

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 053**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/62**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2015 PCT/EP2015/064764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005223**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2015 E 15735887 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3166960**

54 Título: **Polimixinas de baja sustitución y sus composiciones**

30 Prioridad:

**09.07.2014 US 201462022399 P**

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

**18.03.2020**

73 Titular/es:

**XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)  
Dalslandsgade 11  
2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es:

**BJØRNSTAD, VIDAR;  
GUNNES, SØLVI;  
KOCH, TORBEN y  
MELANDER, CLAES**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 749 053 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

Polimixinas de baja sustitución y sus composiciones

5 La presente invención se refiere a nuevas polimixinas de baja sustitución y sus composiciones.

Antecedentes

10 Las polimixinas se descubrieron en 1947 como antibióticos producidos por *Bacillus polymyxa*. Las polimixinas son deca péptidos antibióticos que contienen un anillo heptapéptido y un ácido graso acoplado a amida N-terminal. Hoy, dos mezclas comerciales de Polimixina están en uso clínico; Polimixina B y Polimixina E (Colistina). Ambas mezclas comprenden una variedad de componentes como se describe en J Chromatogr A. 8 de noviembre de 2002:976(1-2):65-78 por Goevaerts y otros y en Talanta 15 de febrero de 2011; 83 (5):1521-9 por Van den Bossche y otros. De acuerdo con la farmacopea Europea, la Colistina debe comprender más del 77% de Polimixina E1, E2, E3, E1-i y E1-7MOA, pero menos del 10% de cada uno de los componentes menores de Polimixina E3, E1-i y E1-7MOA.

Debido a la toxicidad asociada con la Colistina, la mezcla se mejoró mediante sulfometilación en la década de 1950. La Colistina sulfometilada se llama Colistimetato de sodio (CMS), que se ha considerado un profármaco de Colistina. El CMS todavía está en uso clínico como una opción de tratamiento de última línea para organismos resistentes a múltiples fármacos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia* y otros patógenos Gram negativos. Durante muchos años, las soluciones de CMS además se administraron por nebulización en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (CF) para controlar la colonización o las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

20 Hoy, el creciente problema de las infecciones causadas por agentes patógenos resistentes a los antibióticos ha resultado en un mayor uso de productos tal como la Colistina.

El hecho de que los productos comerciales de CMS contengan una mezcla compleja de derivados de diferentes polimixinas tiene varias consecuencias desafortunadas. El más importante de estos se relaciona con el valor terapéutico de cualquier producto comercializado. Dado que el CMS puede considerarse un reservorio antibiótico una vez inyectado o inhalado en el cuerpo, es importante que se alcancen los niveles terapéuticos de los compuestos activados antes del aclaramiento renal o metabólico. Así, una polimixina sulfometilada que contiene solo dos sustituyentes sulfometilo, proporciona un producto bien definido con respecto al peso molecular y la carga. McMillan y otros (Journal of Pharmaceutical Sciences; 58(6); páginas 730-737; 1969) describe los derivados de colistina que se disubstituyen con metanosulfonato en los grupos amina libres.

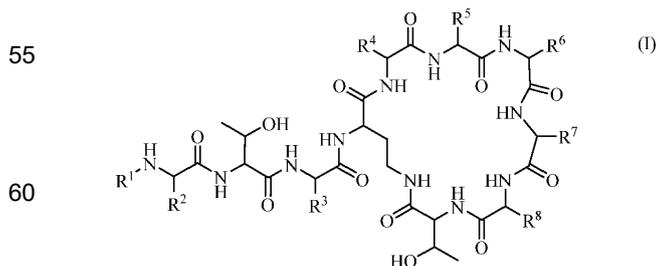
35 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos y composiciones de polimixina mejorados útiles como agentes antimicrobianos, y superar o al menos mitigar las desventajas de los productos de la técnica anterior.

Resumen de la invención

40 Esta invención se refiere a polimixinas que comprenden un total de dos grupos sulfometilo unidos a los grupos  $\gamma$ -amino en los residuos DAB o DAP en la porción polipeptídica de las polimixinas. Estos compuestos y sus composiciones pueden usarse en el tratamiento de infecciones bacterianas.

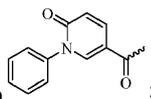
45 En un aspecto, la presente invención proporciona nuevas polimixinas que son más solubles en agua que la Polimixina E y la Polimixina B. Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona polimixinas sulfometiladas que son más estables en solución acuosa que el CMS comercializado. Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona mezclas de polimixinas sulfometiladas que son más uniformes que el CMS comercializado. Finalmente, los presentes compuestos, o las mezclas o composiciones de estos, proporcionan una dosificación y terapia de polimixina mejoradas en comparación con las composiciones de polimixina de la técnica anterior, que actualmente no están bien definidas.

50 Así, la presente invención proporciona una nueva polimixina representada por la Fórmula (I):



en donde

65



- R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, o  
R<sup>5</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
R<sup>6</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;  
5 cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea - (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;  
en donde x es 0 o 1;  
en donde M es un catión; y  
siempre que uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son - (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.
- 10 De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas, representadas por la Fórmula (I);  
en donde dos grupos sulfometilo se unen al mismo grupo γ-amino.
- Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
15 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- 20 Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
25 y;  
R<sup>3</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- 30 Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
35 y;  
R<sup>4</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
40 cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, y R<sup>8</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>7</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- 45 Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
50 y;  
R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
55 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.
- 60 Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula  
(I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;

cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>3</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.

5

Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula (I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>4</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.

10

Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula (I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>7</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.

15

20

Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas representadas por la Fórmula (I), en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> ;  
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>;  
y;  
R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.  
en donde M es un catión monovalente.

25

30

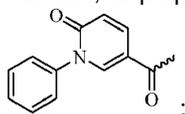
De acuerdo con otro aspecto de las modalidades anteriores de la presente invención, R<sup>1</sup> es 6-metiloctanoilo.

De acuerdo con otro aspecto de las modalidades anteriores de la presente invención, R<sup>1</sup> es 6-metil-heptanoilo.

Aún de acuerdo con otra modalidad de la presente invención, se proporcionan polimixinas de Fórmula (I) en donde R<sup>1</sup> es

35

un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> , o



R<sup>5</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
R<sup>6</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;  
en donde M es un catión; y  
siempre que uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

40

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una o más de las polimixinas de acuerdo con la presente invención.

45

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables .

50

De acuerdo con una modalidad, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas de acuerdo con la presente invención.

Aún de acuerdo con otra modalidad, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

55

Aún de acuerdo con otra modalidad, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende más del 80% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

Aún de acuerdo con otra modalidad, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende más del 90% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

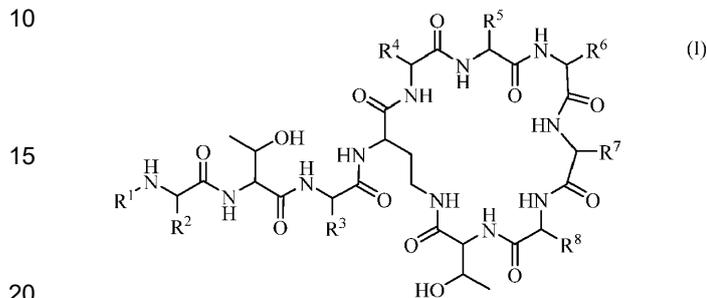
60

Aún de acuerdo con otra modalidad, la presente composición comprende más del 50% medido por HPLC de una o más de las polimixinas representadas por las fórmulas de la figura 1 - 5.

Aún de acuerdo con otra modalidad, la presente composición comprende más del 80% medido por HPLC de una o más de las polimixinas representadas por las fórmulas de la figura 1- 5.

5 Aún de acuerdo con otra modalidad, la presente composición comprende más del 90% medido por HPLC de una o más de las polimixinas representadas por las fórmulas de la figura 1- 5.

