> UFC/ml, que corresponde a 8,08 log<sub>10</sub> UFC/ratón.

50 El día 1 y el día 2 después de la infección, los ratones se trataron por vía subcutánea con soluciones (0,2 mL) que contenían NAB815, polimixina B o vehículo (0,9% de NaCl) dos veces al día. Los grupos de tratamiento (seis ratones en cada uno) fueron los siguientes: control del vehículo; NAB815, 0,25 mg/kg/dosis; NAB815, 0,5 mg/kg/dosis; NAB815, 1 mg/kg/dosis; NAB815, 2 mg/kg/dosis; polimixina B, 0,25 mg/kg/dosis; polimixina B, 0,5 mg/kg/dosis; polimixina B, 1 mg/kg/dosis; y polimixina B, 2 mg/kg/dosis. Además, un grupo sirvió como control de pretratamiento para ayudar a evaluar cómo se desarrolló la infección antes del inicio del tratamiento el día 1 después de la infección.

55 Los días 1, 2 y 3 postinfección se tomaron muestras de orina para el recuento de colonias. El día 1 postinfección (grupo de control previo al tratamiento) y el día 3 postinfección (todos los demás grupos) después de tomar la muestra de orina, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y la vejiga y los riñones se eliminaron asépticamente. La vejiga y los riñones se almacenaron a -80°C y a continuación se homogeneizaron en 0,5 y 1 mL de solución salina, respectivamente.

60 Las CFU en la orina se determinaron inmediatamente en el plazo de las 2-3 horas posteriores a la toma de

5 muestras. Los órganos congelados se descongelaron y se homogeneizaron con esferas de acero en un lisador de tejidos. Todas las muestras, orina, riñón y vejiga, se diluyeron 10 veces en solución salina y se realizaron aplicaciones de 20 µl en placas de agar con sangre por duplicado. Además, se extendieron muestras de orina sin diluir (2-100 µl dependiendo de la cantidad de orina) en una placa de agar separada para determinar el nivel de detección más bajo posible de los recuentos de colonias. Todas las placas de agar se incubaron durante 18-22 h a 35°C en aire ambiente.

10 El tratamiento con 1 y 2 mg/kg/dosis de NAB815 dio como resultado una reducción significativa de los niveles de UFC en la orina, cuando los niveles en el grupo control previo al primer día postinfección se compararon con los niveles dos días después del inicio del tratamiento el día 3 (\*\* p <0,01 y \* p <0,05, respectivamente (prueba ANNOVA de comparación múltiple de Dunnett)). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles correspondientes en el grupo control de vehículo, en los grupos NAB815 que recibieron 0,25 y 0,5 mg/kg/dosis y en cualquier grupo de polimixina B.

15 El tratamiento con NAB815 mostró una tendencia en la dosis-respuesta en las UFC en la vejiga y en los riñones, mientras que el tratamiento con polimixina B no mostró ninguna tendencia en las dosis-respuesta.

20 De los 24 ratones tratados con NAB815 a 0,25-2 mg/kg/dosis, los niveles bacterianos estuvieron por debajo del límite de detección en la orina de 8 ratones y en los riñones de 20 ratones, mientras que los números correspondientes de ratones tratados con polimixina B fueron 1 y 10, respectivamente.

25 Será obvio para un experto en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto inventivo se puede implementar de varias maneras. La invención y sus realizaciones no están limitadas a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

#### LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Northern Antibiotics Ltd
- 30 <120> Derivado de polimixina y usos del mismo
- <130> 2141858FI
- <160> 1
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 10
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> bacteriana
- 45 <220>
- <221> INCIERTO
- <222> (1)..(1)
- <223> Dbu
- 50 <220>
- <221> INCIERTO
- <222> (3)..(3)
- <223> d-Thr
- 55 <220>
- <221> INCIERTO
- <222> (4)..(5)
- <223> Dbu
- 60 <220>
- <221> INCIERTO

