



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 998 053**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 35/66** (2015.01)  
**A61K 38/14** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2018** PCT/US2018/045395  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** WO19028463  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2018** E 18842362 (8)  
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** EP 3661531

⑮ Título: **Paenipeptinas lipopeptídicas lineales y métodos de uso de las mismas**

⑯ Prioridad:

**04.08.2017 US 201762541200 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2025**

⑯ Titular/es:

**BIOVENTURES, LLC (100.00%)**  
4301 W. Markham St. 831  
Little Rock, Arkansas 72205, US

⑯ Inventor/es:

**HUANG, EN;**  
**MOON, SUN, HEE;**  
**SMELTZER, MARK y**  
**MEEKER, DANIEL**

⑯ Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones:

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

**ES 2 998 053 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Paenipeptinas lipopeptídicas lineales y métodos de uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

La tecnología divulgada en el presente documento se refiere generalmente a las paenipeptinas lipopeptídicas lineales y a los métodos de uso de las mismas como agentes antimicrobianos y potenciadores.

10 **Listado de secuencias**

Esta solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web e incluye una lista de secuencias enviada electrónicamente en formato .txt. El archivo .txt contiene un listado de secuencias titulado "2018-08-06\_6401-00035\_ST25.txt", creado el 6 de agosto de 2018, y tiene un tamaño de 7960 bytes. El Listado de secuencias contenido en este archivo .txt forma parte de la memoria descriptiva.

15 **Antecedentes**

20 La aparición continua y la rápida diseminación de patógenos resistentes a los antibióticos se están convirtiendo en una amenaza importante para la salud pública. Las infecciones causadas por las *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE, por sus siglas en inglés), que son difíciles de tratar y a menudo intratables, se reconocieron como una de las amenazas urgentes entre los pacientes en los centros médicos. Otras amenazas graves causadas por patógenos resistentes a los medicamentos incluyen *Acinetobacter* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Campylobacter* farmacorresistente, *Enterococcus* resistente a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (CDC, 2013). Recientemente, se informó del gen de resistencia a la polimixina mediada por plásmidos, *mcr-1*, de bacterias gramnegativas en muchos países de todo el mundo (Liu *et al.*, 2016). Estos hallazgos implicaron una importante brecha en la última línea de defensa contra los patógenos farmacorresistentes. Para agravar la preocupación, muchos patógenos bacterianos son capaces de formar biopelículas, que son agregados celulares incrustados en la matriz, intrínsecamente tolerantes a la mayoría de los tratamientos con antibióticos, tanto en los 25 tejidos hospedadores nativos como en los dispositivos médicos permanentes (Flemming *et al.*, 2016). Las infecciones graves causadas por patógenos resistentes a los antibióticos se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad y contribuyen a costes económicos significativos. Por lo tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar agentes antimicrobianos novedosos, seguros y eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos farmacorresistentes y formadores de biopelículas.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones.

40 En el presente documento se divultan paenipeptinas lipopeptídicas lineales, productos que comprenden los lipopéptidos y métodos para usar los mismos. Un aspecto de la invención es una composición antimicrobiana que comprende un lipopéptido lineal, comprendiendo el lipopéptido un péptido que tiene al menos un 66 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 interpuesto entre un extremo lipófilo -R<sup>1</sup> y un extremo amino -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>. R<sup>1</sup> comprende un alcanoilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> sustituido, ramificado o no ramificado de fórmula R<sup>5</sup>-CH(NH<sub>2</sub>)-C(=O)-, en donde R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo y bifenilalquilo, y R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Convenientemente, la composición puede poseer una o más de las siguientes propiedades:

- 50 (a) el lipopéptido tiene una concentración inhibitoria mínima inferior o igual a 8,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo;  
 (b) el lipopéptido tiene una concentración bactericida mínima inferior o igual a 16,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo;  
 (c) el lipopéptido tiene un porcentaje de hemólisis inferior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 128 µg/ml;  
 55 (d) el lipopéptido tiene un porcentaje de viabilidad superior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 105 µg/ml;  
 (e) el lipopéptido tiene un factor de sensibilización superior o igual a 128 para un agente antimicrobiano contra un microbio; o  
 (f) la composición tiene una cantidad eficaz del lipopéptido para una actividad antibiopelícula de al menos una 60 reducción de 2,0 log en microbios viables sobre una superficie.

Convenientemente, la composición puede poseer al menos dos, tres, cuatro, cinco o todas las propiedades seleccionadas de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

65 En algunas realizaciones, el péptido comprende R<sup>1</sup>-X<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-X<sup>7</sup>-X<sup>8</sup>-X<sup>9</sup>-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, donde:

X<sup>1</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Lys y Arg;  
 X<sup>2</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Ile, Val, Phe, Dap y Phephe;  
 X<sup>3</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Thr, Lys y Arg;  
 5 X<sup>4</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en dLeu, dPhe y Phephe;  
 X<sup>5</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Leu, Phe y Phephe;  
 X<sup>6</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Lys y Arg;  
 X<sup>7</sup> 10 puede seleccionarse del grupo que consiste en dVal, dLeu, dPhe y Phephe;  
 X<sup>8</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Leu, Phe, Phephe y Octgly; y/o  
 X<sup>9</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en Ser y Dab.

10 De acuerdo con lo divulgado en el presente documento, -R<sup>1</sup> puede comprender: R<sup>4</sup>-C(=O)- o R<sup>5</sup>-CH(NH<sub>2</sub>)-C(=O)-. Convenientemente, R<sup>4</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo, bifenilalquilo, alquilamina, cicloalquilamina, fenilalquilamina, bifenilalquilamina, alcoxi, cicloalcoxi, fenilalcoxi o bifenilalcoxi o R<sup>5</sup> puede seleccionarse del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo y bifenilalquilo. En determinadas realizaciones, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan de hidrógeno.

15 Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender además un agente antimicrobiano, tal como un agente antibacteriano. Convenientemente, la composición que comprende el agente antimicrobiano puede poseer una o más de las siguientes propiedades:

- 20 (a) el agente antimicrobiano tiene una concentración inhibitoria mínima contra un microbio en presencia del lipopéptido inferior a una concentración inhibitoria mínima contra el microbio en ausencia del lipopéptido en un medio de cultivo;  
 25 (b) el agente antimicrobiano tiene una concentración bactericida mínima contra un microbio en presencia del lipopéptido inferior a una concentración bactericida mínima contra el microbio en ausencia del lipopéptido en un medio de cultivo;  
 (c) el lipopéptido tiene un factor de sensibilización superior o igual a 128 para el agente antimicrobiano contra un microbio; o  
 30 (d) la composición tiene una cantidad eficaz del lipopéptido y/o el agente antimicrobiano para una actividad antibiopelícula de al menos una reducción de 2,0 log en microbios viables sobre una superficie.

Convenientemente, la composición puede poseer al menos dos, tres o todas las propiedades seleccionadas de (a), (b), (c) o (d). El agente antimicrobiano puede comprender un agente antibacteriano. Los agentes antimicrobianos de ejemplo incluyen, sin limitación, ampicilina, claritromicina, eritromicina, rifampicina o vancomicina.

35 Otro aspecto de la invención comprende productos antimicrobianos que comprenden cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. Uno de dichos productos es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento y un excipiente, un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Otro de dichos productos es un producto antibiopelícula que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento formulado para su aplicación a una superficie. Convenientemente, el producto antibiopelícula puede formularse en forma de una nebulización, un ungüento, un gel, una espuma, una pasta, un hidrogel o un hidrocoloide. Las superficies de ejemplo adecuadas para la aplicación del producto antibiopelícula incluyen, sin limitación, una superficie de dispositivo médico, una superficie de instrumento médico, una superficie de implante médico, una superficie de vendaje, una superficie de herida o la piel. El producto antibiopelícula puede comprender un dispositivo médico, un instrumento médico, un implante médico o un vendaje que tenga cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento dispuestas sobre el mismo. Otro producto de este tipo es un vendaje que comprende un apósito y una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento para tratar o prevenir una infección microbiana o una biopelícula microbiana en una herida o la piel. El apósito puede comprender un tejido, una esponja, un alginato, un colágeno, una película, una lámina de gel, un relleno para heridas, un hidrogel, un hidrocoloide o una combinación de los mismos.

55 Las composiciones antimicrobianas son eficaces para inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio. Otro aspecto de la invención comprende un método para inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio *in vitro*. El método puede comprender poner en contacto el microbio con una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento o cualquiera de los productos antimicrobianos descritos en el presente documento, incluyendo cualquiera de las composiciones farmacéuticas, productos antibiopelícula o vendajes descritos en el presente documento.

60 Las composiciones antimicrobianas también son eficaces para prevenir la formación de una biopelícula sobre una superficie o inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio en la biopelícula. Otro aspecto de la invención comprende un método para prevenir la formación de una biopelícula sobre una superficie o para inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio en la biopelícula *in vitro*. El método puede comprender poner en contacto la superficie o una biopelícula dispuesta sobre la misma con una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento o cualquiera de los productos antimicrobianos descritos en el presente documento, incluyendo cualquiera de las composiciones farmacéuticas, productos antibiopelícula o vendajes

descritos en el presente documento. Las superficies de ejemplo adecuadas para la aplicación del producto antibiopelícula incluyen, sin limitación, una superficie de dispositivo médico, una superficie de instrumento médico, una superficie de implante médico, una superficie de vendaje.

5 Las composiciones antimicrobianas también son eficaces para prevenir una infección microbiana o tratar la infección microbiana en o sobre un sujeto. Otro aspecto de la invención comprende la composición antimicrobiana para su uso en la prevención de una infección microbiana o el tratamiento de la infección microbiana en o sobre un sujeto. El método puede comprender la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las 10 composiciones descritas en el presente documento o cualquiera de los productos antimicrobianos descritos en el presente documento, incluyendo cualquiera de las composiciones farmacéuticas, productos antibiopelícula o vendajes descritos en el presente documento. Las composiciones o productos antibiopelícula pueden administrarse por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica y pulmonar.

15 Convenientemente, los microbios descritos en el presente documento pueden ser bacterias, *por ejemplo*, bacterias gramnegativas o bacterias grampositivas, ya sea que estén presentes o no en una biopelícula. En algunas realizaciones, los microbios son bacterias farmacorresistentes. Esto incluye bacterias gramnegativas farmacorresistentes o bacterias grampositivas farmacorresistentes. Las bacterias gramnegativas de ejemplo incluyen, sin limitación, *E. coli*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Las bacterias grampositivas de ejemplo incluyen, sin limitación, *E. faecium* y *S. aureus*. Las bacterias farmacorresistentes de ejemplo incluyen, sin 20 limitación, bacterias resistentes a carbapenem, bacterias resistentes a meticilina o bacterias resistentes a polimixina. Convenientemente, las biopelículas pueden estar formadas por o comprender cualquiera de los microbios descritos en el presente documento. Convenientemente, las infecciones pueden ser infecciones de cualquiera de los microbios descritos en el presente documento.

25 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1A-1B muestran curvas de letalidad de patógenos con exposición al análogo 17 a razón de 0-32 µg/ml. (Figura 1A) ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*; (Figura 1B) ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*. Los 30 valores se expresan como media (número de experimentos, 3) y las barras de error representan las desviaciones estándar.

Las figuras 2A-2B muestran la actividad relativa de los antibióticos contra las biopelículas establecidas en los catéteres *in vitro*. (Figura 2A) Análogo de paenipeptina 17, ceftarolina (Cef) y daptomicina (Dap) contra una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina LAC. La actividad se determinó en concentraciones correspondientes a 5 veces, 10 veces o 20 veces la concentración correspondiente a la CIM para cada antibiótico contra la cepa LAC. (Figura 2B) Análogo 17 y polimixina B (PMB) contra ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad se determinó en concentraciones correspondientes a 10 veces, 20 veces, 40 veces u 80 veces la concentración correspondiente a la CIM para cada antibiótico contra ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. Los resultados se evaluaron después de 72 h de exposición al antibiótico. Los valores se expresan como medias (número de experimentos, 6). Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre los grupos (p <0,05).

40 Las figuras 3A-3B muestran el impacto del lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA) en la actividad antimicrobiana del análogo 17 de paenipeptina. (Figura 3A) ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*, análogo 17 a razón de 16 µg/ml; (Figura 3B) ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*, análogo 17 a razón de 32 µg/ml. Los 45 valores se expresan como media (número de experimentos, al menos 3) y las barras de error representan las desviaciones estándar. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre los grupos (p <0,05).

Las figuras 4A-4B muestran los cambios en el potencial de membrana bacteriana en presencia del análogo 17 de paenipeptina. (Figura 4A) ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*; (Figura 4B) ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*. Los valores se expresan como media (número de experimentos, 3) y las barras de error representan las 50 desviaciones estándar. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre los grupos (p <0,05).

Las figuras 5A-5B muestran la liberación de iones de potasio intracelulares de las células bacterianas en presencia del análogo 17 de paenipeptina. (Figura 5A) ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*; (Figura 5B) ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus*. Los valores se expresan como media (número de experimentos, 3) y las barras de error representan las 55 desviaciones estándar. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre los grupos (p <0,05).

Las figuras 6A-6B muestran curvas de letalidad de patógenos resistentes a carbapenem con exposición al análogo 1 o 15 solo a razón de 4 µg/ml y junto con claritromicina (CLR) o rifampicina (RIF) a razón de 1 µg/ml en caldo de soja tríptica (TSB). (Figura 6A) FDA-CDC AR0063 de *Acinetobacter baumannii*; (Figura 6B) FDA-CDC AR0097 de *Klebsiella pneumoniae*. Los valores se expresan como medias (número de réplicas biológicas independientes, al menos 3) y las barras de error representan desviaciones estándar. Las medias al final de 24 h con letras diferentes 60 son significativamente diferentes entre los grupos (p <0,05).

Las figuras 7A-7B muestran curvas de letalidad de patógenos resistentes a carbapenem con exposición al análogo 1 o 15 solo a razón de 4 µg/ml y junto con claritromicina (CLR) o rifampicina (RIF) a razón de 4 µg/ml en suero humano al 95 % *in vitro*. (Figura 7A) FDA-CDC AR0063 de *Acinetobacter baumannii*; (Figura 7B) FDA-CDC AR0097 de *Klebsiella pneumoniae*. Los valores se expresan como medias (número de réplicas biológicas 65

independientes, al menos 3) y las barras de error representan desviaciones estándar. Las medias al final de 24 h con letras diferentes son significativamente diferentes entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

#### Descripción detallada de la invención

5 En el presente documento se divultan paenipeptinas lipopeptídicas lineales, productos que comprenden los lipopéptidos y métodos para usar los mismos. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, los lipopéptidos divulgados tienen actividad antimicrobiana y antibioléptica. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que las paenipeptinas divulgadas en el presente documento alteran y dañan la membrana citoplasmática de los microbios.

10 La alteración de la membrana citoplasmática puede ser directamente citotóxica para los microbios, lo que hace que la paenipeptina sea un agente antimicrobiano. En otros casos, la alteración de la membrana citoplasmática puede facilitar el transporte de otros agentes antimicrobianos para potenciar la citotoxicidad del otro agente. En cualquier caso, las composiciones divulgadas en el presente documento son capaces de inhibir la proliferación de microbios y de tratar infecciones microbianas.

15 25 Las composiciones divulgadas en el presente documento son eficaces contra bacterias gramnegativas, incluyendo bacterias farmacorresistentes. Las bacterias gramnegativas son intrínsecamente resistentes a grandes moléculas hidrófobas, incluidos muchos antibióticos, como resultado de la barrera de permeabilidad de la membrana externa. La integridad de la membrana externa reside en la red de lipopolisacáridos aniónicos (LPS) unidos por cationes divalentes ( $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) en la superficie celular. Los lipopéptidos catiónicos, tales como las paenipeptinas divulgadas en el presente documento, que tienen afinidad por los LPS, desorganizan la membrana externa, lo que proporciona actividad antimicrobiana y/o permite la entrada de antibióticos existentes. Los lipopéptidos divulgados tienen actividad antimicrobiana y/o sensibilizan los microbios a los agentes antimicrobianos coadministrados. Como resultado, los lipopéptidos lineales permiten nuevos productos antimicrobianos y usos de los mismos.

#### Lipopéptidos lineales

"Paenipeptina lipopeptídica lineal" (que también puede denominarse "lipopéptido" o "paenipeptina") significa un lipopéptido que comprende un extremo lipófilo, un extremo amino y un péptido interpuesto entre los mismos. Existen 30 tres características estructurales características de la paenipeptina lipopeptídica lineal: una cadena en el extremo N hidrófoba, residuos cargados positivamente y aminoácidos hidrófobos. Como resultado, pueden desarrollarse fácilmente análogos seleccionando la longitud del extremo lipófilo o la estructura del extremo lipófilo; modulando el carácter catiónico de los lipopéptidos; sustituyendo los aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos.

35 40 Los lipopéptidos divulgados en el presente documento son similares en composición a una mezcla natural de lipopéptidos lineales y cílicos producidos por *Paenibacillus* sp. OSY-N. [Huang, E. et al. New *Paenibacillus* strain produces a family of linear and cyclic antimicrobial lipopeptides: cyclization is not essential for their antimicrobial activity. FEMS Microbiology Letters 2017, 364] Particularmente, el uso de "lineal" en el contexto de los lipopéptidos divulgados en el presente documento significa que los lipopéptidos carecen de la ciclación de macrolactona de los lipopéptidos cílicos naturales pero conservan la actividad antimicrobiana de la familia de la paenipeptina. El desarrollo de antibióticos de lipopéptidos lineales es económicamente beneficioso porque simplifica significativamente el proceso sintético y, por lo tanto, reduce el coste de fabricación de esta familia de lipopéptidos. Lo que es más importante, esto nos permite el acceso a una gran cantidad de análogos de paenipeptina lineales usando la síntesis de péptidos en fase sólida estándar.

45 50 55 El lipopéptido lineal puede comprender la fórmula  $R^1-X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-NR^2R^3$ , donde  $R^1$  es un extremo lipófilo,  $NR^2R^3$  es un extremo amino; y  $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9$  es un péptido de nueve aminoácidos interpuesto entre los mismos. En algunas realizaciones, el péptido comprende Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID NO: 1) o un derivado del mismo. Los derivados de SEQ ID NO: 1 pueden comprender al menos un aminoácido sustituido. En realizaciones particulares, el derivado puede comprender una sustitución aminoacídica (es decir, 88 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1), dos sustituciones aminoacídicas seleccionadas independientemente (es decir, 77 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1), o tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente (es decir, 66 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1). En realizaciones particulares, el aminoácido sustituido se selecciona de aminoácidos lipófilos y/o aminoácidos catiónicos.

60 65 El aminoácido sustituido puede ser un aminoácido proteinogénico o un aminoácido no proteinogénico. Los "aminoácidos proteinogénicos" incluyen cualquiera de los isómeros L de los aminoácidos lipófilos [es decir, alanina (Ala), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o valina (Val)], aminoácidos catiónicos [es decir, arginina (Arg), histidina (His) o lisina (Lys)], aminoácidos polares no cargados [es decir, serina (Ser), treonina (Thr), asparagina (Asn) o glutamina (Gln)], aminoácidos aniónicos [es decir, ácido aspártico (Asp) o ácido glutámico (Glu)], cisteína (Cys), glicina (Gly), prolina (Pro), selenocisteína (Sec) o pirrolisina (Pyl)].

Los "aminoácidos no proteinogénicos" incluyen cualquiera de los isómeros D de un aminoácido proteinogénico, un análogo no natural de un aminoácido proteinogénico, un aminoácido funcionalizado o un aminoácido que tiene una cadena lateral alargada. Los "análogos no naturales de aminoácidos proteinogénicos" incluyen isómeros L y D de

5 aminoácidos proteinogénicos sustituidos,  $\beta$ -aminoácidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos proteinogénicos o cualquier combinación de los mismos. Los aminoácidos proteinogénicos sustituidos pueden tener uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfona, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto, amino o cualquier combinación de los mismos. Un "aminoácido funcionalizado" incluye un aminoácido con un reticulador fotoactivable; un aminoácido marcado con espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un grupo funcional novedoso; un aminoácido que interactúa covalente o no covalentemente con otra molécula; un aminoácido de unión a metales; un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoactivado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o análogo de biotina; un aminoácido glucosilado o modificado con hidratos de carbono; un aminoácido que contiene ceto; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado; un aminoácido químicamente escindible o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral alargada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcar, por ejemplo, una serina sustituida con azúcar o similares; un aminoácido que contiene azúcar ligado al carbono; un aminoácido redox activo; un ácido que contiene  $\alpha$ -hidroxi; un aminoácido que contiene ácido amino tio; un aminoácido  $\alpha,\alpha$  disustituido; un  $\beta$ -aminoácido; y un aminoácido cíclico distinto de prolina. Los ejemplos de aminoácidos no proteinogénicos incluyen ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap), ornitina (Om), 4-fenil-fenilalanina (Phephe) u octilglicina (Octgly).

20 Los derivados de SEQ ID NO: 1 incluyen, pero sin limitación, cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 17 (Tabla 1). También pueden prepararse derivados de las secuencias de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 17, que comprenden al menos un aminoácido sustituido como se ha descrito anteriormente. En realizaciones particulares, el derivado puede comprender una sustitución de aminoácido, dos sustituciones aminoacídicas seleccionadas independientemente o tres sustituciones aminoacídicas seleccionadas independientemente.

25 En determinadas realizaciones de la invención,  $X^1$  a  $X^9$  pueden seleccionarse independientemente de varios aminoácidos diferentes.  $X^1$  puede seleccionarse independientemente de Dab, Orn, Dap, Lys o Arg.  $X^2$  puede seleccionarse independientemente de Ile, Val, Phe, Dap o Phephe.  $X^3$  puede seleccionarse independientemente de Dab, Orn, Dap, Lys, Arg o Thr.  $X^4$  puede seleccionarse independientemente de dLeu, dPhe o Phephe.  $X^5$  puede seleccionarse independientemente de Leu, Phe o Phephe.  $X^6$  puede seleccionarse independientemente de Dab, Dap, Orn, Lys o Arg.  $X^7$  puede seleccionarse independientemente de dVal, dLeu, dPhe o Phephe.  $X^8$  puede seleccionarse de Leu, Phe, Phephe, Octgly.  $X^9$  puede seleccionarse independientemente de Ser o Dab. Los péptidos pueden comprender cualquier combinación de los mismos.

35 El extremo lipófilo puede ser un resto alcanoílo hidrófobo, ramificado o no ramificado, sustituido o sin sustituir, que se extiende desde un extremo del péptido. El extremo lipófilo puede extenderse desde el extremo N del péptido. En algunas realizaciones, el extremo lipófilo es un alcanoílo lineal, ramificado o cíclico que se extiende desde el extremo N a través de un enlace imida. El extremo lipófilo puede ser un resto que tiene al menos 2 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el extremo lipófilo tiene de 2 a aproximadamente 20 (es decir, un alcanoílo  $C_2-C_{20}$ ), de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 (es decir, un alcanoílo  $C_2-C_{14}$ ), de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 (es decir, un alcanoílo  $C_6-C_{14}$ ), o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono (es decir, un alcanoílo  $C_6-C_{10}$ ).