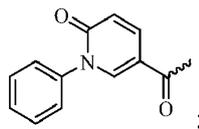
Una primera modalidad se dirige a una polimixina representada por la Fórmula (I):



en donde

R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, o

25



R<sup>5</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
 R<sup>6</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;  
 cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o  
 35 -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;  
 en donde X es 0 o 1;  
 en donde M es un catión; y  
 en donde uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

40 En un primer aspecto de la primera modalidad, R1 es heptanoilo, metilheptanoilo, octanoilo, metiloctanoilo, nonanoilo, metilnonanoilo o decanoilo.

En un segundo aspecto de la primera modalidad, R1 es heptanoilo, 6-metilheptanoilo, octanoilo, (S)-6-metiloctanoilo, 7-metiloctanoilo, 3-hidroxi-6-metiloctanoilo, nonanoilo, (8-metilnonanoilo o decanoilo.

45

En un tercer aspecto de la primera modalidad, las polimixinas descritas anteriormente se caracterizan porque M se selecciona del grupo que consiste en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ½ Mg<sup>2+</sup>, H<sub>m</sub>N(C<sub>1-4</sub>alquilo)<sub>n</sub><sup>+</sup>, o sus combinaciones, donde m es 0-4 y n es 0-4 con la condición de que m+n=4.

50 En un cuarto aspecto de la primera modalidad, x es 1 y M es H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

En un quinto aspecto de la primera modalidad, x es 1 y M es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

Una segunda modalidad está dirigida a una composición que comprende al menos una polimixina representada por la Fórmula (I):

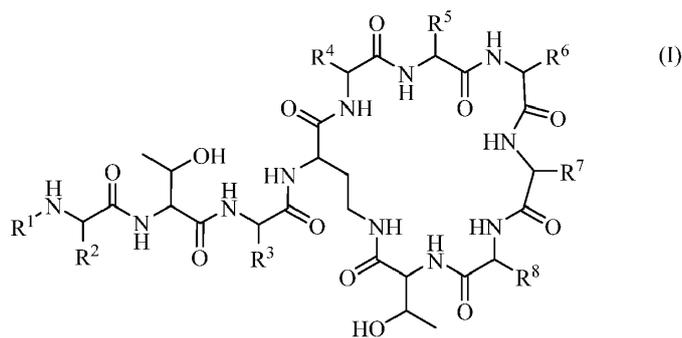
55

60

65

5

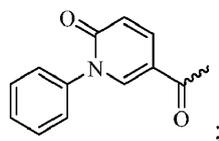
10



15

en donde  
R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, o

20



25

R<sup>5</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
R<sup>6</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;  
cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;  
en donde x es 0 o 1;  
en donde M es un catión; y  
en donde uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

30

En un primer aspecto de la segunda modalidad, R<sub>1</sub> es heptanoilo, metilheptanoilo, octanoilo, metiloctanoilo, 3-hidroxi-6-metiloctanoilo, nonanoilo, metilnonanoilo o decanoilo.

35

En un segundo aspecto de la segunda modalidad, R<sub>1</sub> es heptanoilo, 6-metilheptanoilo, octanoilo, (S)-6-metiloctanoilo, 3-hidroxi-6-metiloctanoilo, 7-metiloctanoilo, nonanoilo, 8-metilnonanoilo o decanoilo.

40

En un tercer aspecto de la segunda modalidad, las polimixinas descritas anteriormente se caracterizan porque M se selecciona del grupo que consiste en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sub>m</sub>N(C<sub>1-4</sub>alquilo)<sub>n</sub><sup>+</sup>, ½ Mg<sup>2+</sup> o sus combinaciones, donde m es 0-4 y n es 0-4 con la condición de que m+n=4.

45

En un cuarto aspecto de la segunda modalidad, x es 1 y M es H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

50

En un quinto aspecto de la segunda modalidad, x es 1 y M es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

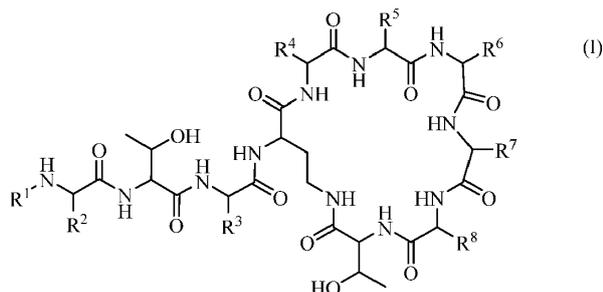
En un sexto aspecto de la segunda modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

55

En un séptimo aspecto de la segunda modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I) y x es 1 y M es Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

Una tercera modalidad se dirige a una polimixina representada por la Fórmula (I):

60



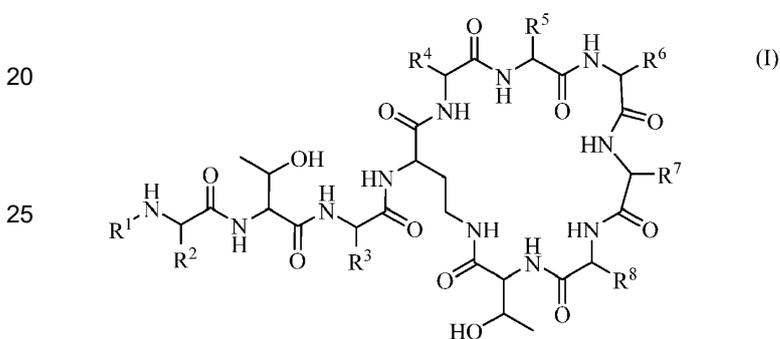
65

en donde

- 5 R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;  
 R<sup>5</sup> es -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
 R<sup>6</sup> es -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
 cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;  
 en donde M es un catión; y  
 10 en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

En un primer aspecto de la tercera modalidad, el grupo acilo alifático C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> o el grupo acilo ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente contiene un grupo hidroxilo.

- 15 Una cuarta modalidad se dirige a una composición que comprende al menos una polimixina representada por la Fórmula (I):



en donde

- R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;  
 R<sup>5</sup> es -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;  
 R<sup>6</sup> es -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
 35 cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>; en donde M es un catión; y  
 en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

En un primer aspecto de la cuarta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

En un segundo aspecto de la cuarta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 80% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

En un tercer aspecto de la cuarta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I) y se usa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas.

En un cuarto aspecto de la cuarta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I) y M se selecciona de cationes farmacéuticamente aceptables.

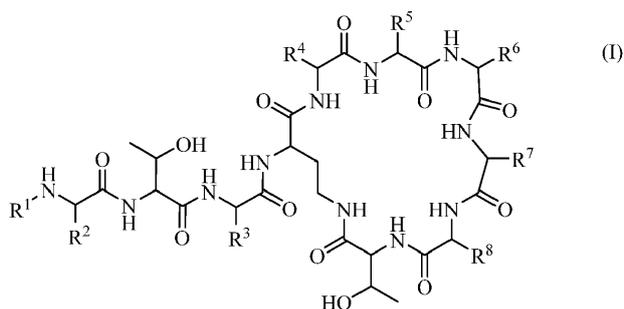
En un quinto aspecto de la cuarta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I) y M se selecciona de cationes monovalentes farmacéuticamente aceptables.

En un sexto aspecto de la cuarta modalidad, el grupo acilo alifático C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> o el grupo acilo ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente contiene un grupo hidroxilo.

Una quinta modalidad se dirige a una composición que comprende al menos una polimixina representada por la Fórmula (I):

5

10



15

en donde

R<sup>1</sup> es 6-metiloctanoilo, 6-metilheptanoilo u octanoilo;R<sup>5</sup> es -CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;R<sup>6</sup> es -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;

20

cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>; yen donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>.

En un primer aspecto de la quinta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

25

En un segundo aspecto de la quinta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 80% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I).

30

En un tercer aspecto de la quinta modalidad, la composición farmacéutica comprende más del 50% medido por HPLC de las polimixinas representadas por la Fórmula (I) y se usa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas.

