



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 828**

51 Int. Cl.:
A61K 31/155 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04721079 .4**
86 Fecha de presentación : **17.03.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1605927**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Derivados de guanidina basados en diamina antimicrobially activos.**

30 Prioridad: **20.03.2003 AT A 453/2003**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **Geopharma ProduktionsgmbH**
Richard-Neutra-Gasse 5
1210 Wien, AT

72 Inventor/es: **Georgopoulos, Apostolos**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Derivados de guanidina basados en diamina antimicrobially activos.

5 La invención se refiere a una composición de medicamento con actividad antimicrobiana o microbicida, respectivamente.

10 Especialmente en años recientes, el desarrollo de nuevos antibióticos ha sido una carrera en creciente desarrollo contra la resistencia de los microorganismos. El tratamiento de infecciones nosocomiales, a menudo causadas por microorganismos resistentes, es uno de los principales problemas encontrados por los hospitales en todo el mundo. Las infecciones en el campo de la dermatología tales como infecciones posteriores a quemaduras en la piel, infecciones de heridas, úlceras por decúbito o acné, a menudo requieren tratamientos prolongados con antibióticos. Al mismo tiempo, el desarrollo de resistencias puede observarse con frecuencia en cepas de estafilococos y pseudomonas. Las infecciones del tracto gastrointestinal por *Helicobacter pylori* a menudo también representan un problema terapéutico. Más aún, 15 especialmente conjuntivitis, infecciones del oído, nariz y garganta, y regiones genitales causadas por bacterias o virus pueden significar problemas terapéuticos.

20 El objeto de la invención es proporcionar una nueva composición de medicamento que tenga una efectividad incrementada contra una pluralidad de microorganismos.

De conformidad con la invención, dicho objeto se logra usando un derivado de guanidina polimérico basado en una diamina que contiene cadenas de oxialquileo entre dos grupos amino, en donde el derivado de guanidina representa un producto de policondensación entre una sal ácida de adición de guanidina y una diamina que contiene cadenas de polioxialquileo entre grupos amino, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la 25 producción de una composición de medicamento con actividad microbiana.

Además, la invención se refiere el uso de sales de polioxialquilenguanidina preparadas utilizando trietilenglicoldiamina (masa molecular relativa: 148), polioxipropilendiamina (masa molecular relativa: 230), así como polioxietilendiamina (masa molecular relativa: 600).

30 Preferiblemente, el clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] que tiene por lo menos 3 grupos guanidinio está contenido como la sustancia del medicamento, con la masa molecular promedio variando en particular entre 500 y 3000 D.

35 Los derivados de guanidina poliméricos usados de conformidad con la invención se conocen a partir de PCT/AT01/00134.

Se describen a continuación la preparación de un representante preferido de los compuestos utilizados de conformidad con la invención así como la prueba de actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] con una masa molecular promedio de 1000 D ilustrativa para la clase de compuestos utilizados de conformidad con la invención se describe a continuación (CAS N° 374572-91-5).

40 Para preparar dicho compuesto, se disolvieron 4,43 moles de clorhidrato de guanidinio en trietilenglicoldiamina a 50°C. A continuación, esto se calentó a 120°C y se agitó durante dos horas a dicha temperatura. Posteriormente, se mantuvo esa temperatura durante dos horas, después se aplicó vacío (0,1 bar) y continuó la agitación bajo vacíos durante dos horas más a 170°C. A continuación, esto se aireó a presión normal, seguido por un enfriamiento a 120°C y se diluyó con agua desmineralizada a aproximadamente el 50%. Se neutralizó a un pH de aproximadamente 6 con ácido fosfórico, se dejó enfriar y se diluyó a la concentración deseada. Se determinó que el peso molecular era de 1000 D.

50 La sustancia de medicamento clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] presenta propiedades farmacodinámicas favorables, junto a una baja toxicidad y a una buena tolerancia desde un punto de vista farmacológico, y por lo tanto puede utilizarse como un medicamento en terapias antimicrobianas. La sustancia de medicamento presente en particular una excelente propiedad antimicrobiana que se podría demostrar a través de pruebas realizadas en una pluralidad de microorganismos tales como bacterias multirresistentes (que son resistentes contra los antibióticos comunes), hongos (*Blastomyces*, dermatofitos, mohos) y virus tales como el del herpes simple. Debido a la rápida actividad microbicida, nos espera un desarrollo de resistencia, como se muestra a través de las pruebas realizadas en un número comparativamente grande de cepas bacterianas (30 especies bacterianas y 30 pasajes).