45 El alcanoílo puede comprender un resto alquilo, un resto alquenilo, un resto alquinilo, un resto cicloalquilo, un resto cicloalquenilo, un resto fenilo, un resto bifenilo, un resto amino, un resto alcoxi, un resto halo o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el alcanoílo tiene una fórmula general  $R-C(=O)-$ , donde R es un alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo, bifenilalquilo, alquilamina, cicloalquilamina, fenilalquilamina, bifenilalquilamina, alcoxi, cicloalcoxi, fenilalcoxi o bifenilalcoxi. En determinadas realizaciones específicas, el alcanoílo tiene una fórmula general  $R-CH(NH_2)-C(=O)-$  y R es un resto alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo o bifenilalquilo. Los ejemplos de extremos lipófilos incluyen, sin limitación, etanoílo, butanoílo, hexanoílo, heptanoílo, octanoílo, decanoílo, benzoílo, benciloxicarbonilo, 3-ciclohexilanlanilo, biofenil-4-carboxilo, 4-fenil-fenilalanilo o 4-bromo-fenilalanilo.

55 El extremo amino puede ser cualquier resto amino que se extienda desde un extremo del péptido. En algunas realizaciones, el extremo amino se extiende desde el extremo C del péptido. El extremo amino puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria de fórmula general  $-NRR'$ , en donde R y R' se seleccionan independientemente de hidrógeno o restos alquilo  $C_1-C_6$ .

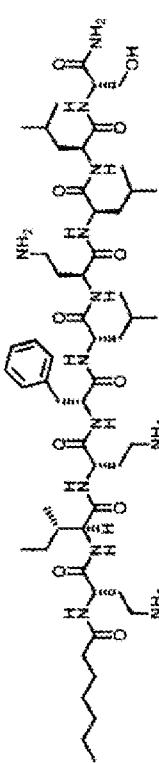
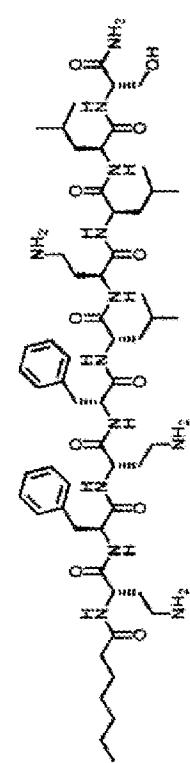
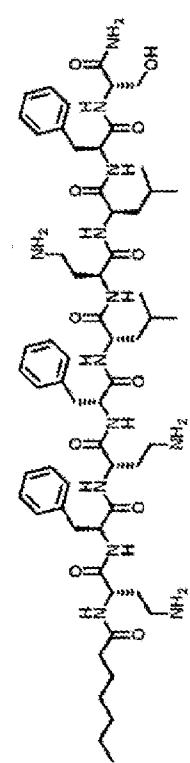
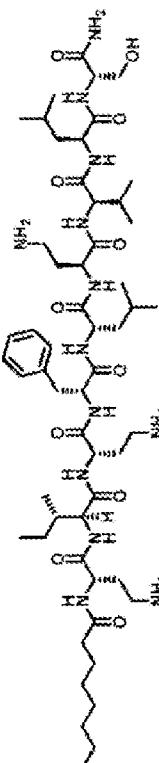
60 Los lipopéptidos pueden prepararse en forma de una sal. En algunas realizaciones, el lipopéptido puede prepararse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

65 Existen tres características estructurales en la paenipeptina lipopeptídica catiónica: la cadena de acilo graso del extremo N hidrófoba, los residuos cargados positivamente y los aminoácidos hidrófobos. En la Tabla 1 se proporcionan realizaciones de ejemplo de los lipopéptidos. Las variaciones de estructura en estos análogos incluyen, por ejemplo, (i) variación de la longitud de la cadena de acilo graso del extremo N (por ejemplo, grupos hexanoílo, heptanoílo, octanoílo y decanoílo en los análogos 1, 3, 8 y 12, respectivamente); (ii) reemplazo de la cadena de acilo graso con grupos acilo hidrófobos (por ejemplo, grupos benzoílo, benciloxicarbonilo y 3-ciclohexilanlanilo en los análogos 14, 15 y 16, respectivamente); (iii) modificación de los residuos cargados positivamente (por ejemplo, análogos 9, 10, 11 y

13); y (iv) cambio de los aminoácidos hidrófobos en la paenipeptina (por ejemplo, análogos 2, 4, 5, 6, 7 y 17).

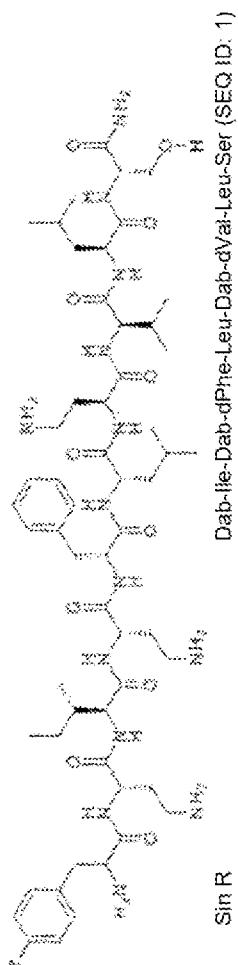
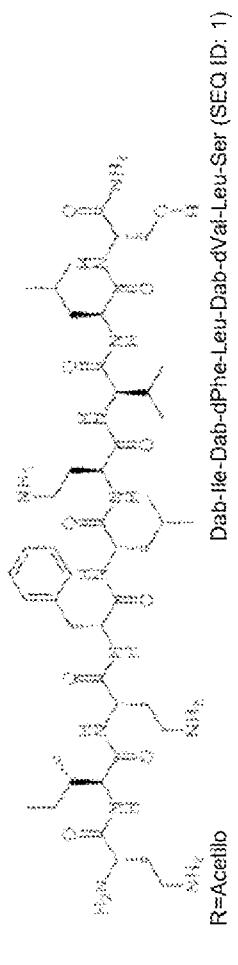
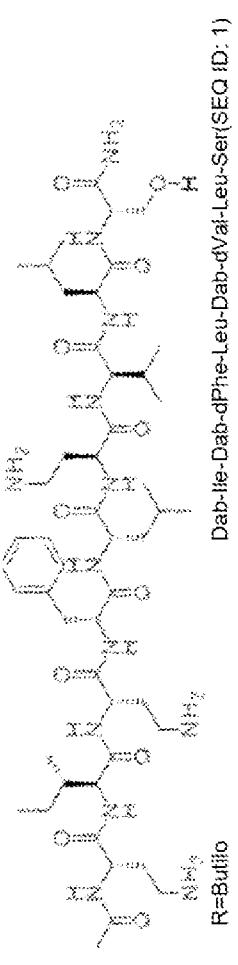
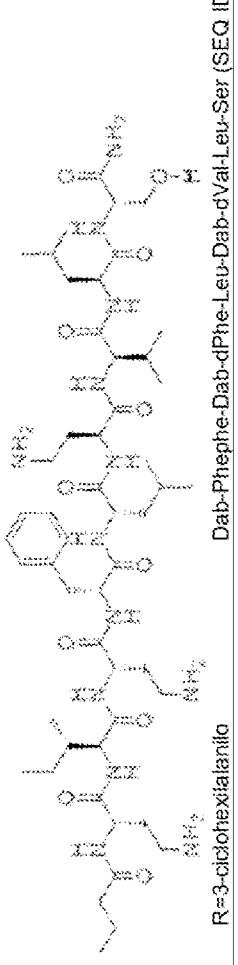
Tabla 1. Secuencia de lipopeptidos de análogos de paenipeptina (An.)

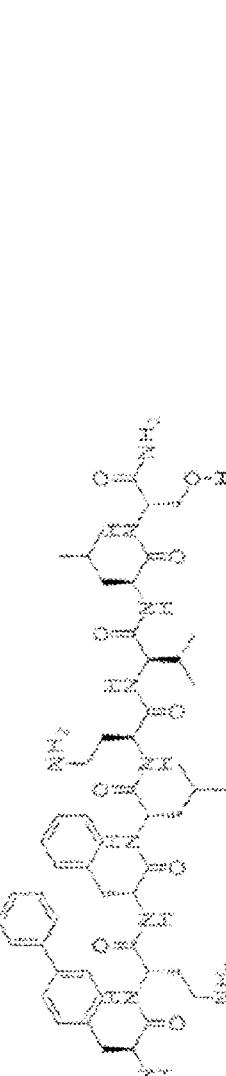
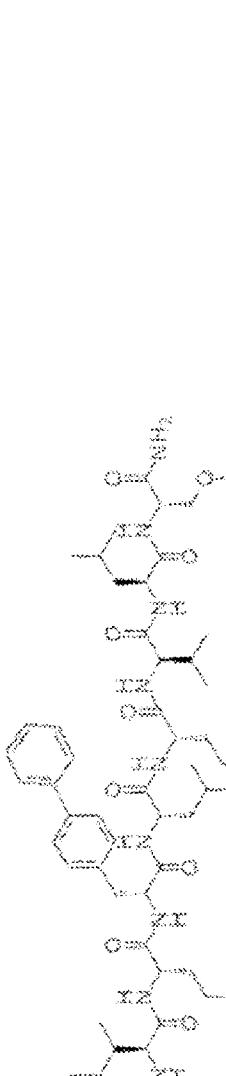
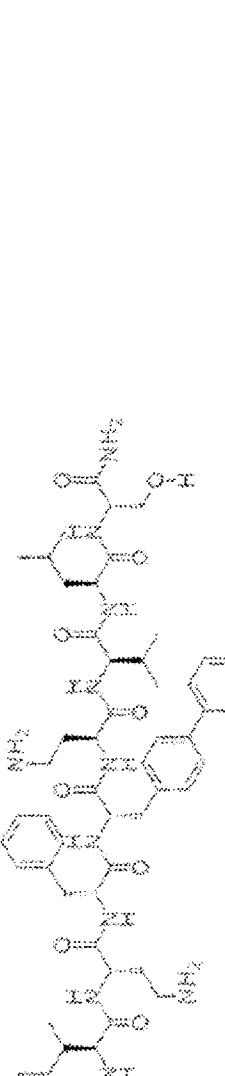
| An. | Nombre      | R=Hexanoilo | Secuencias peptídicas  |
|-----|-------------|-------------|--|
| 1   | C6-Pat      |             | Dab- <sup>1</sup> Leu-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 1)              |
| 2   | C7Val2-Pat  |             | <sup>1</sup> Dab-Val-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 2)               |
| 3   | C7-Pat      |             | <sup>2</sup> Dab- <sup>1</sup> Leu-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 1) |
| 4   | C7Phe2-Pat  |             | <sup>3</sup> Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 3)               |
| 5   | C7dLeu7-Pat |             | <sup>4</sup> Dab- <sup>1</sup> Leu-Dab-dPhe-Leu-Dab-dLeu-Leu-Ser (SEQ ID: 4) |

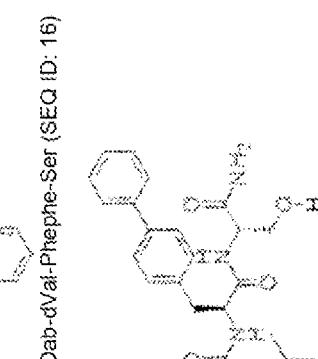
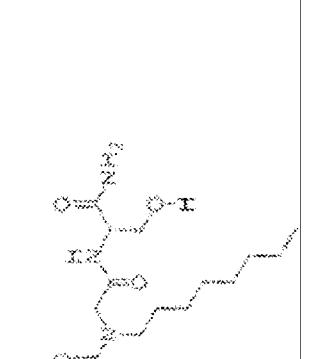
| An. | Nombre              | (continuación)   |   |
|-----|---------------------|--|---|
|     |                     | Secuencias peptídicas  |   |
| 6   | C7Phe2dLeu7-Pat     |    | <sup>5</sup> Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dLeu-Leu-Ser (SEQ ID: 5)          |
| 7   | C7Phe2dLeu7Phe8-Pat |    | <sup>6</sup> Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dLeu-Phe-Ser (SEQ ID: 6)          |
| 8   | C8-Pat              |    | <sup>7</sup> Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dLeu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 1) |
| 9   | Dab9-Pat            |  | <sup>8</sup> Dab-Dab-dPhe-Leu-Dab-dLeu-Dab-dVal-Leu-Dab (SEQ ID: 7)     |

| Ab. | Nombre          | (continuación) Secuencias peptídicas |   |
|-----|-----------------|--------------------------------------|---|
|     |                 | 9                                    | 10  |
| 10  | Dab2,9-Pat      | R=Octanolio                          | Dab-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Dab (SEQ ID: 8)         |
| 11  | Orn-Pat         | R=Octanolio                          | Orn-Ile-Orn-dPhe-Leu-Om-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 9)      |
| 12  | C10-Pat         | R=Decanolio                          | Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 1)     |
| 13  | C10Thr3Leu4-Pat | R=Decanolio                          | Dab-Ile-Thr-Ole-Leu-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 10) |

| Ab <sub>3</sub> | Nombre              | (continuación)   |  |
|-----------------|---------------------|--|--|
|                 |                     | Secuencias peptídicas                                  | Chemical structure                                     |
| 14              | Benzolio-Pat        | <br>Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 13) | <br>Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |
| 15              | Cbz-Pat             | R=Benziloxicarbonilo                                   | <br>Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |
| 16              | Cha-Pat             | R=3-ciclohexialario                                    | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 6)  |
| 17              | ChaPhe2Leu7Phe8-Pat | R=3-ciclohexialario                                    | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 11) |
| 18              | Dap-Pat             | R=3-acetanoilo   | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |
| 19              | Bip-Pat             | R=4-bifenil-4-carboxilo                                | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |
| 20              | PhePhe-Pat          | R=4-fenil-fenilalario                                  | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |
| 21              | BroPhe-Pat          | R=4-bromo-fenilalario                                  | <br>Dab-Phe-Dab-dPhe-Leu-Dab-dVai-Leu-Ser (SEQ ID: 1)  |

| An. | Nombre         | (continuación)        |  |
|-----|----------------|-----------------------|--|
|     |                | Secuencias peptídicas |  |
| 22  | C0-Pat         | Sir R                 |    |
| 23  | C2-Pat         | R=Acetilo             |    |
| 24  | C4-Pat         | R=Butilo              |   |
| 25  | ChaPhephe2-Pat | R=3-ciclohexitalanilo |  |

| An. | Nombre        | (continuación)<br>Secuencias peptídicas  |
|-----|---------------|--|
| 26  | ChaPhepe4-Pat | <br>R=3-ciclohexilalanilo<br>Dab-Ile-Dab-Phephe-Leu-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 13)  |
| 27  | ChaPhepe5-Pat | <br>R=3-ciclohexilalanilo<br>Dab-Ile-Dab-dPhe-Phephe-Dab-dVal-Leu-Ser (SEQ ID: 14) |
| 28  | ChaPhepe7-Pat | <br>R=3-ciclohexilalanilo<br>Dab-Ile-Dab-dPhe-Leu-Dab-Phephe-Leu-Ser (SEQ ID: 15) |

| An. | Nombre         | (continuación)        |  |
|-----|----------------|-----------------------|--|
|     |                | Secuencias peptídicas | Chemical structures  |
| 29  | ChaPhepheg-Pat | R=3-ciclohexilalanilo |   |
| 30  | ChaOctgly8-Pat | R=3-ciclohexilalanilo |  |

<sup>a</sup>Dab: ácido 2,4-diaminobutírico;

<sup>b</sup>CS-Pat: compuesto principal; los grupos en el extremo N sustituidos y los residuos de aminoácidos en otros análogos están en negrita;

<sup>c</sup>Or: ornitina

<sup>d</sup>Dap: ácido diaminopropiónico;

<sup>e</sup>Phephe:4-fenil-fenilalanilo;

<sup>f</sup>Octgly: Octiglicilo

## Productos antimicrobianos

Las composiciones divulgadas en el presente documento amplían el espectro antimicrobiano y mejoran la actividad antibiótica de los agentes antimicrobianos, tales como la claritromicina y la rifampicina. Como resultado, los

5 lipopéptidos por sí mismos o junto con otros antibióticos pueden ser una opción terapéutica alternativa para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas resistentes a los antibióticos, incluidos los patógenos resistentes a carbapenem.

10 A través de los estudios de la relación de estructura-actividad descritos en el presente documento, se identifican lipopéptidos potentes capaces de inhibir la proliferación de microbios o destruirlos, incluidos los análogos 7, 12 y 17. El análogo 17 mostró una potente actividad contra biopelículas de *S. aureus* resistentes a meticilina comparable a la observada con daptomicina y ceftarolina. Este nuevo análogo también exhibió una fuerte eficacia contra biopelículas de *P. aeruginosa* establecidas. Por lo tanto, el análogo 17 es un candidato prometedor a antibiótico de amplio espectro

15 para atacar a patógenos farmacorresistentes tanto en condiciones planctónicas como asociadas a biopelículas. El análogo 9 no fue hemolítico y mantuvo una potente actividad antimicrobiana específica de *P. aeruginosa*. Esto demuestra que los lipopéptidos divulgados en el presente documento pueden usarse como productos antimicrobianos de amplio espectro o productos antimicrobianos de espectro limitado capaces de reducir la presión antibiótica sobre las bacterias comensales.

20 Muchos antibióticos hidrófobos potentes de gran tamaño, incluyendo rifampicina, claritromicina y eritromicina, no son activos contra los patógenos gramnegativos debido a la barrera de permeabilidad de la membrana externa. El LPS en la membrana externa de las bacterias gramnegativas es la principal barrera de permeabilidad que excluye dichos fármacos. Considerando la urgente necesidad de tratar infecciones causadas por patógenos gramnegativos multirresistentes, los permeabilizadores de la membrana externa, que promueven la entrada de los antibióticos existentes, proporcionan un enfoque alternativo para combatir la resistencia a los antibióticos.

25 Entre los lipopéptidos de paenipeptina divulgados en el presente documento, se ensayaron 10 compuestos, que mostraron poca actividad hemolítica y carecían de actividad contra *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, junto con rifampicina contra estos dos patógenos. Cuando se ensayaron a razón de 4 µg/ml, seis análogos de paenipeptina (1, 3, 9, 14, 15 y 16) redujeron la CIM de rifampicina contra *A. baumannii* y *K. pneumoniae* de 16 µg/ml (19,42 µM) a niveles nanomolares y subnanomolares (factor de sensibilización: 2.048-8.192). También se observó un nivel similar de sinergia entre los análogos 9 y 16 y el inhibidor de la síntesis de proteínas claritromicina. Por lo tanto, las paenipeptinas pueden potenciar diferentes clases de antibióticos que tienen diferentes modos de acción.

30 35 Pueden prepararse composiciones y productos antimicrobianos a partir de los lipopéptidos descritos anteriormente. Como se ilustrará más completamente a continuación, los lipopéptidos tienen actividad antimicrobiana, actividad antibiopelícula y sensibilizan los microbios a otras composiciones antimicrobianas. Esto permite el desarrollo de varios productos antimicrobianos diferentes, incluyendo composiciones farmacéuticas o formulaciones para su aplicación en superficies susceptibles a la formación de biopelículas. Las composiciones pueden comprender los lipopéptidos como único agente antimicrobiano o los lipopéptidos además de otro agente antimicrobiano. También pueden prepararse composiciones farmacéuticas donde el péptido lineal puede ser el único principio farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés) o usarse junto con uno o más API adicionales. Para formulaciones para su aplicación en superficies susceptibles a la formación de biopelículas, el péptido lineal puede ser la composición solitaria que tiene actividad antimicrobiana y/o antibiopelícula o usarse junto con una o más composiciones adicionales que tienen actividad antimicrobiana y/o antibiopelícula.

40 45 Un lipopéptido que tiene actividad antimicrobiana significa que el lipopéptido es capaz de inhibir la proliferación de un microbio y/o capaz de destruir un microbio. Convenientemente, el lipopéptido tiene una concentración inhibitoria mínima inferior o igual a 8,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo y/o una concentración bactericida mínima inferior o igual a 16,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo. La "concentración inhibitoria mínima" (o "CIM") significa la concentración más baja de lipopéptido que da como resultado un crecimiento no visible de células microbianas después de la incubación. La "concentración bactericida mínima" (o "CBM") significa la concentración más baja de lipopéptido que conduce al menos a una reducción del 99,9 % en el número de células bacterianas viables en relación con el inóculo inicial. Convenientemente, los lipopéptidos pueden poseer una o ambas de estas propiedades y considerarse que poseen actividad antimicrobiana. Se divulan lipopéptidos que tienen una actividad antimicrobiana superior. Convenientemente, los lipopéptidos pueden tener una CIM inferior o igual a 6,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 2,0 µg/ml o 1,0 µg/ml y/o una CBM inferior o igual a 14,0 µg/ml, 12,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, 8,0 µg/ml, 6,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 2,0 µg/ml o 1,0 µg/ml. El medio de cultivo puede ser cualquier sólido, líquido o semisólido adecuado diseñado para soportar el crecimiento del microbio, incluyendo, sin limitación, caldo de soja tríptica ("TBS") o un fluido corporal tal como suero.

50 55 60 El microbio puede ser cualquiera de varios microorganismos diferentes, tales como bacterias, arqueas y levaduras. Las bacterias pueden ser bacterias gramnegativas, por ejemplo, bacterias del género *Acinetobacter*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Fransella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio* o *Yersinia*. Las bacterias grampositivas, por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*,

*Clostridium, Corynebacterium, Listeria, Staphylococcus o Streptococcus*, o bacterias que no son ni gramnegativas ni grampositivas, por ejemplo, bacterias del género *Chlamydia, Chlamydophila, Mycobacterium o Mycoplasma*.

5 El microbio puede ser un microbio farmacorresistente. Como se usa en el presente documento, "farmacorresistente" significa que la CIM de un agente antimicrobiano es superior a 32,0 µg/ml en un medio de cultivo. Convenientemente, el microbio es un microbio resistente a carbapenem o un microbio resistente a polimixina.

10 En algunas realizaciones, el lipopéptido no es hemolítico ni citotóxico. Como se usa en el presente documento, un lipopéptido es "no hemolítico" si el porcentaje de hemólisis es inferior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 128 µg/ml. Convenientemente, el porcentaje de hemólisis es inferior o igual al 45,0 %, 40,0 %, 35,0 %, 30,0 %, 25,0 %, 20,0 %, 15,0 %, 10,0 % o el 5,0 % a una concentración de lipopéptido de 128 µg/ml. Como se usa en el presente documento, un lipopéptido es "no citotóxico" si el porcentaje de viabilidad frente a la línea celular de riñón humano HEK 293 es superior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 105 µg/ml. Convenientemente, el porcentaje de viabilidad puede ser superior o igual al 55,0 %, 60,0 % o el 65,0 % a una concentración de lipopéptido de 105 µg/ml.

15 Los lipopéptidos pueden usarse junto con una serie de agentes antimicrobianos diferentes, sensibilizando los microbios al agente antimicrobiano. Como se usa en el presente documento, "factor de sensibilización" significa la relación entre la CIM del agente antimicrobiano en ausencia del lipopéptido con respecto a la CIM del agente antimicrobiano en presencia de 4 µg/ml del lipopéptido frente a un microbio. El factor de sensibilización es superior o igual a 128 (es decir,  $2^7$ ) para el agente antimicrobiano contra el microbio. Convenientemente, el factor de sensibilización es superior o igual a 256 (es decir,  $2^8$ ), 512 (es decir,  $2^9$ ), 1024 (es decir,  $2^{10}$ ), 2048 (es decir,  $2^{11}$ ), 4096 (es decir,  $2^{12}$ ) u 8192 (es decir,  $2^{13}$ ) para el agente antimicrobiano contra el microbio. Como resultado de la sensibilización proporcionada por el lipopéptido, el agente antimicrobiano puede ser eficaz para reducir la cantidad de agente antimicrobiano necesaria para inhibir la proliferación del microbio de más de 10 µg/ml a menos de 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml o 0,001 µg/ml. En algunos casos, esto permite que los agentes antimicrobianos sean eficaces contra microbios farmacorresistentes, tales como microbios resistentes a carbapenem o polimixina.

