

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 474**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>A61K 31/78</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 31/77</b> | (2006.01) |
| <b>A01N 31/02</b> | (2006.01) |
| <b>C08G 2/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C08G 2/18</b>  | (2006.01) |
| <b>C08G 4/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C08F 16/34</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 31/04</b> | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015 PCT/AU2015/050721**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16077879**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015 E 15861097 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3220923**

54 Título: **Copolímero y método para el tratamiento de infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

**18.11.2014 AU 2014904635**  
**25.11.2014 AU 2014904763**  
**03.07.2015 AU 2015902630**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.04.2020**

73 Titular/es:

**RECCE PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)**  
**3 Brodie-Hall Drive, Suite 10**  
**Bentley, WA 6102, AU**

72 Inventor/es:

**MELROSE, GRAHAM JOHN HAMILTON y**  
**DILIZIA, MICHELE KERYN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 755 474 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

Copolímero y método para el tratamiento de infecciones bacterianas

**Campo**

5 Método de tratamiento de infección bacteriana, particularmente infección bacteriana parenteral, mediante un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol donde el copolímero tiene un peso molecular de hasta 1.000 Daltons y a un proceso para la preparación del copolímero mediante polimerización de acroleína en una solución acuosa del polialquilenglicol.

**Antecedentes de la invención**

10 Las infecciones parenterales (distintas de infecciones del tracto gastrointestinal) ocurren cuando un organismo tiene acceso a componentes intercelulares e intracelulares por debajo de las membranas protectoras exteriores o de la piel. Punciones, inyecciones, mordeduras, cortes, heridas, cirugía, divisiones entre piel y membranas mucosas, son todos los ejemplos de acciones que conducen a infección parenteral. La infección parenteral no incluye infecciones dentro del lumen del tracto gastrointestinal.

15 Las infecciones parenterales, particularmente infección bacteriana a través de una vía parenteral, pueden generar enfermedades graves y mortales con respuesta inflamatoria. Si no se controla, la infección parenteral puede producir una sepsis con pérdida de presión sanguínea, lo que expone a la persona a una infección letal.

20 Los orígenes más comunes de una sepsis son infecciones de la sangre (bacteremia), meninges, pulmones, tracto urinario, senos, piel, heridas, abscesos y procedimientos quirúrgicos. Los estudios de organismos causales comunes asociados con la sepsis muestran que aproximadamente el 53% de los casos están asociados con bacterias gram-positivas y aproximadamente el 42% con bacterias gram-negativas.

25 Los ejemplos de bacterias gram-negativas que pueden desarrollar sepsis incluyen *Proteus Spp*, *Serratia Spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Los ejemplos de gram-positivos incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus de coagulasa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus Pneumoniae*, *Enterococcus Spp*.

30 Generalmente, la septicemia y/o la bacteremia interrelacionada se tratan ya sea de manera preventiva (profiláctica) y/o curativa con antibióticos; una estadística bien reconocida es la probabilidad de supervivencia disminuye 6% por cada hora de retraso en el tratamiento. Sin embargo, la identificación de las bacterias como la raíz del problema puede tomar días e incluso una vez identificada, los antibióticos utilizados no siempre funcionan. La resistencia a los antibióticos está llevando a un mayor aumento del riesgo de sepsis y este riesgo se exagera con frecuencia en hospitales, donde la resistencia a antibióticos puede ser particularmente alta debido a la prevalencia del uso de antibióticos.

35 Aproximadamente el 30% de las personas diagnosticadas con sepsis muere, lo que la convierte en una de las principales causas de muerte en las unidades de terapia intensiva de la mayoría de los hospitales. En los Estados Unidos mata aproximadamente entre 120.000 y 200.000 personas anualmente. A nivel mundial, 13 millones de personas desarrollan sepsis cada año, y 4 millones de personas mueren por esa causa.

La amenaza creciente de bacterias resistentes a antibióticos a la población mundial es reconocida universalmente.

40 La amenaza es más crítica cuando la infección es causada por una bacteria resistente a antibióticos ("superbacteria"). Se necesita urgentemente dar con un antibiótico que permita el tratamiento de un amplio rango de infecciones parenterales bacterianas para proporcionar mayor certeza del tratamiento inmediato efectivo de infecciones bacterianas parenterales que incluyen bacterias que se han vuelto resistentes a uno o más de los antibióticos actualmente utilizados.

45 La acroleína es extremadamente dañina para tejidos corporales debido a su alta reactividad. La poliacroleína pura sola no se conoce que presente una actividad antimicrobiana significativa. Sin embargo, algunas patentes (Melrose et al 1988; Melrose 1996; Melrose y Huxham 2000; Melrose et al 2001; Staton y Melrose 2002; Melrose et al 2003; Tilbrook 2005; Melrose 2009) revelan la preparación y los usos de poliacroleínas modificadas como agentes antimicrobianos en el tracto gastrointestinal. La acroleína es un monómero extremadamente reactivo y, cuando se polimeriza, forma rápidamente una red intrincada de alto peso molecular. Normalmente, las polimerizaciones aniónicas se llevan a cabo en un disolvente libre de agua y proporcionan polimerizaciones rápidas para formar polímeros de alto peso molecular.

50 La técnica anterior atribuye la actividad antimicrobiana de las poliacroleínas modificadas a sus grupos carbonilo químicamente reactivos, que, en el tracto gastrointestinal, se afirma que reaccionan destructivamente con la proteína de las membranas externas de los microbios. Una de las ventajas percibidas de los polímeros descritos en la técnica anterior es que no pueden penetrar la pared del intestino de manera que su actividad se limita al tracto gastrointestinal. Melrose 2009 describe un polímero de poliacroleína que se puede formar mediante polimerización catalítica de

acroleína y/o su acetal con un alcohol. Los polímeros tienen la ventaja de una tendencia reducida a migrar a través de membranas.

La patente de los Estados Unidos 6.060.671 (Werle Et al.) describe polímeros liberadores de acroleína que liberan suficiente acroleína para proporcionar actividad como agentes desinfectantes en sistemas de agua. Estos polímeros no son adecuados para su uso *in vivo* debido a la toxicidad de los niveles significativos de acroleína liberada en medios acuosos.

Se ha descubierto ahora que los copolímeros de bajo peso molecular que comprenden el segmento derivado de anacroleína y el segmento de oligómero de polialquilenglicol se pueden preparar de manera de limitar el peso molecular del copolímero a no más de 1.500 Daltons, preferiblemente no más de 1.000 Daltons. Además, hemos descubierto que los copolímeros de bajo peso molecular proporcionan una potente actividad antimicrobiana para el tratamiento de infecciones parenterales, sin liberación del monómero de acroleína. De hecho, se ha descubierto que la actividad mejora cuando se compara con polímeros de acroleína de mayor peso molecular.

La discusión de los antecedentes de la invención se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe tomarse como admisión de que cualquiera de los materiales referidos, conocidos o parte del conocimiento general habitual en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

### Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones que no estén dentro del ámbito de estas reivindicaciones se incluyen solamente a modo de referencia.

Por consiguiente, se proporciona un copolímero para su uso como método de tratamiento de una infección parenteral en un sujeto; el copolímero comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular de 200 a 600 Daltons); el copolímero tiene un peso molecular no mayor que 1.500 Daltons, preferiblemente no mayor que 1.000 Daltons.

En un conjunto de modalidades se proporciona un método de tratamiento de una infección parenteral en un sujeto que comprende administrar al sujeto un copolímero que comprende un segmento oligómero de poliacroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular de 200 a 600 Daltons), el copolímero tiene un peso molecular de no más de 1.500 Daltons, preferiblemente no más de 1.000 Daltons.

También se proporciona un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína, como un segmento oligómero de poliacroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular en el intervalo de 200 a 600 Daltons), en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una infección parenteral en un sujeto, donde el copolímero es para administración oral o parenteral al sujeto; el copolímero tiene un peso no mayor que 1.500 Daltons, preferiblemente no mayor que 1.000 Daltons.

En un conjunto de realizaciones, el segmento derivado de acroleína es un oligómero de poliacroleína.

En un aspecto adicional se proporciona un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular de 200 a 600 Daltons); el copolímero tiene un peso molecular no mayor que 1.500 Daltons, preferiblemente no mayor que 1.000 Daltons; el copolímero se usa generalmente en el tratamiento de una infección parenteral en un sujeto, ya sea un tratamiento profiláctico o curativo.

El segmento derivado de acroleína en un conjunto de realizaciones es un oligómero de poliacroleína.

En otro aspecto, se provee un procedimiento para la preparación de un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína (como un oligómero de poliacroleína) y un oligómero de polialquilenglicol que comprende copolimerizar acroleína y oligómero de polialquilenglicol en condiciones de catálisis alcalina de pH no mayor que 12,0 y con un pH entre 12,0 y 7,0 en una solución acuosa que comprende al menos 20% p/p de agua, y el oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular de 200 a 600 Daltons) en una relación en peso de polialquilenglicol/acroleína de al menos 4, preferiblemente al menos 10.

### Definiciones

El término "cuerpo" significa el cuerpo de seres humanos y/o animales; el término "sujeto" significa el cuerpo que es el sujeto.

Terapia intravenosa (terapia IV o terapia iv) es la infusión de sustancias líquidas directamente en una vena.

Como se utiliza en la presente, el término "parenteral" significa tomado en el cuerpo de una manera diferente a través del canal digestivo intacto. Es decir, no dentro del estómago o intestino normal; no intestinal.

El término "infección parenteral" se refiere a la infección contraída en el cuerpo fuera del tracto gastrointestinal. Esta infección puede ocurrir a través del sistema vascular (sanguíneo/linfático), el tracto genital-urinario, los pulmones, la

rotura de la piel o las membranas protectoras exteriores, como en caso de cirugía, lesiones con agujas, cortes, abrasiones, o cualquier rotura en la piel o huecos entre la piel y las membranas mucosas. Por lo tanto, se entiende que deberá distinguirse claramente la infección parenteral que se puede tratar potencialmente con cualquier método de administración de fármacos, incluso la administración oral (asumiendo que una dosis efectiva alcanza el sitio de infección)-de la administración parenteral de un fármaco que se limita a la administración diferente de la vía oral.

Como se utiliza en la presente, cuando se refiere a un patógeno bacteriano, el término "resistente a antibióticos" o "superbacteria" se refiere a un patógeno bacteriano que puede resistir el efecto de un antibiótico utilizado en la técnica para tratar al patógeno bacteriano (es decir, una cepa no resistente del patógeno bacteriano). Por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* puede tratarse con metilicina; sin embargo, una cepa resistente a antibióticos de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*: USA 300, es *Staphylococcus Aureus* Resistente a Metilicina (MRSA). Aunque la cepa bacteriana es común, *S. aureus*: USA: 300 habitualmente infecta a aquellos que están inmunocomprometidos o en un ambiente susceptible. Las infecciones entran a menudo en el cuerpo a través de un pequeño corte o llaga. Otros síntomas asociados con USA 300 son neumonía, fascitis necrosante, endocarditis e infección en huesos y articulaciones.

El término "administración pulmonar" se refiere a la administración de una formulación de la invención en los pulmones por inhalación.

El término "sistémico" se refiere a una enfermedad o trastorno o sitio original de lesión distante del sitio original de infección, o que implica todo el cuerpo del organismo. El término "local," por lo tanto, se utiliza en la presente con respecto al sitio de infección original. De esta manera, una infección sistémica es una en la que el patógeno se encuentra en los órganos o sangre (incluso bacteremia), y puede asociarse con una enfermedad grave mortal, como sepsis. Una infección local es una en la cual el patógeno ha migrado solamente hasta el tejido local de infección, como el pulmón o sitio de una herida.

Como se utiliza en la presente, el término "inhalación" se refiere al ingreso de aire a los alvéolos del pulmón. En los ejemplos específicos, el ingreso puede ocurrir por autoadministración de una formulación de la invención mientras que se inhala, o por administración a través de un respirador, por ejemplo, a un paciente en un respirador. El término "inhalación" usado con respecto a una formulación de la invención es sinónimo de "administración pulmonar".