ES 2 656 562 T3

<222> (6)..(6)  
<223> d-Phe

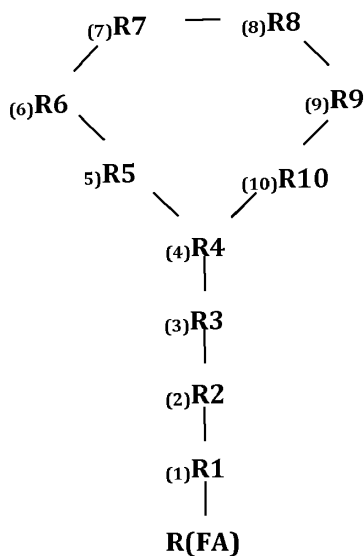
5 <220>  
<221> INCIERTO  
<222> (8)..(8)  
<223> Abu

10 <220>  
<221> INCIERTO  
<222> (9)..(9)  
<223> Dbu

15 <400> 1  
Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr  
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I),



5 en donde

- R1 es Dab
- R2 es Thr
- 10 R3 es DThr
- R4 es Dab
- R5 es Dab
- R6 es DPhe
- R7 es Leu
- 15 R8 es Abu
- R9 es Dab;
- R10 es Thr; y
- R (FA) es octanoilo;
- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

25 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente uno o más ingredientes activos.

30 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho otro ingrediente activo es un agente antibacteriano seleccionado del grupo que consiste en daritromicina, azitromicina, eritromicina y otros macrólidos, cetólidos, fluorocetólidos, clindamicina y otras lincosaminas, estreptograminas, rifampina, rifabutina, rifalazil y otras rifamicinas, ácido fusídico, mupirocina, oxazolidinonas, vancomicina, dalbavancina, telavancina, oritavancina y otros antibióticos glucopéptidos, fluoroquinolonas, bacitracina, tetraciclina y derivados de fluorociclina, antibióticos betalactámicos, novobiocina, pleuromutilinas, inhibidores de la síntesis de folato, inhibidores de la desformilasa e inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano.

35 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en: daritromicina, azitromicina, eritromicina, telitromicina, solitromicina, clindamicina, la combinación de estreptogramina quinupristina-dalfopristina, eravaciclina, minociclina, omadaciclina, rifampina, rifabutina, rifalazil, ácido fusídico, mupirocina, las oxazolidinonas tedizolida y linezolida, vancomicina, dalbavancina, oritavancina, telavancina, las fluoroquinolonas moxifloxacina, delafloxacina y avarafloxacina, y el inhibidor de la síntesis de folato trimetoprim.

40 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera

de las reivindicaciones 2 a 5, para su uso como medicamento.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana.

5 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la bacteria es una bacteria Gram negativa.

10 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichas bacterias se seleccionan del grupo que consiste en: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*.