60 Después de una administración sistémica (intravenosa o intraperitoneal) de clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] en cantidades de hasta 15 mg/kg de peso corporal, se midieron las concentraciones en el suero de hasta 100 µg/ml en sangre de rata después de dos horas, por lo que, al mismo tiempo, la tolerancia de buena. Estas concentraciones están significativamente por encima del nivel requerido para ser expuesto en una aplicación terapéutica. Al mismo tiempo, se observó una buena tolerancia incluso con una dosis alta, no se produjeron mortalidad ni efectos colaterales severos. Por lo tanto, se puede emplear el clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] como un agente 65 microbiano.

La sustancia de medicamento se puede administrar como una medicina en una forma de fármaco adecuada, sola o junto con adyuvantes inorgánicos u orgánicos farmacológicamente indiferentes. La sustancia, por ejemplo, se puede emplear como un componente de una pomada o una solución, en donde la concentración en la pomada puede alcanzar hasta aproximadamente entre 0,01 y 5 g de sustancia de medicamento por gramo de pomada o, en solución, hasta una concentración de 15 mg/kg de peso corporal. Debido a las propiedades farmacológicas favorables antes mencionadas, la aplicación comuna, dar o como una solución se puede considerar favorable en una pluralidad de indicaciones. Se consideran para este propósito en infecciones particulares de la piel, las membranas mucosas, los ojos, o del tracto gastrointestinal. En estas áreas, la sustancia de medicamento según la invención puede realizar esta forma una contribución importante para evitar resistencias a los antibióticos.

Actividad antimicrobiana

A fin de probar la actividad antimicrobiana, se probaron 334 microorganismos, aislados, clínicamente relevantes, y cepas de ATCC como gérmenes de referencia para su concentraciones mínimas de inhibición (MIC). Además, se examinó la destrucción respecto al tiempo y la concentración de gérmenes (curvas de aniquilación) así como el potencial para el desarrollo de resistencias.

1. Microorganismos

En total, se emplearon 323 bacterias de varias especies, 10 blastomyces así como un dermatofito. Los microorganismos probados se aislaron en el tracto respiratorio, el tracto urogenital, de la sangre y de otros materiales biológicos de pacientes según procedimientos de laboratorio estándares y se caracterizaron de manera precisa.

2. Sustancia de prueba

El cloruro de poli-[C2-(2-etoxi)-etoxietil]guanidinio] anteriormente descrito (masa molecular: 1000 D) se usó como una solución de abastecimiento en una solución acuosa al 25%. La solución se diluyó con agua estéril a la respectiva concentración fácil de utilizar. Las sustancias de pruebas se almacenaron a temperatura ambiente.

3. Determinación de la concentración mínima de inhibición (MIC)

Las actividades de la sustancia de prueba se examinaron por el procedimiento de microdilución en caldo de Mueller-Hinton según los lineamientos del NCCLS. El inóculo microbiano alcanzó por lo menos 5×10^5 CFU/ml y la incubación se llevó a cabo durante 16 a 20 horas 36°C /aire ambiental. La sustancia de medicamento se utiliza a concentraciones de 1000 $\mu\text{g/ml}$ a 0,001 $\mu\text{g/ml}$.

La combinación de sustancia de medicamento más baja en la cual no fue visible crecimiento bacteriano se definió como MIC. En cada lote de prueba, se incluyeron cepas de control de calidad de ATCC con una MIC conocida.

4. Desarrollo de resistencia

Con base en los valores de MIC, se emplearon 30 cepas bacterianas para experimentos sobre el desarrollo de resistencia:

Gérmenes gram-positivos: MSSA (n=1), MRSA (n=2), MRSE (n=4), VRE (n=5), *S. aureus* ATCC 29213.

Gérmenes gram-negativos: *E. coli* multiresistente (n=4), *Klebsiella pneumoniae* (n=1), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (n=4), *Acinetobacter sp.* (n=2) y *E. coli* ATCC 35218 y 25922.

Todas las cepas se incubaron con una sustancia de prueba a concentraciones de entre 1000 $\mu\text{g/ml}$ y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas. Los tubos de prueba en los cuales se detectó crecimiento de bacterias después del primer pasaje se emplearon como inóculo para el segundo pasaje. Para cada cepa bacteriana, se realizaron 30 pasajes, en donde la nueva MIC siempre se comparó con la MIC del inicio de los experimentos (1º pasaje).

5. Destrucción de gérmenes dependiente del tiempo en la concentración

Para medir el potencial microbicida de la sustancia de medicamento, se emplearon dos cepas multirresistentes de estafilococos, enterococos, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en cada caso.

La velocidad de destrucción se verificó después de la adición (tiempo 0) de la suspensión bacteriana (1×10^6 a 5×10^6 CFU/ml) y después de 2, 5, 10 y 30 minutos.

En estos experimentos, se realizó una reducción de gérmenes cuantitativa en cualquier tiempo y a cualquier concentración. La sustancia de medicamento se utilizó en concentraciones de 10%, 1%, 0,1% y 0,001%. Como un control, siempre se incluyó una serie sin sustancia de medicamento.