20 30 Los agentes antimicrobianos usados junto con los lipopéptidos pueden ser un antibiótico que inhibe las vías celulares y/o la estructura o función de una membrana celular, por ejemplo, una membrana citoplasmática. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede inhibir la síntesis de proteínas, la síntesis de ARN, la síntesis de ADN, el metabolismo o la síntesis de la pared celular. Los ejemplos de agentes antimicrobianos capaces de realizar dichas funciones incluyen, pero sin limitación, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, oxazolidinonas, estreptograminas, licosamidas, rifampinas, quinolonas, novobiocina, trimetoprim, sulfametoazol,  $\beta$ -lactamas, glucopéptidos, tunicamicinas, bacitracinas, polimixinas o nisina.

25 35 40 Un lipopéptido que tiene actividad antibiopelícula significa que el lipopéptido es capaz de inhibir la proliferación de un microbio y/o capaz de destruir un microbio sobre una superficie. Convenientemente, las composiciones divulgadas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz de lipopéptido para una actividad antibiopelícula de al menos una reducción de 2,0 log en microbios viables o unidades formadoras de colonias sobre una superficie en comparación con la superficie no tratada. Convenientemente, el lipopéptido puede tener una cantidad eficaz para una reducción de 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 o 5,0 log en microbios viables sobre la superficie.

45 Los lipopéptidos que tienen una o más de las propiedades descritas en el presente documento pueden formularse en productos antimicrobianos, incluyendo composiciones farmacéuticas, productos antibiopelícula o vendajes.

### Composiciones farmacéuticas

50 55 60 Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse en forma de composiciones farmacéuticas que incluyen: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos como se divulga en el presente documento; y (b) uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser del lipopéptido por sí mismo o la combinación del lipopéptido y un agente antimicrobiano. La composición farmacéutica puede incluir el compuesto en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 2000 mg (preferentemente, de aproximadamente 0,5 a 500 mg, y más preferentemente, de aproximadamente 1 a 100 mg). La composición farmacéutica puede administrarse para proporcionar el compuesto en una dosis diaria de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal (preferentemente, de aproximadamente 0,5 a 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal). En algunos casos, después de administrar a un paciente la composición farmacéutica (por ejemplo, después de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas posteriores a la administración), la concentración del compuesto en el sitio de acción es de aproximadamente 2 a 10 µM.

65 Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica en una forma farmacéutica sólida, aunque se puede utilizar cualquier forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas sólidas de ejemplo incluyen, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, sobres, pastillas para chupar, polvos, píldoras o gránulos, y la forma farmacéutica sólida puede ser, por ejemplo, una forma farmacéutica de fusión rápida, una forma farmacéutica de liberación controlada, una forma

farmacéutica liofilizada, una forma farmacéutica de liberación retardada, una forma farmacéutica de liberación prolongada, una forma farmacéutica de liberación pulsátil, una forma farmacéutica mixta de liberación inmediata y de liberación controlada, o una combinación de las mismas.

- 5 Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica que incluye un portador. Por ejemplo, el portador puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas, hidratos de carbono, azúcar, talco, estearato de magnesio, celulosa, carbonato de calcio y pasta de gelatina y almidón.
- 10 Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica que incluye uno o más agentes aglutinantes, agentes de relleno, agentes lubricantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes saporíferos, conservantes, tampones, agentes humectantes, disgregantes y agentes efervescentes. Los agentes de relleno pueden incluir lactosa monohidrato, lactosa anhidra y diversos almidones; los ejemplos de agentes aglutinantes son diversas celulosas y polivinilpirrolidona reticulada, celulosa microcristalina, tales como Avicel® PH101 y Avicel® PH102, celulosa microcristalina y celulosa microcristalina silicificada (ProSolv SMCC™). Los lubricantes adecuados, incluidos los agentes que actúan sobre la fluidez del polvo a comprimir, pueden incluir dióxido de silicio coloidal, tal como Aerosil®200, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio y gel de sílice. Los ejemplos de edulcorantes pueden incluir cualquier edulcorante natural o artificial, tal como sacarosa, xilitol, sacarina sódica, ciclamato, aspartamo y acsulfamo. Los ejemplos de agentes saporíferos son Magnasweet® (marca registrada de MAFCO), sabor a chicle y sabores de frutas, y similares. Los ejemplos de conservantes pueden incluir sorbato de potasio, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico y sus sales, otros ésteres de ácido parahidroxibenzoico, tal como butilparabeno, alcoholes, tales como alcohol etílico o bencílico, compuestos fenólicos, tal como fenol, o compuestos cuaternarios, tal como cloruro de benzalconio.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Los diluyentes adecuados pueden incluir cargas inertes farmacéuticamente aceptables, tales como celulosa microcristalina, lactosa, fosfato de calcio dibásico, sacáridos y mezclas de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos de diluyentes incluyen celulosa microcristalina, tal como Avicel® PH101 y Avicel® PH102; lactosa tal como lactosa monohidrato, lactosa anhidra y Pharmatose® DCL21; fosfato de calcio dibásico tal como Emcompress®; manitol; almidón; sorbitol; sacarosa; y glucosa.
- Los disgregantes adecuados incluyen polivinilpirrolidona ligeramente reticulada, almidón de maíz, almidón de patata, almidón de maíz criollo y almidones modificados, croscarmelosa sódica, crospovidona, glicolato de almidón sódico y mezclas de los mismos.
- Los ejemplos de agentes efervescentes son pares efervescentes tales como un ácido orgánico y un carbonato o bicarbonato. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, tartárico, málico, fumárico, adípico, succínico y algínico y anhídridos y sales ácidas. Los carbonatos y bicarbonatos adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de magnesio, carbonato de glicina sódica, carbonato de L-lisina y carbonato de arginina. Como alternativa, puede estar presente únicamente el componente de bicarbonato de sodio de la par efervescente.
- Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse en forma de una composición farmacéutica para suministro por cualquier vía adecuada. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica y pulmonar. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas para administración oral incluyen cápsulas, jarabes, concentrados, polvos y gránulos.
- Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden administrarse en formas farmacéuticas convencionales preparadas combinando el principio activo con portadores o diluyentes farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada.
- Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos pueden adaptarse para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por la vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, poniendo en asociación el principio activo con el uno o más portadores o excipientes.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse en forma de unidades individuales, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse en forma de parches individuales destinados a permanecer en estrecho contacto con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el principio activo puede suministrarse desde el parche mediante iontoporesis.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse en forma de ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apóritos impregnados, nebulizaciones, aerosoles o aceites y pueden contener aditivos convencionales apropiados tales como conservantes, disolventes para facilitar la penetración del fármaco y emolientes en ungüentos y cremas.

- 5 Para aplicaciones en los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones farmacéuticas se aplican preferentemente como ungüento o crema tópica. Cuando se formula en un ungüento, el compuesto puede emplearse con una base de ungüento parafínico o miscible en agua. Como alternativa, el compuesto puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o como una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica ocular incluyen colirios, donde el principio activo se disuelve o suspende en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

- 10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, grageas y enjuagues bucales.
- 15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden presentarse en forma de supositorios o enemas.

- 20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal donde el portador es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula (por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros) que se administra de la manera en que se administra rapé (es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz). Las formulaciones adecuadas donde el portador es un líquido, para la administración en forma de aerosol nasal o en forma de gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

- 25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados de dosis medida.

- 30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

- 35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles, para inyección, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado criodesecado (liofilizado) que requiera sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

- 40 Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden encontrarse en una forma de presentación de dosis unitaria y pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz criollo, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la formación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desengranados, por ejemplo, almidón de patata; o agentes humectantes aceptables, tales como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden ser en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse en forma de un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y, si se desea, agentes saporíferos o colorantes convencionales.

- 45 Los compuestos empleados en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden administrarse como composiciones farmacéuticas y, por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que incorporan los compuestos se consideran realizaciones de las composiciones divulgadas en el presente documento. Dichas composiciones pueden adoptar cualquier forma física que sea farmacéuticamente aceptable; de manera ilustrativa, pueden ser composiciones farmacéuticas administradas por vía oral. Dichas composiciones farmacéuticas contienen una cantidad eficaz de un compuesto divulgado, cuya cantidad eficaz está relacionada con la dosis diaria del compuesto a administrar. Cada unidad de dosificación puede contener la dosis diaria de un compuesto determinado o cada unidad de dosificación puede contener una fracción de la dosis diaria, tal como la mitad o un tercio de la dosis. La cantidad de cada compuesto que debe estar contenida en cada unidad de dosificación puede depender, en parte,

de la identidad del compuesto particular elegido para la terapia y otros factores, tal como la indicación para la que se administra. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden formularse de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos.

- 5 Los compuestos para su uso de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento pueden administrarse como un compuesto único o una combinación de compuestos. Por ejemplo, un compuesto que trata la actividad del cáncer puede administrarse como un compuesto único o junto con otro compuesto que trata el cáncer o que tiene una actividad farmacológica diferente.
- 10 Como se ha indicado anteriormente, se contemplan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos y también pueden usarse en los métodos divulgados. Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos que son sustancialmente no tóxicas para los organismos vivos. Las sales farmacéuticamente aceptables típicas incluyen aquellas sales preparadas por reacción de los compuestos como se divulga en el presente documento con un ácido mineral u orgánico farmacéuticamente aceptable o una base orgánica o inorgánica. Dichas sales se conocen como sales de adición de ácido y sales de adición de base. El lector experto apreciará que la mayoría o la totalidad de los compuestos, como se divulga en el presente documento, son capaces de formar sales y que las formas de sal de los productos farmacéuticos se usan comúnmente, a menudo porque se cristalizan y purifican más fácilmente que los ácidos o bases libres.
- 15
- 20 Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácido pueden incluir ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sulfato, pirosulfato, bisulfato, sulfito, bisulfato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, clorhidrato, diclorhidrato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexina-1,6-dioato, benzoato, clorbenzoato, metilbenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, 30 citrato, lactato, alfa-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.
- 35 Las sales de adición de base incluyen aquellas procedentes de bases inorgánicas, tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos de amonio o de metales alcalinos o alcalinotérreos, y similares. Las bases útiles para preparar dichas sales incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y similares.
- 40 El contraión particular que forma parte de cualquier sal de un compuesto divulgado en el presente documento puede no ser crítico para la actividad del compuesto, siempre que la sal en su conjunto sea farmacológicamente aceptable y siempre que el contraión no aporte cualidades no deseadas a la sal en su conjunto. Las cualidades no deseadas pueden incluir solubilidad o toxicidad no deseadas.
- 45 También se pueden emplear ésteres y amidas farmacéuticamente aceptables de los compuestos en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento. Los ejemplos de ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo, arilo y aralquilo, tales como ésteres metílicos, ésteres etílicos, ésteres propílicos, ésteres dodecílicos, ésteres bencílicos y similares. Los ejemplos de amidas adecuadas incluyen amidas no sustituidas, amidas monosustituidas y amidas disustituidas, tales como metilamida, dimetilamida, metiletilamida y similares.
- 50 Además, los métodos divulgados en el presente documento se pueden poner en práctica usando formas de solvato de los compuestos o sales, ésteres y/o amidas, de los mismos. Las formas de solvato pueden incluir solvatos de etanol, hidratos y similares.
- Productos antibiopelícula**
- 55 Los compuestos utilizados en los métodos divulgados en el presente documento pueden formularse como composiciones antibiopelícula que incluyen una cantidad eficaz de uno o más compuestos como los divulgados en el presente documento formulados para su aplicación a una superficie para tratar o prevenir una biopelícula microbiana sobre una superficie formulada para su aplicación a una superficie. La cantidad eficaz puede ser del lipopéptido por sí mismo o la combinación del lipopéptido y un agente antimicrobiano. La superficie puede ser cualquier superficie donde sea deseable prevenir o tratar biopelículas, incluyendo, pero sin limitación, dispositivos médicos, instrumentos médicos, implantes médicos, vendajes, heridas o piel. El producto antibiopelícula puede formularse de cualquier manera adecuada para su aplicación a una superficie. Los ejemplos de formulaciones incluyen, sin limitación, nebulizaciones, ungüentos, geles, espumas, pastas, hidrogeles o hidrocoloides.
- 60
- 65 En una realización particular, el producto antibiopelícula es un vendaje que comprende un apósito y una cantidad eficaz de uno o más compuestos como se divulga en el presente documento para tratar o prevenir una infección

microbiana o un biopelícula microbiana en una herida. Los compuestos pueden formularse en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, por ejemplo, nebulizaciones, ungüentos, geles, espumas, pastas, hidrogeles o hidrocoloides, y aplicarse a la superficie del apósito o impregnarse en el apósito. El apósito puede ser cualquier apósito adecuado para su aplicación en una herida, incluyendo, sin limitación, tejidos naturales y sintéticos, tales como una gasa, esponjas, alginatos, colágenos, películas, láminas de gel, rellenos para heridas, hidrogeles o hidrocoloides, o combinaciones de los mismos.

#### **Métodos de uso de los lipopéptidos**

10 Los lipopéptidos y composiciones de la presente invención pueden usarse de diversas maneras, incluyendo para la inhibición de la proliferación o la destrucción de un microbio, la prevención de la formación de una biopelícula sobre una superficie o la inhibición de la proliferación o la destrucción de un microbio en la biopelícula, la prevención de la formación de una biopelícula sobre una herida o piel, o la inhibición de la proliferación o la destrucción de un microbio en la biopelícula, o la prevención de una infección microbiana o el tratamiento de la infección microbiana en un sujeto.

15 **Métodos de tratamiento**

Un uso de las composiciones descritas en el presente documento es para la prevención de una infección microbiana o el tratamiento de la infección microbiana en un sujeto o en una herida o la piel. Como se usan en el presente documento, los términos "que trata/n" o "tratar" significan cada uno aliviar los síntomas, eliminar la causa de los síntomas resultantes, ya sea de forma temporal o permanente, y/o prevenir o retardar la aparición o revertir la progresión o gravedad de los síntomas resultantes de la enfermedad o trastorno nombrados. Como tal, los métodos divulgados en el presente documento abarcan tanto la administración terapéutica como la profiláctica.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto, tras la administración de una dosis única o múltiple al sujeto, que proporciona el efecto deseado en el sujeto bajo diagnóstico o tratamiento. Los métodos divulgados pueden incluir la administración de una cantidad eficaz de los compuestos divulgados (por ejemplo, como están presentes en una composición farmacéutica) para tratar una infección microbiana de cualquiera de los microbios descritos en el presente documento.

30 Como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser intercambiable con "paciente" o "individuo" y significa un animal, que puede ser un animal humano o no humano, que necesita tratamiento. Un "sujeto que necesita tratamiento" puede incluir un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección que responde a la terapia con los lipopéptidos o compuestos antimicrobianos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, un "sujeto que necesita tratamiento" puede incluir un sujeto que tiene una enfermedad o afección microbiana. Convenientemente, la enfermedad o afección microbiana puede ser una infección bacteriana gramnegativa o una infección bacteriana grampositiva, incluyendo infecciones bacterianas farmacorresistentes de bacterias gramnegativas o grampositivas. Las infecciones bacterianas grampositivas de ejemplo incluyen, sin limitación, infecciones por *E. coli*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* o *P. aeruginosa*. Las infecciones bacterianas gramnegativas de ejemplo incluyen, sin limitación, infecciones por *E. faecium* y *S. aureus*. Las infecciones bacterianas farmacorresistentes de ejemplo incluyen, sin limitación, bacterias resistentes a carbapenem, bacterias resistentes a meticilina o infecciones bacterianas resistentes a polimixina.

45 Una cantidad eficaz se puede determinar fácilmente por el médico tratante, como experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad o dosis eficaz del compuesto administrado, el médico tratante puede tener en cuenta una serie de factores, tales como: la especie del sujeto; su tamaño, edad y salud general; el grado de afectación o la gravedad de la enfermedad o trastorno implicado; la respuesta del sujeto individual; el compuesto administrado particular; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la pauta posológica seleccionada; el uso de medicación simultánea; y otras circunstancias relevantes.

50 Una dosis diaria típica puede contener de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg (tal como de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y/o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg) de cada compuesto usado en el presente método de tratamiento.

55 Las composiciones se pueden formular en una forma farmacéutica unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg de cada compuesto individualmente o en una única forma farmacéutica unitaria, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg, y/o aproximadamente 25 mg. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosificaciones unitarias para un paciente, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un portador, diluyente o excipiente farmacéutico adecuado.

#### **Métodos para inhibir la proliferación o la destrucción de un microbio**

60 Un uso de las composiciones descritas en el presente documento es para la inhibición de la proliferación o la

destrucción de un microbio. Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibir la proliferación de un microbio" significa retardar el crecimiento de células microbianas después de la incubación con las composiciones descritas en el presente documento. Convenientemente, el retraso del crecimiento de células microbianas después de la incubación puede ser que no haya un crecimiento visible de las células microbianas después de la incubación. Como se usa en el presente documento, la expresión "destruir el microbio" significa que hay una reducción en el número de células microbianas viables en relación con el número inicial de células microbianas viables o inóculo. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto, que proporciona el efecto deseado. La cantidad efectiva puede ser la CIM de la composición para inhibir la proliferación de los microbios o la CBM de la composición para destruir el microbio.

En un aspecto alternativo de la invención, los lipopéptidos pueden usarse para prevenir la formación de una biopelícula sobre una superficie o para inhibir la proliferación o la destrucción de un microbio en la biopelícula. El método comprende poner en contacto una superficie o una biopelícula dispuesta sobre la misma con una cantidad efectiva de composiciones descritas en el presente documento. El lipopéptido puede aplicarse como cualquier formulación adecuada para su aplicación a una superficie. Convenientemente, la superficie es una herida o la piel. Las composiciones pueden aplicarse a una herida o la piel mediante aplicación directa sobre la herida o indirectamente a través de un vendaje que comprende el lipopéptido sobre la superficie de la misma o impregnado en el interior.

### Ejemplos

#### Síntesis y caracterización de análogos de paenipeptina.

Los análogos de paenipeptina se sintetizaron a través de un servicio comercial de péptidos personalizados (Genscript Inc., Piscataway, NJ). La síntesis de péptidos en fase sólida se realizó usando química Fmoc en resina de amida de Rink. La resina se hinchó previamente en DMF durante 1 h antes de su uso. La reacción de amidación se logró mediante la adición del aminoácido correspondiente, HOBT y DIC, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1 h. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante el tratamiento de piperidina al 20 % (v/v) en DMF durante 1 h. Entre la desprotección y el acoplamiento, el recipiente de síntesis de péptidos en fase sólida se drenó bajo presión de N<sub>2</sub> y se lavó con DMF 5 veces. Se escindió una pequeña porción de resina y se analizó por HPLC para confirmar la conversión. Finalmente, la resina se trató con una mezcla de TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (18:1:1, v/v/v) y se agitó suavemente durante 2 h. La solución de escisión se filtró y se concentró al vacío. Los péptidos en bruto se purificaron usando C<sub>18</sub>-RP-HPLC a escala preparativa. Los lipopéptidos sintéticos se purificaron por HPLC hasta homogeneidad ( $\geq 95\%$  de pureza) y se caracterizaron por espectrometría de masas de alto rendimiento. Los espectros de masas (MS) se registraron usando el espectrómetro de masas LC de tiempo de vuelo (TOF) Agilent 6210 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en la Universidad de California en Riverside. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN de cada análogo de paenipeptina se registraron en D<sub>2</sub>O en un espectrómetro Agilent 400-MR DD2 (400 MHz) usando tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos se informaron como δ (ppm) y las constantes de acoplamiento de espín-espín como valores J (Hz). Los datos de pureza, HRMS y <sup>1</sup>H RMN se presentaron en los materiales complementarios.

#### Método de HPLC para la determinación de la pureza

Método A: El análisis por HPLC se realizó usando una columna Alltima C18 (5 micrómetros, 4,6 x 250 mm) en un sistema HPLC de fase inversa (RP-HPLC) a un caudal de 1,0 ml/min. La separación se logró mediante una elución en gradiente usando la fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,065 % en agua al 100 % (v/v) y la fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo al 100 % (v/v). La elución se detectó usando un monitor UV a una longitud de onda de 220 nm. La pureza de los lipopéptidos objetivo se calculó de acuerdo con el área del pico. Método B: El análisis por HPLC se realizó usando una columna Thermo Scientific BetaSil C18 (3 micrómetros, 4,6 x 150 mm) en un sistema de HPLC de fase inversa (RP-HPLC) a un caudal de 0,8 ml/min. La separación se logró mediante una elución en gradiente usando la fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua al 100 % (v/v) y la fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,1 % en MeOH al 100 % (v/v). La elución se detectó usando un monitor UV a una longitud de onda de 220 nm. La pureza de los lipopéptidos objetivo se calculó de acuerdo con el área del pico (Tabla 2).

Tabla 2: Pureza por HPLC de los análogos 1-17

| Análogo | Método A            |                           | Método B            |                           |
|---------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
|         | Pureza por HPLC (%) | Tiempo de retención (min) | Pureza por HPLC (%) | Tiempo de retención (min) |
| 1       | 96                  | 16,4                      | 97                  | 5,7                       |
| 2       | 96                  | 18,1                      | 96                  | 5,7                       |
| 3       | 96                  | 17,4                      | 96                  | 7,9                       |

(continuación)

Tabla 2: Pureza por HPLC de los análogos 1-17

| Análogo | Método A            |                           | Método B            |                           |
|---------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
|         | Pureza por HPLC (%) | Tiempo de retención (min) | Pureza por HPLC (%) | Tiempo de retención (min) |
| 4       | 97                  | 20,5                      | 97                  | 6,3                       |
| 5       | 97                  | 21,4                      | 99                  | 11,5                      |
| 6       | 96                  | 19,6                      | 96                  | 9,5                       |
| 7       | 96                  | 21,0                      | 96                  | 10,9                      |
| 8       | 98                  | 18,4                      | 96                  | 4,9                       |
| 9       | 97                  | 18,2                      | 95                  | 4,7                       |
| 10      | 95                  | 18,0                      | 96                  | 2,1                       |
| 11      | 96                  | 19,6                      | 99                  | 5,6                       |
| 12      | 99                  | 18,2                      | 96                  | 19,9                      |
| 13      | 95                  | 13,1                      | 99                  | 25,9                      |
| 14      | 95                  | 18,8                      | 97                  | 3,5                       |
| 15      | 95                  | 19,7                      | 96                  | 4,3                       |
| 16      | 95                  | 19,9                      | 95                  | 3,5                       |
| 17      | 99                  | 19,9                      | 99                  | 5,4                       |

Datos de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de análogos de paenipeptina

5

## C6-Pat (1)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,36 - 7,01 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,58 (t, J = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,38 - 4,10 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,00 - 3,93 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,78 - 3,67 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,08 - 2,82 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,70 - 2,45 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,14 (t, J = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,11 - 1,66 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,60 - 0,93 (m, 14H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,85 - 0,58 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>53</sub>H<sub>94</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1088,7197; Observado: 1088,7194.