Figura 1

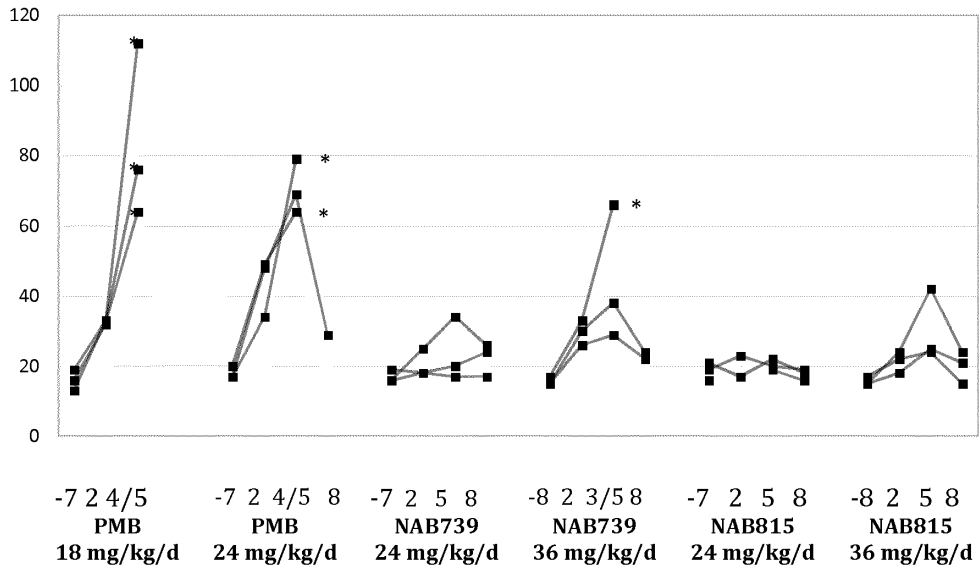


Figura 2

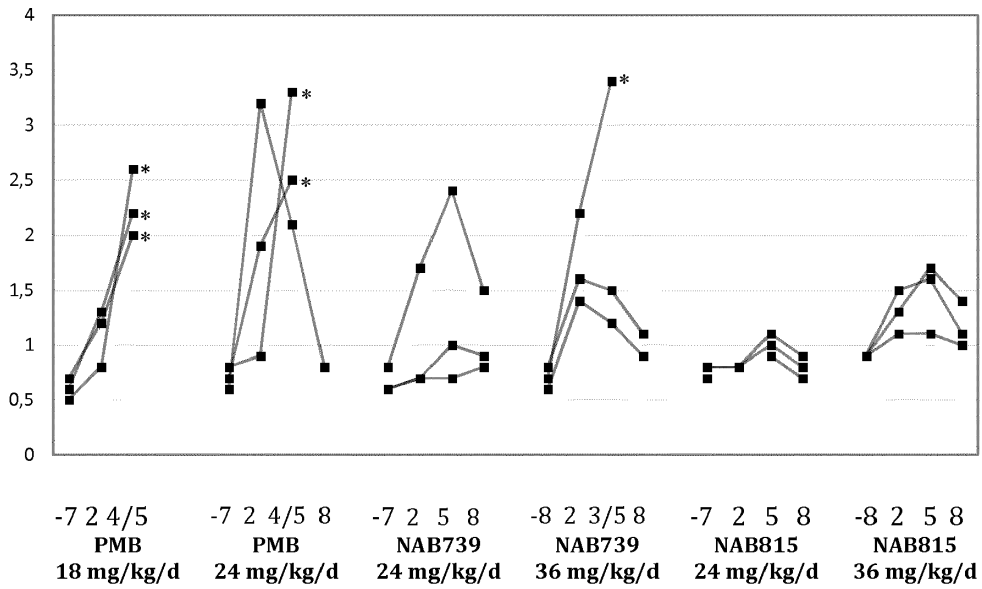


Figura 3

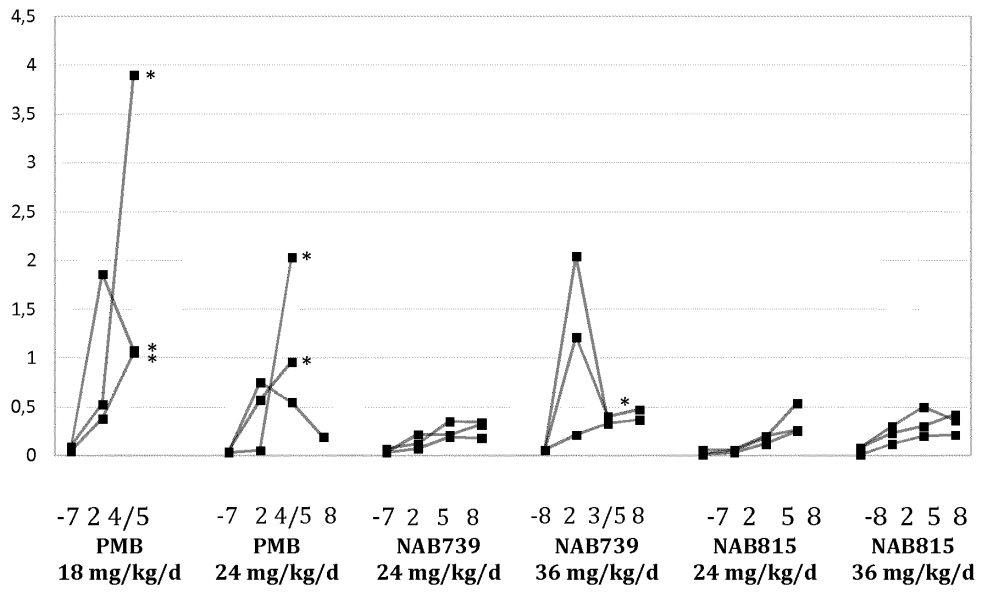


Figura 4