Descripción detallada

Breve descripción de las figuras

35

**Figura 1** muestra la estructura de la sal disódica de PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>1</sup>**Figura 2** muestra la estructura de la sal disódica de PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>3</sup>**Figura 3** muestra la estructura de la sal disódica de PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>5</sup>**Figura 4** muestra la estructura de la sal disódica de PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>8</sup>**Figura 5** muestra la estructura de la sal disódica de PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>9</sup>

40

**Figura 6** muestra un cromatograma de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup>**Figura 7** muestra la degradación de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en condiciones de no equilibrio después de 90 min, pH 9.**Figura 8** muestra la degradación de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en condiciones de no equilibrio después de 3 días, pH 8,0.**Figura 9** muestra la degradación de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en condiciones de no equilibrio después de 3 días, pH 7,0.**Figura 10** muestra la degradación de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en condiciones de no equilibrio después de 3 días, pH 6,5.

45

**Figura 11** muestra la degradación de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en condiciones de no equilibrio después de 3 días, pH 6,0.**Figura 12** muestra los espectros de MS obtenidos para dos Polimixina E1 sustituida. m/z 677,3 [-2] y 1355,5 [-1] se obtuvo en modo negativo.**Figura 13 (parte superior)** muestra un cromatograma que confirma la presencia de cinco componentes individuales de Polimixina que comprenden dos grupos sulfometilo (señal UV a 215 nm).

50

**Figura 13 (fondo)** muestra la corriente de iones extraída (EIC) para las masas correspondientes a la Polimixina E1 mono (bis-sulfometilada) (m/z de 677,62, 1356,2, 1378,06).**Figura 14** muestra espectros de masas de polimixina E1 mono(bis-sulfometilada).

Definiciones

55

Como se usa por toda esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

60

El término "polimixina" como se describe en la presente descripción se refiere a compuestos antibióticos que comprenden una porción péptido acoplado con amida a una porción de ácido graso.

El término "residuo Dab" como se describe en la presente descripción, se refiere a un compuesto de 2,4-diaminobutirato acoplado con amida a al menos un aminoácido. Las polimixinas de origen natural normalmente comprenden 6 residuos Dab de los cuales 5 tienen un grupo γ-amino libre.

65

- El término "Dab" como se describe en la presente descripción, se refiere al radical derivado del ácido 2,4-diaminobutanoico, en el que el átomo de carbono adyacente al carbono carbonílico (es decir, el carbono  $\alpha$ ) tiene una estereoquímica designada como la configuración L. L-Dab se denomina alternativamente en la literatura como L-Dbu.
- 5 El aminoácido en la posición 6 en las polimixinas representadas por la Fórmula (I) tiene configuración D, es decir, el residuo de aminoácido al que se une R<sup>5</sup>.
- El término "residuo DAP" como se describe en la presente descripción se refiere a un compuesto de 2,3-diaminopropionato acoplado con amida a al menos un aminoácido.
- 10 El término "DAP" como se describe en la presente descripción se refiere al compuesto 2,3-diaminopropionato.
- El término "sulfometilo" como se describe en la presente descripción se refiere a la porción -CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M, donde M es como se define más abajo. La porción sulfonato (-SO<sub>3</sub>) puede estar en forma ácida, pero en un entorno fisiológico (*in vivo*) tendrá una carga negativa y tendrá un catión asociado, tal como M.
- 15 El término "CMS" como se describe en la presente descripción se refiere a una composición que comprende Colistina sulfometilada. Resúmenes químicos han asignado a dicha composición el número 8068-28-8 para el CMS.
- 20 El término "CMS E1" como se describe en la presente descripción se refiere a una composición hecha a partir de la sulfometilación de Polimixina E1 relativamente pura (> 80% de pureza por HPLC).
- El término "Colistina" como se describe en la presente descripción se refiere a una composición que comprende polimixina E1 y polimixina E2. Resúmenes químicos le han asignado el número 1066-17-7 para la Colistina. De acuerdo con la Farmacopea europea, la Colistina debe comprender más del 77% de Polimixina E1, E2, E3, E1i y E1-7MOA, pero menos del 10% de cada uno de los componentes menores de Polimixina E3, E1-i y E1-7MOA.
- 25 El término "polimixina E" como se describe en la presente descripción se usa indistintamente con "Colistina".
- 30 El término "Polimixina E1" como se describe en la presente descripción se refiere al compuesto que tiene elnúmero CAS 7722-44-3. La polimixina E1 se usa indistintamente con la Colistina A.
- El término "Polimixina E2" como se describe en la presente se refiere al compuesto que tiene elCAS número 7239-48-7. La Polimixina E2 se usa indistintamente con la Colistina B.
- 35 La expresión "polimixina sulfometilada" como se describe en la presente se refiere a una polimixina que comprende al menos un grupo sulfometilo unido a un grupo  $\gamma$ -amino en un residuo L-DAB.
- El término "M" es un catión y se refiere a una especie catiónica que contiene una o dos cargas positivas, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>,  $\frac{1}{2}$  Mg<sup>2+</sup>, H<sub>m</sub>N(C<sub>1-4</sub>alquilo)<sub>n</sub><sup>+</sup>, donde m es 0-4 y n es 0-4 con la condición de que m+n = 4.
- 40 La expresión "un grupo acilo alifático lineal o ramificado C6-C10", como se describe en la presente, se refiere a un sustituyente que contiene una porción carbonilo y una porción no carbonilo que contiene un total de 6 a 10 átomos de carbono. Incluye los grupos acilo encontrados en los compuestos de polimixina conocidos. Además, incluye, pero no se limita a, heptanoilo, metilheptanoilo (que incluye (S)-6-metilheptanoilo), octanoilo, metiloctanoilo (que incluye (S)-6-metiloctanoilo, 7-metiloctanoilo), nonanoilo, metilnonanoilo y decanoilo.
- 45 El término "sales" o "sus sales como se describe en la presente descripción, se refiere a un compuesto que comprende un catión y un anión, que puede prepararse mediante cualquier proceso conocido por un experto en la materia, por ejemplo, por la protonación de una porción que acepta protones y/o desprotonación de una porción que dona protones. Alternativamente, la sal puede prepararse o bien mediante una metátesis catiónica/aniónica o una reacción de intercambio catiónico/aniónico.
- 50 El término "más de X% medido por HPLC" como se describe en la presente descripción debe entenderse como el área integrada relativa del (de los) pico(s) correspondientes en el cromatograma que resulta de un método de HPLC como se describe en los ejemplos de esta solicitud o, alternativamente, como se describe en el documento de patente número WO2014195405A1.
- 55 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan nuevas polimixinas que comprenden dos grupos de sulfometilo que están unidos a cualquiera de los residuos Dab de la estructura anterior que tiene una  $\gamma$ -amina libre, es decir, cualquiera de los residuos Dab Dab1, Dab3, Dab5, Dab8 o Dab9. Por lo tanto, la Fórmula (I) está destinada a cubrir las polimixinas mono(bis-sulfometiladas), pero no las polimixinas tri-, tetra- o penta(bis-sulfometiladas).
- 60 Un ejemplo de las nuevas polimixinas se designa en la presente descripción como *mono* (N'-bis-sulfometil) Dab<sup>9</sup> polimixina E1, es decir, en donde los sustituyentes de fórmula I se representan por R<sup>1</sup> siendo 6-metiloctanoilo, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es-
- 65

$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ; cada uno de  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  y  $\text{R}^7$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ; y  $\text{R}^8$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{M})_2$  en donde M es  $\text{Na}^+$ . Un ejemplo de este tipo de ensayo se muestra en la Figura 5. El nombre abreviado de este compuesto es PE1-(SM) $_2$ <sup>9</sup>.

5 Otros ejemplos de polimixinas mono bis-sulfometiladas son polimixina E1 *mono* (*N'*-bis-sulfometil) Dab<sup>1</sup>, polimixina E1 *mono* (*N'*-bis-sulfometil) Dab<sup>3</sup>, polimixina E1 *mono* (*N'*-bis-sulfometil) Dab<sup>5</sup>, polimixina E1 *mono* (*N'*-bis-sulfometil) Dab<sup>8</sup>, de las cuales las estructuras disódicas se muestran en las Figuras 1-4, respectivamente.