15

## C7Val2-Pat (2)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,31 - 7,08 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,56 (t, J = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,37 - 4,06 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,02 - 3,91 (m, 2H, Val2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,79 - 3,67 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,08 - 2,83 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,73 - 2,48 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,16 (t, J = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,12 - 1,69 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Val2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ ), 1,65 - 0,93 (m, 14H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ ), 0,89 - 0,59 (m, 27H, Val2-H $\gamma$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>53</sub>H<sub>94</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1088,7197; Observado: 1088,7186.

25

## C7-Pat (3)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,40 - 7,04 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,56 (t, J = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,44 - 4,06 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,00 - 3,93 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,78 - 3,67 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,12 - 2,81 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,70 - 2,48 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,16 (t, J = 7,5 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,11 - 1,64 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,60 - 0,95 (m, 16H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,88 - 0,59 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>54</sub>H<sub>96</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1102,7353; Observado: 1102,7316.

35

## C7Phe2-Pat (4)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,38 - 6,96 (m, 10H, Phe2-ArH + D-Phe4-ArH), 4,58 - 4,42 (m, 2H, D-Phe4-H $\alpha$  + Phe2-H $\alpha$ ), 4,31 - 4,10 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 3,95 (d, J = 7,4 Hz, 1H, D-Val7-H $\alpha$ ), 3,79 - 3,67 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,08 - 2,71 (m, 8H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Phe2-H $\beta$ ), 2,67 - 2,47 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,10 (t, J = 7,5 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,06 - 1,65 (m, 7H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,60 - 0,98 (m, 14H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ ), 0,84 - 0,60 (m, 21H, Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>57</sub>H<sub>94</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1136,7197; Observado: 1136,7196.

45

## C7dLeu7-Pat (5)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,40 - 7,01 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,56 (t, J = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,37 - 4,06 (m, 7H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + D-Leu7-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 3,98 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Ile2-H $\alpha$ ),

5 3,83 - 3,66 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,11 - 2,82 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,72 - 2,47 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,16 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,12 - 1,62 (m, 7H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$ , 1,62 - 0,94 (m, 19H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + D-Leu7-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,85 - 0,60 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Leu7-H $\delta$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>55</sub>H<sub>98</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1116,7510; Observado: 1116,7510.

## C7Phe2dLeu7-Pat (6)

10 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,33 - 6,99 (m, 10H, Phe2-ArH + D-Phe4-ArH), 4,57 - 4,42 (m, 2H, Phe2-H $\alpha$  + D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,31 - 4,10 (m, 7H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + D-Leu7-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 3,83 - 3,66 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ , 3,06 - 2,71 (m, 8H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Phe2-H $\beta$ , 2,68 - 2,44 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,10 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,06 - 1,65 (m, 6H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$ ), 1,62 - 0,98 (m, 17H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + D-Leu7-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ ), 0,84 - 0,60 (m, 21H, Leu5-H $\delta$  + D-Leu7-H $\delta$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>58</sub>H<sub>96</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1150,7353; Observado: 1150,7335.

## 15 C7Phe2dLeu7Phe8-Pat (7)

20 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,39 - 6,96 (m, 15H, Phe2-ArH + D-Phe4-ArH + Phe8-ArH), 4,61 - 4,41 (m, 3H, Phe2-H $\alpha$  + D-Phe4-H $\alpha$  + Phe8-H $\alpha$ ), 4,31 - 3,98 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + D-Leu7-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 3,83 - 3,66 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,20 - 2,73 (m, 10H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Phe2-H $\beta$  + Phe8-H $\beta$ , 2,68 - 2,42 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ , 2,09 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,04 - 1,63 (m, 6H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$ ), 1,45 - 0,96 (m, 14H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + D-Leu7-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ ), 0,79 - 0,53 (m, 15H, Leu5-H $\delta$  + D-Leu7-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>61</sub>H<sub>94</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1184,7197; Observado: 1184,7200.

## 25 C8-Pat (8)

30 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,37 - 6,98 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,54 (t,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,38 - 4,08 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,00 - 3,93 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,78 - 3,67 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,10 - 2,80 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,70 - 2,45 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,14 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,10 - 1,64 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,56 - 0,95 (m, 18H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,85 - 0,58 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>55</sub>H<sub>98</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1116,7510; Observado: 1116,7518.

## 35 Dab9-Pat (9)

40 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,39 - 7,02 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,57 (t,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,37 - 4,11 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Dab9-H $\alpha$ ), 4,02 - 3,96 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,08 - 2,84 (m, 8H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Dab9-H $\gamma$ ), 2,73 - 2,46 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,16 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,12 - 1,64 (m, 10H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Dab9-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,63 - 1,00 (m, 18H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,83 - 0,62 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>56</sub>H<sub>101</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1129,7826; Observado: 1129,7823.

## 45 Dab2,9-Pat (10)

50 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,39 - 7,07 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,59 (t,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,39 - 4,05 (m, 7H, Dab1-H $\alpha$  + Dab2-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Dab9-H $\alpha$ ), 4,00 (d,  $J$  = 7,1 Hz, 1H, D-Val7-H $\alpha$ ), 3,08 - 2,83 (m, 10H, Dab1-H $\gamma$  + Dab2-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Dab9-H $\gamma$ ), 2,72 - 2,52 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,17 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,13 - 1,67 (m, 11H, Dab1-H $\beta$  + Dab2-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Dab9-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,60 - 0,95 (m, 16H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ ), 0,89 - 0,57 (m, 21H, Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>54</sub>H<sub>98</sub>N<sub>15</sub>O<sub>10</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1116,7622; Observado: 1116,7660.

## 55 Orn-Pat (11)

60 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,31 - 7,03 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,56 - 4,48 (m, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,39 - 4,07 (m, 6H, Orn1-H $\alpha$  + Orn3-H $\alpha$  + Orn6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,03 - 3,94 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,83 - 3,68 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,15 - 2,80 (m, 6H, Orn1-H $\beta$  + Orn3-H $\beta$  + Orn6-H $\beta$ ), 2,80 - 2,64 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,15 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,01 - 0,92 (m, 32H, Orn1-H $\gamma$ , H $\gamma$  + Orn3-H $\gamma$ , H $\gamma$  + Orn6-H $\gamma$ , H $\gamma$  + Ile2-H $\beta$ , H $\gamma$  + D-Val7-H $\beta$  + Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ ), 0,93 - 0,58 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>58</sub>H<sub>104</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1158,7979; Observado: 1158,7989.

## C10-Pat (12)

65 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7,36 - 7,04 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,56 (t,  $J$  = 7,8 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,38 - 4,10 (m, 6H,

5 Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,02 - 3,95 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,82 - 3,68 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,10 - 2,81 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,73 - 2,47 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,16 (t, J = 7,3 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,12 - 1,64 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,62 - 0,95 (m, 22H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ , H $\eta$ , H $\theta$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,87 - 0,60 (m, 27H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>57</sub>H<sub>102</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1144,7823; Observado: 1144,7844.

C10Thr3Leu4-Pat (13)

10 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4,40 - 3,95 (m, 10H, Dab1-H $\alpha$  + Ile2-H $\alpha$  + Thr3-H $\alpha$  + D-Leu4-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$  + Thr3-H $\beta$ , 3,80 - 3,64 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,02 - 2,84 (m, 4H, Dab1-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,16 (t, J = 7,3 Hz, 2H, Lípido-H $\alpha$ ), 2,11 - 1,71 (m, 6H, Dab1-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,62 - 0,98 (m, 28H, D-Leu4-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Lípido-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ , H $\eta$ , H $\theta$  + Ile2-H $\gamma$  + Thr3-H $\gamma$ ), 0,89 - 0,67 (m, 33H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + D-Leu4-H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$  + Lípido-CH<sub>3</sub>) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>54</sub>H<sub>103</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1111,7819; Observado: 1111,7803.

Benzoílo-Pat (14)

20 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,73 - 7,34 (m, 5H, Benzoílo-ArH), 7,32 - 7,05 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,58 - 4,46 (m, 2H, D-Phe4-H $\alpha$  + Dab1-H $\alpha$ ), 4,35 - 4,06 (m, 5H, Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,02 - 3,95 (m, 2H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,80 - 3,65 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,12 - 2,80 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,78 - 2,49 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ , 2,25 - 1,63 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,62 - 0,93 (m, 8H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,91 - 0,59 (m, 24H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$ ) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>54</sub>H<sub>88</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1094,6727; Observado: 1094,6746.

25 Cbz-Pat (15)

30 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,43 - 7,02 (m, 10H, D-Phe4-ArH + Cbz-ArH), 5,00 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 4,54 (t, J = 7,9 Hz, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,39 - 3,98 (m, 8H, Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$  + Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$ ), 3,80 - 3,65 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,11 - 2,81 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,76 - 2,47 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,15 - 1,68 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,61 - 0,97 (m, 8H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Ile2-H $\gamma$ ), 0,83 - 0,56 (m, 24H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$ ) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>55</sub>H<sub>90</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1124,6833; Observado: 1124,6811.

35 Cha-Pat (16)

40 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,37 - 7,07 (m, 5H, D-Phe4-ArH), 4,60 - 4,55 (m, 1H, D-Phe4-H $\alpha$ ), 4,50 - 4,07 (m, 6H, Dab1-H $\alpha$ , Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + Leu8-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 4,03 - 3,92 (m, 3H, Ile2-H $\alpha$  + D-Val7-H $\alpha$  + Cha-H $\alpha$ ), 3,77 - 3,70 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,20 - 2,78 (m, 6H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$ ), 2,73 - 2,39 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,23 - 1,64 (m, 8H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$  + Ile2-H $\beta$  + D-Val7-H $\beta$ , 1,59 - 0,94 (m, 21H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + Leu8-H $\beta$ , H $\gamma$  + Ile2-H $\gamma$ , Cha-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ ), 0,90 - 0,53 (m, 24H, Ile2-H $\gamma$ , H $\delta$  + Leu5-H $\delta$  + D-Val7-H $\gamma$  + Leu8-H $\delta$ ) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>56</sub>H<sub>99</sub>N<sub>14</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1143,7619; Observado: 1143,7636.

45 ChaPhe2Leu7Phe8-Pat (17)

50 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,35 - 6,95 (m, 15H, Phe2-ArH + D-Phe4-ArH + Phe8-ArH), 4,62 - 4,00 (m, 9H, Phe2-H $\alpha$  + D-Phe4-H $\alpha$  + Phe8-H $\alpha$  + Dab1-H $\alpha$  + Dab3-H $\alpha$  + Dab6-H $\alpha$  + Leu5-H $\alpha$  + D-Leu7-H $\alpha$  + Ser9-H $\alpha$ ), 3,89 - 3,81 (m, 1H, Cha-H $\alpha$ ), 3,79 - 3,65 (m, 2H, Ser9-H $\beta$ ), 3,19 - 2,72 (m, 10H, Dab1-H $\gamma$  + Dab3-H $\gamma$  + Dab6-H $\gamma$  + Phe2-H $\beta$  + Phe8-H $\beta$ , 2,65 - 2,40 (m, 2H, D-Phe4-H $\beta$ ), 2,10 - 1,61 (m, 6H, Dab1-H $\beta$  + Dab3-H $\beta$  + Dab6-H $\beta$ , 1,60 - 0,73 (m, 19H, Leu5-H $\beta$ , H $\gamma$  + D-Leu7-H $\beta$ , H $\gamma$  + Cha-H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$ , H $\epsilon$ , H $\zeta$ ), 0,70 - 0,55 (m, 12H, Leu5-H $\delta$  + D-Leu7-H $\delta$ ) ppm. HRMS-ESI (m/z) calculada para C<sub>63</sub>H<sub>97</sub>N<sub>14</sub>O<sub>11</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 1225,7462; Observado: 1225,7471.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

55 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

60 La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los análogos de paenipeptina se determinó usando el método de microdilución en caldo (Wirkar, M.A. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Norma aprobada M07-A8; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2009). Siete cepas de referencia (ATCC 19606 de *Acinetobacter baumannii*, ATCC 25922 de *Escherichia coli*, ATCC 13883 de *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 19434 de *Enterococcus faecium*, ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus* y ATCC 43300 de *S. aureus* resistente a meticilina) se sometieron a pruebas de CIM.

65 Los análogos de paenipeptina se diluyeron dos veces en caldo de soja tríptica (TSB; Becton Dickinson) y se mezclaron con un volumen equivalente de suspensiones bacterianas en TSB que contenían aproximadamente 1,5 x 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en una placa de microvaloración de 96 pocillos esterilizada con luz UV (NBS, Corning

Inc., Corning, NY). El volumen total fue de 100 µl y las concentraciones finales de paenipeptina variaron entre 0,5-32 µg/ml. La placa de microvaloración se incubó a 37 °C durante 18-20 h. La CIM para cada cepa se definió como la concentración más baja de cada análogo de paenipeptina que no produjo crecimiento visible de células bacterianas después de la incubación.

5 Las actividades antibacterianas de estos 17 análogos de paenipeptina se determinaron contra cuatro cepas gramnegativas y tres grampositivas basándose en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada cepa. Los valores de CIM de todos los análogos de paenipeptina contra las especies bacterianas ensayadas se enumeran en la Tabla 3. La actividad antibacteriana aumentó con el aumento de la longitud de la cadena de ácidos 10 grasos de C6 a C10 en los análogos 1, 3, 8 y 12. Los análogos 1 y 3, en los que las cadenas lipídicas son más cortas que C8, fueron significativamente menos activos que el análogo 8. Por el contrario, el análogo 12, que contiene una cola lipídica C10, mostró un aumento notable en la actividad antibacteriana. La sustitución de la cadena lipídica por 15 un grupo benzoilo o benciloxicarbonilo (análogos 14 y 15) disminuyó la actividad antimicrobiana, pero el sustituyente 3-ciclohexilalanilo en el análogo 16 mantuvo su actividad contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Tabla 3).

15 **Tabla 3. Comparación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 17 análogos sintéticos de paenipeptina**

| An. | <i>A. baumannii</i><br>ATCC<br>19606 | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>25922 | <i>K. pneumoniae</i><br>ATCC 13883 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | <i>E. faecium</i><br>ATCC<br>19434 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>29213 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>43300 | CIM (µg/ml) |
|-----|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|
|     |                                      |                                 |                                    |                                    |                                    |                                   |                                   |             |
| 1   | >32                                  | 8-16                            | ≥32                                | 8-16                               | >32                                | >32                               | >32                               | >32         |
| 2   | >32                                  | 16                              | >32                                | 16                                 | >32                                | >32                               | >32                               | >32         |
| 3   | >32                                  | 4                               | 32                                 | 4                                  | >32                                | >32                               | >32                               | >32         |
| 4   | 32                                   | 1-4                             | 8                                  | 2-4                                | >32                                | ≥32                               | 32                                |             |
| 5   | 8-16                                 | 1-4                             | 4                                  | 2-4                                | 8-16                               | 16-32                             | 16                                |             |
| 6   | 8                                    | 1-4                             | 4                                  | 2-4                                | 16                                 | 16-32                             | 16-32                             |             |
| 7   | 2-4                                  | 0,5-2                           | 1                                  | 1-2                                | 8                                  | 8                                 | 8                                 |             |
| 8   | 16                                   | 2-4                             | 8-16                               | 2                                  | 16                                 | 8-16                              | 8-16                              |             |
| 9   | ≥32                                  | 4-16                            | >32                                | 2-4                                | 32                                 | >32                               | 32                                |             |
| 10  | >32                                  | >32                             | >32                                | 16-32                              | >32                                | ≥32                               | >32                               |             |
| 11  | 32                                   | 32                              | >32                                | 16                                 | >32                                | >32                               | 32                                |             |
| 12  | 0,5-2                                | 2-8                             | 2-4                                | 1-2                                | 2                                  | 2-4                               | 2-4                               |             |
| 13  | >32                                  | >32                             | >32                                | >32                                | ≥32                                | >32                               | >32                               |             |
| 14  | >32                                  | 16-32                           | >32                                | 8-32                               | >32                                | >32                               | >32                               |             |
| 15  | 16                                   | 8-16                            | >32                                | 16                                 | >32                                | >32                               | >32                               |             |
| 16  | ≥32                                  | 4-8                             | 32                                 | 2-8                                | >32                                | >32                               | 32                                |             |
| 17  | 2-4                                  | 0,5-1                           | 2                                  | 0,5-1                              | 8                                  | 2-4                               | 4                                 |             |

20 El compuesto 8 consiste en tres residuos de ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) cargados positivamente. La sustitución de los 3 residuos de Dab por ornitina (Om), que posee un carbono adicional en la cadena lateral (análogo 11), eliminó inesperadamente la actividad antibacteriana. Las alteraciones del número de residuos cargados positivamente también tuvieron efectos considerables en la actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la alteración de la Ser a Dab en el extremo C en la posición 9 (análogo 9) dio como resultado un aumento en la CIM para todas las especies bacterianas excepto *P. aeruginosa*. De manera similar, la adición de un Dab adicional en la posición 2 (análogo 10) o la reducción de la carga de Dab en la posición 3 (análogo 13) dio como resultado la pérdida de casi toda la actividad antibacteriana. 25 Por el contrario, los cambios asociados con una mayor hidrofobicidad se asociaron con aumentos en la actividad antibacteriana. Por ejemplo, los análogos 3 y 4 tienen más residuos hidrófobos (Ile o Phe) en la posición 2 y fueron más potentes que el análogo 2, que tiene un residuo Val en la misma posición. El reemplazo de Val por Leu en la posición 7 (análogo 5) también mostró un aumento en la actividad antimicrobiana. Los aumentos adicionales en la hidrofobicidad en los análogos 6, 7 y 17 mejoraron significativamente la actividad antibacteriana contra todas las cepas 30 bacterianas ensayadas (Tabla 3).

#### Concentración inhibitoria mínima (CIM) para cepas resistentes a antibióticos

35 Además de las cepas de referencia anteriores, se ensayó la susceptibilidad de nueve aislados resistentes a carbapenem y seis cepas resistentes a polimixina (Tablas 4 y 5), incluidos los aislados clínicos del Banco de resistencia a antibióticos de la FDA-CDC, para el análogo 17 de paenipeptina seleccionado. Hubo al menos tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

40 El análogo 17 de paenipeptina es el compuesto más activo entre 17 análogos diseñados racionalmente. Por lo tanto, este análogo se evaluó más a fondo para determinar su eficacia *in vitro* contra bacterias gramnegativas farmacorresistentes. El análogo 17 de paenipeptina mostró una potente actividad con una CIM de 0,5-2 µg/ml contra nueve aislados clínicos resistentes a carbapenem del Banco de resistencia a antibióticos de la FDA-CDC, incluyendo *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Tabla 4). Además, el análogo 17 fue activo contra cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a polimixina, incluyendo una cepa portadora del gen de

resistencia a polimixina *mcr-1* (Tabla 5).

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima (μg/ml) del análogo 17 contra patógenos resistentes a carbapenem del Banco de resistencia a antibióticos (AR, por sus siglas en inglés) de la FDA-CDC

| N.º del Banco de RA de la FDA-CDC | Cepas                          | Resistencia conocida <sup>a</sup> | Análogo 17 (μg/ml) |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 063                               | <i>Acinetobacter baumannii</i> | OXA-23, 24/40                     | 0,5                |
| 083                               | <i>A. baumannii</i>            | OXA-23, NDM                       | 2                  |
| 038                               | <i>Enterobacter cloacae</i>    | NDM                               | 0,5                |
| 053                               | <i>E. cloacae</i>              | KPC-3, TEM-1                      | 0,5                |
| 048                               | <i>Escherichia coli</i>        | NDM                               | 0,5                |
| 061                               | <i>E. coli</i>                 | KPC-3, TEM-1                      | 0,5-1              |
| 068                               | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | NDM, OXA-181                      | 0,5-2              |
| 097                               | <i>K. pneumoniae</i>           | KPC                               | 1-2                |
| 064                               | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | SPM                               | 2                  |

<sup>a</sup> Producción de diversos tipos de beta-lactamasa

5

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima (μg/ml) del análogo 17 contra cepas resistentes a polimixina

| Cepas  | Análogo 17 (μg/ml) | Polimixina B (μg/ml) |
|--|--------------------|----------------------|
| AR 0494 de <i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>      | 0,5                | 2-8                  |
| UAMS-ECPR1 de <i>E. coli</i> <sup>b</sup>            | <0,5               | 32                   |
| UAMS-ECPR2 de <i>E. coli</i> <sup>b</sup>            | <0,5               | 32                   |
| AR 0109 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a</sup> | 4-8                | 16-32                |
| UAMS-KPPR1 de <i>K. pneumoniae</i> <sup>c</sup>      | 2                  | >32                  |
| UAMS-KPPR3 de <i>K. pneumoniae</i> <sup>c</sup>      | 2                  | >32                  |

<sup>a</sup> Las cepas bacterianas se obtuvieron del Banco de resistencia a antibióticos de la FDA-CDC, AR 0494 de *Escherichia coli* lleva el gen de resistencia a la polimixina codificado por plásmido, *mcr-1*; <sup>b</sup> las cepas son los derivados de ATCC 25922 de *E. coli*; <sup>c</sup> las cepas son los derivados de ATCC 13883 de *K. pneumoniae*

#### Concentración bactericida mínima (CBM)

10 La concentración bactericida mínima (CBM) de análogos de paenipeptina se determinó al final de las pruebas de CIM subcultivando una alícuota de 50 μl de suspensión celular de la placa de microvaloración de 96 pocillos usada para las pruebas de CIM. Las células supervivientes de cada concentración antimicrobiana sin crecimiento visible se enumeraron sembrándolas en agar de soja tríptica (TSA). La CBM se definió como la concentración más baja del agente antimicrobiano que condujo a una reducción de al menos el 99,9 % en el número de células bacterianas viables en relación con el inóculo inicial. Hubo tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

15

20 Se eligieron seis análogos de paenipeptina (5, 6, 7, 8, 12 y 17) que mostraban una actividad antibacteriana potente y amplia para determinar su actividad bactericida mínima (CBM) contra las mismas cuatro cepas gramnegativas y tres grampositivas. Los análogos 9 y 16 mostraron una actividad limitada contra *Pseudomonas*; por lo tanto, la CBM de estos análogos solo se determinó para *P. aeruginosa*. Los valores de CBM de los análogos de paenipeptina seleccionados se enumeran en la Tabla 6. En comparación con el compuesto principal (análogo 8), tres nuevos análogos de paenipeptina (7, 12 y 17) mostraron un aumento de 2-8 veces en su actividad bactericida contra la mayoría de las cepas bacterianas ensayadas (Tabla 6).