6. Concentración mínima de inhibición (MIC)

Los resultados de la prueba de MIC se resumen en lo cuadro 1 5.

5 En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*, la sustancia de medicamento mostró una actividad muy buena con valores de MIC de 4 a 30 µg/ml, independientemente del perfil de resistencia de los aislados contra antibióticos. Los estafilococos multirresistentes (MRSA) también mostraron MIC en este intervalo de tiempo (cuadro 1).

10 Las pruebas para *Enterococcus faecalis* también dieron valores de MIC de 16 a 32 µg/ml (cuadro 1), en donde las cepas de enterococos multirresistentes y resistentes a la vancomicina (n=5) nuevamente no difirieron de los aislados sensibles.

15 Enterobacterias: con respecto a las especies de *E. coli*, *Klebsiella*, la especie de *Enterobacter* y *Proteus mirabilis*, la sustancia de medicamento dio muy buenos resultados con valores de MIC de 4 a 32 µg/ml (cuadro 2).

Las *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica* que se probaron también se paralizaron muy bien (cuadro 3).

20 El grupo no fermentador, *Pseudomonas aeruginosa* y especie de *Acinetobacter*, también se volvió sensible contra la sustancia del medicamento, con valores de MIC de 4 32 µg/ml (cuadro 3).

También en este caso, la buena efectividad de la sustancia de medicamento utilizada según la invención se mostró en cinco aislados de *Pseudomonas* que fueron resistentes contra todo los antibióticos clínicamente importantes.

25 La sustancia de medicamento fue también efectiva contra *Mycobacterium tuberculosis*, complejo de *avium*, *kansaii* y *gordoniae* (cuadro 4) con valor de MIC de 16 a 32 µg/ml.

30 Las pruebas de especies de hongos clínicamente importantes tales como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* (*blastomyces*) así como *Trichophyton mentagrophytes* (dermatofitos) también dieron actividad antimicótica muy buena (valores de MIC 8 a 32 µg/ml) (cuadro 5).

7. Desarrollo de resistencia

35 Para este propósito, se emplea un total de 30 gérmenes de no especies bacterianas patógenas diferentes - gérmenes gram-positivos tales como *Staphylococcus aureus* y *epidermidis* así como gérmenes gram-negativos tales como *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*. Se probaron tanto las cepas de ATCC sensibles como multirresistentes aislados clínicamente.

40 Después de 30 pasajes, no se pudo observar desarrollo de resistencia en ambos grupos, es decir, no se detectó incremento en los valores de MIC.

8. Destrucción de gérmenes dependiente del tiempo de la concentración

45 A fin de evaluar la propiedad bactericida de la sustancia de medicamento, se determinó la velocidad de la destrucción de bacterias.

50 Para los experimentos, se emplearon en cada caso dos cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

55 En el caso de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, el poder de destrucción de la sustancia de medicamento persistió hasta una concentración de 0,01%, inmediatamente después del adición del inoculo (0 a 30 segundos).

En el caso de enterococos, fue necesario un período de 10 a 30 minutos para la destrucción de los gérmenes, con una concentración de 0,01% de sustancia de medicamento.

ES 2 299 828 T3

TABLA 1

Efectividad contra bacterias gram-positivas

Especies	Número de cepas n (%) que tienen una CIM (en mg/l) de			
	4	8	16	32
MSSA (n = 35)	0 (0)	6 (17,1)	20 (57,1)	9 (25,8)
MRSA (n = 60)	3 (5)	10 (16,7)	38 (63,3)	9 (15)
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 32)	0 (0)	0 (0)	16 (50)	16 (50)

TABLA 2

Efectividad contra Enterobacteriaceae

Especies	Número de cepas n (%) que tienen una CIM (en mg/l) de			
	4	8	16	32
<i>Klebsiella spp.</i> (n = 43)	0 (0)	5 (11,6)	18 (41,9)	20 (46,5)
<i>Escherichia coli</i> (n = 59)	2 (3,4)	17 (28,8)	39 (66,1)	1 (1,7)
<i>Enterobacter spp.</i> (n = 17)	1 (5,9)	1 (5,9)	12 (70,6)	3 (17,6)
<i>Proteus spp.</i> (n = 7)	0 (0)	0 (0)	3 (42,9)	4 (57,1)

ES 2 299 828 T3

TABLA 3

Efectividad contra bacterias gram-negativas

Especies	Número de cepas n (%) que tienen una CIM (en mg/l) de			
	4	8	16	32
<i>Pseudomonas spp.</i> (n = 55)	1 (1,8)	5 (9,1)	32 (58,2)	17 (30,9)
<i>Acinetobacter spp.</i> (n = 2)	0 (na)	0 (na)	1 (na)	1 (na)
<i>Salmonella spp.</i> (n = 6)	0 (na)	2 (na)	4 (na)	0 (na)
<i>Shigella spp.</i> (n = 2)	0 (na)	0 (na)	1 (na)	1 (na)
<i>Yersinia enterocolitica</i> (n = 1)	0 (na)	0 (na)	0 (na)	1 (na)