10 La expresión " $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ " se entiende que cubre ya sea  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$  en dependencia del pH del medio.

10 La expresión " $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ " se entiende que cubre ya sea  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$  o  $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$  en dependencia del pH del medio.

15 Las polimixinas como se describen en la presente descripción abarcan muchas especies moleculares. Por ejemplo, en soluciones acuosas, la carga dependerá del pH. Los compuestos de polimixina como se describe en la presente descripción cubren todas las sales farmacéuticamente aceptables y sus iones. Entre tales polimixinas están, por supuesto, las sales de disodio. Se incluyen además, otras sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de potasio, litio, y amonio (tales como  $\text{H}_m\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{alquilo})_n^+$  donde m es 0-4 y n es 0-4 con la condición de que  $m+n=4$ ), o sus combinaciones.

20 Las polimixinas tal como se describen en la presente pueden usarse en el tratamiento o prevención de trastornos infecciosos, particularmente las infecciones causadas por bacterias Gram negativas, tales como, pero no se limita a, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* y *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, y *Enterobacter aerogenes*. De acuerdo con un aspecto, la presente invención incluye el uso de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción para el tratamiento de una infección bacteriana gram negativa.

25 Los presentes compuestos pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. "Una cantidad terapéuticamente eficaz" pretende describir una cantidad suficiente del compuesto para tratar la infección. El experto en la materia reconocerá que la dosis diaria adecuada de un paciente en particular, puede variar en dependencia de los factores tales como el trastorno que se trata, y la gravedad de este; la composición empleada, la edad, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, y las preferencias y la experiencia del médico involucrado, etc.

30 Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse para su uso en la medicina humana y veterinaria. La composición descrita en la presente descripción puede administrarse a un paciente que lo necesite a través de diversas rutas, tales como la vía subdérmica, por inhalación, oral, parenteral o tópica. La composición puede ser de cualquier forma bien conocida por la persona experta e incluye, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas, cremas o preparaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones parenterales estériles.

35 En un aspecto, la composición es útil para la administración por infusión intravenosa o inyecciones. Puede prepararse una formulación intravenosa o de inyección de acuerdo con los métodos bien conocidos por el experto. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente descripción pueden disolverse en agua para inyección, seguido de esterilización por filtración y luego transfiriendo dicha composición filtrada a un vial adecuado.

40 De acuerdo con un aspecto, la composición se liofiliza. El polvo liofilizado se reconstituye, por ejemplo, en agua para inyección, antes de su uso, por ejemplo, antes de la administración por inyección, o antes de la administración por inhalación (por ejemplo, con el uso de un nebulizador o cualquier otro de los dispositivos para inhalaciones adecuados). Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto, la composición se formula para su administración por inhalación.

45 Los compuestos descritos en la presente descripción pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen, pero no se limitan a, un conservante, un tampón, y antioxidante, o un diluyente. Los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, agua para inyección, NaCl al 0,9%, dextrosa al 5% en NaCl al 0,9%, dextrosa al 5% en agua, dextrosa al 5% en NaCl al 0,45%, dextrosa al 5% en NaCl al 0,225% y solución de Ringer lactato.

50 Los compuestos descritos en la presente descripción pueden administrarse además en combinación con uno o más agentes antibacterianos adicionales. Los compuestos descritos en la presente pueden administrarse en combinación con otro agente antibacteriano simultáneamente, por separado o secuencialmente con uno o más de otros agentes antibacterianos.

55 La presente invención se ilustra además mediante los ejemplos más abajo. Debe entenderse que el alcance de la presente invención no se limita en modo alguno por el alcance de los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

60 La presente descripción se respalda y ejemplifica adicionalmente por la siguiente sección experimental, pero no se limita a la misma.

## Ejemplo 1:

## Material de partida.

5 Se mezclaron sulfato de polimixina E1 aislado (3,5 g) y una solución acuosa al 45% p/p de hidroximetanosulfonato de sodio (11,3 g) y se calentaron a 60°C mientras se agitaba. Luego se mantuvo el pH a 7,0 -7,5 mediante varias adiciones de NaOH 2 M. Después de 18 h, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el producto bruto se suministró como un sólido blanco por precipitación en 200 mL de metanol/acetoneitrilo 1/1 v/v.

10 El producto se desaló y pulió mediante el siguiente procedimiento: Una columna C18 de 6 µ, por ejemplo, Phenomenex X Bridge Prep Shield 10 x 250 mm o similar, se lavó y se equilibró con MeCN al 5% (sin sal). La columna se montó en un sistema de HPLC Waters Delta Prep, flujo máximo de 150 mL/min. El detector estuvo en 5, un Waters 2487, ajustado a 280 nm. Una mezcla de 9 mL de la solución de MeCN al 5% de 230 mg de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> y 1 mL de NaCl 2M se cargó en la columna y el flujo fue de 6-8 mL/min.

15 La columna se eluyó y desaló con MeCN al 5% con 6-8 mL/min y se recogió la fracción de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup>. Se produjo cierta degradación en la columna durante el proceso, pero al cortar la cabeza y la cola, se mantiene la alta pureza. La fracción de la cabeza, 35 mL ca., se recogió directamente en 450 mL de MeCN al 100% y se añadió además 550 mL de MeCN al 100% antes de la evaporación al vacío de la solución de MeCN:H<sub>2</sub>O 97:3 en un frasco de evaporación en forma de pera de 2 L.

20 El proceso de destilación se realizó con un Rotavapor Büchi 15. El azeótropo 94:6 se destila preparando un PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> libre de agua-residuo en el frasco de destilación al vacío de 2 L. El residuo se eliminó con 3 x 8 mL de MeOH al 100% (seco) y se vertió en un frasco de evaporación al vacío de 50 mL y se evaporó al vacío para una suspensión de 1-2 mL de MeOH-PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup>. Se añadieron 15 mL de MeCN al 100% y la solución/suspensión 20 se evaporó al vacío adicionalmente hasta sequedad con una temperatura del baño de agua de 35°C. La presión se redujo de 70-60 Torr a 20-15 Torr durante el proceso. El secado al vacío adicional se realizó durante 30 min con rotación lenta en el baño de agua a 35°C con vacío mantenido. El rendimiento fue de 150 mg de sustancia del PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup>.

## Ejemplo 2

Producción de una mezcla que comprende Polimixina E1 *mono* (*N*-bis-sulfometil).

35 Cuando las polimixinas sulfometiladas se degradan hacia colistina, se libera el hidroximetanosulfonato. El proceso es reversible ya que el hidroximetanosulfonato regenera fácilmente la molécula sulfometilada parental.

El propósito de este estudio fue investigar la degradación de las polimixinas sulfometiladas en condiciones de no equilibrio mediante la eliminación continua de hidroximetanosulfonato con el uso de la nanofiltración.

40 El experimento se configuró con 2 L de 10 mM de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup> en agua RO y el volumen de la solución se mantuvo constante en la unidad de filtración mediante la adición frecuente de agua RO. La unidad de nanofiltración se ejecutó en campañas diarias a 40 C bajo una presión de 3 bar, eliminando aprox. 5 l de efluente cada vez. El pH se ajustó con HCl 0,1 M hasta que fue estable a 8,0; 7,0; 6,5 y 6,0. Los resultados se muestran en las figuras 6 - 11.

45 Los datos de MS confirman la disulfometilación de las polimixinas. La figura 12 muestra los espectros de MS obtenidos, m/z 677,3 [-2] y 1355,5 [-1], en modo negativo.