25 Tabla 6. Comparación de la concentración bactericida mínima (CBM) de 8 análogos sintéticos de paenipeptina seleccionados

| Análogo | MBM (μg/ml)                          |                                 |                                    |                                       |                                    |                                   |                                   |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|         | <i>A. baumannii</i><br>ATCC<br>19606 | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>25922 | <i>K. pneumoniae</i><br>ATCC 13883 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC<br>27853 | <i>E. faecium</i><br>ATCC<br>19434 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>29213 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>43300 |
| 5       | 16                                   | 16                              | 8                                  | 8-16                                  | 16                                 | 16-32                             | 16-32                             |
| 6       | 8                                    | 32                              | 8                                  | 8-16                                  | 32                                 | 16-32                             | 32                                |
| 7       | 4                                    | 8-16                            | 2                                  | 4                                     | 16                                 | 8-32                              | 8-16                              |
| 8       | 16-32                                | 16                              | 8-16                               | 8-16                                  | 16-32                              | 16                                | 8-32                              |
| 9       | ND <sup>a</sup>                      | ND                              | ND                                 | 16                                    | ND                                 | ND                                | ND                                |
| 12      | 0,5-2                                | 8                               | 4-8                                | 2-4                                   | 2-4                                | 4-8                               | 2-4                               |
| 16      | ND                                   | ND                              | ND                                 | 16-32                                 | ND                                 | ND                                | ND                                |

(continuación)  
seleccionados

| Análogo | MBM (µg/ml)                          |                                 |                                    |                                       |                                    |                                   |                                   |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|         | <i>A. baumannii</i><br>ATCC<br>19606 | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>25922 | <i>K. pneumoniae</i><br>ATCC 13883 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC<br>27853 | <i>E. faecium</i><br>ATCC<br>19434 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>29213 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>43300 |
| 17      | 4-8                                  | 8-16                            | 4                                  | 2-4                                   | 16                                 | 8                                 | 8                                 |

<sup>a</sup> ND: no determinado debido a una concentración inhibitoria mínima relativamente alta**Ensayo de letalidad**

5 La cinética de letalidad del análogo 17 se determinó en tres concentraciones (8, 16 y 32 µg/ml) usando las cepas de referencia ATCC 27853 de *P. aeruginosa* y ATCC 29213 de *S. aureus*. Las células supervivientes después del tratamiento antimicrobiano se enumeraron a las 0, 2, 4, 6 y 24 h mediante siembra en TSA. Hubo tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento

10 Se realizaron ensayos de letalidad con el análogo 17, que fue el análogo más eficaz contra ATCC 27853 de *P. aeruginosa* y ATCC 29213 de *S. aureus*. Esto se realizó en tres concentraciones diferentes (8, 16 y 32 µg/ml). El análogo 17 mostró un efecto bactericida dependiente de la concentración contra ambos patógenos. Por ejemplo, el número de células viables de *P. aeruginosa* se redujo en 5,1 log y 3,7 log en 2 h cuando se expuso al análogo 17 a razón de 32 µg/ml y 16 µg/ml, respectivamente, y no se detectaron células viables después de 24 h de exposición a cualquiera de las concentraciones. El análogo 17 a razón de 8 µg/ml dio como resultado una reducción de 2,2 log de células viables de *P. aeruginosa* en 2 h, pero se observó un recrecimiento bacteriano significativo a las 24 h (figura 1A). El análogo 17 tardó más en lograr una reducción similar en el número de células viables de *S. aureus*. Específicamente, la exposición al análogo 17 a razón de 32 µg/ml y 16 µg/ml redujo el número de células viables de *S. aureus* en 5,4 log y 3,1 log, respectivamente, pero solo después de 4 h. También se observó un nuevo crecimiento de *S. aureus* cuando las células se expusieron al análogo 17 a razón de 8 µg/ml (figura 1B).

**Impacto del suero humano en la actividad antibacteriana y la estabilidad.**

25 El impacto del suero humano en la actividad antibacteriana de análogos de paenipeptina seleccionados se determinó usando un procedimiento similar al usado para la determinación de la CIM como se ha descrito anteriormente, excepto que el medio microbiológico se reemplazó por suero humano (MP Biomedicals, Solon, OH). Los análogos de paenipeptina se diluyeron dos veces en suero humano al 100 % y se mezclaron con un volumen equivalente de suero al 90 % que contenía aproximadamente 1,5 x 10<sup>5</sup> UFC/ml de ATCC 25922 de *E. coli* o ATCC 29213 de *S. aureus*. Las concentraciones finales de paenipeptina variaron entre 0,5-64 µg/ml en suero al 95 %. A continuación, se ensayó la CIM en presencia de suero como se ha descrito anteriormente.

30 Para determinar la estabilidad de los péptidos en suero humano, se añadieron análogos de paenipeptina a suero humano al 100 % hasta una concentración final de 64 µg/ml. Las mezclas se incubaron a 37 °C y se extrajeron muestras en 0, 6, 12 y 24 h. Los análogos de paenipeptina tratados se diluyeron dos veces en suero humano al 100 % y se mezclaron con un volumen equivalente de células de ATCC 25922 de *E. coli* en TSB (aproximadamente 1,5 x 10<sup>5</sup> UFC/ml) para la determinación de la CIM. La actividad antibacteriana residual después de la incubación en suero humano se comparó con el control no tratado.

35 40 El suero humano inhibió el crecimiento de ATCC 27853 de *P. aeruginosa* y ATCC 13883 de *K. pneumoniae* (datos no mostrados); por lo tanto, se usaron otras cepas de referencia (ATCC 25922 de *E. coli* y ATCC 29213 de *S. aureus*) que crecieron en suero al 95 % para ensayar la eficacia antibacteriana de los análogos de paenipeptina en presencia de suero humano. En suero humano, los análogos 9 y 16 mostraron una potente actividad contra *E. coli*, mientras que el análogo 9 exhibió un ligero aumento en la actividad contra *S. aureus* (Tabla 7). Sin embargo, otros análogos mostraron reducciones en la actividad antimicrobiana en presencia de suero humano. Por ejemplo, el análogo 17 mostró un aumento de 8 a 16 veces en la CIM contra *E. coli* y *S. aureus*, lo que corresponde a una reducción del 88-94 % en su actividad. Generalmente, se cree que las proteínas séricas humanas pueden unirse a determinados antibióticos lipopeptídicos y limitar su actividad antibacteriana. Por ejemplo, la CIM del lipopéptido MX-2401 contra ATCC 29213 de *S. aureus* aumentó de 2 µg/ml en medio microbiológico a 128 µg/ml en suero de ratón al 95 %; esto correspondió a una unión a proteínas del 98,9 %. Sin embargo, el grado de unión a proteínas no se puede usar para predecir con precisión el rendimiento terapéutico final de los antibióticos. Por ejemplo, la daptomicina es un lipopéptido muy unido a las proteínas plasmáticas (94 %), pero es un fármaco eficaz recientemente aprobado para tratar infecciones causadas por *S. aureus* resistente a meticilina.

45 50 55 Entre ocho análogos de paenipeptina ensayados en presencia de suero humano al 95 %, cuatro análogos (8, 9, 16 y 17) mostraron una actividad relativamente alta contra *E. coli* (Tabla 7), por lo que estos cuatro análogos se ensayaron más a fondo para determinar su estabilidad a 37 °C en suero humano. El análogo 16 mostró un aumento en su CIM de 1-2 µg/ml a >32 µg/ml después de la incubación en suero durante 6 h, lo que indica que el análogo 16 puede no ser estable a 37 °C en suero humano (Tabla 8). Específicamente, el análogo 16 mostró una CIM relativamente baja

(2 µg/ml) en suero humano contra *E. coli* (Tabla 7) pero perdió su eficacia después de un tiempo de incubación prolongado a 37 °C en suero. Esto sugiere que el análogo 16 puede destruir rápidamente las células bacterianas pero es inactivado por los componentes del suero con el tiempo. De manera importante, los otros tres análogos ensayados (8, 9 y 17) mostraron una pequeña disminución en la actividad antibacteriana después de la incubación en suero humano a 37 °C durante hasta 24 h (Tabla 8). El análogo 8 difiere del análogo 16 en las modificaciones en el extremo N. Basándose en esto, la cadena lipídica del extremo N en el análogo 8 puede estar asociada con su alta estabilidad en suero humano. Sin embargo, el grupo hidrófobo (3-ciclohexilalanilo) en el análogo 16 no lo protegió de ser inactivado en suero. Los análogos 16 y 17 compartían la misma modificación en el extremo N, pero este último se volvió más estable cuando tres aminoácidos en las posiciones 2, 7 y 8 se sustituyeron por más residuos hidrófobos.

10

Tabla 7. Impacto del suero humano en la actividad antimicrobiana de análogos de paenipeptina seleccionados

| Análogo | Concentración inhibitoria mínima (µg/ml) |  |                                       |  |
|---------|--|--|---------------------------------------|--|
|         | ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i>    | ATCC 29213 de <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i> | ATCC 29213 de <i>Staphylococcus aureus</i> |
|         | Suero al 95 %                            | Caldo TSB                                  | Suero al 95 %                         | Caldo TSB                                  |
| 5       | 16                                       | 1-4  | 32                                    | 16-32                                      |
| 6       | 32                                       | 1-4  | 64                                    | 16-32                                      |
| 7       | 32                                       | 0,5-2                                      | 32-64                                 | 8  |
| 8       | 8  | 2-4  | 16-32                                 | 8-16                                       |
| 9       | 2-4                                      | 4-16                                       | 16                                    | >32  |
| 12      | 32                                       | 2-8  | 16                                    | 2-4  |
| 16      | 2  | 4-8  | >64                                   | >32  |
| 17      | 8  | 0,5-1                                      | 32                                    | 2-4  |

Tabla 8. Estabilidad de análogos de paenipeptina seleccionados en suero humano a 37 °C<sup>a</sup>

| Análogo | Concentración inhibitoria mínima (µg/ml) |     |      |      |
|---------|--|-----|------|------|
|         | 0 h                                      | 6 h | 12 h | 24 h |
| 8       | 8  | 8   | 8    | 8    |
| 9       | 1-2                                      | 2   | 1-2  | 2    |
| 16      | 1-2                                      | >32 | >32  | >32  |
| 17      | 4-8                                      | 4-8 | 4-8  | 8    |

<sup>a</sup> Se determinó la CIM contra ATCC 25922 de *Escherichia coli*

## 15 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se evaluó usando sangre de conejo desfibrinada en una placa de 96 pocillos como se ha descrito previamente. Se usó un tensioactivo no iónico Triton X-100, que es capaz de lisar los glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés), al 0,1 % como control positivo. Brevemente, se diluyó sangre de conejo (Hardy Diagnostics, Santa María, CA) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2) en una relación de 1:19 (v/v) y se eliminó la hemoglobina libre lavando los RBC y centrifugándolos cuatro veces a razón de 1000 x g a 4 °C durante 5 min. Se incubaron alícuotas (50 µl) de RBC lavados con 150 µl de diluciones dobles de análogos de paenipeptina a concentraciones finales de 16-128 µg/ml a 37 °C durante 30 min en una placa de microvaloración (NBS, Corning Inc.). Despues de la incubación, los RBC tratados se mezclaron suavemente mediante pipeteo repetido. Se mezclaron alícuotas (20 µl) de la suspensión celular con 200 µl de PBS en una nueva placa de 96 pocillos y se centrifugaron a razón de 2204 x g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos para la medición de la absorbancia a 415 nm usando un lector multimodo de imágenes celulares (Cytation 3, BioTek; Winooski, VT). El porcentaje de hemólisis observado después de la exposición a cada análogo de paenipeptina se calculó en relación con Triton X-100. Hubo al menos tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

30

La alteración de la cadena lipídica en el extremo N tuvo un impacto sustancial en la actividad hemolítica de la paenipeptina. Entre los análogos 1, 3, 8 y 12, la actividad hemolítica contra los glóbulos rojos de conejo aumentó a medida que la longitud de la cadena lipídica aumentó de C6 a C10. Específicamente, los análogos 1 y 3 con una cadena lipídica C6 y C7, respectivamente, mostraron poca hemólisis a 128 µg/ml, mientras que a la misma concentración, el análogo 12 portador de una cadena lipídica C10 mostró una fuerte actividad hemolítica (Tabla 9). De manera importante, estas mismas tendencias se reflejaron en la actividad antibacteriana relativa, que también aumentó con el aumento de la longitud de la cadena. Por el contrario, el reemplazo de la cadena de ácidos grasos con grupos hidrófobos en los análogos 14, 15 y 16 redujo en gran medida su actividad hemolítica. Estos resultados concuerdan con informes anteriores donde el reemplazo de la cadena de ácidos grasos con grupos aromáticos redujo la toxicidad de las polimixinas lipopeptídicas. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, el reemplazo de la cadena de ácidos grasos por grupos hidrófobos en los análogos 14 y 15 también dio como resultado una actividad antibacteriana reducida.

45 Los análogos 9 y 16, que conservaron su actividad contra *P. aeruginosa*, no fueron hemolíticos a 128 µg/ml (Tabla 9), por lo que estos dos derivados de paenipeptina podrían desarrollarse aún más como agentes anti *Pseudomonas* de espectro limitado. Entre los derivados de paenipeptina C7 (análogos 2-7), la actividad hemolítica aumentó cuando se introdujeron más aminoácidos hidrófobos en la cadena peptídica. Una excepción fue el análogo 6, que fue más

hidrófobo pero mucho menos hemolítico que el análogo 5. En comparación con el compuesto 8, el análogo 17 mostró al menos una mejora de 4 veces en la actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *K. pneumoniae* (Tabla 3) pero a expensas de un aumento del 37 % en la actividad hemolítica (Tabla 9).

5 Tabla 9. Comparación de la actividad hemolítica<sup>a</sup> de 17 análogos de paenipeptina frente a glóbulos rojos de conejo

| Análogo | Hemólisis (%) |              |             |              |
|---------|---------------|--------------|-------------|--------------|
|         | 128 µg/ml     | 64 µg/ml     | 32 µg/ml    | 16 µg/ml     |
| 1       | 0,61 ± 0,25   | 0,08 ± 0,85  | 0,41 ± 0,58 | 0,48 ± 0,64  |
| 2       | 0,95 ± 0,45   | 0,79 ± 0,63  | 0,32 ± 0,74 | -0,17 ± 0,19 |
| 3       | 1,77 ± 0,81   | 1,18 ± 0,68  | 0,78 ± 0,30 | 0,18 ± 0,54  |
| 4       | 1,28 ± 1,65   | 0,60 ± 1,35  | 0,49 ± 1,22 | 0,28 ± 1,11  |
| 5       | 26,5 ± 4,45   | 4,86 ± 1,05  | 1,39 ± 0,55 | 0,96 ± 0,59  |
| 6       | 8,34 ± 1,80   | 2,03 ± 0,44  | 0,39 ± 0,30 | 0,14 ± 0,20  |
| 7       | 64,2 ± 3,28   | 18,8 ± 2,44  | 5,10 ± 1,26 | 0,99 ± 0,31  |
| 8       | 25,3 ± 4,15   | 6,18 ± 2,48  | 1,91 ± 0,25 | 0,93 ± 0,45  |
| 9       | 2,25 ± 2,18   | 0,73 ± 0,50  | 0,80 ± 0,68 | 0,52 ± 0,58  |
| 10      | 0,80 ± 0,40   | 0,41 ± 0,53  | 0,38 ± 0,62 | 0,37 ± 0,62  |
| 11      | 1,12 ± 0,47   | 0,69 ± 0,64  | 0,44 ± 0,30 | 0,86 ± 0,72  |
| 12      | 93,9 ± 7,57   | 73,4 ± 7,59  | 37,2 ± 8,62 | 14,3 ± 4,25  |
| 13      | 24,9 ± 2,71   | 10,0 ± 1,03  | 5,06 ± 1,14 | 1,25 ± 0,71  |
| 14      | 0,70 ± 0,34   | 1,14 ± 1,05  | 0,71 ± 0,82 | 0,22 ± 0,17  |
| 15      | 0,65 ± 0,29   | 0,54 ± 0,70  | 0,41 ± 0,67 | 0,77 ± 0,15  |
| 16      | 1,63 ± 0,40   | 0,65 ± 0,62  | 0,33 ± 0,83 | 0,55 ± 0,75  |
| 17      | 34,6 ± 0,91   | 11,02 ± 0,99 | 2,46 ± 0,34 | 0,60 ± 0,18  |

<sup>a</sup> El porcentaje de hemólisis se calculó en relación con el control positivo, Triton X-100.

### Citotoxicidad

La citotoxicidad de los análogos de paenipeptina se determinó frente a una línea celular de riñón humano (HEK 293) usando ensayos MTT (Huang E, Yousef AE. 2014. Paenibacterin, a novel broad-spectrum lipopeptide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 44: 74-77). La viabilidad celular se midió 24 h después de la adición de lipopéptidos en concentraciones entre 30-105 µg/ml. La viabilidad de las células de riñón embrionario humano (HEK 293) disminuyó con el aumento de la concentración de paenipeptina. La viabilidad de las células HEK 293 en presencia de los análogos de paenipeptina 1 y 15 a razón de 105 µg/ml fue del 61 % y 67 %, respectivamente (Tabla 10). La citotoxicidad relativamente baja de los análogos 1 y 15 de paenipeptina se correlacionó con su baja actividad hemolítica contra los glóbulos rojos.

20 Tabla 10. Viabilidad (%) de células renales embrionarias humanas (HEK 293) después del tratamiento con los análogos 1 y 15 de paenipeptina durante 24 h

| An. | 30 µg/ml      | 45 µg/ml      | 60 µg/ml      | 75 µg/ml      | 90 µg/ml      | 105 µg/ml    |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| 1   | 85,23 ± 10,15 | 78,41 ± 11,15 | 78,43 ± 13,49 | 73,09 ± 11,35 | 69,03 ± 8,14  | 61,01 ± 6,38 |
| 15  | 91,39 ± 4,09  | 84,32 ± 8,12  | 82,04 ± 4,54  | 73,34 ± 5,37  | 67,13 ± 10,03 | 67,47 ± 9,66 |

### Actividad antibioléptica

El efecto del análogo 17 de paenipeptina sobre biolépticas asociadas a catéteres de *S. aureus* o *P. aeruginosa* establecidas se determinó *in vitro* como se ha descrito previamente con modificaciones menores.<sup>18</sup> Brevemente, segmentos de 1 cm (n = 6) de catéteres de etileno propileno fluorado (calibre 14; catéter de seguridad Introcan; B. Braun, Bethlehem, PA), se recubrieron previamente con plasma humano al 20 % durante una noche antes de colocarlos en 2 ml de medio de bioléptica (TSB complementado con glucosa al 0,5 % y NaCl al 3,0 %) en los pocillos de una placa de microvaloración de 24 pocillos (superficie de adhesión ultrabaja; Corning Inc.). Cada pocillo se inoculó con la cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina LAC o ATCC 27853 de *P. aeruginosa* a una DO<sub>600 nm</sub> de 0,05. Después de la incubación a 37 °C durante 24 h, los catéteres con biolépticas establecidas se transfirieron a un medio de bioléptica recién preparado con o sin análogo 17 de paenipeptina en concentraciones correspondientes a 5, 10 y 20 veces su CIM para la cepa de *S. aureus* LAC o 10, 20, 40 y 80 veces su CIM para ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. Los valores de CIM del análogo 17 contra LAC y ATCC 27853 de *P. aeruginosa* fueron 8 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente. Seis catéteres colonizados con cada cepa y expuestos a cada concentración se retiraron a intervalos diarios y se transfirieron a un medio recién preparado que contenía la misma concentración del análogo 17. Después de 72 h de exposición, los catéteres se aclararon con PBS, seguido de sonicación (para *S. aureus*) o agitación vortical vigorosa (para *P. aeruginosa*) para recuperar cuantitativamente las bacterias adherentes. Las células viables de *S. aureus* o *P. aeruginosa* se enumeraron mediante diluciones en serie en placas en TSA. Se usaron cefotarolina y daptomicina a una concentración de 20 veces la CIM para cada antibiótico como controles positivos en el contexto de biolépticas formadas con la cepa de *S. aureus* LAC. Se usó polimixina B como control positivo a una concentración de 20 veces su CIM (10 µg/ml) como control positivo en el contexto de biolépticas formadas por ATCC 27853 de *P.*

*aeruginosa*.

Las células bacterianas en biopelículas son más tolerantes que las células planctónicas al tratamiento con antibióticos, por lo que es importante identificar aquellos antibióticos que tienen la mayor eficacia en el contexto de una biopelícula establecida. Estudios anteriores demostraron que la daptomicina y la ceftarolina son más activas en este contexto que muchos otros antibióticos. Por este motivo, la evaluación del análogo 17 en el contexto de una biopelícula establecida se basó en la comparación con estos dos antibióticos. Como se muestra en la figura 2A, la actividad del análogo 17 fue comparable a la de ambos antibióticos cuando se ensayó *in vitro* en el contexto de una biopelícula asociada a catéter establecida formada por la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina LAC. Específicamente, el tratamiento con el análogo 17 a razón de 40 µg/ml (5 veces la CIM) o 160 µg/ml (20 veces la CIM) dio lugar a reducciones de 3 log y 5 log, respectivamente, de células de *S. aureus* asociadas a la biopelícula viables. Además, a una concentración igual a 20 veces su CIM, la exposición al análogo 17 eliminó por completo tres de seis catéteres de bacterias viables (50 %), mientras que la exposición a daptomicina a un múltiplo equivalente de su CIM solo eliminó uno de seis catéteres (17 %), y ninguno fue eliminado por una concentración equivalente de ceftarolina. El análogo 12, que tenía la CIM más baja según se evaluó usando células planctónicas de la cepa de *S. aureus* LAC, no tuvo actividad en el contexto de una biopelícula asociada a catéter establecida (datos no mostrados). El análogo 17 también se ensayó contra biopelículas formadas por ATCC 27853 de *P. aeruginosa* usando el mismo modelo de biopelícula asociada a catéter *in vitro*. Después de la exposición al análogo 17 a razón de 40 veces la CIM (40 µg/ml), se observó una reducción de 2,6 log en el número de células viables de *P. aeruginosa* en una biopelícula establecida (figura 2B).

#### 20 **Potenciación de patógenos gramnegativos a rifampicina y claritromicina**

Las bacterias gramnegativas, incluyendo *Acinetobacter* y *Klebsiella*, son intrínsecamente resistentes al antibiótico hidrófobo rifampicina. La CIM de la rifampicina contra ATCC 19606 de *A. baumannii* y ATCC 13883 de *K. pneumoniae* fue de 16 µg/ml (Tabla 11). Diez análogos de paenipeptina, que carecían de actividad antibacteriana directa contra *Acinetobacter* y *Klebsiella* cuando se usaban solos, se investigaron para determinar un posible efecto sinérgico con la rifampicina. El análogo 13 de paenipeptina fue el único compuesto ensayado que no mostró sinergia con la rifampicina. Esto probablemente se deba al reemplazo del Dab cargado positivamente por Thr en la posición 3 del péptido. Esta sustitución reduce las cargas generales del péptido y, por lo tanto, puede disminuir la interacción con LPS en bacterias gramnegativas. Por lo tanto, el análogo 13 puede no ser capaz de promover la entrada de rifampicina en patógenos gramnegativos. Nueve análogos mostraron diversos grados de efectos sinérgicos con la rifampicina. Cuando se ensayaron a razón de 4 µg/ml, seis análogos de paenipeptina (1, 3, 9, 14, 15 y 16) redujeron las CIM de rifampicina contra *Acinetobacter* y *Klebsiella* de 16 µg/ml a un intervalo entre <0,00098 µg/ml y 0,0078 µg/ml, lo que correspondió a un aumento de 2.048 a 8.192 veces en la actividad antibacteriana de la rifampicina (Tabla 11).