TABLA 4

Efectividad contra Mycobacteria

Especies	Número de cepas n (%) que tienen una CIM (en mg/l) de			
	4	8	16	32
<i>Mykobakterium spp.</i> (n = 6)	0 (na)	0 (na)	5 (na)	1 (na)

TABLA 5

Efectividad contra hongos

Especies	Número de cepas n (%) que tienen una CIM (en mg/l) de			
	4	8	16	32
<i>Candida spp.</i> (n = 10)	0 (na)	1 (na)	3 (na)	6 (na)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (n = 1)	0 (na)	0 (na)	1 (na)	0 (na)

Actividad clínica

A fin de confirmar la buena actividad *in vitro* de la sustancia de medicamento *in vivo*, se emplea la sustancia bajo condiciones clínicas en pacientes voluntarios que padecían infecciones problemáticas. La sustancia se usó en una solución acuosa o en forma de gel a una concentración de 0,5%.

Pacientes

- 12 pacientes con edad de 35 a 62 años se trataron con la sustancia de medicamento.
- 2 pacientes que padecían gastritis crónica (*Helicobacter pylori* positivo).
- 3 pacientes que padecían inflamaciones crónicas de la encía y la mucosa oral.
- 3 pacientes que padecían de inflamación crónica de mucosa vaginal.
- 1 paciente que padecía de gangrena del pie.
- 3 pacientes que padecían de onicomycosis (1 paciente que padecía de micosis de las manos, 2 pacientes que padecían de micosis de los pies).

Resultados

La efectividad clínica de la sustancia de medicamento en 12 pacientes seleccionados se resume en el cuadro 6. También se puede ver el tipo de tratamiento, duración del tratamiento, señales clínicas principales y éxito clínico.

En breve, se pudo observar efectividad clínica convincente en todos los 12 casos después de un período de tratamiento de 2 a 28 días. Se produjo una clara mejora de los signos principales, viéndose que la tolerancia local fue excelente. En ninguno de los casos se produjeron efectos colaterales tales como enrojecimiento, irritaciones o náuseas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

Número de Pacientes	Indicación	Síntomas clínicos	Tipo de Tratamiento	Duración del tratamiento (en días)	Éxito clínico
2	Gastritis crónica (<i>H. pylori</i> positivo)	Sensibilidad al ácido gástrico al presionar, acidosis	Solución al 0,5% oralmente, dos veces al día	14	Sin quejas
3	Inflamación de encía y mucosa oral.	Centros de inflamación dolorosos, hemorragia en las encías	Solución al 0,5% localmente, dos veces al día	2	Cicatrización significativa, sin dolor, sin hemorragia de las encías
3	Inflamación de mucosa vaginal	Ardor, flujo, comezón	Solución al 0,5% localmente, dos veces al día	5	Sin quejas
1	Gangrena del pie	Cambios ulcerosos, penetración edematosa, mal olor, cirugía contraindicada	Solución al 0,5% localmente, tres veces al día	28	Mejora clara de hallazgos locales, sin desarrollo de olor, inicio de preparaciones quirúrgicas
3	Micosis de manos y pies	Comezón, deformación y cambios de color de las	Solución al 0,5% localmente, tres veces	28	Sin comezón, Nuevo crecimiento de uña sana.

Número de Pacien- tes	Indicación	Síntomas clínicos	Tipo de Trata- miento	Duración del trata- miento (en días)	Éxito clínico
		uñas	al día		

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado el máximo cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP se descarga de cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- AT0100134W [0007]

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un derivado polimérico de guanidina basado en una diamina que contiene cadenas de oxialquileno entre dos grupos amino, representando el derivado de guanidina un producto de policondensación entre una sal de adición ácida de guanidina y una diamina que contiene cadenas de polioxialquileno entre dos grupos amino, para la producción de una composición de medicamento con actividad microbiana.

10 2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que, entre los representantes de la familia de sales de polioxialquileno guanidina, se encuentran trietilenglicoldiamina (masa molecular relativa: 148), polioxi-propilendiamina (masa molecular relativa: 230), así como polioxietilendiamina (masa molecular relativa: 600).

15 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** por el hecho de que se emplea clorhidrato de poli-[2-(2-etoxietoxietil)guanidinio] que tiene al menos 3 grupos guanidinio.

20 4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que la masa molecular promedio de la sustancia de medicamento varía entre 500 y 3000.

25 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que la composición del medicamento se diseña como una composición de medicamento para uso veterinario.

30

35

40

45

50

55

60

65