## Ejemplo 3: Síntesis de Colistinas de baja sustitución.

50 Se disolvió el sulfato de colistina (1,0 g, 0,71 mmol) en 20 ml de agua. Se añadió hidroximetanosulfonato de sodio al 45% (0,847 g, 2,841 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (0,12 g, 1,40 mmol). La solución transparente se agitó durante 12h a 25°C. El producto se precipitó mediante la adición lenta de 100ml de acetoneitrilo y metanol (50:50). Se aisló el compuesto como un polvo blanco.

## Ejemplo 4a: Síntesis de la Polimixina E1 de baja sustitución.

55 La Polimixina E1 (1,0 g, 0,71 mmol) se disolvió en 20 ml de agua. Se añadió hidroximetanosulfonato al 45% (0,847 g, 2,841 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (0,12 g, 1,40 mmol). La solución transparente se agitó durante 12h a 25°C. El producto se precipitó mediante la adición lenta de 100 ml de acetoneitrilo y metanol (50:50). Se aisló el compuesto como un polvo blanco.

## Ejemplo 4b: Cromatografía y MS de la Polimixina E1 de baja sustitución.

60 La Polimixina E1 mono(bis-sulfometilada) tal como se preparó en el ejemplo 4a se analizó con el uso de un método de espectrometría de masas (MS en modo negativo) y el método de UV compatible en el que la separación se realizó a pH 6,6. La parte superior de la figura 13 muestra un cromatograma que confirma la presencia de cinco componentes individuales de la Polimixina que comprenden dos grupos de sulfometilo (señal de UV a 215 nm). La parte inferior de la

Figura 13 muestra la corriente iónica extraída (EIC) para las masas correspondientes a la Polimixina E1 mono(bis-sulfometilada) (m/z de 677,62; 1356,2; 1378,06).

5 La Figura 14 muestra los espectros de masas individuales de la polimixina E1 mono(bis-sulfometilada). La m/z de 677 corresponde a [M+2H]<sup>2+</sup>, 1356 corresponde a [M+H]<sup>+</sup>, y 1378 corresponde a [M+Na]<sup>+</sup> de la Polimixina E1 mono(bis-sulfometilada).

Ejemplo 5: MIC

10 Una muestra que comprende Polimixina E1 mono(*N*-bis-sulfometil) 93% ca. se sometió a análisis MIC contra *Bordetella bronchiseptica*, ATCC 4617 y se midió la potencia microbiana que era 611 µg/g.

Ensayo MIC

15 Los organismos de prueba se cultivaron en frascos de agitación durante aprox. 16 horas a 250 rpm, 34°C para *Pseudomonas aeruginosa* y 37°C para *Klebsiella baumannii* y *Acinetobacter baumannii*. Se volvieron a cultivar hasta un crecimiento log tardío, se diluyeron a concentraciones listas para el uso y se congelaron con glicerol a ±75 °C. El medio usado fue el caldo Mueller Hinton.

20 Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de los compuestos en 1 ml de caldo Mueller Hinton. Las muestras se diluyeron y se añadieron a los pocillos, se añadieron los organismos de prueba y después de aprox. 16 horas de incubación a 37 °C con agitación para *Klebsiella baumannii* y *Acinetobacter baumannii*, a 34 °C sin agitación para *Pseudomonas aeruginosa*, se midió la inhibición del crecimiento mediante OD<sub>600</sub>. Los resultados se proporcionan en la Tabla 1.

25 Tabla 1

Muestra	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>A.baumannii</i>
Polimixina E1 mono ( <i>N</i> -bis-sulfometil)	4 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml
Colistina	2 µg/ml	4 µg/ml	0,5 µg/ml
CMS	4 µg/ml	8µg/ml	4 µg/ml

35 Ejemplo 6: Toxicidad de los compuestos de la presente invención

La nefrotoxicidad se midió con el uso de KIM-1 (molécula 1 de lesión renal) como biomarcador de necrosis tubular aguda.

40 Los ratones se trataron con una mezcla que comprende Polimixina E1 mono(*N*-bis-sulfometil) o CMS al 93% durante 5 días y se controlaron los signos clínicos de toxicidad y las concentraciones de KIM-1 en la orina. Durante los 5 días de tratamiento, los ratones no mostraron signos clínicos de toxicidad. Los niveles de KIM-1 en orina indicaron un ligero aumento en comparación con el tratamiento del vehículo. El intervalo normal de KIM-1 en orina de ratón, como se indica en las instrucciones del estuche de ELISA, es de 456-8048 pg/ml.

45 Las mezclas se recibieron como polvo seco y se disolvieron en los viales con solución salina estéril a la concentración indicada en la tabla 1, inmediatamente antes de la inyección.

50 Una vez al día durante 5 días, los ratones se trataron por vía subcutánea en la región del cuello con 0,2 ml en correspondencia con las dosis indicadas en la Tabla 1. La dosificación se basó en un peso promedio de 28 g.

Se recogieron muestras de orina a las 24 horas después de la 2da dosificación y 4 horas después de la 5ta dosificación. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta que se analizaron las concentraciones de KIM-1

55 Las muestras de orina se descongelaron, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 g y se diluyeron x50 antes de realizar el ELISA de acuerdo con las instrucciones en el estuche del inmunoensayo cuantitativo de TIM-1/KIM-1/HAVCR de ratón.

60

65

Tabla 1. Esquema tratamiento

5	Tratamiento: Dosis	Concentración de la solución de dosificación	Número de ratones
	Una mezcla que comprende Polimixina E1 <i>mono</i> (N'-bis-sulfometil) al 93% : 25 mg/kg	3,5 mg/ml	5
10	una mezcla que comprende Polimixina E1 <i>mono</i> (N'-bis-sulfometil) al 93% : 30 mg/kg	4,3 mg/ml	5
	CMS : 32 mg/kg	4,7 mg/ml	5
	Gentamicina: 80 mg/kg	12 mg/ml	5
15	Vehículo		5

20 Todas las mezclas probadas se toleraron bien por los ratones según lo determinado por el peso corporal y la puntuación clínica. Se observó la piel engrosada en el sitio de inyección en los grupos de ratones inyectados con una mezcla que comprende Polimixina E1 *mono*(N'-bis-sulfometil) al 93%. Sin embargo, se observó solo un ligero aumento, pero no significativo, en los niveles de KIM-1 en la orina:

Tabla 2. Concentraciones de KIM-1 en la orina después de 5 dosis.

25	<b>Tratamiento</b>	<b>Identificación del ratón</b>	<b>KIM-1 (pg/ml)</b>
	Una mezcla que comprende Polimixina E1 <i>mono</i> (N'-bis-sulfometil) al 93% 25 mg/kg	31	5400
		32	4700
30		33	1600
		34	9500
		35	7350
35	Una mezcla que comprende Polimixina E1 <i>mono</i> (N'-bis-sulfometil) al 93% 30 mg/kg	36	6800
		37	3200
		38	8900
40		40	5500
45	CMS32 mg/kg	41	12700
		42	4350
		43	1950
		44	3800
		45	3800
50	Gentamicina 80 mg/kg	46	12850
		47	5900
		48	5750
55	Vehículo	51	6950
		52	5400
		54	2500

60 Ejemplo 6: Actividad *in vivo* de la Polimixina E1 mono bis-sulfometilada

65 Un modelo de ratón con infecciones pulmonares de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PAX11045) se trataron con la administración peritoneal de Polimixina E1, CMS E1 y Polimixina E1 mono bis-sulfometilada. UFC es el número calculado de unidades formadoras de colonias en el tejido pulmonar después de 22 horas, excepto para el grupo de ratones sin tratamiento. La puntuación clínica se basa en las observaciones en los intervalos de tiempo respectivos, como se muestra en la tabla 3:

Tabla 3:

	Tratamiento	log10 UFC pulmonar	promedio log10 UFC	Puntuación clínica en T = 19	Puntuación clínica en T = 22
5	Ninguno T=4	6,00	6,10		
		6,08			
10		6,06			
		6,19			
		6,15			
15	PolimixinaE1 (dosis: 10 mg/kg)	5,65	4,43	3	4
		4,08		2	2
		6,06		3	4
20		4,05		3	3
		3,78		3	3
		3,70		3	3
		3,72		3	3
25	Una mezcla que comprende polimixina E1 mono (Ny-bis-sulfometil) (dosis: 51 mg/kg)	6,67	5,60	4	
		7,17		4	
		6,13		4	
30		5,14		3	3
		4,63		3	3
		3,83		3	3
35	CMS E1 (dosis: 41 mg/kg)	3,95	4,53	2	2
		5,40		4	
40		3,98		3	3
		4,60		3	3
45		4,65		3	3
		4,60		3	3
50	Vehículo	7,05	6,80	3	5
		7,15		3	5
		7,13		3	5
		6,35		3	4
		6,57		3	4
55		6,05		3	4
		7,30		3	4
60	Puntuación 0 saludable Puntuación 1 signos clínicos menores de infección e inflamación tipo piloerección en la piel, sufrimiento y abstinencia social Puntuación 2 signos moderados de infección tipo posición del cuerpo cambiada, cambios en el patrón de movimiento, pérdida de curiosidad o actividad cambiada.				
65					

5

Puntuación 3 signos severos de infección tipo movimientos rígidos, ventilación forzada,  
Puntuación 4 dolor severo, el ratón se sacrificó inmediatamente para minimizar el sufrimiento  
Puntuación 5 El ratón estaba muerto

10

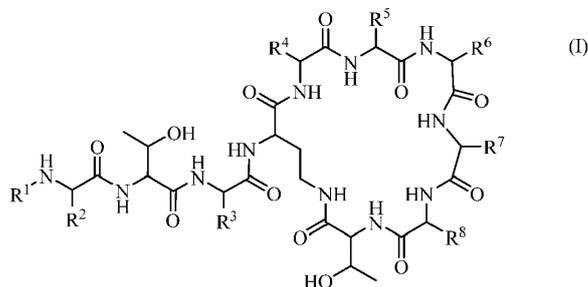
## REIVINDICACIONES

1. Una polimixina representada por la Fórmula (I):

5

10

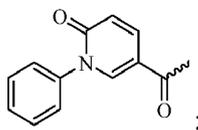
15



en donde

R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, o

20



25

R<sup>5</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;

R<sup>6</sup> es -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>;

30

en donde x es 0 o 1;

en donde M es un catión; y

en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

35

2. Una polimixina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es un grupo acilo alifático lineal o ramificado C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>.

3. Una polimixina de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R<sup>1</sup> es heptanoilo, 6-metilheptanoilo, octanoilo, (S)-6-metiloctanoilo, 3-hidroxi-6-metiloctanoilo, 7-metiloctanoilo, nonanoilo, 8-metilnonanoilo o decanoilo.

40

4. Una polimixina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>; en donde M es un catión; y en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

45

5. Una polimixina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>; en donde M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable; y en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

50

6. Una polimixina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde cada uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es ya sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>; en donde M es Na<sup>+</sup>; y en donde solo uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M)<sub>2</sub>.

7. Una composición que comprende más del 50% de las polimixinas medido por HPLC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

55

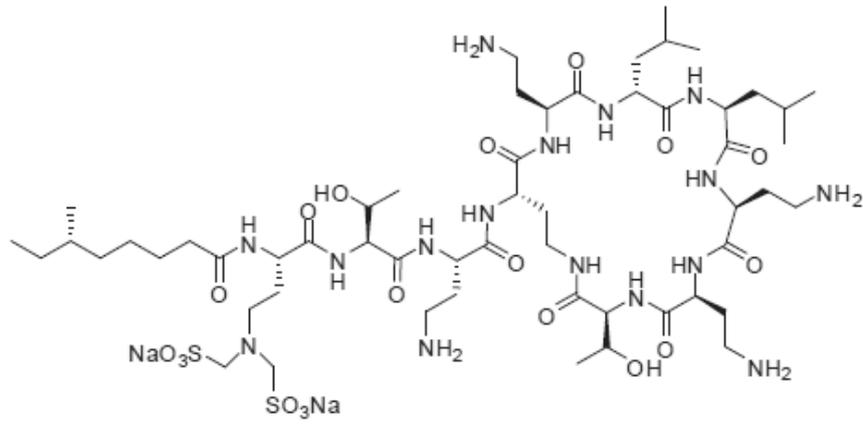
8. Una composición que comprende más del 80% de las polimixinas medido por HPLC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

9. Una composición que comprende más del 90% de las polimixinas medido por HPLC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

60

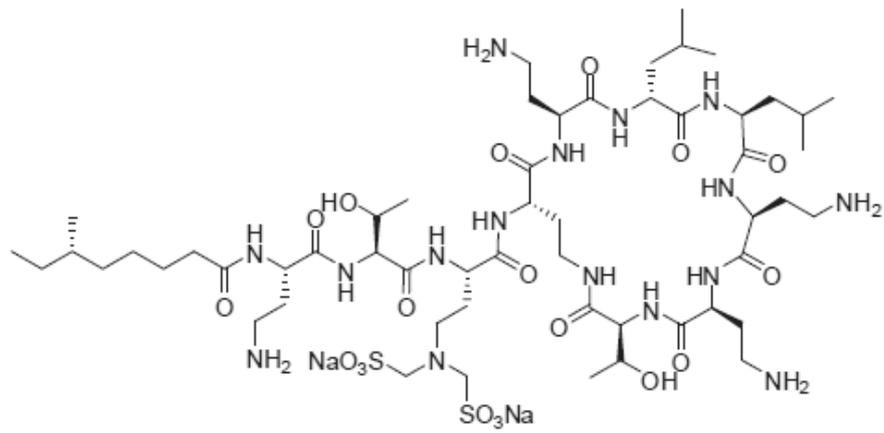
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9 para su uso en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas.

Figura 1:



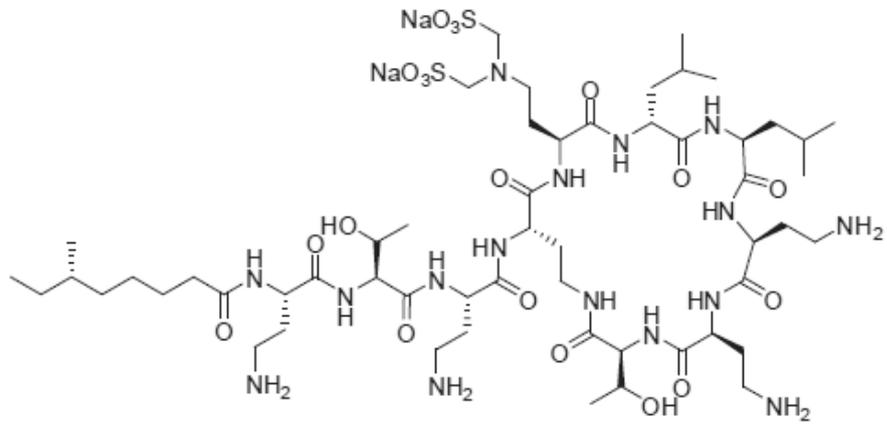
PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>1</sup>

Figura 2:



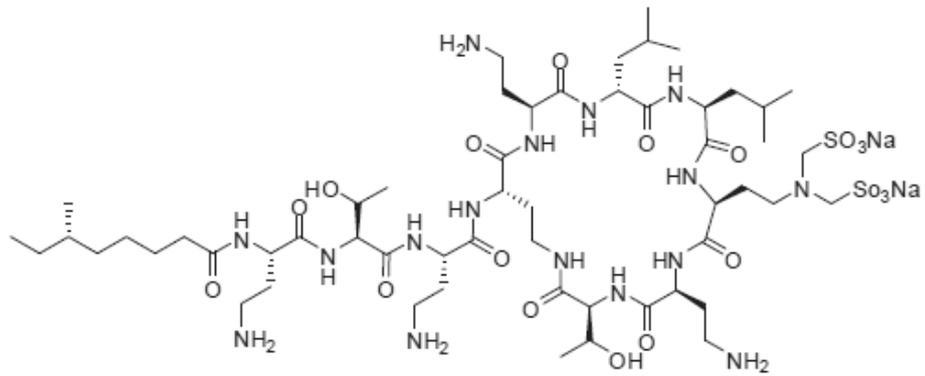
PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>3</sup>