35

Tabla 11. Concentración inhibidora mínima (CIM) de rifampicina con o sin análogos de paenipeptina

| An. | CIM de rifampicina (μg/ml) |                |                  | ATCC 19606 de <i>Acinetobacter baumannii</i> |         |               | ATCC 13883 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> |                           |  |
|-----|----------------------------|----------------|------------------|--|---------|---------------|--|---------------------------|--|
|     | 0 μg/ml                    | 2 μg/ml        | 4 μg/ml          | Factor de sensibilización <sup>a</sup>       | 0 μg/ml | 2 μg/ml       | 4 μg/ml                                    | Factor de sensibilización |  |
| 1   | 16                         | 0,0078-0,0156  | 0,00195-0,0039   | 4.096-8.192                                  | 16      | 0,0039        | 0,00195                                    | 8.192                     |  |
| 2   | 16                         | 0,125          | 0,0313-0,0625    | 256-512                                      | 16      | 0,0156        | 0,0039                                     | 4,096                     |  |
| 3   | 16                         | 0,0078         | 0,0039           | 4,096  | 16      | 0,0039        | <0,00098-0,00195                           | ≥8.192                    |  |
| 9   | 16                         | 0,0019         | 0,00195          | 8.192  | 16      | 0,0019-0,0039 | <0,00098-0,00195                           | ≥8.192                    |  |
| 10  | 16                         | 0,03125-0,0625 | 0,0313-0,0625    | 256-512                                      | 16      | 0,0625-0,125  | 0,0625                                     | 256                       |  |
| 11  | 16                         | 0,0625         | 0,0156-0,0313    | 512-1.024                                    | 16      | 0,0313-0,0625 | 0,0078-0,0156                              | 1.024-2.048               |  |
| 13  | 16                         | >0,125         | >0,125           | <128   | 16      | >0,125        | >2   | <8                        |  |
| 14  | 16                         | 0,03125        | 0,0039-0,0078    | 2.048-4.096                                  | 16      | 0,0078        | 0,00195-0,0039                             | 4,096-8.192               |  |
| 15  | 16                         | 0,0019-0,0039  | <0,00098-0,00195 | ≥8.192                                       | 16      | 0,0039        | 0,00195-0,0039                             | 4,096-8.192               |  |
| 16  | 16                         | 0,0039-0,0078  | 0,0039           | 4,096  | 16      | 0,0039        | <0,00098-0,00195                           | ≥8.192                    |  |

<sup>a</sup> Factor de sensibilización: La relación de la CIM en ausencia de paenipeptinas con respecto a la CIM en presencia de 4 μg/ml de paenipeptinas.

Se seleccionaron dos análogos de paenipeptina (9 y 16) que mostraron una sinergia prometedora con la rifampicina para realizar más pruebas junto con cuatro antibióticos adicionales con diferentes mecanismos de acción. Específicamente, la claritromicina y la eritromicina bloquean la síntesis de proteínas, mientras que la vancomicina y la ampicilina inhiben la biosíntesis de la pared celular. Estos cuatro antibióticos, cuando se usaron solos, no fueron 5 eficaces contra los patógenos gramnegativos (CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ). Cuando se combinó con los análogos 9 y 16 a razón de 4  $\mu\text{g/ml}$ , la claritromicina mostró un aumento de 2.048 a 8.192 veces en su actividad contra ATCC 19606 de *A. baumannii* y ATCC 13883 de *K. pneumoniae* (Tabla 12). En presencia de los análogos 9 y 16 a razón de 4  $\mu\text{g/ml}$ , la eritromicina exhibió un aumento moderado (de 64 a 512 veces) contra estos dos patógenos. Curiosamente, los 10 análogos 9 y 16 potenciaron la actividad de la vancomicina contra *A. baumannii* pero no contra *K. pneumoniae*. No se observó ningún efecto sinérgico entre los análogos 9 o 16 y la ampicilina (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (CIM) de ampicilina, claritromicina, eritromicina y vancomicina con o sin los análogos 9 y 16 de paenipeptina

| Análogo | CIM (µg/ml) de antibióticos en presencia de 0 o 4 µg/ml de análogos de paenipeptina |         |  | ATCC 13883 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
|---------|---|---------|--|--|
|         | 0 µg/ml   | 4 µg/ml | Factor de sensibilización <sup>a</sup> |  |
| 9       | Ampicilina  | >32     | 1-2                                    | 16-32                                      |
|         | Claritromicina  | 32      | 0.0039-0.0078                          | 4.096-8.192                                |
|         | Eritromicina  | 32      | 0.125-0.25                             | 128-256                                    |
|         | Vancomicina   | >32     | 0.25-0.5                               | 64-128                                     |
|         | Ampicilina  | >32     | 8-16                                   | 2-4  |
|         | Claritromicina  | 32      | 0.0156                                 | 32   |
|         | Eritromicina  | 32      | 0.5                                    | 64   |
|         | Vancomicina   | >32     | 0.5-1                                  | 32-64                                      |
| 16      | Ampicilina  | >32     | 1-2                                    | 16-32                                      |
|         | Claritromicina  | 32      | 0.0039-0.0078                          | 4.096-8.192                                |
|         | Eritromicina  | 32      | 0.125-0.25                             | 128-256                                    |
|         | Vancomicina   | >32     | 0.25-0.5                               | 64-128                                     |
|         | Ampicilina  | >32     | 8-16                                   | 2-4  |
|         | Claritromicina  | 32      | 0.0156                                 | 32   |
|         | Eritromicina  | 32      | 0.5                                    | 64   |
|         | Vancomicina   | >32     | 0.5-1                                  | 32-64                                      |

<sup>a</sup> Factor de sensibilización: La relación de la CIM en ausencia de paenipeptinas con respecto a la CIM en presencia de 4 µg/ml de paenipeptinas

**Interacción de análogos de paenipeptina con lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico.**

Para identificar la diana de unión inicial de la paenipeptina en la superficie celular, se investigaron LPS o LTA purificados para determinar su impacto en las actividades bactericidas del análogo 17 de paenipeptina. Para estudios

5 con LPS, ATCC 27853 de *P. aeruginosa* se diluyó con TSB para contener aproximadamente  $10^6$  UFC/ml. A la suspensión celular se le añadió LPS purificado de O111:B4 de *E. coli* (Sigma) a una concentración final de 10, 25, 50 o 100  $\mu$ g/ml. A continuación, se añadió el análogo 17 de paenipeptina a una concentración final de 16  $\mu$ g/ml. Las mezclas se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 60 min. Las células supervivientes se cuantificaron mediante siembra en TSA. Hubo tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento. Para los

10 experimentos con LTA, se diluyó ATCC 29213 de *S. aureus* a  $\sim 10^6$  UFC/ml y se mezcló con LTA (Sigma) aislado de *S. aureus* a una concentración final de 10, 25, 50 o 100  $\mu$ g/ml. Después de la adición del análogo 17 a una concentración final de 32  $\mu$ g/ml y la incubación a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 60 min, se enumeraron las células supervivientes de *S. aureus* mediante siembra en TSA. Hubo cuatro experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

15 15 El LPS purificado tuvo un impacto significativo en la actividad antimicrobiana del análogo 17 de paenipeptina contra ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. La adición de LPS purificado a una concentración alta (100  $\mu$ g/ml) neutralizó la actividad bactericida de 17 (figura 3A). Se observó una tendencia similar para los análogos 7, 8, 9 y 12 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la paenipeptina tiene una alta afinidad por el LPS de la membrana externa

20 de las bacterias gramnegativas. Por lo tanto, es probable que el LPS en la superficie celular de las bacterias gramnegativas sea la diana de unión inicial de la paenipeptina. En las bacterias grampositivas, los ácidos lipoteicoicos (LTA) cargados negativamente son un componente importante en la superficie celular. Como se muestra en la figura 3B, a razón de 100  $\mu$ g/ml, el LTA purificado redujo significativamente la actividad antibacteriana del análogo 17 contra ATCC 29213 de *S. aureus*. El LTA a razón de 50  $\mu$ g/ml mostró cierta inhibición, pero el efecto no fue estadísticamente

25 diferente del control sin LTA. Estos resultados sugieren que el LTA en bacterias grampositivas también puede servir como una molécula de acoplamiento para las paenipeptinas, probablemente a través de interacciones electrostáticas. Esto es consistente con la observación de que el LTA cargado negativamente se notificó como la diana inicial de varios péptidos catiónicos, incluyendo nisin y brevibacilina.

30 **Ensayo de integridad de la membrana citoplasmática.**

La alteración del potencial de membrana después del tratamiento con paenipeptina se determinó usando la sonda fluorescente yoduro de 3,3'-dipropiliadicarbocianina [DiSC<sub>3</sub>(5); Invitrogen]. DiSC<sub>3</sub>(5) es un colorante sensible al potencial de membrana, que se acumula en las membranas citoplasmáticas polarizadas y se autoinactiva. Para cada

35 ensayo, se diluyó 1/100 en TSB durante una noche un cultivo de ATCC 27853 de *P. aeruginosa* o ATCC 29213 de *S. aureus* y se cultivó a 37 °C con agitación a 200 rpm durante  $\sim$  5 h. Después de la incubación, las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación a razón de 3660 x g a 4 °C durante 10 min y se lavaron dos veces con un tampón HEPES 5 mM (pH 7,2, Sigma) complementado con glucosa 5 mM (tampón A). Las células de *S. aureus* se suspendieron de nuevo en el tampón A, mientras que las células de *P. aeruginosa* se suspendieron de nuevo en el

40 tampón B (tampón A complementado con EDTA 0,2 mM), que se sabe que promueve la captación de DiSC<sub>3</sub>(5) por bacterias gramnegativas. Se añadió DiSC<sub>3</sub>(5) a las suspensiones celulares a una concentración final de 0,5  $\mu$ M, seguido de una incubación durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió KCl a una concentración final de 100 mM. Se añadieron alícuotas (90  $\mu$ l) de la suspensión celular con DiSC<sub>3</sub>(5) integrado a los

45 pocillos de una microplaca NBS de color negro (Coming Inc.). A esto le siguió la adición de 10  $\mu$ l del análogo 17 de paenipeptina a una concentración final de 8-64  $\mu$ g/ml. El aumento de la señal de fluorescencia debido a la despolarización de la membrana y la liberación de la sonda DiSC<sub>3</sub>(5) de las células bacterianas se registró usando un lector multimodo de imágenes celulares (Cytation 3, BioTek) a una excitación de 622 nm y una emisión de 670 nm. Hubo tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

50 **Ensayo de liberación de iones de potasio.**

Los iones de potasio que se filtraron de las células bacterianas tratadas con paenipeptina se midieron usando una sonda sensible a K<sup>+</sup> (PBFI; Invitrogen), que es impermeable a las células bacterianas sanas. Se prepararon suspensiones celulares de ATCC 29213 de *S. aureus* y ATCC 27853 de *P. aeruginosa* en el tampón A usando los

55 mismos procedimientos mencionados anteriormente en el ensayo de integridad de la membrana citoplasmática. Se dispensaron alícuotas (90  $\mu$ l) de células bacterianas en pocillos de una microplaca NBS de color negro. La sonda sensible a K<sup>+</sup> de PBFI se añadió a la suspensión celular a una concentración final de 2  $\mu$ M. A esto le siguió la adición de 10  $\mu$ l del análogo 17 de paenipeptina a una concentración final de 8-64  $\mu$ g/ml. Se registró un cambio en la fluorescencia correspondiente a la concentración de iones de potasio en el tampón usando un lector multimodo de imágenes celulares (Cytation 3, BioTek) a una longitud de onda de excitación de 346 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm. Hubo tres experimentos independientes con una réplica en cada experimento.

60 65 Las células bacterianas mantienen un gradiente de protones a través de la membrana citoplasmática donde el gradiente de potencial eléctrico es un componente principal de la fuerza motriz de los protones. Como se muestra en las figuras 4A-4B, el análogo 17 de paenipeptina a  $\geq$ 16  $\mu$ g/ml despolarizó el potencial de membrana como se evidencia por el aumento de la fluorescencia debido a la liberación de una sonda DiSC<sub>3</sub>(5), que solo se acumula en membranas

celulares polarizadas sanas. Además, el análogo 17 a razón de 32-64 µg/ml liberó significativamente iones de potasio intracelulares de células de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tratadas (figuras 5A-5B). Por lo tanto, la actividad bactericida de las paenipeptinas probablemente se puede atribuir a la alteración y el daño de las membranas citoplasmáticas.

## 5 Análisis estadístico.

Para los ensayos de inactivación bacteriana, se analizaron los recuentos de células supervivientes al final de cada experimento. Para las mediciones de fluorescencia, se analizaron los cambios en la intensidad de la fluorescencia antes y después de añadir el análogo 17. Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey usando SPSS Statistics (versión 24; SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

### Potenciación de la claritromicina y la rifampicina contra patógenos resistentes a carbapenem

15 A través de los estudios de la relación de estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés) anteriores, se identificaron dos análogos (1 y 15), que no son hemolíticos a 128 µg/ml. El análogo 1 de paenipeptina posee una cadena lipídica más corta (C6) en comparación con la paenipeptina C', mientras que el análogo 15 sustituye la cadena lipídica con un grupo carboxibencilo hidrófobo. Estos dos análogos potenciaron la rifampicina contra dos cepas de referencia, ATCC 19606 de *Acinetobacter baumannii* y ATCC 13883 de *Klebsiella pneumoniae*. La naturaleza catiónica de los análogos 20 de paenipeptina puede alterar la membrana externa de los patógenos gramnegativos, lo que promueve la entrada de antibióticos hidrófobos para atacar las dianas intracelulares del fármaco. En este estudio, se propuso evaluar la citotoxicidad de los análogos de paenipeptina (1 y 15) y se determinó la posible potenciación con claritromicina o rifampicina contra 10 cepas resistentes a carbapenem, incluyendo *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* del Banco de aislados de resistencia antimicrobiana de la FDA-CDC.

25 La concentración inhibitoria mínima (CIM) de claritromicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas), rifampicina (un inhibidor de la síntesis de ARN), nonapéptido de polimixina B, análogos de paenipeptina o sus combinaciones se determinó contra 10 cepas resistentes a carbapenem usando un método de microdilución. El análogo 1 o 15 de paenipeptina por sí solo mostró actividad inhibitoria contra determinados aislados de *A. baumannii*, tales como AR 0037, AR 0052, AR 0063 y AR 0070, que también fueron susceptibles a la rifampicina (Tabla 13). La mayor susceptibilidad de estos aislados podría depender de la cepa, con una tasa más alta en *A. baumannii*; ninguna de las cinco cepas de *K. pneumoniae* ensayadas fue susceptible a la paenipeptina o la rifampicina. Las paenipeptinas 1 y 15 mostraron una CIM similar en presencia de suero fetal bovino (FBS) al 10 %, que se usó en los experimentos de cultivo tisular para los ensayos de citotoxicidad. El nonapéptido de polimixina B, que se conoce como potenciador de 30 antibióticos, no fue eficaz contra las 10 cepas analizadas (CIM >32 µg/ml) cuando se usó solo (Tabla 13). Como se muestra en la Tabla 14, la combinación de nonapéptido de polimixina B con claritromicina o rifampicina mostró un efecto de potenciación moderado en comparación con los análogos de paenipeptina. Por el contrario, los análogos de paenipeptina aumentaron drásticamente la actividad antibacteriana de la claritromicina y la rifampicina. Por ejemplo, los análogos 1 y 15 de paenipeptina a razón de 4 µg/ml redujeron la CIM de claritromicina contra FDA-CDC AR 0037 35 de *A. baumannii* de 16 µg/ml a 0,0313 y 0,0019 µg/ml, respectivamente, lo que correspondió a un aumento de 512 a 8.192 veces en su actividad antibiótica (Tabla 14). Estos resultados fueron consistentes con los hallazgos anteriores donde los análogos de paenipeptina aumentaron la eficacia de los antibióticos contra cepas de referencia susceptibles a los antibióticos.

40 45 Tabla 13. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de claritromicina, rifampicina, nonapéptido de polimixina B, análogos 1 y 15 de paenipeptina contra 10 patógenos resistentes a carbapenem del Banco de aislados de resistencia antimicrobiana de la FDA-CDC

| Aislados clínicos resistentes a los antibióticos | CIM (µg/ml)    |             |                             |     | análogo 1            |             | análogo 15 |             |
|--|----------------|-------------|-----------------------------|-----|----------------------|-------------|------------|-------------|
|  | claritromicina | rifampicina | nonapéptido de polimixina B |     | Sin FBS <sup>a</sup> | FBS al 10 % | Sin FBS    | FBS al 10 % |
| <i>A. baumannii</i>                              |                |             |                             |     |                      |             |            |             |
| FDA-CDC AR 0037                                  | 16             | 2           | >32                         |     | 8                    | 16          | 8          | 4           |
| FDA-CDC AR 0052                                  | 4              | 1           | >32                         |     | 2-4                  | 2-4         | <0,5       | <0,5        |
| FDA-CDC AR 0063                                  | 16-32          | 1           | >32                         |     | 8-32                 | 32          | 0,5-4      | 2           |
| FDA-CDC AR 0070                                  | 2-4            | 1           | >32                         |     | 2                    | 2-8         | ≤0,5       | 0,5-1       |
| FDA-CDC AR 0083                                  | >32            | 32          | >32                         |     | 32                   | ≥32         | 8-16       | 4-8         |
| <i>K. pneumoniae</i>                             |                |             |                             |     |                      |             |            |             |
| FDA-CDC AR 0034                                  | >32            | 16          | >32                         | ≥32 | >32                  | ≥32         | >32        | >32         |
| FDA-CDC AR 0044                                  | >32            | 32          | >32                         | 16  | 16                   | 32          | 16-32      |             |
| FDA-CDC AR 0068                                  | >32            | 32          | >32                         | >32 | >32                  | >32         | >32        |             |

(continuación)  
resistencia antimicrobiana de la FDA-CDC

| Aislados clínicos<br>resistentes a los<br>antibióticos | CIM (µg/ml)    |             |                                |     | análogo 1               |                   | análogo 15 |                |
|--|----------------|-------------|--------------------------------|-----|-------------------------|-------------------|------------|----------------|
|  | claritromicina | rifampicina | nonapéptido de<br>polimixina B |     | Sin<br>FBS <sup>a</sup> | FBS<br>al<br>10 % | Sin<br>FBS | FBS al<br>10 % |
|  |                |             |                                |     |                         |                   |            |                |
| FDA-CDC AR 0080  | >32            | >32         | >32                            | 16  | 32                      | 32                | 32         | 32             |
| FDA-CDC AR 0097  | >32            | 32          | >32                            | >32 | 16-32                   | >32               | >32        | 16-32          |

<sup>a</sup>FBS: suero fetal bovino; la CIM de los análogos 1 y 15 de paenipeptina se analizó con o sin FBS al 10 %.

Tabla 14. Concentración inhibitoria mínima (CIM,  $\mu\text{g/ml}$ ) de claritromicina y rifampicina junto con nonapeptido de polimixina B (PMBN), análogos 1 o 15 de paenipeptina contra 10 patógenos resistentes a carbapenem del Banco de aislados de resistencia antimicrobiana de la FDA-CDC

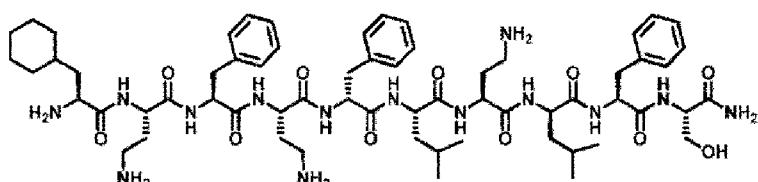
| Aislados clínicos resistentes a los antibióticos | CIM de claritromicina y rifampicina en presencia de PMBN o análogo de paenipeptina a razón de 4 $\mu\text{g/ml}$ |                            | CIM de claritromicina y rifampicina + análogo 15 |                    | CIM de claritromicina y rifampicina + análogo 1 |                         |
|--|--|----------------------------|--|--------------------|---|-------------------------|
|  | PMBN   | claritromicina + análogo 1 | claritromicina + análogo 15                      | rifampicina + PMBN | rifampicina + análogo 15                        | rifampicina + análogo 1 |
| <i>A. baumannii</i>                              |  |                            |  |                    |   |                         |
| FDA-CDC AR 0037                                  | 0,125-0,25   | 0,0313                     | <0,0019  | 0,25               | 0,0039  | <0,0019                 |
| FDA-CDC AR 0052                                  | 0,0313-0,0625  | 2                          | 0,0625-0,125                                     | 0,125              | 0,0019  | <0,0019                 |
| FDA-CDC AR 0063                                  | 0,5-1  | 0,0313                     | -  | 0,0625-0,125       | -   | -                       |
| FDA-CDC AR 0070                                  | 0,25-0,5   | -                          | -  | 0,0625-0,125       | -   | -                       |
| FDA-CDC AR 0083                                  | 32   | 16                         | 1-4  | 8                  | 0,25-0,5  | 0,0313-0,0625           |
| <i>K. pneumoniae</i>                             |  |                            |  |                    |   |                         |
| FDA-CDC AR 0034                                  | >32  | 0,25                       | 0,125-0,5  | 1                  | <0,0019   | <0,0019                 |
| FDA-CDC AR 0044                                  | 4  | 0,0156                     | 0,0078-0,0156                                    | 2                  | <0,0019   | <0,0019                 |
| FDA-CDC AR 0068                                  | >32  | 1                          | >32  | 2-8                | 0,0039-0,0156                                   | 0,0039-0,0078           |
| FDA-CDC AR 0080                                  | 4  | 0,0313                     | 0,0156   | >32                | 0,0625  | 0,0313                  |
| FDA-CDC AR 0097                                  | 32   | 0,0313-0,0625              | 0,0078-0,0156                                    | 16                 | 0,0039-0,0078                                   | 0,0019-0,0039           |

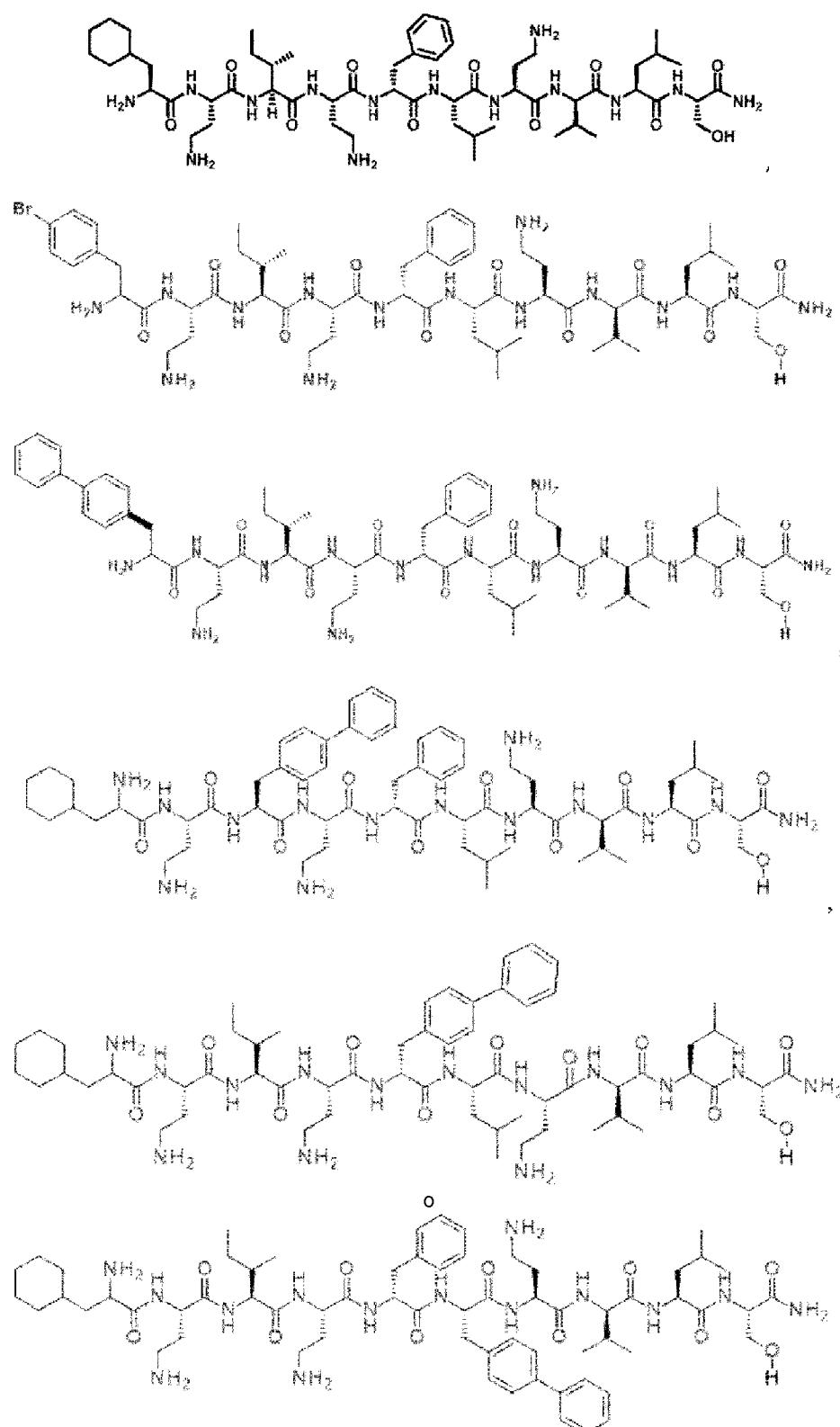
\* - no se ensayó debido a que no hubo crecimiento bacteriano en presencia de los análogos 1 o 15 de paenipeptina solos a razón de 4  $\mu\text{g/ml}$

- Se usaron ensayos cinéticos de letalidad para determinar la actividad bacteriostática o bactericida de la claritromicina o la rifampicina en presencia de análogos de paenipeptina. Los análogos de paenipeptina, la claritromicina y la rifampicina se usaron en concentraciones terapéuticamente relevantes en los ensayos cinéticos de letalidad. Los recuentos de bacterias viables se determinaron 0, 2, 4, 6 y 24 h después del tratamiento antimicrobiano. Los recuentos de bacterias supervivientes al final de 24 h se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey usando SPSS Statistics (versión 24; SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Como se muestra en la figura 6A, cuando se usaron solos, los análogos de paenipeptina a razón de 4  $\mu$ g/ml y la claritromicina o la rifampicina a razón de 1  $\mu$ g/ml no inhibieron el crecimiento de FDA-CDC AR 0063 de *A. baumannii* en caldo de soja tríptica a 37 °C; la población bacteriana aumentó a 2,1-3,0 log en 24 h. Por el contrario, la población celular disminuyó de manera constante con el tiempo cuando se trató con el análogo 1 o 15 de paenipeptina junto con claritromicina o rifampicina. El tratamiento combinado dio como resultado una reducción de 4,7-5,1 log en 24 h. Se observó una tendencia similar para un segundo patógeno resistente a carbapenem, FDA-CDC AR 0097 de *K. pneumoniae* (figura 6B). Los análogos de paenipeptina, claritromicina o rifampicina por sí solos no fueron bactericidas en las concentraciones ensayadas contra FDA-CDC AR 0097 de *K. pneumoniae*; la combinación de análogos de paenipeptina con claritromicina redujo los recuentos celulares en 2,1-2,5 log en 24 h, mientras que la combinación con rifampicina produjo una reducción de 4,9 log en 24 h en caldo de soja tríptica (figura 6B). Por lo tanto, los análogos de paenipeptina más claritromicina o rifampicina fueron significativamente superiores a cada agente individual contra *A. baumannii* y *K. pneumoniae* en caldo de soja tríptica.
- Para ensayar aún más el potencial terapéutico de los análogos de paenipeptina, se realizaron ensayos cinéticos de letalidad de paenipeptinas por sí solas o junto con otros antibióticos en suero humano al 95 % *in vitro*. Sin tratamiento antimicrobiano, la población de FDA-CDC AR 0063 de *A. baumannii* aumentó de 5,8 log a 9,3 log en 24 h. La rifampicina a razón de 4  $\mu$ g/ml dio como resultado una reducción de 1,4 log de la población celular en 24 h, pero otro tratamiento antibiótico único no fue eficaz (figura 7A). La rifampicina por sí sola también mostró una actividad similar o ligeramente mejor en comparación con los tratamientos combinados entre la claritromicina y el análogo 1 o 15 de paenipeptina. Además, la combinación de rifampicina con el análogo 1 o 15 de paenipeptina redujo la población bacteriana en 2,7 log, lo que fue significativamente mejor que cada tratamiento con agente único. De manera similar, los análogos 1 y 15 de paenipeptina potenciaron significativamente la claritromicina contra FDA-CDC AR 0063 de *A. baumannii*, lo que llevó a una reducción de 1,3 y 0,7 log, respectivamente, en 24 h en suero humano al 95 %. (Figura 7A).
- El suero humano exhibió un efecto bacteriostático contra FDA-CDC AR0097 de *K. pneumoniae*; los recuentos de células bacterianas superiores a 24 nunca superaron la población bacteriana inicial. También se observó que el suero humano inhibió el crecimiento de una cepa de referencia, ATCC 13883 de *K. pneumoniae* (datos no mostrados). De manera similar, otros investigadores notificaron el efecto inhibidor del suero humano contra determinadas cepas de *K. pneumoniae* (7, 8). La presencia de suero humano mejoró la eficacia bactericida del análogo 1 de paenipeptina, que inactivó 4,2 log de células de *K. pneumoniae* en 24 h (figura 7B). La combinación del análogo 1 con claritromicina o rifampicina dio como resultado una reducción de 4,9 log en la población bacteriana en 24 h, aunque el tratamiento combinado no fue estadísticamente mejor que el análogo 1 solo en suero humano al 95 %. El análogo 15 de paenipeptina, que difiere del análogo 1 en el extremo N, no mostró actividad bactericida ni potenció la claritromicina contra FDA-CDC AR0097 de *K. pneumoniae* en suero humano. Sin embargo, cuando el análogo 15 se combinó con rifampicina, se logró una reducción de 4,6 log en 24 h (figura 7B). Por lo tanto, la combinación entre el análogo 15 y la rifampicina fue significativamente mejor que el tratamiento único respectivo contra *K. pneumoniae* en suero humano al 95 %.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana que comprende un lipopéptido lineal, comprendiendo el lipopéptido un péptido que tiene al menos un 66 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 interpuesto entre un extremo lipófilo -R<sup>1</sup> y un extremo amino -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>,
- en donde R<sup>1</sup> comprende un alcanoílo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> sustituido, ramificado o no ramificado de fórmula R<sup>5</sup>-CH(NH<sub>2</sub>)-C(=O)-, en donde R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, cicloalquilo, fenilalquilo y bifenilalquilo, y en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde:
- el lipopéptido tiene una concentración inhibitoria mínima inferior o igual a 8,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo;
  - el lipopéptido tiene una concentración bactericida mínima inferior o igual a 16,0 µg/ml contra un microbio en un medio de cultivo;
  - el lipopéptido tiene un porcentaje de hemólisis inferior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 128 µg/ml;
  - el lipopéptido tiene un porcentaje de viabilidad superior o igual al 50,0 % a una concentración de lipopéptido de 105 µg/ml;
  - el lipopéptido tiene un factor de sensibilización superior o igual a 128 para un agente antimicrobiano contra un microbio, en donde, opcionalmente, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en ampicilina, claritromicina, eritromicina, rifampicina y vancomicina;
  - la composición tiene una cantidad eficaz del lipopéptido para una actividad antibiolítica de al menos una reducción de 2,0 log en microbios viables sobre una superficie; o
  - cualquier combinación de los mismos.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde el microbio es:
- una bacteria gramnegativa, en donde, opcionalmente, la bacteria gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*;
  - una bacteria grampositiva, en donde, opcionalmente, la bacteria grampositiva se selecciona del grupo que consiste en *E. faecium* y *S. aureus*;
  - una bacteria farmacorresistente, en donde, opcionalmente, la bacteria farmacorresistente es una bacteria resistente a carbapenem, una bacteria resistente a meticilina o una bacteria resistente a polimixina; o
  - una combinación de (i) y (iii) o (ii) y (iii).
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el péptido comprende R<sup>1</sup>-X<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-X<sup>7</sup>-X<sup>8</sup>-X<sup>9</sup>-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> y
- X<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Lys y Arg;
- X<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en Ile, Val, Phe, Dap y Phephe;
- X<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Thr, Lys y Arg;
- X<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en dLeu, dPhe y Phephe;
- X<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en Leu, Phe y Phephe;
- X<sup>6</sup> se selecciona del grupo que consiste en Dab, Orn, Dap, Lys y Arg;
- X<sup>7</sup> se selecciona del grupo que consiste en dVal, dLeu, dPhe y Phephe;
- X<sup>8</sup> se selecciona del grupo que consiste en Leu, Phe, Phephe y Octgly; y
- X<sup>9</sup> se selecciona del grupo que consiste en Ser y Dab.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan de hidrógeno.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el lipopéptido es





7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende además un agente antimicrobiano.

15

8. La composición de la reivindicación 7, en donde:

(a) el agente antimicrobiano tiene una concentración inhibitoria mínima contra un microbio en presencia del lipopéptido inferior a una concentración inhibitoria mínima contra el microbio en ausencia del lipopéptido en un

- medio de cultivo;
- (b) el agente antimicrobiano tiene una concentración bactericida mínima contra un microbio en presencia del lipopéptido inferior a una concentración bactericida mínima contra el microbio en ausencia del lipopéptido en un medio de cultivo;
- 5 (c) el lipopéptido tiene un factor de sensibilización superior o igual a 128 para el agente antimicrobiano contra un microbio, en donde, opcionalmente, el agente antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en ampicilina, claritromicina, eritromicina, rifampicina y vancomicina;
- (d) la composición tiene una cantidad eficaz del lipopéptido y/o el agente antimicrobiano para una actividad antibiopelícua de al menos una reducción de 2,0 log en microbios viables sobre una superficie; o
- 10 (e) cualquier combinación de los mismos.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un excipiente, un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 15 10. Un producto antibiopelícua que comprende una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, formulado para su aplicación sobre una superficie, en donde, opcionalmente, la superficie es una superficie de dispositivo médico, una superficie de instrumento médico, una superficie de implante médico, una superficie de vendaje, una superficie de herida o la piel, en donde, opcionalmente, el producto está formulado como
- 20 una nebulización, un ungüento, un gel, una espuma, una pasta, un hidrogel o un hidrocoloide.
11. Un vendaje que comprende un apósito y una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para tratar o prevenir una infección microbiana o una biopelícula microbiana sobre una herida o la piel, opcionalmente, el apósito comprende un tejido, una esponja, un alginato, un colágeno, una película, una lámina de gel, un relleno para heridas, un hidrogel, un hidrocoloide o una combinación de los mismos.
- 25 12. Un método para inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto el microbio con una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 30 13. Un método para prevenir la formación de una biopelícula sobre una superficie o inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio en la biopelícula *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto la superficie o una biopelícula dispuesta sobre la misma con una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o el producto antibiopelícua de acuerdo con la reivindicación 10, en donde, opcionalmente, la superficie es una superficie de dispositivo médico, una superficie de instrumento médico, una superficie de implante
- 35 médico o una superficie de vendaje.
14. Una composición, producto o vendaje para su uso para prevenir la formación de una biopelícula en una herida o la piel o para inhibir la proliferación, para destruir o para sensibilizar un microbio en la biopelícula que comprende una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, la composición farmacéutica de la reivindicación 9, el producto antibiopelícua de la reivindicación 10 o el vendaje de la reivindicación 11.
- 40 15. Una composición, producto o vendaje para su uso para prevenir una infección microbiana o tratar la infección microbiana en o sobre un sujeto, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, el producto antibiopelícua de la reivindicación 10 o el vendaje de la reivindicación 11.
- 45

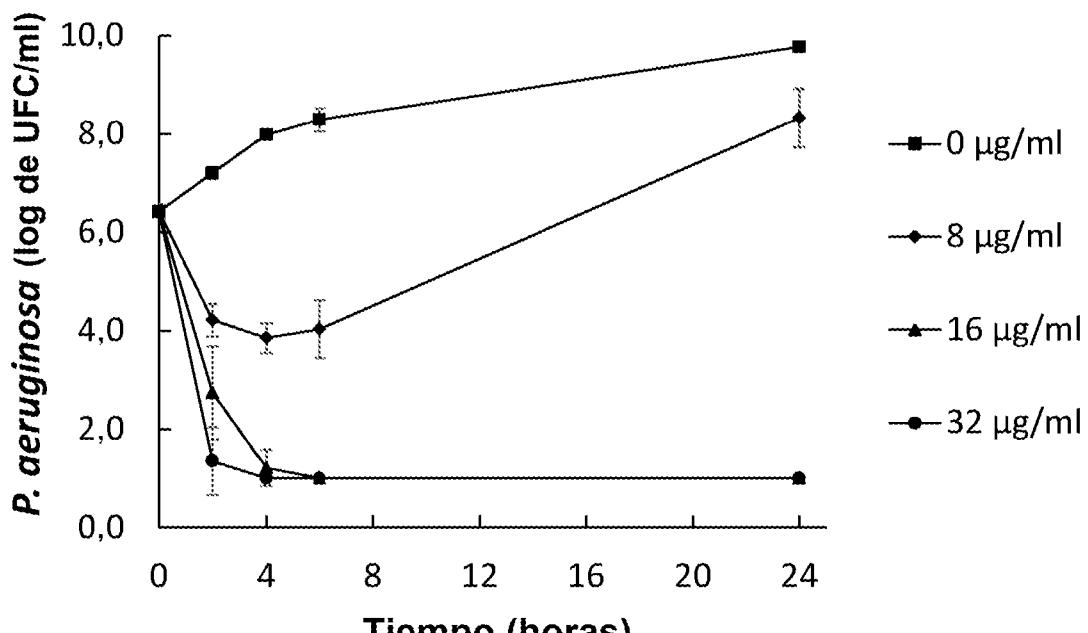


FIG. 1A

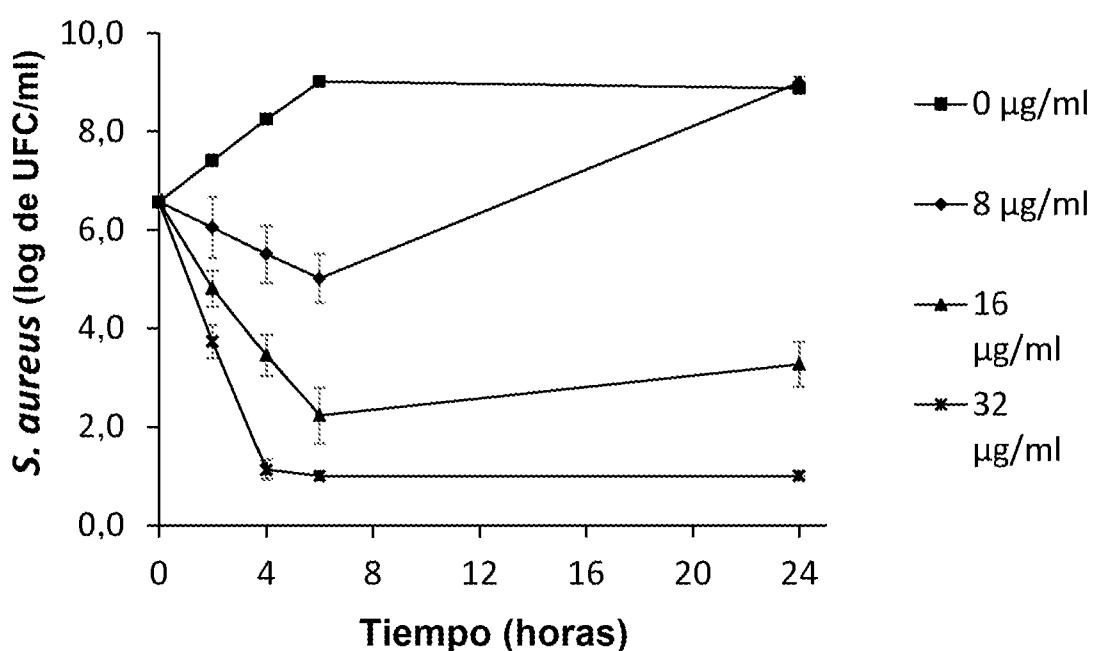


FIG. 1B

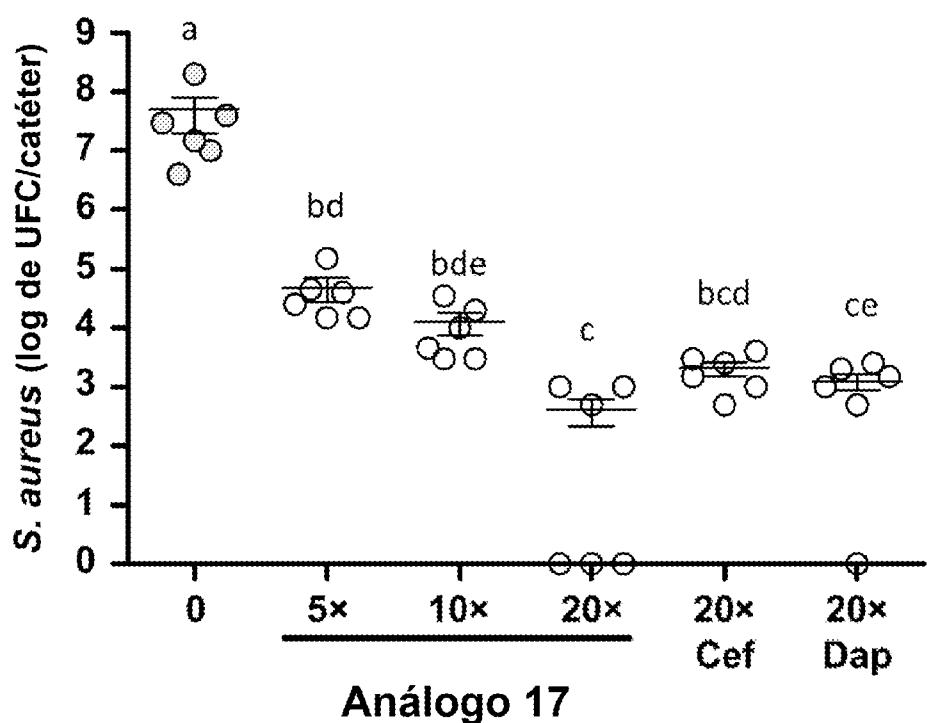


FIG. 2A

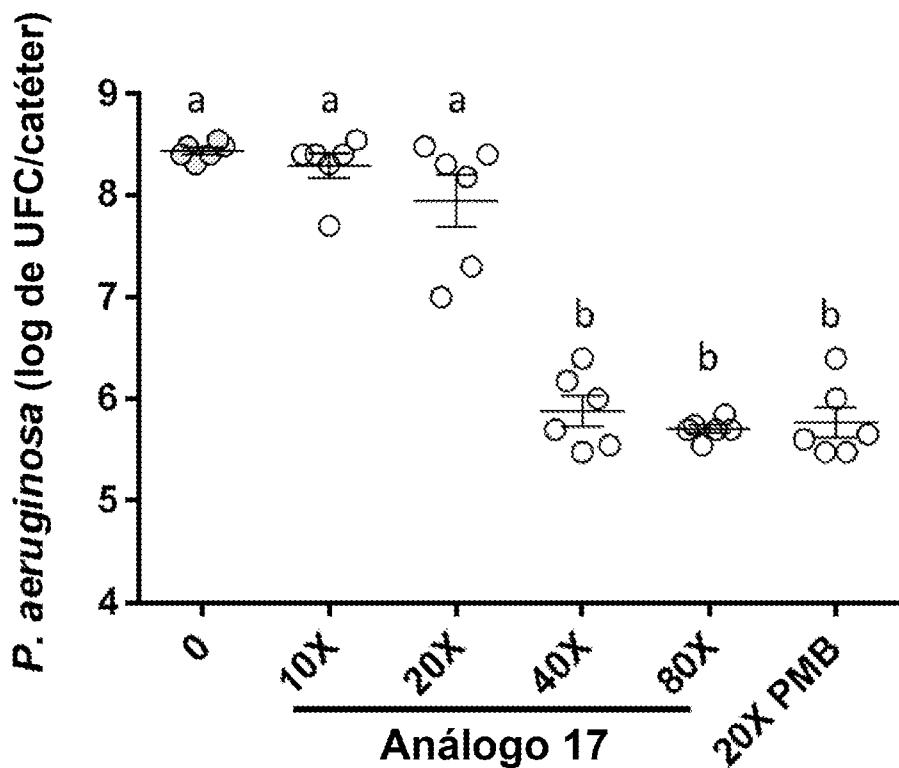


FIG. 2B

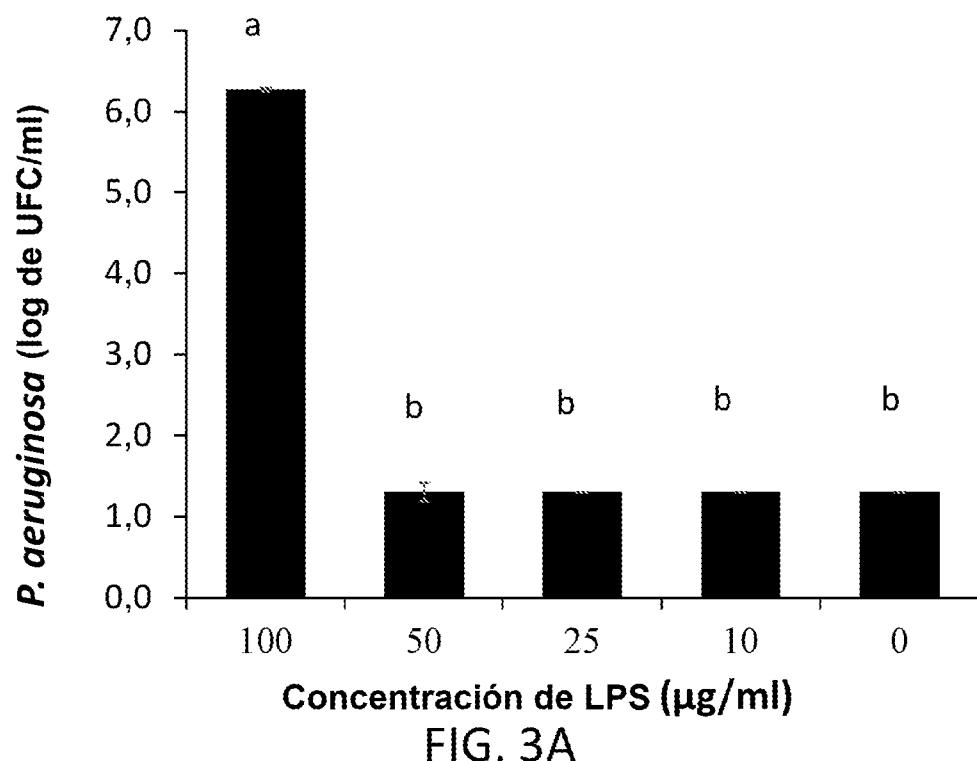


FIG. 3A

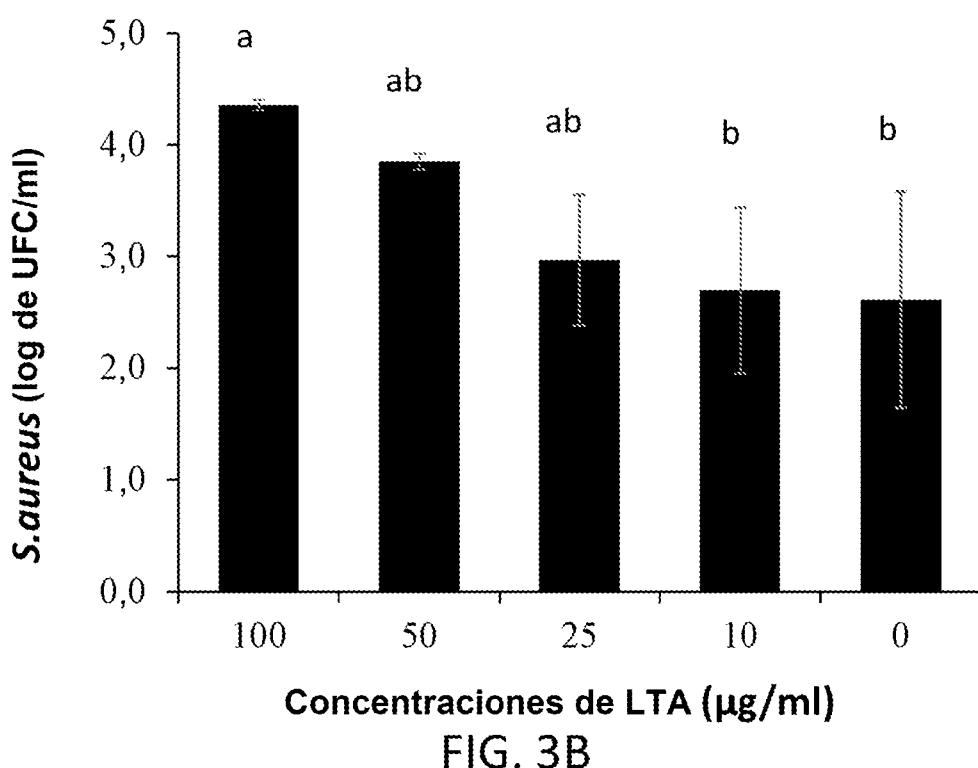


FIG. 3B

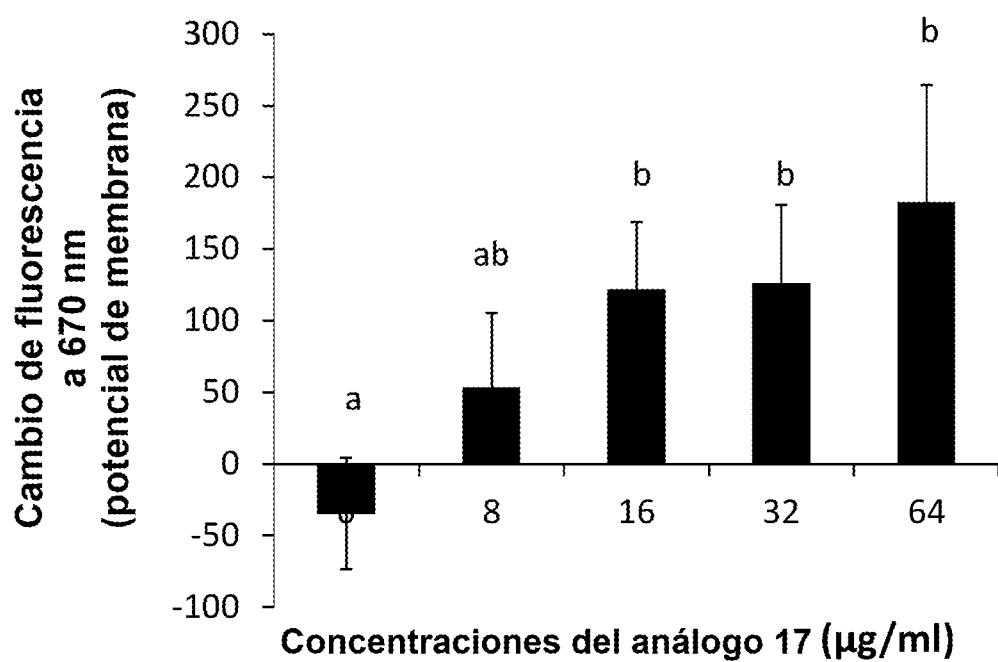


FIG. 4A

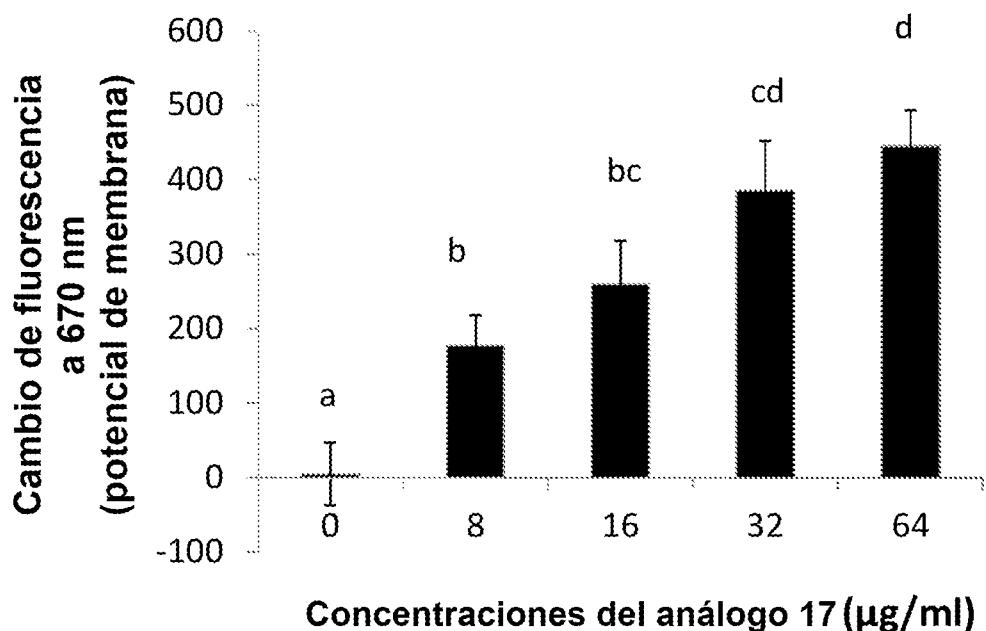


FIG. 4B

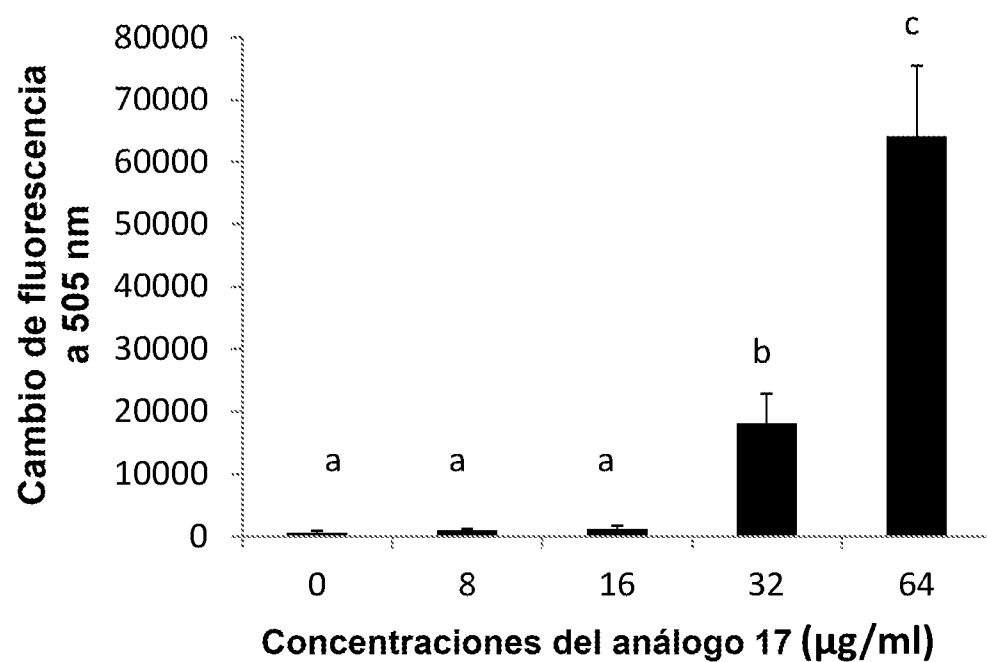


FIG. 5A

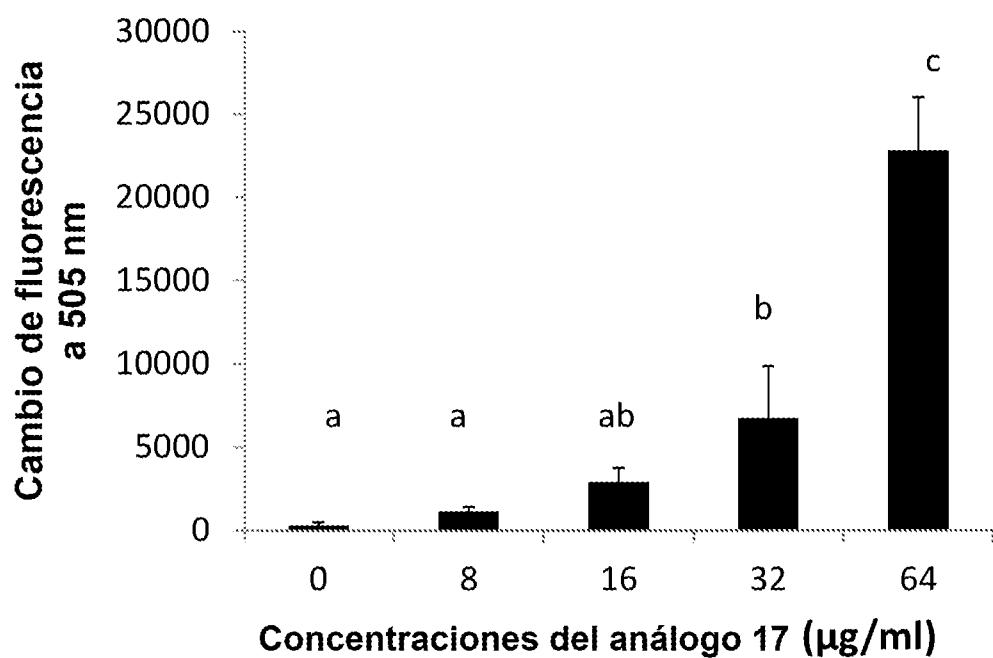


FIG. 5B

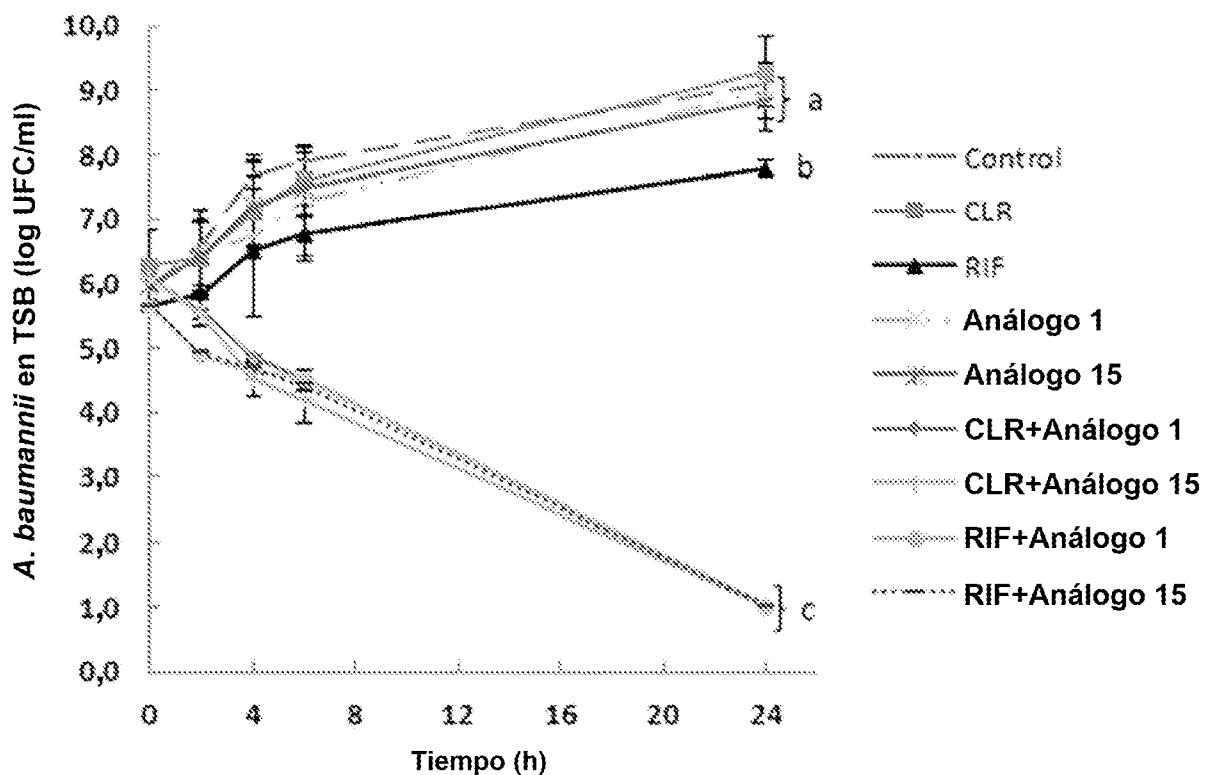


FIG. 6A

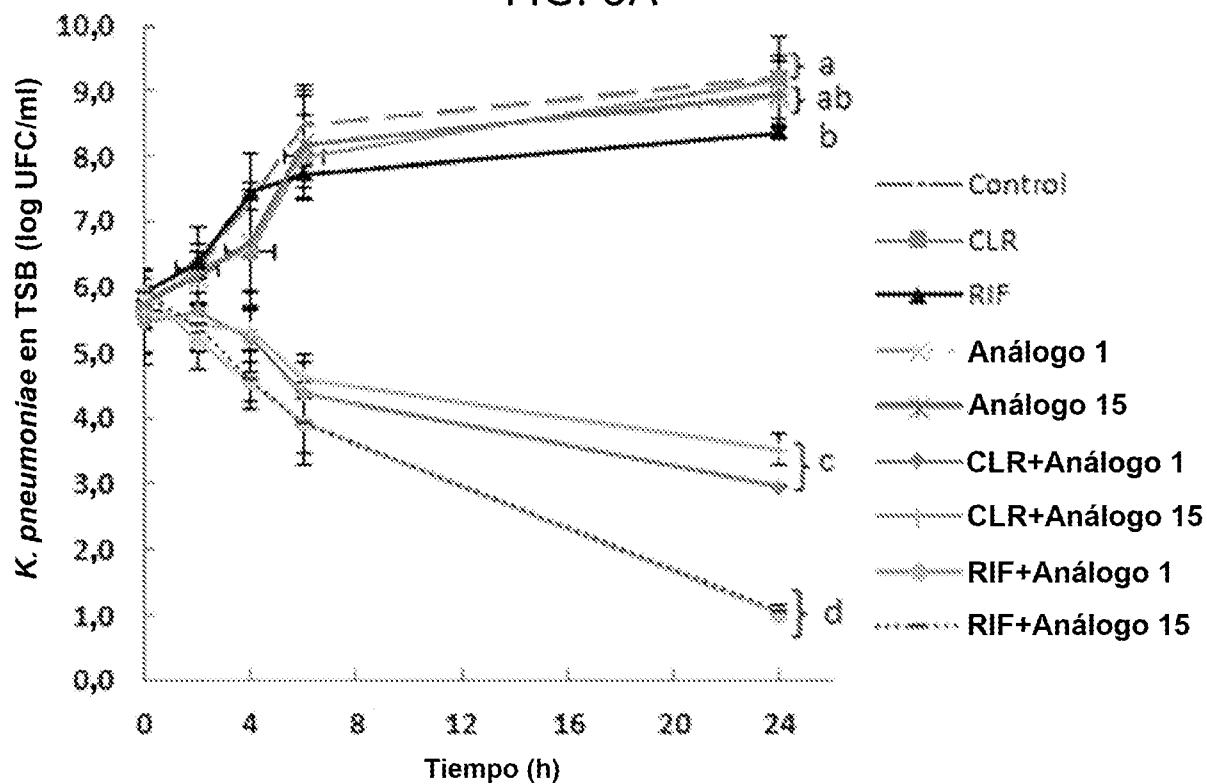


FIG. 6B

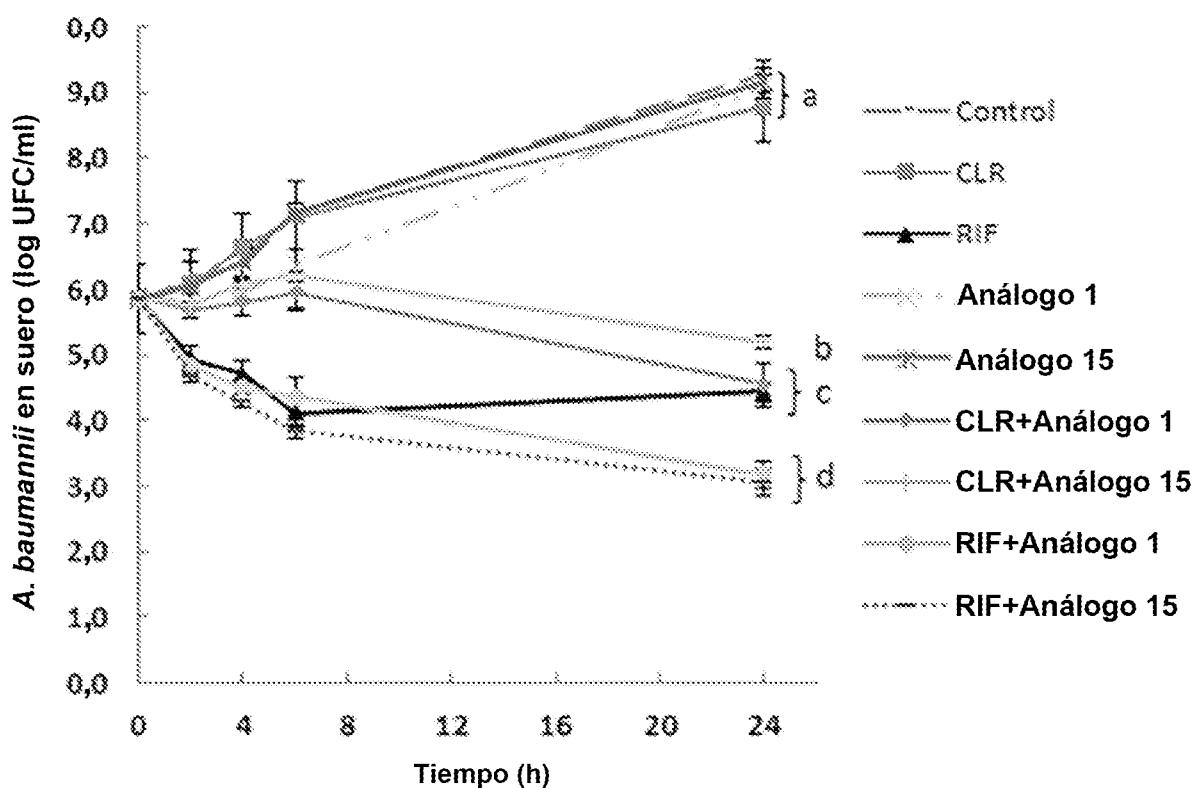


FIG. 7A

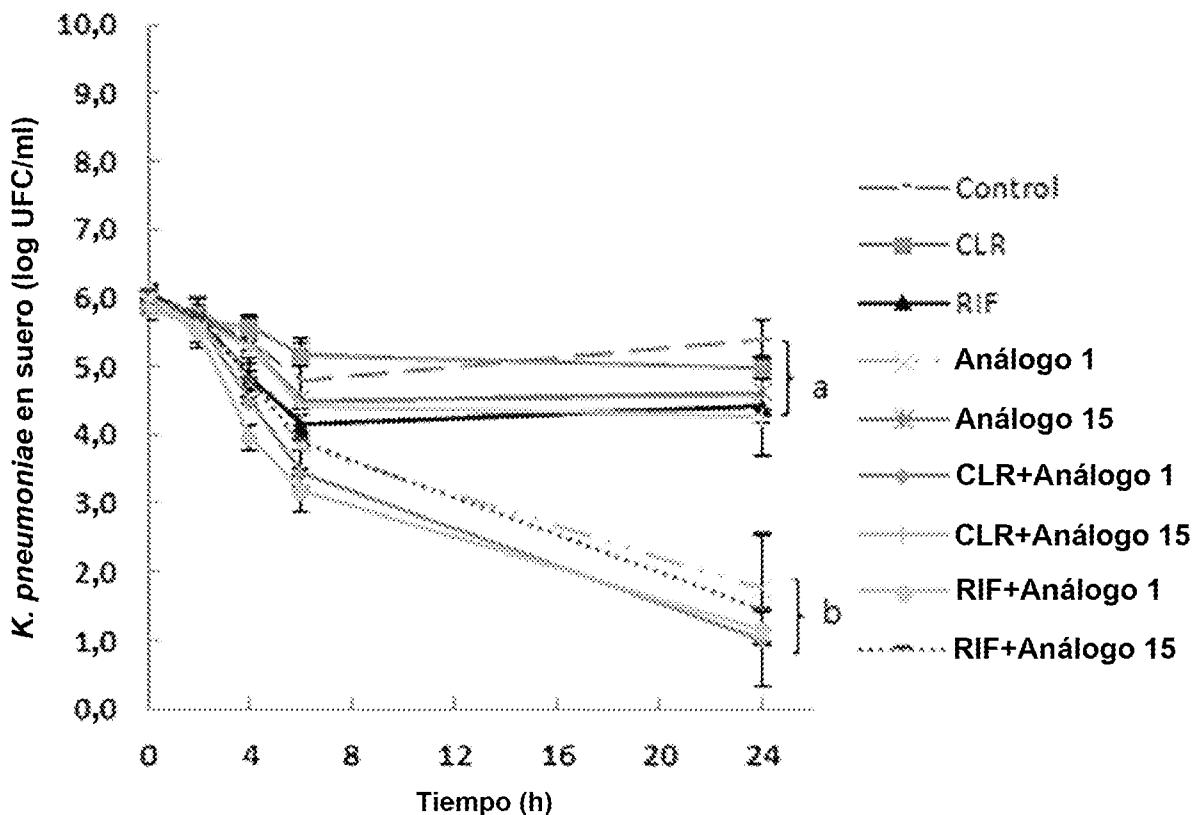


FIG. 7B