Los términos "tratamiento" y "tratando" buscan abarcar también la profilaxis, terapia y curación. En consecuencia, en un aspecto, un tratamiento implica prevenir o retardar o ralentizar el comienzo de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno) asociado con bacterias resistentes a antibióticos. En otro aspecto, un tratamiento implica tratar (por ejemplo, minimizar o reducir o ralentizar el desarrollo o reversión) una enfermedad o trastorno existente (por ejemplo, síntomas asociados con la enfermedad o trastorno) asociado con bacterias resistentes a antibióticos. En una realización, un tratamiento proporciona una cura para una enfermedad o trastorno.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, o material encapsulante de disolvente, que lleva o transporta el copolímero y/o composición objeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser indebidamente dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son: azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, como celulosa carboximetil de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites, como aceite de maní, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, como propilenglicol; polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de PH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El copolímero se puede usar en una cantidad terapéuticamente efectiva (o "farmacéuticamente efectiva o activa") para proporcionar el tratamiento de la infección parenteral. La cantidad dependerá del modo de administración, es decir, oral, intramuscular, intravenosa, inhalación o transdérmica. La frase "cantidad terapéuticamente efectiva", como se utiliza en la presente, significa la cantidad de un copolímero y/o una composición, material o una composición que comprende la composición de copolímero que es efectiva para producir algún efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células en un animal con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para inhibir la supervivencia bacteriana en al menos un subgrupo de células. Por consiguiente, una cantidad terapéuticamente efectiva previene o reduce el avance de la enfermedad. El avance de la enfermedad se puede monitorear con relación a un avance de enfermedad esperada que se basa en estudios de población, observaciones controladas en individuos, o una combinación de ambos.

El término segmento derivado de acroleína se refiere al segmento de copolímero que comprende uno o más residuos

de monómero de acroleína.

Los términos oligómero, oligómero de polialquilenglicol y oligómero de poliácroleína se refieren a polímeros que consisten de al menos dos unidades de monómeros, preferiblemente al menos tres unidades de monómeros. Los oligómeros comprenderán generalmente de 2 a 20 unidades de monómero; en una realización la cantidad de unidades es de 2 a 10.

Los términos "unidades de monómero" y "residuos de monómero" se refieren a unidades presentes en el copolímero derivado de los monómeros de reacción, como acroleína y polialquilenglicol.

El índice de polidispersidad es la relación entre el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) del polímero y el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) del polímero. El peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número de un polímero se pueden determinar mediante métodos analíticos, como cromatografía líquida de alto rendimiento. Una vez determinados los pesos moleculares promedio en peso y promedio en número, se calcula fácilmente el índice de polidispersidad dividiendo el peso molecular promedio en peso por el peso molecular promedio en número,  $M_w/M_n$ . Un polímero monodisperso hipotético tiene un índice de polidispersidad de 1.000. Sin embargo, los polímeros comerciales típicos, como las resinas comercialmente disponibles, tienen un índice de polidispersidad de 10 o más. Los polímeros con distribuciones de peso molecular amplio tienen índices de polidispersidad más altos y los polímeros con distribuciones de peso molecular estrecho tienen índices de polidispersidad más bajos.

La sepsis es una infección metastática y un proceso inflamatorio que surge cuando los microbios infecciosos en el sistema circulatorio, incluso dentro de la sangre o los ganglios linfáticos, devasta al sistema inmune y los microorganismos ya no pueden eliminarse de la sangre circulante más rápido de lo que se proliferan. Los orígenes más comunes de infecciones que se evolucionan a sepsis son bacteremia, infecciones del tracto urinario-genital, neumonía, celulitis, heridas y abscesos, sinusitis, meningitis y procedimientos quirúrgicos (incluso el tracto gastrointestinal), o un área infectada.

A lo largo de esta memoria descriptiva, el uso de los términos "comprende" o "que comprende" o sus variaciones gramaticales especifican la presencia de características establecidas, enteros, pasos o componentes, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, enteros, pasos, componentes o grupos de ellos no mencionados específicamente.

### Descripción detallada

El método de tratamiento comprende administrar un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento oligómero de polialquilenglicol (preferiblemente de peso molecular de 200 a 600 Daltons); el copolímero tiene un peso molecular no mayor que 1.500 Daltons, preferiblemente no mayor que 1.000 Daltons.

El segmento derivado de acroleína puede comprender uno o más residuos de monómeros de acroleína. En una realización, el segmento derivado de acroleína comprende un oligómero de poliácroleína.

El polialquilenglicol puede ser un poli ( $C_1$  a  $C_4$  alquilen glicol) o una mezcla o copolímero de ellos, pero en general el polialquilenglicol es más preferiblemente un polietilenglicol, preferiblemente de peso molecular de entre 200 y 600 Daltons.

Los expertos en la materia entenderán que el término polietilenglicol preferiblemente no incluye dietilenglicol. El polietilenglicol de peso molecular promedio entre 200 y 600 Daltons incluye polietilenglicol de peso molecular promedio nominal entre 200 y 600 Daltons, donde el peso molecular promedio no es mayor que 110% ni menor que 90% (preferiblemente no mayor que 105% y no menor que 95%) del valor nominado. El polietilenglicol es de fórmula  $H-[OCH_2CH_2]_n-OH$ . El valor medio de  $n$  es al menos 3 y es generalmente entre 3 y 13 (aunque el promedio no necesita ser un entero). El polietilenglicol se encuentra ampliamente disponible de proveedores comerciales en calidades farmacéuticas y se vende en pesos moleculares nominales especificados que generalmente significan que el peso molecular promedio no es mayor que 105% ni menor que 95% del valor nominado. Las viscosidades y los métodos para la determinación del peso molecular se describen en USP NF Official Compendium of Standards Volumen 1 1180-1182 [Edición 2007]. En un conjunto de realizaciones, el peso molecular del polietilenglicol es de entre 200 y 400. En algunas realizaciones, se puede preferir usar un oligómero puro específico de etilenglicol, como el compuesto de la Fórmula  $H-[OCH_2CH_2]_n-OH$  en donde  $n$  es 3 o 4.

En un conjunto de realizaciones, el peso molecular (siempre con el significado que se le asignó en la presente, es decir, el peso molecular promedio en número), del copolímero es de al menos 300 Daltons, preferiblemente al menos 400 Daltons, como en el intervalo de 400 a 1500 Daltons y más preferiblemente el peso molecular está en el intervalo de 400 a 1.000 Daltons.

El copolímero es particularmente adecuado para el tratamiento de infecciones parenterales y se puede administrar mediante varios métodos adecuados para proporcionar niveles efectivos del copolímero al sitio de la infección parenteral. El tratamiento puede ser profiláctico, curativo o puede llevarse a cabo para controlar la infección, por ejemplo, para permitir la confirmación de la susceptibilidad del patógeno responsable. En un conjunto de realizaciones, el copolímero se administra directamente a un sitio local de infección, como una lesión de la piel, herida, pulmones u

otro sitio de infección en un órgano o tejido específico del sujeto.

En otra realización, el copolímero se administra sistémicamente, por ejemplo, por administración oral, inhalación, administración transdérmica o por inyección, como al torrente sanguíneo, o inyección intramuscular o por terapia intravenosa. Se acepta generalmente que las moléculas de peso molecular de menos de aproximadamente 800 Daltons tienen un paso razonablemente libre a través de las membranas abdominales. La administración oral requiere que el copolímero sea absorbido a través de la pared del intestino y en la circulación sistémica. En esta realización, se prefiere particularmente que el copolímero administrado oralmente tenga un peso molecular no mayor que 1.000 Daltons, como un peso molecular en el intervalo de 400 a 800 Daltons. Se ha descubierto que los copolímeros de este peso molecular, cuando se administran oralmente, se transportan a la circulación sistémica para proporcionar el tratamiento de infección parenteral. La proporción del copolímero absorbido a través de la pared del intestino es generalmente mayor para los copolímeros de menor peso molecular en este intervalo.

En un conjunto de realizaciones, el tratamiento proporciona protección contra infección por bacterias, como *S aureus* resistente a metilicina (superbacterias) como se demuestra en los ejemplos en un modelo de ratón. Los resultados demuestran que la eficacia de la destrucción *in vivo* de bacterias/profilaxis o terapia después de la administración oral del copolímero de menor peso molecular, como menor que 1.500 Daltons y preferiblemente menor que 1.000 Daltons, como de 400 a 1000 Daltons, proporciona mayor eficacia que los copolímeros de mayor peso molecular, como 2.500 Daltons (véase la Figura 4).

La presente invención se extiende además al tratamiento (ya sea profiláctico o curativo) de infecciones que se han dispersado en la sangre y/o a órganos vitales. De esta manera, la invención incluye tratamiento parenteral, como por administración oral o inyección en la sangre, en particular inyección intravenosa o terapia, para tratar infecciones que se han diseminado en la sangre u órganos vitales, como riñones, hígado o cerebro. Esas enfermedades incluyen, a modo no taxativo, sepsis, bacteremia y meningitis. El uso de la terapia intravenosa puede ser de particular importancia en donde la exposición a una infección parenteral grave se sospecha y/o la condición del sujeto que se va a tratar se deteriora rápidamente debido a una infección parenteral. Por ejemplo, cuando se diagnostica sepsis o bacteriemia, se puede preferir la terapia intravenosa con el copolímero, por ejemplo, como una solución acuosa o salina.

El copolímero se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva para proporcionar tratamiento tópico local en el sitio de infección y, en tales casos, la dosis dependerá del grado y/o gravedad de la infección, como la extensión o gravedad de una infección de heridas o similar. El copolímero se puede aplicar en forma de aerosol, gel, espuma tópica o ungüento o impregnado en un vendaje para aplicar a heridas, quemaduras, sitios quirúrgicos o similares. En un conjunto adicional de realizaciones, el copolímero se aplica como una inhalación a través de un aerosol o similar. La inhalación se puede utilizar para tratar la infección pulmonar o para proporcionar tratamiento sistémico a través de los pulmones.

La infección por neumococo de la sangre con frecuencia se desarrolla a partir de una infección pulmonar y puede producir complicaciones graves, a modo no taxativo, sepsis, bacteremia y meningitis. En un conjunto de realizaciones, el copolímero se administra como una inhalación, como una inhalación de aerosol.

En una realización adicional, el copolímero se suministra mediante administración transdérmica a partir de una composición que puede comprender un potenciador de penetración para los parches de polímero, microagujas o dispositivos similares para mejorar la administración transdérmica.

En una realización adicional el copolímero se administra por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa.

El copolímero se puede formular en una composición acuosa dado que es soluble y permanece soluble en el intervalo total de 1 a 14 de pH. El copolímero puede administrarse en composiciones farmacéuticas con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos; sin embargo, las formulaciones acuosas proporcionan una ventaja significativa. La composición puede comprender un amplio rango de concentraciones del copolímero dependiendo de la infección específica que se va a tratar y el modo de administración. En un conjunto de realizaciones, la concentración del copolímero en una composición farmacéutica acuosa está en el intervalo de 0,01% en peso a 20% en peso de la composición. De acuerdo con ello, en un conjunto preferido de realizaciones el copolímero se administra como una solución acuosa.

La composición se puede administrar oralmente en forma de comprimido, cápsula, jarabe o líquido y la dosis administrada oralmente dependerá de la gravedad y el tipo de infección, pero puede estar en el intervalo, por ejemplo, de 1 mg a 1.000 mg por kilogramo de peso corporal por día, como de 10 mg a 500 mg por kilogramo de peso corporal por día.

Una de las ventajas significativas del copolímero y método de tratamiento es que se pueden utilizar contra infecciones de un amplio rango de patógenos y en particular es útil en el tratamiento de infecciones bacterianas que pueden escalar rápidamente y presentar una amenaza grave, como bacteremia o sepsis o neumonía o meningitis o celulitis. Los ejemplos específicos de dichas infecciones bacterianas se pueden seleccionar del grupo de bacterias que incluyen *Proteus Spp*, *Serratia Spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus Aureus*, *coagulasa-gram negativo Staphylococcus Spp*, *Streptococcus Pyogenes*, *Streptococcus*

*pneumoniae* y *Enterococcus Spp.*

La actividad contra un amplio rango de patógenos y particularmente un amplio rango de bacterias permite que el copolímero se use como una primera línea de tratamiento en infecciones graves o mortales en donde, por ejemplo, la gravedad de la infección puede no permitir suficiente tiempo para identificar adecuadamente las bacterias responsables.

El descubrimiento de la presente invención respecto de que los copolímeros de acroleína son activos contra la infección parenteral no se esperaba, debido a que se creía que el mecanismo de acción se relacionaba con su actividad. Melrose 1996 utiliza proteína añadida para extinguir totalmente la actividad antimicrobiana de polímeros de acroleína. El enfoque de la técnica anterior ha sido tratar infecciones en el tracto gastrointestinal mediante la administración oral de polímeros de acroleína que tienen pesos moleculares suficientemente altos para evitar su migración transintestinal. De hecho, la reactividad del monómero de acroleína es tal que hasta ahora no se ha considerado factible polimerizar acroleína para producir productos que tienen pesos moleculares no mayores que aproximadamente 1.000 Daltons. La administración contra la infección parenteral también se ha evitado deliberadamente por su toxicidad potencial (incluso la reacción con proteínas de suero).

En la técnica anterior de preparación de poliácroleína se consideró que el mecanismo de polimerización fue aniónico, y que el contenido de agua necesitaba ser minimizado a fin de evitar la extinción del anión o disociación del producto. Se ha descubierto ahora que el peso molecular puede limitarse a 1.000 Daltons o menos si se controla la relación de monómeros, la dilución de acroleína y polietilenglicol con agua y en comparación con la técnica anterior, si se mantiene el pH en un intervalo inferior, no mayor que 12,0 y dentro de un intervalo de pH de 12,0 a 7,0. Es decir, para conseguir el nuevo mecanismo de polimerización, el intervalo de pH cae en dos unidades de pH enteros, o tiene una concentración de iones hidroxilo 100 veces menor, utilizada en las polimerizaciones de la técnica anterior.

En un conjunto de realizaciones, la invención proporciona un método para la preparación de un copolímero para el tratamiento de una infección parenteral; el proceso comprende la polimerización catalítica de acroleína en una solución acuosa que comprende polietilenglicol (preferiblemente de peso molecular entre 200 y 600 Daltons), donde la relación polialquilenglicol/acroleína es al menos 4, preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 10, y el agua está presente en una cantidad de al menos 20% en peso de la composición.

En un conjunto preferido de realizaciones, el procedimiento comprende adicionar una solución acuosa de acroleína, que tiene preferentemente una concentración de acroleína no mayor que 50% en peso, a una solución acuosa de polietilenglicol que comprende al menos 10% en peso de agua y un pH no mayor que 12,0, preferiblemente no mayor que 1.

En una realización incluso más preferida, la acroleína se añade como una solución acuosa a una solución acuosa de polialquilenglicol de pH 9 a 11.

En general hemos descubierto que, en los sistemas acuosos utilizados en el proceso, un pH relativamente bajo no mayor que 12,0, como no mayor que 11,5 (preferiblemente no mayor que 11) proporciona ventajas significativas sobre el intervalo de pH de la técnica anterior de hasta 14 pH, utilizada para polimerizar acroleína. El pH relativamente alto, como se utilizó en la técnica anterior durante periodos prolongados, genera oxidación e introduce grupos carboxilo que mejoran la solubilidad. Sin embargo, hemos descubierto que la solubilidad se logra en el proceso de la invención sin la necesidad de calentamiento prolongado a un pH relativamente alto y como resultado, el contenido de carbonilo y/o carboxilo es muy bajo, típicamente 0-10% del copolímero. Se cree que el contenido mínimo de carbonilo o carboxilo minimiza tanto la reacción no deseada con proteínas de origen misceláneo o repulsión a recubrimientos ácidos y aniónicos de gérmenes, en ambos casos, mejorando la acción antibiótica.

Sin estar limitados por la teoría, se cree que, en el proceso de la presente invención, la polimerización de acroleína en presencia de álcali no procede por un mecanismo totalmente aniónico en presencia de cantidades significativas de agua, sino que tiene un mecanismo de polimerización de radicales libres significativo.

Esta conclusión encuentra sustento en los siguientes hechos: (a) la polimerización se facilitó por la presencia del radical libre doble, oxígeno (b) el agua, que es un componente principal del disolvente, extingue aniones (c) la polimerización es significativa a temperatura ambiente y temperaturas superiores-rápida, exotérmica e inhibida por el inhibidor típico de radicales libres, la hidroquinona - todas las observaciones son típicas de la polimerización por radicales libres, en lugar de la polimerización iónica (Florey; Odian). Una vez más, sin desear estar limitados por la teoría, se cree que el mecanismo de reacción implica la formación de un radical iniciador entre el ion hidroxilo y oxígeno, seguido por transferencia de radicales a un disolvente de polietilenglicol, iniciando así la polimerización; posteriormente, se termina la transferencia de disolvente que implica que el disolvente hidroxilo limite la cantidad de residuos de acroleína polimerizados en el sitio de radicales activos, adyacentes al carbonilo dentro del copolímero.

Se cree que el oligómero de polialquilenglicol proporciona una transferencia de cadena y/o una terminación de cadena, mediante la cual limita (junto con la dilución acuosa), el peso molecular en proporción directa al contenido total de hidroxilo.

En resumen, la estrategia central de la síntesis, diferente de la técnica anterior (Melrose2009), es hacer que los dos

segmentos del producto copolimérico resultante sean unidos por un mecanismo que se cree, sin estar limitados por la teoría, que procede por un mecanismo de radicales libres, en lugar de mediante una adición nucleofílica de Michael. Esto se logra al maximizar la formación de centros activos de radicales libres que se propagan (al maximizar la presencia del radical, oxígeno) y reducir al mínimo el pH, minimizando la formación de centros activos deficientes en iones de hidrógeno para la adición de nucleófila Michael.

La HPLC mostró que el copolímero antimicrobiano activo tiene una reacción insignificante con cualquiera de los modelos de aminoácido cisteína (sulfhidrilo) o treonina(hidroxilo), y que las actividades antimicrobianas de los copolímeros pueden atribuirse solamente a un efecto hidrófobo físico, no covalente, en los carbonos próximos identificados dentro de los copolímeros, una vez estabilizadas las membranas externas bacterianas. El mecanismo de acción de la técnica anterior, que se basa en la reacción química de grupos carbonilo en poliacroleína modificada con proteína, no se cree que es responsable de la actividad antimicrobiana de los presentes copolímeros.

En contraste con la técnica anterior que enseña la reactividad destructiva de polímeros de acroleína con proteína, hemos descubierto que las tasas antimicrobianas de los copolímeros no se reducen significativamente por la presencia de una proteína. De hecho, para la mayoría de las bacterias, especialmente para *C. difficile*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, las tasas netas de eliminación (eliminación bruta menos crecimiento bruto) mejoraron incluso cuando la proteína era un caldo, que promueve el crecimiento del microbio objetivo (Véase la Tabla 2). Hemos descubierto que –las tasas antimicrobianas de los copolímeros son suficientemente rápidas para competir con cualquier reacción química intravascular con proteína que conduce a toxicidad, o con procesos de depuración *in vivo*. En las perspectivas de la técnica anterior, de manera consistente, estas observaciones y conclusión resultaron contradictorias para avanzar con la síntesis y después usar el copolímero (como el copolímero del Ejemplo 1) de manera parenteral, como en la presente.

Se ha descubierto además que los copolímeros exhiben tasas de muerte antimicrobiana más lentas contra células eucariotas, como los hongos, cuando se comparan con el alto nivel de actividad encontrado contra bacterias procariotas. Se ha notado que las células vasculares y gastrointestinales dentro de mamíferos son eucariotas, y esta observación es inherente al diseño de la presente invención que busca la selectividad de la reactividad por los copolímeros, entre células de bacterias y otras células.

Los copolímeros divulgados en la presente representan un desafío intravascular mucho menos tóxico que los polímeros de acroleína de la técnica anterior. Se ha descubierto que los copolímeros se pueden preparar con una polidispersidad baja y que una polidispersidad baja, preferentemente menor que 5, más preferentemente menor que 2, e incluso más preferentemente menor que 1,5 y mucho más preferentemente menor que 1,2, mejora el desempeño del copolímero, particularmente cuando el peso molecular es menor que 1000, como entre 400 y 1.000 Daltons, más preferentemente entre 400 y 800 Daltons, como entre 400 y 600 Daltons. Los polímeros de la presente invención se pueden preparar como un polímero único, simétrico y estrecho, con un índice de polidispersidad de aproximadamente 1. Los polímeros de acroleína previamente descritos contienen generalmente una polidispersidad más alta, o en el caso del polímero del Ejemplo 6 de la Patente WO 09/059350 contienen, conforme surge de una detección UV muy sensible, aproximadamente 1% y aproximadamente 8 veces más de una amplia gama de polímeros/residuos de bajo peso molecular, que no son fácilmente detectables a partir de la detección del índice de refracción. Los copolímeros de la presente se pueden formar cuantitativamente, en estrecha distribución de peso molecular de polidispersidad cerca de la unidad. Los copolímeros contienen muchos menos contaminantes potencialmente tóxicos (productos secundarios y materiales de partida, incluyendo acroleína residual, acroleína) que los polímeros de acroleína fuertemente calentados y autooxidados de la técnica anterior. En la realización preferida de la invención, tanto el contenido de carbonilo como el pH utilizados en la preparación por catalíticos están en un mínimo sin precedentes, y ambos factores pueden ser utilizados para minimizar los productos secundarios y su potencial toxicidad de particularmente, la reacción de Canizarro con carbonilo, y que se ha descubierto que la técnica anterior es anormalmente rápida en polímeros de acroleína.

Se ha descubierto que el copolímero tiene actividad antimicrobiana activa contra un sitio, que es común a todas las bacterias, sin importar la mutación. Se arriba a esta conclusión a partir de los resultados de un intervalo de bacterias representativas en la Tabla 2 (que ilustra que los copolímeros tienen la misma tasa de actividad antimicrobiana independientemente de si las bacterias que están en forma natural o mutaron a una superbacteria) y la Tabla 3 (que ilustra que no se produjo resistencia independientemente de la mutación, que provocaba inactividad en Amoxicilina, por el uso repetido). Esto representa un método novedoso, general y exitoso de tratamiento y prevención de infección en un sujeto, de bacterias de todos los tipos y que exhiben la propensión a desarrollar resistencia antimicrobiana.

Además de monómero de acroleína, se pueden usar otros monómeros, por ejemplo, ácido acrílico, acrilamida, acrilonitrilo, cloruro de vinilo, estireno, ácido metacrílico, metacrilato de metilo y acetato de vinilo, vinil-piridina y vinil-pirrolidona como monómeros adicionales para preparar copolímeros que comprenden un segmento de oligómero de polialquilenglicol y un segmento derivado de acroleína, como se describe en la presente. Los monómeros adicionales pueden estar presentes en cantidades que no son adversas a la actividad antimicrobiana del copolímero. La relación de los monómeros se puede elegir para mantener la solubilidad en agua del copolímero y la incorporación de otros monómeros se puede controlar por las condiciones de reacción y las concentraciones de monómero relativos teniendo en cuenta la reactividad del monómero. En general, se prefiere que otros monómeros constituyan no más de 15% en moles de los residuos de monómero del copolímero, preferiblemente no más de 10% en moles y más preferiblemente el copolímero consiste solamente en polialquilenglicol y residuos de monómeros de acroleína.

El mecanismo hidrofóbico, que es característico de los copolímeros de la invención, se logra a través de las etapas del proceso, que proporcionan control sobre:

peso molecular; afinidad para la reacción antimicrobiana con células bacterianas sobre células eucariotas; actividad antibacteriana mejorada en presencia de proteína; y minimización del contenido de carbonilo y carboxilo dentro de los copolímeros.

Los antibióticos de copolímero proporcionados en la presente proporcionan generalmente eficacia contra un amplio rango de bacterias, ya sea resistentes o no resistentes, y proporcionan actividad con certeza. La actividad puede o no exceder la actividad de antibióticos específicos contra ciertas bacterias específicas, pero en la presente, la certeza de la actividad antibiótica contra el espectro de bacterias, especialmente bacterias resistentes como las que están involucradas en la escalada de enfermedades infecciosas graves contemporáneas, proporciona una confianza mayor y valiosa para el tratamiento apropiado de infecciones bacterianas de todos los tipos. El mismo nivel de confianza con antibióticos convencionales requiere en primer lugar, una determinación de la identidad y patología relativa a las bacterias presentes en la infección y, recién entonces, una selección de los restantes antibióticos activos.

En un conjunto preferido de realizaciones, el método de preparación de copolímeros de la presente invención comprende las siguientes etapas:

proporcionar una solución acuosa básica suave (preferiblemente un pH no mayor que 12,0; más preferiblemente 9 a 11) de un polialquilenglicol (preferiblemente polietilenglicol de peso molecular en el intervalo de 200 a 600 Daltons);

agitar la solución básica suave vigorosamente para arrastrar aire; añadir (preferiblemente lentamente durante un período de al menos 2 minutos, más preferiblemente de al menos 5 minutos) acroleína como una solución acuosa de concentración no mayor que 50% en peso de la solución acuosa de acroleína (que contiene habitualmente un conservante);

mantener la temperatura de reacción en el intervalo de 10°C a 40°C;

y una vez consumido el monómero de acroleína, añadir ácido para proporcionar un pH menor que 9 y preferentemente no mayor que 8.

El peso molecular del copolímero resultante se controla por el peso molecular del polialquilenglicol, así como directamente proporcional a su concentración de hidroxilo. (La polimerización comienza a temperatura ambiente, luego se eleva ligeramente como la polimerización exotérmica, que es evidente por la apariencia, y el avance de la desaparición del color amarillo del conservante.)

Durante la reacción se continúa agitando, y el pH se mantiene básico suave (preferiblemente de pH no mayor que 12,0, más preferiblemente entre 9 y 11), solo según sea necesario. La adición de más base y su concentración se minimiza para reducir las reacciones de degradación/secundarias y para reducir la formación de carbonilo o carboxilo en el producto.

Finalmente, se puede reducir el pH de la solución. Un conjunto preferido de realizaciones, el pH se ajusta a casi neutro, mediante la adición de ácido. El olor extremadamente penetrante de la acroleína ya no es evidente en el producto de copolímero, que se forma en al menos 99% de producto.

Los copolímeros de acroleína resultantes tienen típicamente pesos moleculares en el intervalo de 250 a 1000 Daltons (como 300 a 1000 Daltons, 400 a 1000 Daltons o 400 a 800 Daltons). Los copolímeros no presentan la turbidez que se esperaría de cualquier contenido de poliacroleína. El contenido y la unión del segmento derivado de acroleína y el segmento oligómero de polietilenglicol, de la manera propuesta anteriormente, se demuestran por la separación de tamaño de HPLC de todos los copolímeros, cada uno de ellos con un pico de masa estrecho, simétrico, dominante e irresoluble sin indicar monómero de acroleína residual o poliacroleína sustancial; además, el copolímero de MW 1,000 del Ejemplo 2 contrario al cambio de resolución y la expectativa si la asociación entre los segmentos fuera meramente inter-adsorción física, no cambió en la separación por tamaño de HPLC, ni en la actividad antimicrobiana, después del equilibrio con polietilenglicol de MW 200 en condiciones básicas comparables a las utilizadas en la preparación original de todos los copolímeros. (Véase el Ejemplo 2).

Relación en peso de acroleína: el polietilenglicol utilizado en la preparación del copolímero se encuentra preferiblemente en el intervalo de 1:4 y 1:40, y más preferiblemente en el intervalo 1: 8 1,20.

La base preferida es una solución acuosa de un hidróxido alcalino; más preferiblemente, el hidróxido alcalino es hidróxido de sodio.

El ácido preferido es el ácido clorhídrico diluido, aunque el ácido acético es útil para fines de tamponamiento de pH.

Se prefiere que la adición de acroleína a la solución acuosa de polialquilenglicol tome aproximadamente 10 minutos y que la reacción se complete, y la adición de ácido generalmente tiene lugar durante aproximadamente 40 minutos, y preferiblemente no supera los 90 minutos.

Típicamente se ha encontrado que un tiempo de reacción de 50 minutos es adecuado para obtener una conversión prácticamente completa en el producto de copolímero.

5 La acroleína se añade preferentemente al polialquilenglicol acuoso como una solución acuosa, más preferiblemente como una concentración en el intervalo de 10% a 30% en peso de monómero de acroleína, con base en el peso de la solución de acroleína acuosa que se debe añadir a la solución acuosa de polialquilenglicol.

El copolímero resultante tiene un contenido de grupo carbonilo reactivo (más cualquier contenido de carboxilo) menor que 10%, más preferiblemente menor que 5%, y todavía más preferiblemente de cero %.

La solución de acroleína contiene normalmente un inhibidor, como hidroquinona, en una cantidad inferior al 0,5% y típicamente en una cantidad de entre 0,01 y 0,5% y, más preferiblemente, en una cantidad de 0,1% p/p

10 Será evidente para los entendidos en la técnica que los copolímeros de la presente invención se pueden incluir en una variedad de composiciones y formas físicas. Particularmente, las composiciones y los métodos farmacéuticos de uso *in vivo* serán evidentes, aprovechando la separación más lenta del copolímero. Además, será evidente que puede aprovecharse la ventaja farmacológica de la variación en el peso molecular para ajustar la velocidad de penetración a través de membranas, tejidos y órganos y la absorción o distribución resultante en humanos o animales; en este  
15 contexto, los copolímeros de menor peso molecular, como los copolímeros con un peso molecular en el intervalo de 400 a 800 Daltons, que los copolímeros con un peso molecular superior a 1000 Daltons.

En vista de los resultados de la presente, también es concebible añadir proteína, particularmente caldo, para mejorar la actividad antimicrobiana de los copolímeros.

20 Los productos objeto de la presente son solubles en agua y la administración a seres humanos/animales puede realizarse por los métodos habituales conocidos en medicina -particularmente, por vía oral o por inyección, y pueden usarse en cualquier forma farmacéutica práctica, solos o en composiciones, dentro de órganos y tejidos, o en contacto con sistemas vasculares *in vivo* de seres humanos o animales o en dichos sistemas. Cuando los copolímeros se administran a humanos y animales, pueden ser administrados per se o como una composición farmacéutica que  
25 contiene, por ejemplo, 0,1% a 99,5% (más preferiblemente 0,5% a 90%) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden ser sólidos, soluciones, geles, emulsiones o suspensiones de materia que comprenden una cantidad farmacológicamente efectiva del copolímero.

30 Los copolímeros y sus composiciones tienen actividad antimicrobiana *in vitro* sustancial contra bacterias, particularmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, pero menor actividad contra hongos *Aspergillus Bremsilensis* y *Candida Albicans*.

De particular importancia debido a los problemas globales de resistencia bacteriana a los antibióticos, los copolímeros tienen más estabilidad antimicrobiana que la Amoxicilina una la exposición repetitiva a *E. coli*, *S. aureus* o *P. aeruginosa*. Los copolímeros, sin exhibir ninguna resistencia inusual a partir de generaciones sucesivas de las bacterias, normalmente y rutinariamente matan "superbacterias" de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

35 Las concentraciones mínimas de eliminación para estas tres bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* estaban en el intervalo práctico de 1-200 ppm de copolímero.

### Ejemplos

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos.

40 Se debe entender que los ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la invención y que de ninguna manera limitan el alcance de la invención.

Los copolímeros del Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 tienen características antimicrobianas de Concentración de Eliminación Mínima, velocidades de amplio espectro de eliminación más rápida en presencia de proteína-caldo, y resistencia al desarrollo de superbacterias. (Véanse las Tablas 1, 2 y 3). En el contexto de la administración por adsorción a través de membranas pulmonares, es de interés que el copolímero de bajo peso molecular sea capaz de  
45 destruir *Micobacterium fortuitum-sT*, un modelo de copolímero de MW 2500 para la bacteria que produce tuberculosis del Ejemplo Comparativo 1, *in vivo* es un activo antimicrobiano (Figuras.1 y4). Sin embargo, como puede verse en la Tabla 2, aunque con frecuencia tiene actividad antimicrobiana *in vitro* más rápida/más activa que el copolímero de MW inferior a 500 del Ejemplo 1 -siempre *in vivo* -, ya sea profiláctica o curativamente (por ejemplo, en experimentos que dan lugar a las Figuras 4 y 5), su rendimiento fue notablemente más lento y el copolímero más pequeño, efectivo  
50 o más que el control positivo. Es decir, la síntesis y el uso del copolímero de bajo peso molecular de conformidad con la presente invención han dado un atributo y una ventaja significativos respecto del copolímero del Ejemplo Comparativo 1; además, este atributo y ventaja del copolímero más pequeño *in vivo* son contraintuitivos respecto de la técnica anterior y de las pruebas *in vitro* realizadas inicialmente, que muestran la superioridad del copolímero más grande, conforme se describe en este párrafo.

*In vivo* dentro de ratones, a un nivel de confianza  $p > 0,01$ , el copolímero del Ejemplo 1, MW 500, después de una sola dosis de 132 mg/kg de ratón, eliminó eficazmente a la superbacteria *S. aureus* USA 300 resistente a metilina en un protocolo que implica actividad antimicrobiana tanto profiláctica como curativa en la sangre y los riñones de los sujetos; ilustra la aplicación de protección profiláctica en la sangre, en las primeras horas antes de que el germen se haya dispersado como una infección en su sitio preferido (los riñones), mientras se produce la terapia curativa. (Véase la Figura 1).

### Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

La Figura 1 es un gráfico de la relación porcentual de incidencia (ufc/ml) de *S. pyogenes* en la sangre de dos grupos de diez ratones 12 a 24 horas después de la infección con las bacterias de conformidad con el procedimiento experimental del Ejemplo 5. Un grupo de ratones se trató con los copolímeros del Ejemplo Comparativo 1 15 minutos después de la infección y el otro grupo no recibió tratamiento (control negativo) sino solo solución salina.

La Figura 2 es un diagrama de columnas que compara las velocidades de separación después de 8 días, de ratones dentro de 3 grupos, cada uno de los 10 ratones, de conformidad con el procedimiento experimental del Ejemplo 6. 10 minutos antes de la infección con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) los tres grupos de ratones recibieron el copolímero de la invención del Ejemplo 1, MW 500; 132 mg/Kg de ratón, Oxacilina de control positivo, 500 mg/Kg y solución salina de control negativo, respectivamente.

La Figura 3 es un gráfico de la puntuación de la salud (véase el párrafo 176 para una explicación de la puntuación de la Salud) durante 10 días de dos grupos de 10 ratones cada uno, ambos tratados con el copolímero de MW 500; Ejemplo 1 (Ej1); 132 mg/Kg de ratón; un grupo ("infectado") de ratones se infectó con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) y el segundo grupo ("no infectado") no se infectó con las bacterias. El gráfico muestra los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 4 es un gráfico de los ratones separados debido a la morbilidad o mortalidad entre dos grupos de 10 ratones cada uno, infectados con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) y 24 horas después tratado curativamente con el copolímero de MW 500 del Ejemplo 1 a 132 mg/Kg de ratón, o el copolímero de MW 2500 del Ejemplo Comparativo 1 a 167 mg/Kg de ratón. El procedimiento experimental se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 5 es un diagrama de columna que muestra el número de ratones separados debido a la morbilidad o mortalidad en cuatro grupos de 10 ratones cada uno, infectados con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300), y 24 horas después de tratado de manera curativa con el copolímero de MW 500 del Ejemplo 1 (Ej.) a 132 mg/Kg de ratón o el copolímero de MW 2500 del Ejemplo Comparativo 1 (EC1) a 167 mg/Kg de Oxacilina de control positivo 500 mg/kg o solución salina de control negativo. El procedimiento experimental se describe en el Ejemplo 9.

### Microbios

Los microbios utilizados experimentalmente en esta invención y proporcionados por ThermoFisher Scientific (Australia) fueron *Escherichia coli* (atcc 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (atcc 27853), *Klebsiella pneumoniae* resistente a beta-lactama (atcc700603), *Staphylococcus aureus* (atcc 25923), *S. aureus* resistente a la metilina (atcc 43300), *Streptococcus pyogenes* (atcc 19615), *Enterococcus faecalis* (atcc 29212), *E. faecalis* resistente a la vancomicina (atcc 51299), *Clostridium difficile* (atcc 9689); *Microbacteria fortuitum* (atcc 6841); *Aspergillus bralliensis* (atcc 16404) y *Candida albicans* (atcc 1023.).

### Estimaciones del contenido de carbonilo

Las estimaciones del contenido de carbonilo que se informan en la presente se basan en un método establecido (Peters 1962; Melrose 2009). Por duplicado, se pesó una solución de muestra acuosa de copolímero (1 g) a una precisión de 0,01 g -se añadió agua (9 g) y luego la solución se llevó a pH 6,00 mediante la adición de ácido clorhídrico 0,01 M o hidróxido sódico acuoso 0,01 M, según corresponda.

Una solución al 1% de clorhidrato de hidroxilamina (50 ml) se llevó a pH 6,00 con hidróxido sódico acuoso 0,01 M.

Las soluciones anteriores de copolímero y reactivo se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos; a continuación, los reactivos se volvieron a valorar con hidróxido sódico acuoso 0,01 M (V ml) a pH 6,00.

De esta manera, el % p/p del contenido de carbonilo de la solución de muestra original (Pg) se estimó como acroleína; igual a:  $V \times 0,10 \times 5,6/P$

### Análisis Cuantitativo de Copolímero por HPLC

La Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) se realizó en equipo de Prominencia Shimadzu mediante el uso simultáneo de detectores de índice de refracción y UV (268 nm); la columna fue Hidrogel de Agua 120 o Hidrogel de Agua 250 para separación por exclusión por tamaño, o ambas en serie.

La calibración de MW se realizó mediante un gráfico lineal de tiempo de exclusión frente a log MW de polietilenglicoles Sigma-Aldrich con un rango medio de MW de 200 a 10.000 Daltons. Por lo tanto, del método de determinación se deduce que los pesos moleculares de los acroleinopolímeros que siempre se determinaron sobre esta base y se informaron aquí, siempre se refieren a un Peso Molecular Promedio Numérico (corregido a los 500 Daltons más cercanos).

Se realizaron Separaciones en soluciones acuosas de soluto (0,020 ml; 0,4% p/p), con agua-disolvente (0,6 ml a 1,0ml/minuto).

#### **Análisis cuantitativo de copolímero por espectrometría de masas**

Se realizaron dos técnicas separadas (por cortesía de Shimadzu Scientific Instruments (Oceania) Pty Ltd):

10 Inyección directa en el espectrómetro de masas, sin cromatografía previa;

Espectrometría de masas, después de una cromatografía previa

Equipo; las condiciones experimentales fueron: gradiente de alta presión binaria de Nexina UHPLC y LCMS-8060 (ejecutado bajo 03 escaneos para simular espectrometría de masas de cuadrupolo simple; fase móvil partes iguales de ácido fórmico en agua al 0,02% y ácido fórmico en acetonitrilo al 0,02% y la columna Phenomenex Aerois XB C18 300A 150x2,1 mm

#### **Análisis UV/Visible cuantitativo de soluciones de polímeros**

Las soluciones para el análisis se prepararon mediante dilución de copolímero (250 mg) en agua (20 g) y luego, de corresponder, un equivalente molar estequiométrico de reactivo; después, diluido 1: 9 con agua antes de tomar el espectro UV en equipo Shimadzu UVmini-1240.

#### **Ejemplo 1 y Ejemplo Comparativo 1**

Este Ejemplo describe la preparación de un copolímero de la invención de peso molecular de aproximadamente 500 Daltons, que comprende un segmento de oligómero de poliácroleína y un segmento de oligómero de polietilenglicol de peso molecular de 200 Daltons. El copolímero se ilustra determinadamente a partir de una preparación a pH 12,0, ya que este es el pH más alto recomendado para un éxito confiable, sin introducir niveles de reacciones secundarias no deseadas como se describe en la presente. La actividad antimicrobiana del copolímero se compara con la de un copolímero correspondiente de peso molecular de aproximadamente 2500 Daltons.

#### **Ejemplo 1 - Preparación de un copolímero de peso molecular de aproximadamente 500 Daltons**

Se añadió lentamente durante 10 minutos una solución de acroleína recién destilada (5g; inhibida con hidroquinona al 0,1% p/p) en agua (20 g) a una solución de agua (20 g) y polietilenglicol (60 g; MW 200) que había adquirido pH 12 mediante la adición de hidróxido sódico acuoso 1 M; durante los 10 minutos, apareció rápidamente el color amarillo de la hidroquinona oxidada y luego desapareció. Durante el proceso, la composición se agitó continua y vigorosamente para proporcionar un contacto abundante con el aire. Se realizó una polimerización exotérmica y rápida, y la temperatura de los reactivos se mantuvo entre aproximadamente 25°C y 35°C

Después de otros 50 minutos, la solución transparente se ajustó a pH 7,5 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 M; el producto fue una solución transparente, casi incolora (amarillo muy pálido). Todas las pruebas realizadas sobre la muestra y los resultados de la presente se basaron en una muestra sin purificación, almacenada durante 4 o 6 años a 7° C; esto es indicativo de la alta pureza y alta estabilidad del producto.

El espectro UV-visible de 200-600 nM del producto solo tenía una absorción sustancial en el borde lejano de la región 200-300 nM. Esto es consistente con un contenido insignificante de insaturación conjugado con carbonilo y que puede estar asociado con la propensión a una reacción de Michael.

La HPLC indicó que el rendimiento de polimerización fue de 99-100% p/p, y cualquier monómero de acroleína residual fue inferior a 1 ppm p/p; el MW fue de aproximadamente 500 Daltons. La espectrometría de masas mostró una base de un pico base de 312, lo que indica que el copolímero comprendía cinco residuos de oxietileno (ej. PEG) unidos covalentemente a dos residuos de 2-propanal (ej. acroleína).

45 Cuando se probó hasta pH 1 (y hasta pH 14), el copolímero permaneció soluble. El copolímero tiene aproximadamente 0-10% p/p de contenido de carbonilo o contenido de carboxilo.

El único pico del producto en HPLC permaneció estrecho y no resuelto cuando la HPLC se realizó en agua a 1 ml/minuto, a través de Waters Hidrogel 120, Waters Hidrogel 250, de forma singular o en serie de una secuencia alternativa.

50 Los mismos resultados preparatorios ocurrieron cuando la polimerización se realizó a pH 8 o pH 10, y siempre con exactamente la misma velocidad microbiana *in vitro* contra E. coli, y los mismos resultados de HPLC (excepto que

el pH 8 dio un producto que tiene una cantidad de materiales indicativos de dímeros u oligómeros de acroleína de una cantidad total menor que 1% p/p); los ensayos de velocidad microbiológica *in vivo* fueron los mismos para todos los productos.

5 La preparación del Ejemplo 1 se repitió independientemente varias veces, a diversos pH entre 8 y 12, incluso pH 8, pH 10 y pH 12 por separado por otro miembro del laboratorio de los solicitantes, y dio resultados de polimerización, HPLC y ensayo de velocidad *in vitro* contra *E. coli* idénticos.

**Ejemplo Comparativo 1 - Copolímero de peso molecular de aproximadamente 2500 Daltons**

Este Ejemplo describe la preparación de un copolímero, no de la invención, de peso molecular superior, 2500 Daltons, que comprende un segmento de polietilenglicol de peso molecular 2000.

10 Se añadió lentamente durante 10 minutos una solución de acroleína recién destilada (5 g; inhibida con hidroquinona al 0,1% p/p) en agua (20 g) a una solución de agua (30 g) y polietilenglicol (20 g; MW 2.000) que había adquirido pH 1 mediante la adición de hidróxido sódico acuoso 1 M; durante este período, apareció rápidamente el color amarillo de la hidroquinona oxidada y después desapareció. La composición se agitó vigorosa y mecánicamente antes y durante la adición para proporcionar un contacto abundante con el aire. Se realizó una polimerización exotérmica y rápida, y se mantuvo la temperatura entre 25° C y 35° C.

15 Después de agitar durante 50 minutos adicionales, la solución transparente se ajustó a pH 7,5 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 M; el producto era una solución transparente, casi incolora (amarillo muy pálido).

20 Es notable que en común con todos los productos de poliácroleína de la técnica anterior, no se utilizaron en la presente las técnicas de agardifusión de análisis microbiológico debido a la resistencia de los productos de peso molecular relativamente alto a la difusión a través de agar.

Todas las pruebas realizadas sobre la muestra y sus resultados se registraron en una muestra sin purificación y se almacenaron durante 4 a 6 años a 7° C; esto es indicativo de la alta pureza y alta estabilidad del producto.

El espectro UV-visible de 200-600 nM del producto solo tenía una absorción sustancial en el borde lejano de la región 200-300 nM.

25 La HPLC indicó que el rendimiento de polimerización fue de 99 a 100% p/p, y cualquier monómero de acroleína residual fue inferior a 1 ppm p/p; el MW fue de aproximadamente 2.500 Daltons. Cuando se ensayó hasta pH 1 (y hasta pH14), el polímero permaneció soluble. El polímero tiene un contenido de carbonilo de aproximadamente 0-10% p/p.

30 El único pico del producto en HPLC permaneció estrecho y no resuelto cuando la HPLC se realizó en agua a 1 ml/minuto, sobre el Waters Hidrogel 120, el Waters Hidrogel 250, de manera singular o en serie de cualquier secuencia alternativa.

35 Basado en el mecanismo de polimerización descrito en la presente, se puede calcular que los equivalentes de monómero de acroleína añadidos en la polimerización (en relación con los equivalentes de polietilenglicol) son mayores en el caso del Ejemplo Comparativo 1 que en el Ejemplo 1 y, por lo tanto, cualquier propensión a formar cualquier poliácroleína insoluble es mayor en el primero, pero no se observó, incluso después de reposar a 7° C/6 años. La acidificación por etapas de una solución diluida del polímero de acroleína a pH 2,5 con ácido clorhídrico diluido y la titulación inversa con solución de hidróxido sódico diluido demostró la ausencia de grupos carboxilo ( $pK_a = 4,5$ ).

40 **Estimación de la concentración de eliminación mínima de los copolímeros del Ejemplo 1 y del Ejemplo Comparativo 1**

Se realizaron diluciones en serie del copolímero. Por duplicado, cada dilución luego se inoculó con bacterias para lograr una concentración aproximada de  $10^6$  ufc/ml, y se incubó a pH entre 6,5 y 7,0 a 37° C durante 24 horas.

45 Se retiró una alícuota de 1 ml de cada solución respectiva y se mezcló durante un minuto con una alícuota de 1 ml de caldo de tripticasa desoja; luego se añadieron y mezclaron 8 ml de agua estéril. Posteriormente, se removieron alícuotas (1 ml) de cada solución y se inocularon en el césped mediante inundación sobre placas de agar de sangre de caballo durante 24 o 48 horas de incubación a 37° C.

Se realizaron recuentos visuales de crecimiento bacteriano (unidades formadoras de colonias; ufc) en las placas.

La concentración de eliminación mínima de los copolímeros del Ejemplo Comparativo 1 y del Ejemplo 1 se determinó contra un intervalo de bacterias, y los resultados se muestran en la Tabla 1.

50

Tabla 1 - Concentraciones de eliminación mínima

|                      | Copolímero<br>(Ejemplo 1) | Copolímero<br>(Ejemplo Comparativo 1) |
|----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <i>S. aureus</i>     | 10 ppm                    | 1 ppm                                 |
| <i>S. pyogenes</i>   |                           | 20 ppm                                |
| <i>E. coli</i>       | 10 ppm                    | 10 ppm                                |
| <i>P. aeruginosa</i> |                           | 200 ppm                               |
| <i>E. faecalis</i>   |                           | 150 ppm                               |

El Ensayo Microbiológico de cada composición se mantuvo inalterado luego del envejecimiento a 8° C/4 años o la exposición a las condiciones ácidas simuladas dentro del estómago (véase el Ejemplo 4).

- 5 Cada uno de los copolímeros del Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 tiene una actividad antimicrobiana *in vitro* sustancial contra bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero una menor actividad contra hongos *Aspergillus Bremsilensis* y *Candida Albicans*.

Ambos copolímeros eran aún estables después de cuatro años a 8° C y permanecieron estables a condiciones de pH simuladas durante el tiempo de residencia en el estómago humano.

- 10 Se añadió un microorganismo viable (para dar como resultado aproximadamente 10x10<sup>6</sup> células por ml ) a una solución acuosa del copolímero del Ejemplo 1 (383 mg; 5,4% p/p sobre acroleína) o del copolímero del Ejemplo Comparativo 1 (303 mg; 6,7% p/p sobre acroleína) en agua estéril (20 ml ), pH 6,5 a 7,0; una solución testigo no contenía ningún producto de acroleína. Opcionalmente, se añadió inmediatamente caldo de tripticasa desoja (1 ml ) a los reactivos.

- 15 A intervalos de tiempo, después de mezclar una alícuota (1 ml ) con un volumen igual de medio de crecimiento de caldo de tripticasa de soja durante 1 minuto, y luego agua (8ml), se sembró una alícuota (1 ml) o se inoculó sobre sobre placas de crecimiento de agar incubadas a 30° C o 37° C durante 24 a 48 horas, y se contaron las UFC.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 - Índices de eliminación de microbios

|                            | Copolímero<br>(Ejemplo 1) |            | Copolímero<br>(Ejemplo Comparativo 1) |            |
|----------------------------|---------------------------|------------|---------------------------------------|------------|
|                            | Sin caldo                 | Con caldo  | Sin caldo                             | Con caldo  |
| <i>S. aureus</i>           | 1-3 horas                 | 1-3 horas  | 20-60 min.                            | 20-60 min. |
| <i>S. pyogenes</i>         | 20-60 min.                | 20-60 min. | 20-60 min.                            | 20-60 min. |
| <i>E. faecalis</i>         |                           | 1-3 horas  |                                       | 1-3 horas  |
| <i>E. coli</i>             |                           | 20-60 min. | 20-60 min.                            | 20-60 min. |
| <i>P. aeruginosa</i>       |                           | 3-24 horas |                                       | 3-24 horas |
| <i>C. difficile</i>        |                           |            | >2 horas                              | 20-60 min. |
| <i>C. albicans</i>         |                           | >24 horas  |                                       | 3-24 horas |
| <i>A. brasiliensis</i>     |                           | >24 horas  | >2 horas                              | 3-24 horas |
| <i>I Superbugs</i>         |                           |            |                                       |            |
| MRSA ( <i>S. aureus</i> )  |                           | 1-3 horas  |                                       | 20-60 min. |
| VRE ( <i>E. faecalis</i> ) |                           | 24 horas   |                                       | 1-3 horas  |

|                                  |  |            |            |            |
|----------------------------------|--|------------|------------|------------|
| <i>K. pneumoniae</i>             |  | 1-3 horas  |            | 20-60 min. |
| <i>S. aureus</i> ej. Tabla 3     |  | 1-3 horas  | 1-3 horas  | 20-60 min. |
| # <i>M. fortuitum</i>            |  | > 24 horas |            | 3-24 horas |
| <i>E. coli</i> ej. Tabla 3       |  | 20-60 min. | 20-60 min. | 20-60 min. |
| <i>P. aeruginosa</i> ej. Tabla 3 |  | 20-60 min. | 3-24 horas | 20-60 min. |

- Basado en la morfología de la colonia, notablemente más rápido que el Ejemplo 1  
# *M fortuitum* es una bacteria utilizada como modelo para el estudio de *Mycobacterium tuberculosis* y tuberculosis.

5 (Las actividades antimicrobianas de los copolímeros se incrementan con el pH, de manera que todas las observaciones se hicieron entre pH 6,5 y 7,0, un pH alrededor de la mitad de una unidad por debajo del que se encontró durante la sepsis parenteral de cualquier tipo; además, esto se logró de manera bastante natural y se evitaron las complicaciones de las interacciones con una variedad de sales añadidas de diferentes tampones.)

### Ejemplo 2

10 Este ejemplo demuestra la preparación de un copolímero de la invención de peso molecular de aproximadamente 1000 Daltons, que comprende un segmento oligómero de polietilenglicol de peso molecular de 600 Daltons.

15 Se añadió lentamente durante 10 minutos una solución de acroleína recién destilada (5 g; inhibida con hidroquinona al 0,1% p/p) en agua (20 g) a una solución de agua (20g) y polietilenglicol (60 g; MW 600), que había adquirido pH 10 mediante la adición de hidróxido sódico acuoso 1 M. La composición se agitó vigorosamente antes y durante la adición de la acroleína para arrastrar aire y proporcionar un contacto abundante con el aire; se realizó una polimerización exotérmica y rápida y la temperatura se mantuvo entre aproximadamente 25° C y 35° C. Una vez comenzada la adición, el color amarillo de la hidroquinona oxidada apareció rápidamente y después desapareció, lo que dio como resultado una solución transparente.

20 Después de otros 50 minutos, la solución transparente se ajustó a pH 7 a 8 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 1 M; el producto fue una solución transparente, casi incolora (amarillo muy pálido). (El espectro UV-visible de 200-600 nM del producto solo tenía una absorción sustancial en el borde más alejado de la región 200-300 nM.)

La HPLC indicó que el rendimiento de la polimerización fue de 99-100% p/p, y cualquier monómero residual fue inferior a 1 ppm p/p; el MW fue de aproximadamente 1.000 Daltons. Cuando se probó hasta pH 1 (y hasta pH 14), el copolímero permaneció soluble. El polímero tiene un contenido de carbonilo de aproximadamente 0-10% p/p.

El copolímero eliminó *in vitro*, sin caldo, *E. coli* en 3 horas.

25 El copolímero tiene una actividad antimicrobiana *in vitro* sustancial contra bacterias *S. aureus* y *E. coli*. El Ensayo microbiológico se mantuvo inalterado luego del envejecimiento a 8° C/48 meses.

30 Se añadió polietilenglicol de MW 200 (120 mg) al copolímero (383 mg) y luego, una gota de hidróxido de sodio 1 M para llevar el pH a 11; después de reposar a temperatura ambiente durante 2 horas, el pH se ajustó a 7,5 con una gota de ácido clorhídrico 1 M y se mantuvo 3 días. Ni la HPLC ni la actividad antimicrobiana del copolímero cambiaron como resultado de este tratamiento.

### Ejemplo 3

Este Ejemplo examina la actividad de los copolímeros del Ejemplo 1 y del Ejemplo comparativo 1 después de la actividad repetitiva contra bacterias para examinar la propensión de las bacterias a desarrollar resistencia (Véase la Tabla 3).

35 Se inocularon tres organismos de ensayo -*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*- para lograr una concentración aproximada de 106 ufc/ml en las soluciones de ensayo; las soluciones de ensayo comprendían cada una 19 g de agua destilada estéril, 1 ml de caldo de tripticasa de soja y copolímero (Ejemplo 1: 383 mg; 5,4% p/p con acroleína añadida) o Ejemplo Comparativo 1: 303 mg; una solución al 6,7% p/p con acroleína añadida). Las soluciones de ensayo inoculadas, pH 6,5 a 7,0, se incubaron luego a 37° C durante períodos de tiempo suficientes de manera que se  
40 lograron aproximadamente 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> ufc/ml (o 99-99,9% de organismos) eliminados.

Se retiró una alícuota de 1 ml de cada solución y se mezcló durante un minuto con una alícuota de 1 ml alícuota de caldo de tripticasa de soja; luego se añadieron y mezclaron 8 ml de agua estéril. Posteriormente, se removieron las alícuotas (1 ml) de cada solución y se inocularon en césped mediante inundación sobre placas de agar de sangre de caballo (T durante 24-48 horas de incubación a 37° C. Se realizaron recuentos visuales de crecimiento bacteriano en

placas.

Se cultivaron generaciones sucesivas de *E. coli*, *S. aureus* o *P. aeruginosa* a partir de su selección mediante exposición repetida a un copolímero o amoxicilina; los organismos que sobreviven al tratamiento se cosecharon para otro ciclo de tratamiento - procedimiento que se repite hasta 25 veces.

5 Ambos copolímeros del Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 continuaron logrando una reducción normal de aproximadamente  $10^2$ - $10^3$  ufc/ml (o 99-99,9% de organismos) eliminados contra hasta 25 generaciones sucesivas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente, y en cada caso, sin ningún signo de resistencia incrementada a la actividad antimicrobiana de los copolímeros; los índices de eliminación antimicrobiana de la generación 1 y generaciones de sus superbacterias derivadas, en comparación, fueron las mismas.

10 Se considera que este es un método particularmente exigente para evaluar la propensión de las bacterias a desarrollar resistencia al antibiótico. Si la reducción de los recuentos es de una magnitud de  $10^3$  durante cada uno de 25 ciclos, se puede considerar que el germen resultante es el más resistente en una selección de 1 en  $10^{75}$ .

15 Los estudios paralelos que comparan tratamientos similares de *E. coli* y *S. aureus* con una solución al 0,35% p/p de antibiótico Amoxicilina dieron como resultado resistencia bacteriana después de la segunda y octava generación, respectivamente. El producto de copolímero de acroleína tenía índices antimicrobianos normales contra cada uno de estas "superbacterias" generadas.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Número de generaciones de microbios de resistencia

|                      | Copolímero<br>(Ejemplo 1) |           | Copolímero<br>(Ejemplo Comparativo 1) |           |
|----------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
|                      | Sin caldo                 | Con caldo | Sin caldo                             | Con caldo |
| <i>S. aureus</i>     |                           | >12       | >25                                   | >11       |
| Amoxicilina          |                           |           | 8                                     | 10        |
| <i>E. coli</i>       |                           | >25       | >25                                   |           |
| Amoxicilina          |                           |           | 2                                     | 8         |
| <i>P. aeruginosa</i> |                           | >25       | >25                                   | >9        |
| Amoxicilina          |                           |           |                                       | 6         |

20

**Ejemplo Comparativo 2 - Actividad antimicrobiana hidrófoba del polietilenglicol (PEG).**

Se demostró una actividad antimicrobiana mediante un mecanismo hidrófobo físico (a partir de PEG añadido solamente) por incubación a 37° C, 20 g de agua, 0,299 g de una solución al 30% p/p de PEG 2000, pH 6,5 y 10 e6cfu/ml de *E. coli* durante intervalos de tiempo de 0 minutos, 60 minutos, 24 horas y 48 horas, respectivamente; se observó la eliminación a las 48 horas.

25

**Ejemplo 4 - Simulación *in vitro* de condiciones ácidas residentes en el estómago**

Por duplicado, la solución acuosa de copolímero (1.,00 g) a agua (9 g) y luego se hace pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico al 10%; también por duplicado, como pieza en bruto, una solución acuosa de copolímero (1,00 g) se trató de manera similar, pero sustituyendo el mismo volumen de agua para el ácido clorhídrico.

30 Todas se calentaron a 37° C/4 horas; después se ajustaron a pH 6,5 a 7,0, antes del análisis de sus propiedades

físicas, químicas o microbiológicas.

### Ejemplos 5 a 9 - Experimentos *in vivo*

5 Todos los experimentos fueron previamente auditados y luego se supervisó el cumplimiento de los estándares internacionales para asegurar un trato humano de los animales. Todos los experimentos se realizaron en laboratorios independientes. En particular, todos los experimentos en los Ejemplos 6, 7 y 8 se hicieron en EE.UU. mediante protocolos prediseñados específicamente para investigar la sepsis y bacteriemia; los protocolos fueron "cegados" de la identidad de las soluciones de ensayo, tanto para el supervisor como para los asistentes. Todas las infecciones estaban en 100 µL, diseñadas para dar como resultado aproximadamente 10<sup>7</sup> ufc/ml de infección de sangre de ratón; los ratones eran de tipo BALB/c-diez por grupo en cada experimento. Los ratones se evaluaron mediante sacrificio seguido por la cuenta de ufc/g de bacterias dentro del o los órganos o dentro de una escala de 1 a 7 de Puntuación de Salud, incluso (1; alerta y saludable) a (5; enfermo y pelaje muy arrugado, sacrificado) a (7; fallecido). Los protocolos se tabulan y siguen.

#### Ejemplo 5

15 Este ejemplo examina la actividad *in vivo* del copolímero del Ejemplo Comparativo 1 y la eliminación de bacterias de la sangre durante 24 horas.

Se realizó un experimento preliminar con un copolímero PM 2500; Ejemplo Comparativo 1: 167 mg/kg de ratón. Se utilizaron dos grupos de 10 ratones: un grupo fue el grupo de tratamiento y el otro grupo no fue tratado. Ambos grupos de ratones se infectaron con *S. pyogenes* mediante inyección de cola. 15 minutos después de la infección, el grupo de ratones recibió una inyección de cola del copolímero del Ejemplo Comparativo 1 y el grupo no tratado, solución salina en lugar del tratamiento. La proporción porcentual de incidencia (ufc/ml) de *S. pyogenes* en la sangre de los grupos tratados y no tratados de ratones se monitoreó de 12 a 24 horas después de la infección y el resultado se muestra en la Figura 1.

#### Resumen

Vía de tratamiento: inyección de cola

25 Tiempo de tratamiento antes/después de la infección: 15 minutos después

*Procedimiento de ensayo por copolímero:* Ejemplo Comparativo 1; 167 mg/kg

Control negativo por vía de infección: inyección de cola

Infección por: *S. pyogenes*

Para los resultados, véase la Figura 1

30 La Figura 1 demuestra en primer lugar, que el copolímero *in vivo* tiene actividad antimicrobiana y, en segundo lugar, que las bacterias se eliminan naturalmente de la sangre dentro de veinticuatro horas (se determinó en otro lugar, mediante ensayo, a los riñones).

#### Ejemplo 6

35 Este Ejemplo examina la actividad *in vivo* del copolímero de la invención del Ejemplo 1 contra bacterias resistentes a antibióticos y compara la actividad con un control positivo (Oxacilina) y control negativo (solución salina).

40 El copolímero de la invención de MW 500; Ejemplo 1: 132 mg/kg de ratón, la Oxacilina de control positivo, 500 mg/kg y la solución salina de control negativo se administraron por inyección de cola a tres grupos de 10 ratones antes de la infección por inyección de cola con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300). Durante los siguientes 8 días, se registraron los índices de separación de los ratones dentro de los 3 grupos. La figura demuestra que el copolímero *in vivo* tiene actividad antimicrobiana contra la superbacteria *S. aureus*.

Los resultados del Ejemplo se muestran en la Figura 2.

#### Resumen

Vía de tratamiento: inyección de cola

Tiempo de tratamiento antes/después de la infección: 10 minutos antes

45 *Procedimiento de ensayo por copolímero:* Ejemplo 1 (Ej. 1); 132 mg/kg

Control negativo por: Solución Salina

Control positivo por: Oxacilina; 500 mg/kg

Ruta de infección: Inyección de Cola

Infección por: MRSA (*S. aureus* USA300)

Para los resultados, véase la Figura 2.

### Ejemplo 7

- 5 Este Ejemplo examina la eficacia del copolímero de la invención del Ejemplo 1 en el tratamiento de infección con bacterias resistentes a antibióticos y la seguridad del copolímero para administración parenteral.

Dos grupos de 10 ratones cada uno, ambos tratados con el copolímero de MW 500; Ejemplo 1 (Ej. 1); 132 mg/kg de ratón; un grupo de ratones ("infectado") se infectó con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) y el segundo grupo ("no infectado") no se infectó con las bacterias.

### 10 Resumen

Vía de tratamiento: inyección de cola

Tiempo de tratamiento antes/después de la infección: 10 minutos antes

Procedimiento de ensayo por copolímero: Ejemplo 1; 132 mg/kg

Vía de infección: infección por inyección de cola por: MRSA (*S. Aureus* USA300)

- 15 Para los resultados, véase la Figura 3.

La Figura 3 demuestra que, a esta concentración, en primer lugar, el copolímero no es sustancialmente tóxico y, en segundo lugar, el copolímero *in vivo* tiene actividad antimicrobiana contra superbacterias *S. aureus*.

### Ejemplo 8

- 20 Este ejemplo compara la eficacia del copolímero del Ejemplo 1 de conformidad con la invención con el del Ejemplo Comparativo 1 no de conformidad con la invención.

Dos grupos de 10 ratones cada uno se infectaron con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) y 24 horas después, cada grupo se trató de manera curativa con el copolímero de MW 500 del Ejemplo 1 a 132 mg/kg de ratón o el copolímero de MW de 2500 del Ejemplo Comparativo 1 a 167 mg/kg de ratón. La Figura 4 es un gráfico de ratones que sobrevivieron después de la selección debido a la morbilidad o mortalidad.

### 25 Resumen

Vía de tratamiento: sonda

Tiempo de tratamiento antes/después de la infección: 24 horas después

Procedimiento de ensayo por copolímero: Ejemplo 1; 132 mg/kg

Tratamiento comparativo por copolímero: Ejemplo Comparativo 1; 167 mg/kg

- 30 Control negativo por: -

Control positivo por: -

Vía de infección: infección por inyección de cola por: MRSA (*S. aureus* USA300)

Para los resultados, véase la Figura 4.

- 35 La Figura 4 muestra, en primer lugar, que el copolímero de bajo peso molecular de la invención exhibe mayor actividad en el tratamiento de infecciones parenterales *in vivo* y, en segundo lugar, que como control negativo (solución salina) dio una supervivencia comparable de solo 4 -el copolímero resiste el metabolismo inicial en el hígado.

### Ejemplo 9

- 40 Este ejemplo compara el índice de supervivencia después de la infección con bacterias resistentes a antibióticos de sujetos tratados con copolímeros de la invención del Ejemplo 1, con copolímeros del Ejemplo Comparativo 1, un control positivo (Oxacilina) y un control negativo (solución salina).

Cuatro grupos de 10 ratones cada uno se infectaron con la superbacteria *S. aureus* (*S. aureus* USA300) y 24 horas después, cada grupo fue tratado curativamente con el copolímero de MW 500 del Ejemplo 1 (Ej. 1) a 132 mg/kg de ratón, el copolímero de MW 2500 del Ejemplo Comparativo 1 (EC 1) a 167 mg/kg de ratón, oxacilina de control positivo, 500 mg/kg y solución salina de control negativo, respectivamente. La Figura 5 es un gráfico que muestra el número

de ratones separados debido a la morbilidad o mortalidad.

#### Sumario

Vía de tratamiento: inyección de cola

Tiempo de tratamiento antes/después de la infección: 24 horas después

5 Procedimiento de ensayo por copolímero: Ejemplo 1; 132 mg/kg

Tratamiento comparativo por copolímero: Ejemplo Comparativo 1; 167 mg/kg

Control positivo por: Oxacilina; 500 mg/kg

Control negativo por: Solución Salina

Vía de infección: infección por inyección de cola por: MRSA (*S. aureus* USA300)

10 Para los resultados, véase la Figura 5.

Es evidente a partir de la Figura 5 que el copolímero de inferior MW es más eficaz; también dio a los ratones supervivientes la puntuación de salud más baja (más saludable) = 1,0 comparado con 3,3, 2,5 y 3,3, respectivamente, lo que indica que su grupo ha recobrado una buena salud de manera más efectiva.

#### **Referencias**

15 S.V. Daudouin (2008), "Sepsis", Springer-Verlag

P..J Flory (1953), "Principles of Polymer Chemistry ", Cornell University Press.

G.J.H Melrose, C.M. Klepe, J.W. Lanley, J.M. Stewart and J. Van Dyk (1988), Publicación de Patente Internacional WO 88/04671.

G.J.H Melrose (1996), Publicación de Patente Internacional WO 96/38186.

20 G.J.H Melrose y A.J. Huxham (2000), Publicación de Patente Internacional WO 00 /03723.

G.J.H Melrose, G. Daly and A.J. Huxham (2001 ), Publicación de patente Internacional WO 01/60874 A1.

G.J.H Melrose, A.J. Huxham, D.M.G Tilbrook y V.L. Wycoco (2003), Publicación de Patente Internacional WO 03/061672 A1.

G.J.H Melrose (2009), Publicación de Patente Internacional WO 09/059350.

25 E.D. Peters (1962) en C.W. Smith, "Acrolein ", John Wiley and Sons, Capítulo 16, Página 240.

G. Odian (1981), "Principles of Polymerization", John Wiley and Sons, Segunda Edición.

J.A. Staton y G.J.H Melrose (2002), Publicación de Patente Internacional WO 02/2621 1 A1.

M. Tilbrook (2005), Patente Internacional WO 2005/044874 A1.

## REIVINDICACIONES

1. Un copolímero para usar en un método de tratamiento de una infección parenteral en un sujeto, donde el copolímero comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento de oligómero de polialquilenglicol y tiene un peso molecular de no más de 1000 Daltons.
- 5 2. El copolímero para el uso de conformidad con la reivindicación 1, donde el segmento derivado de acroleína es un oligómero de poli(acroleína) que comprende dos o más residuos de acroleína.
3. El copolímero para el uso de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el segmento de oligómero de polialquilenglicol es un polietilenglicol de peso molecular en el intervalo de 200 a 600 Daltons.
- 10 4. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la infección parenteral se selecciona del grupo que consiste en infecciones de la sangre (bacteriemia), meningitis, pulmones, tracto urinario, senos, piel, heridas, abscesos y procedimientos quirúrgicos.
5. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la infección parenteral es una infección resistente a antibióticos.
- 15 6. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la infección parenteral se selecciona entre sepsis y bacteriemia.
7. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el copolímero se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en administración oral, inhalación, administración transdérmica e inyección.
- 20 8. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el copolímero se administra por terapia intravenosa.
9. El copolímero para el uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el copolímero se administra como una solución acuosa que comprende el copolímero en el intervalo de 0,01 (3/0 en peso al 20% en peso de la solución).
- 25 10. El copolímero para el uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el copolímero se administra sistémicamente a una dosis en el intervalo de 1 mg a 1000 mg por kilogramo de peso corporal por día.
- 30 11. El copolímero para el uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la infección es una infección bacteriana, seleccionándose las bacterias del grupo que consiste en *Proteus spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*. Coagulasa negativa, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus spp*.
12. Un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína y un segmento de oligómero de polialquilenglicol, donde el copolímero tiene un peso molecular de no más de 1000 Daltons.
13. El copolímero de conformidad con la reivindicación 12, donde el segmento de oligómero de polialquilenglicol es polietilenglicol de peso molecular en el intervalo de 200 a 600 Daltons.
- 35 14. El copolímero de acuerdo con la reivindicación 12, formado por polimerización de acroleína en condiciones de catálisis alcalina a un pH de no más de 12,0 en una solución acuosa que comprende al menos 20% p/p de agua y oligómero de polialquilenglicol en una relación en peso de polialquilenglicol / acroleína de al menos 4.
- 40 15. Un proceso para la preparación de un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína y un oligómero de polialquilenglicol y que tiene un peso molecular de no más de 1000, que comprende polimerizar acroleína en condiciones de catálisis alcalina a un pH de no más de 12 en una solución acuosa que comprende al menos 20% p/p de agua y oligómero de polialquilenglicol en una relación en peso de polialquilenglicol/acroleína de al menos 4 para proporcionar dicho copolímero.

**RESUMEN**

Un método de tratamiento de infección en un sujeto que comprende administrar al sujeto un copolímero que comprende un segmento derivado de acroleína o un segmento de oligómero de poliacroleína y un segmento de oligómero de polialquilenglicol, el copolímero tiene un peso molecular de no más de 1500 Daltons.

Figura 1

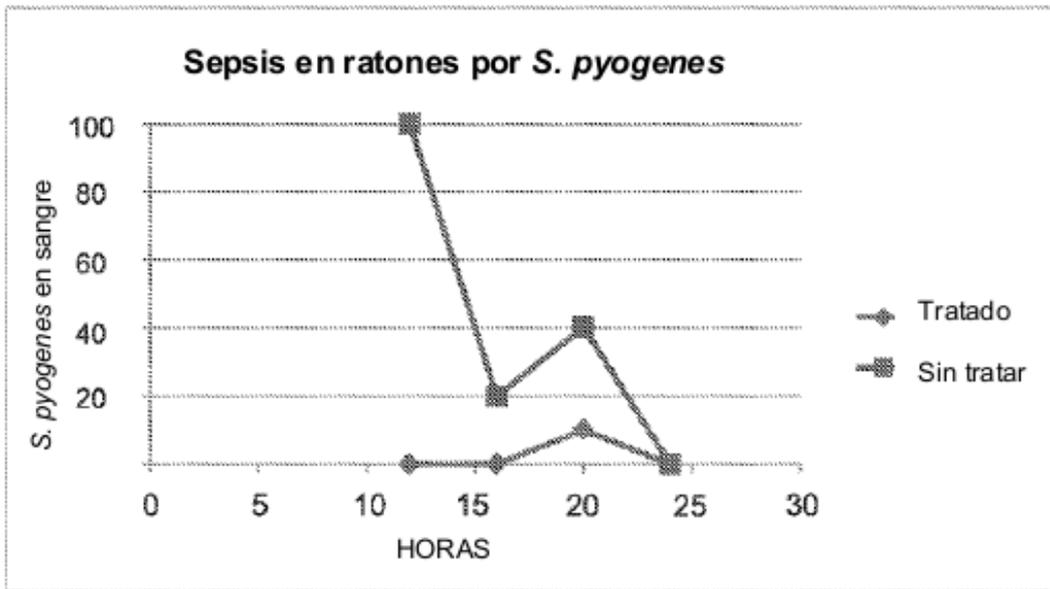


Figura 2

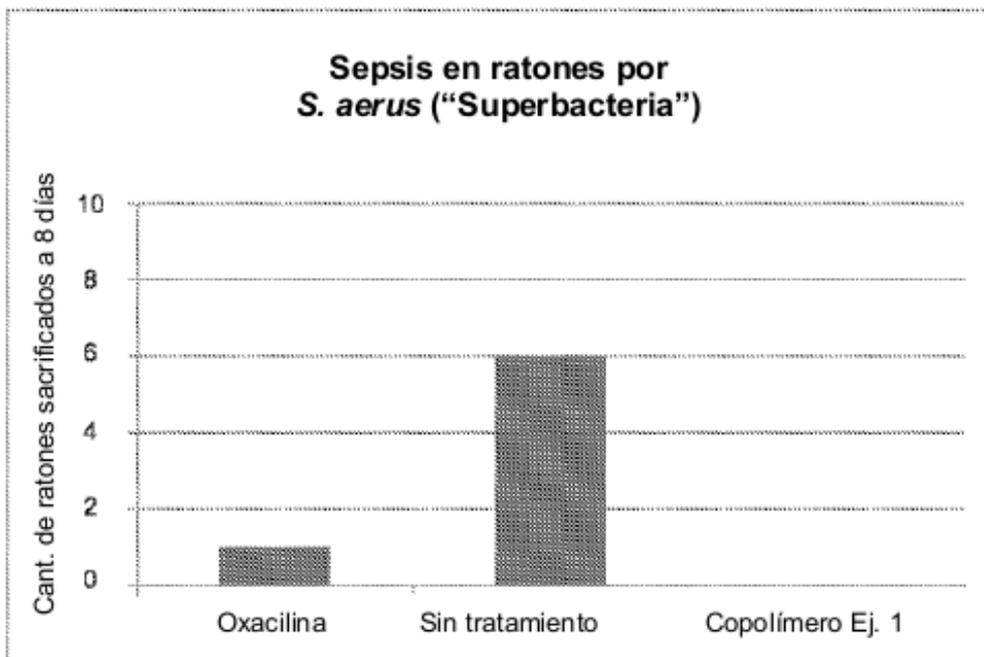
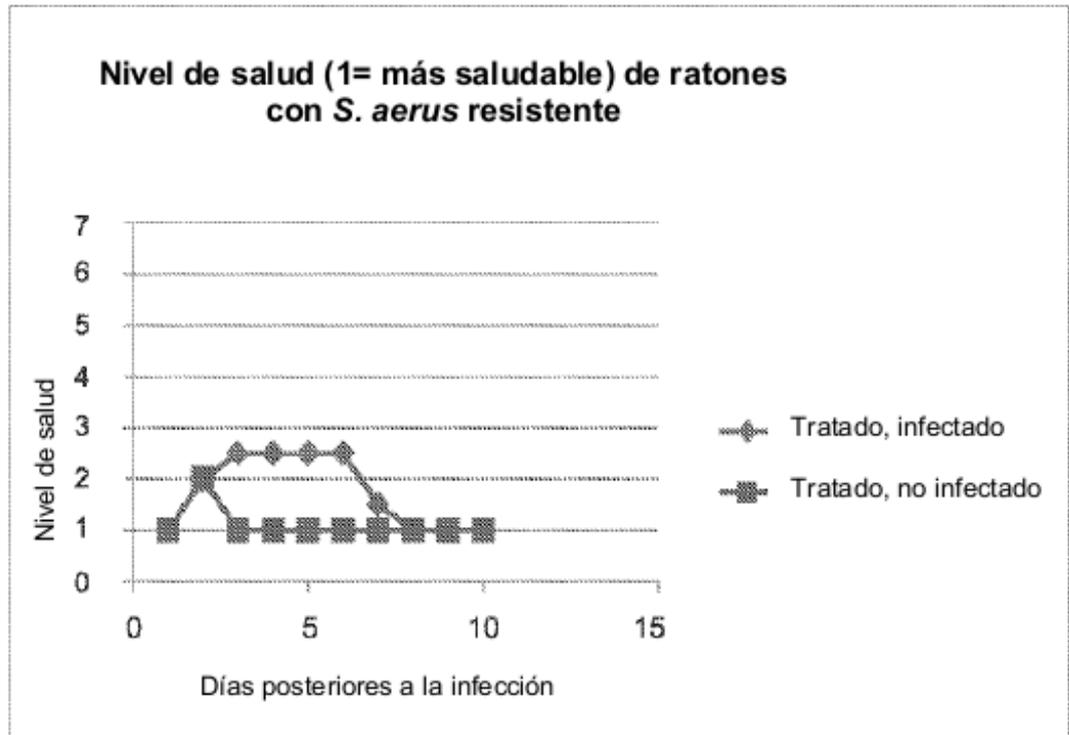


Figura 3



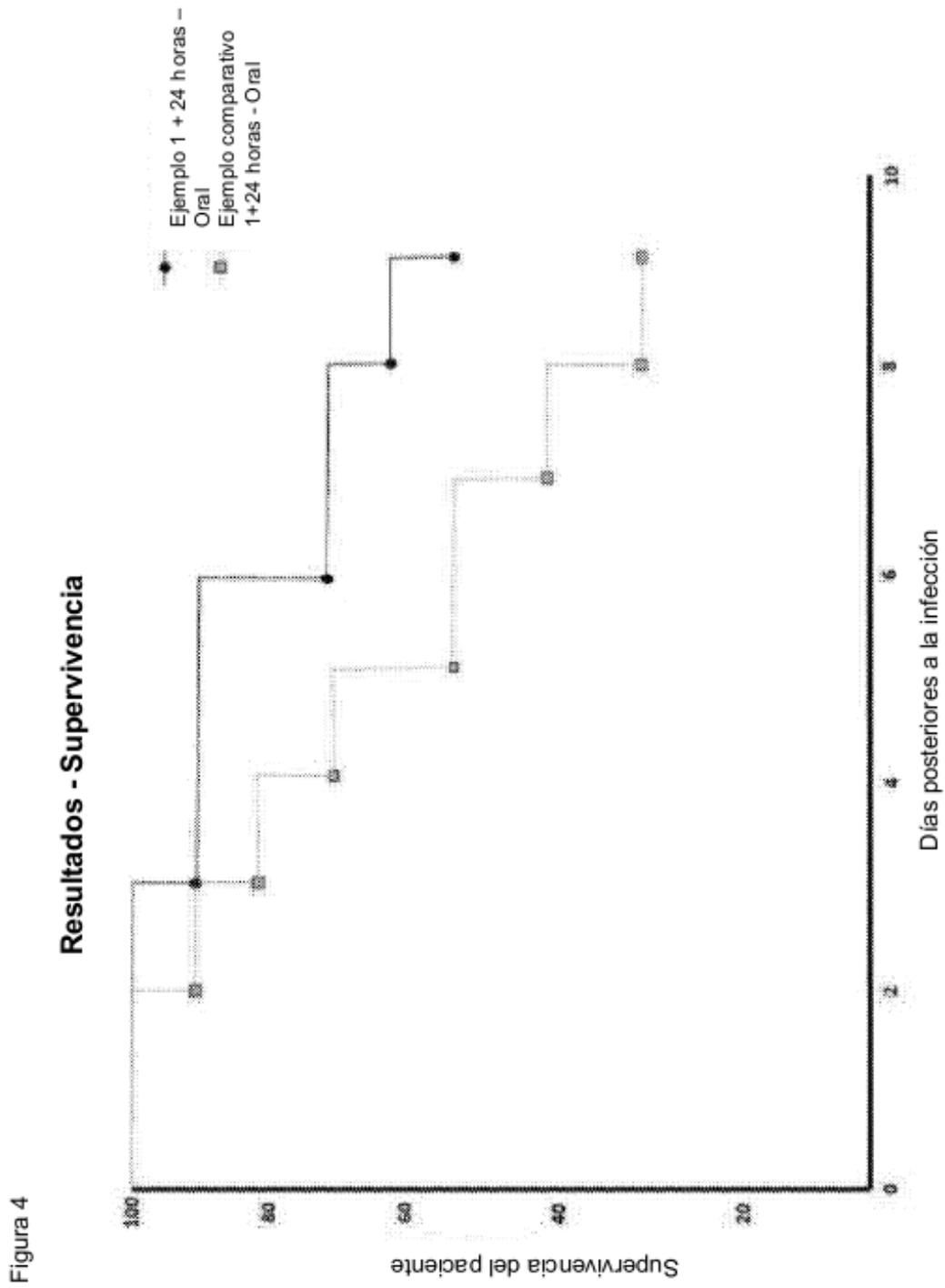


Figura 4

Figura 5