Figura 3:



PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>5</sup>

Figura 4:



PE1-(SM)<sub>2</sub><sup>8</sup>

Figura 5:

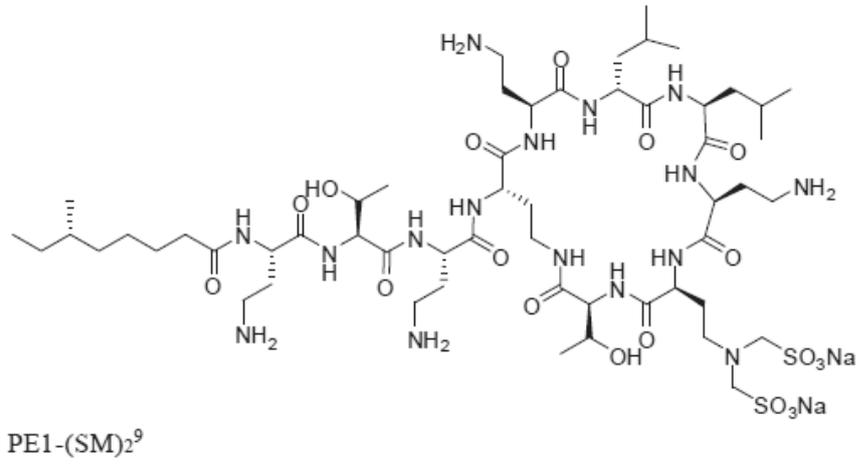


Figura 6:

Inicio de PE1-(SM)<sub>10</sub><sup>1,3,5,8,9</sup>

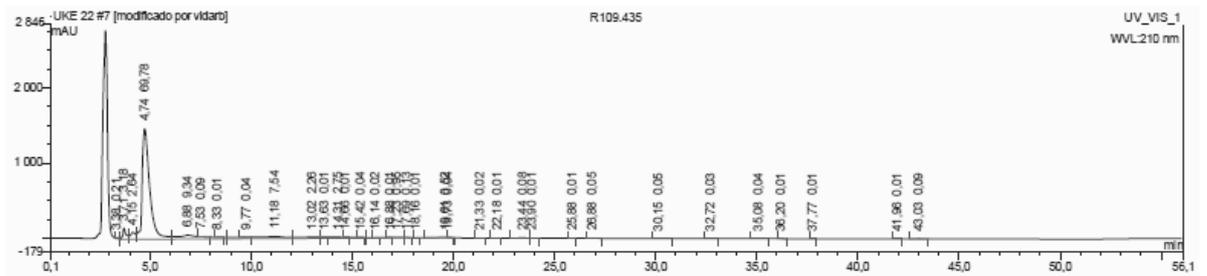


Figura 7:

Después de 90 min, pH 9.:

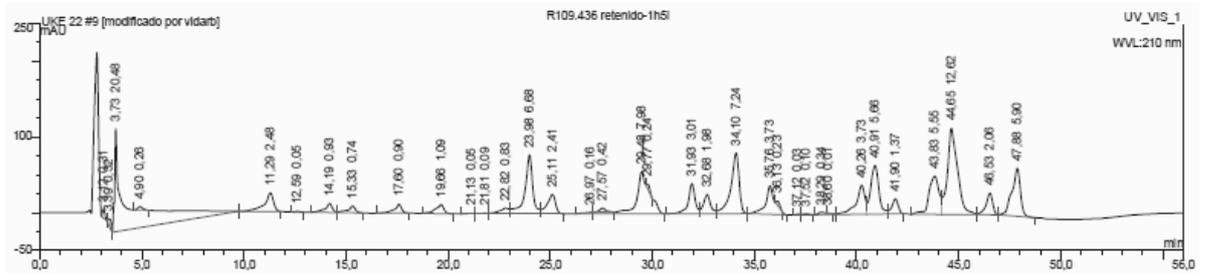


Figura 8:

Sin modificación durante 3 días, pH 8,0:

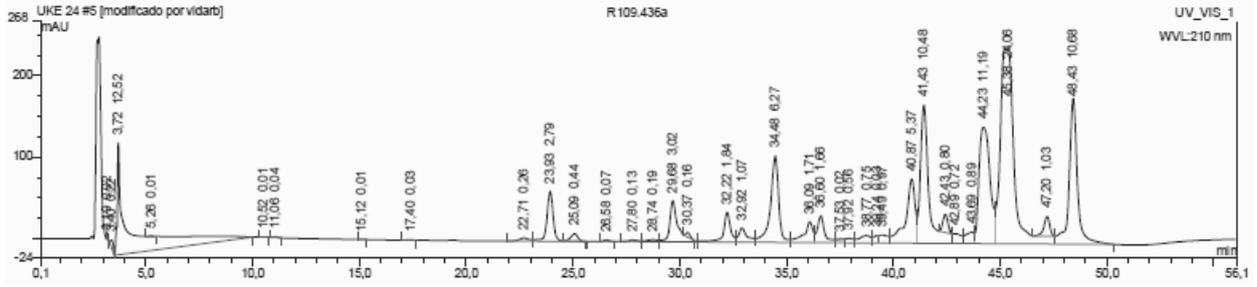


Figura 9:

Sin modificación durante 3 días, pH 7,0:

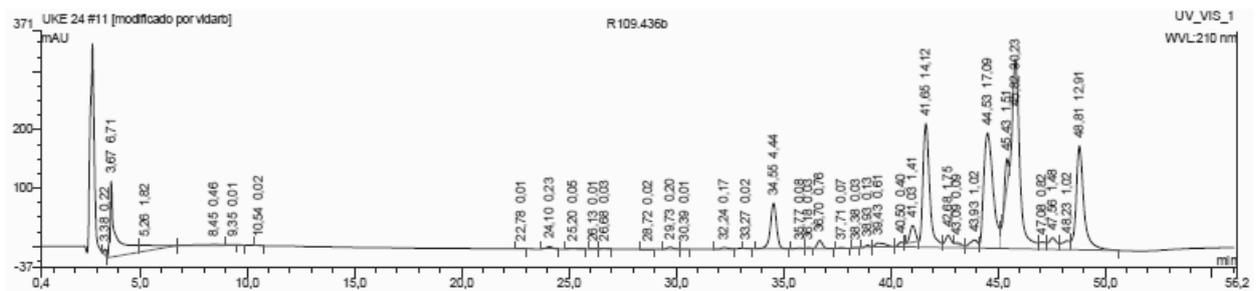


Figura 10:

Sin modificación durante 3 días, pH 6,5:

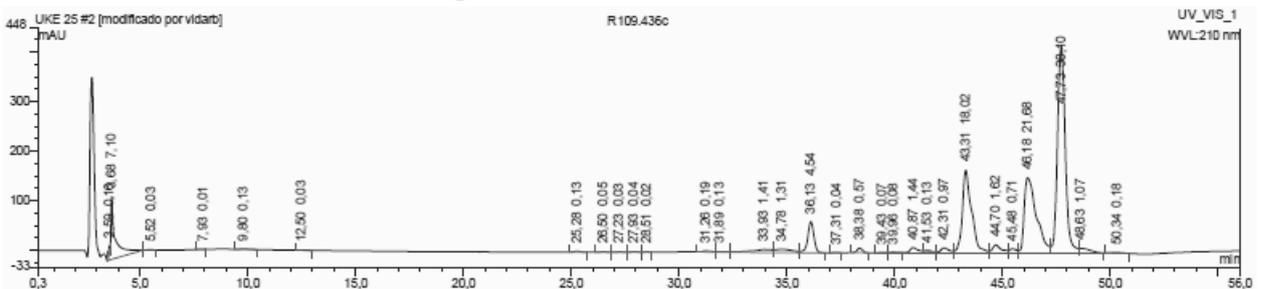


Figura 11:

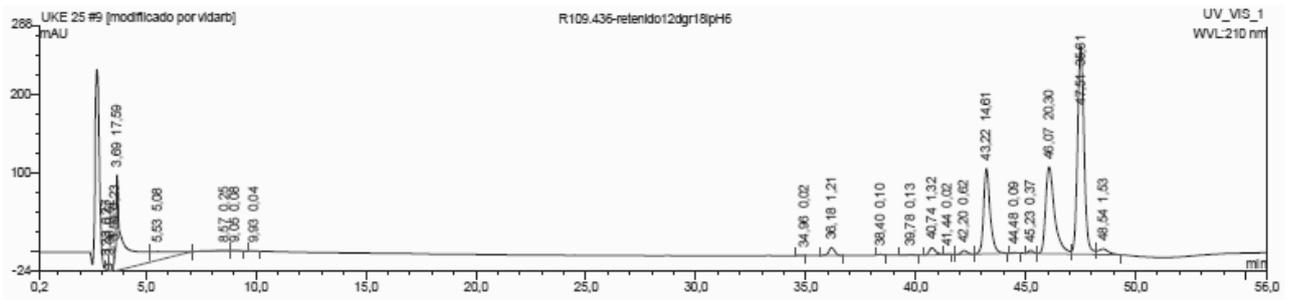


Figura 12:

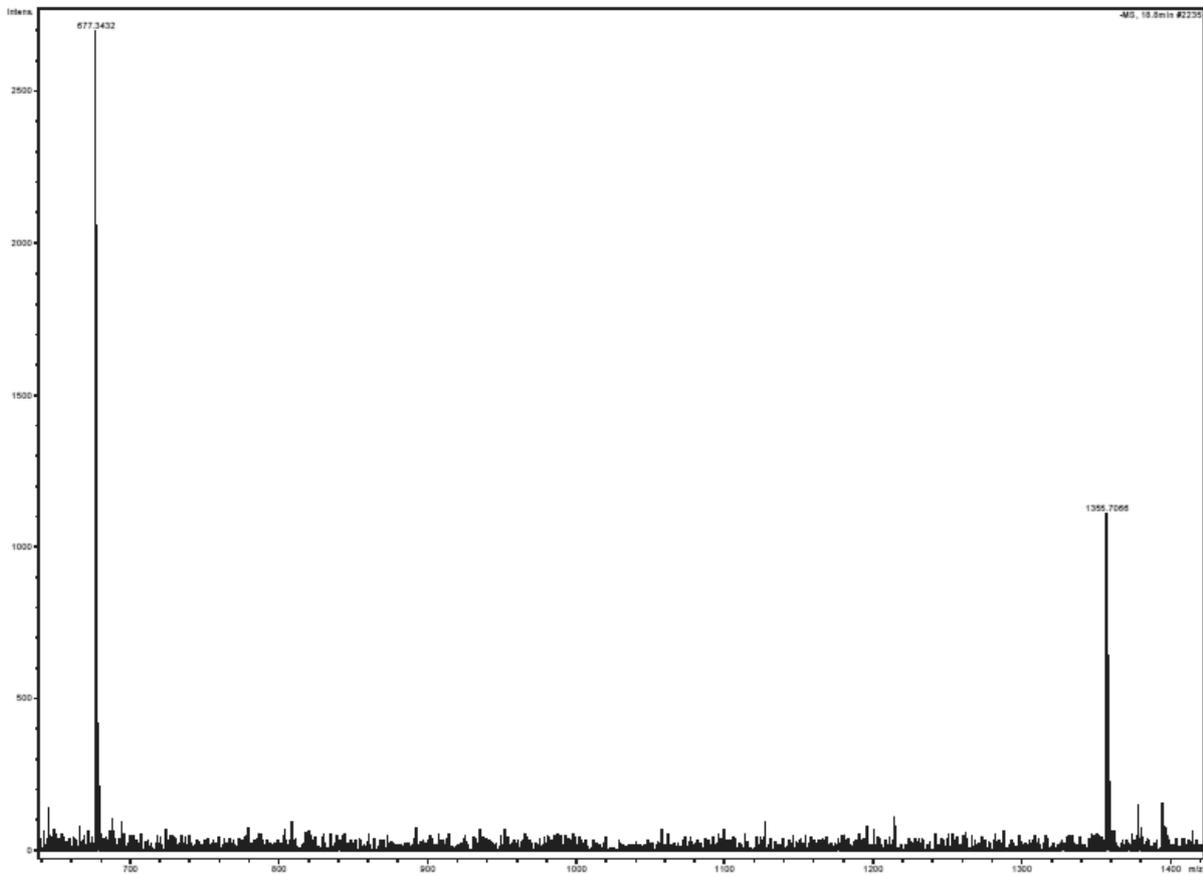


Figura 13:

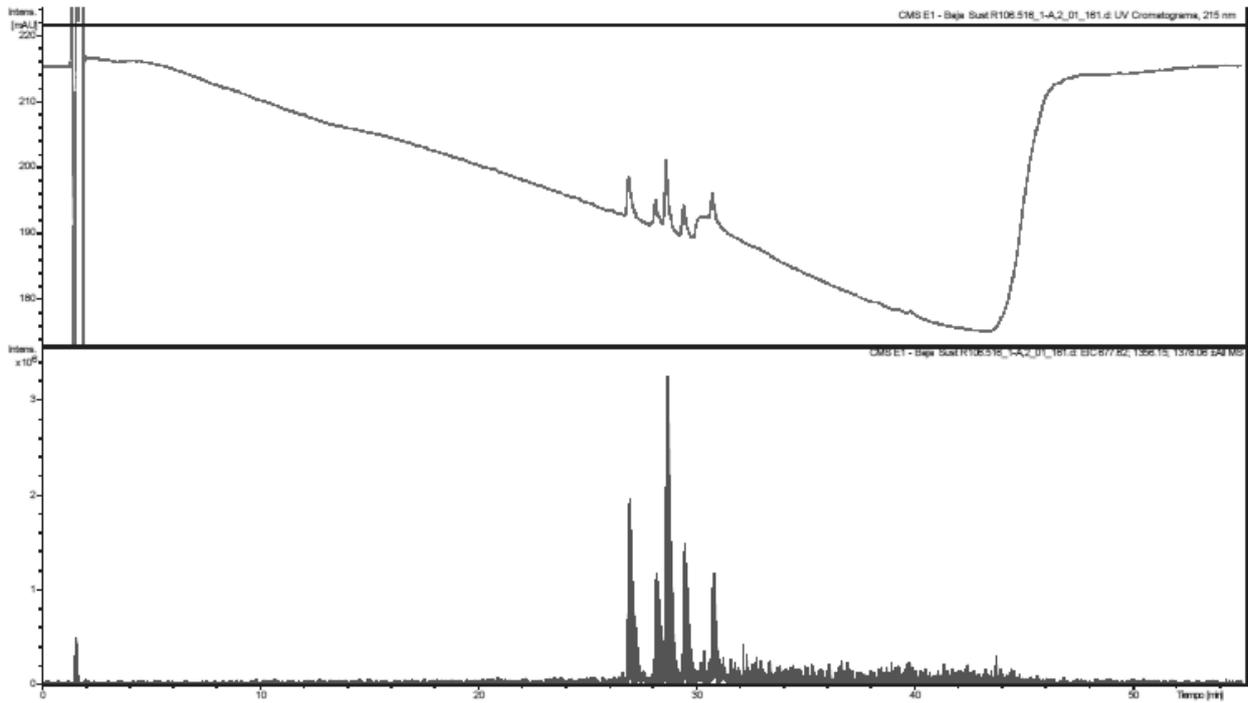


Figura 14:

