

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 987 873**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/02 (2006.01)
C07H 19/04 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01)
C07H 19/23 (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2018 PCT/US2018/022068**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018 WO18165673**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2018 E 18763136 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 3592430**

(54) Título: **Compuestos antimicrobianos, composiciones y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

10.03.2017 US 201762470025 P
10.03.2017 US 201762470039 P

(73) Titular/es:

LAKWOOD AMEDEX, INC. (100.0%)
3030 University Parkway
Sarasota, FL 34243-2502, US

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

18.11.2024

(72) Inventor/es:

KATES, STEVEN, A.;
SLEET, RANDOLPH, B. y
PARKINSON, STEVEN

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 987 873 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

Compuestos antimicrobianos, composiciones y usos de los mismos

CAMPO

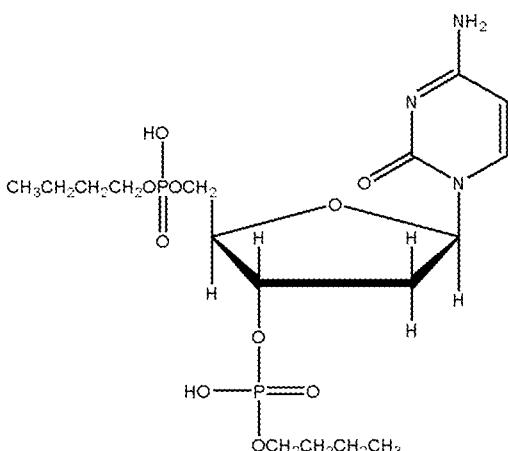
La presente divulgación proporciona un compuesto antimicrobiano novedoso y composiciones del mismo, así como el compuesto para su uso en el tratamiento.

ANTECEDENTES

Los compuestos de Bisfosfocina® tienen actividad antimicrobiana. Pat. de EE. UU. No. 7,868,162 (publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2011/0135713 A1) divulga compuestos de Bisfosfocina® que tienen una estructura X-Y-Z, donde X y Z son grupos de bloqueo final e Y es una molécula que contiene fósforo con sitios de protonación - un compuesto ejemplar es [(2R,3S,5R)-3-[butoxi(hidroxi)fosforil]oxi-5-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)oxolan-2-il]metil butil hidrógeno fosfato (Bisfosfocina® Nu-3).

SUMARIO

La presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



Fórmula (III)

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

20 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una úlcera de pie diabético.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección complicada del tracto urinario.

25 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección pulmonar derivada de la fibrosis quística.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la neumonía adquirida por ventilación mecánica.

30 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección en una herida por quemadura.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la otitis externa.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la vaginosis bacteriana.

- 5 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento del impétigo.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

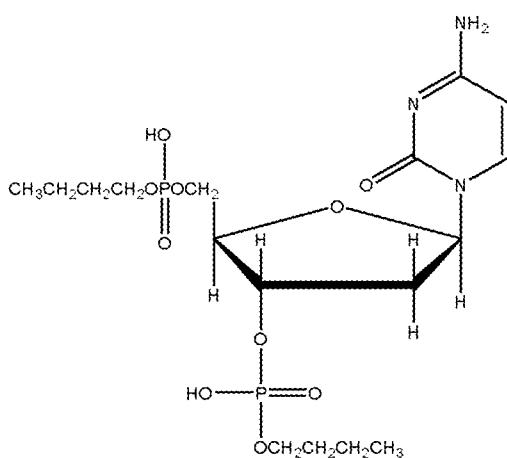
- 10 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una infección.

En algunas realizaciones, un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene ciertas características y ventajas sorprendentes que no podrían haberse predicho antes de la presente divulgación. Una ventaja de un compuesto de (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación es que dicho compuesto y/o sal tiene un alto nivel de actividad biológica cuando dicho compuesto y/o sal se formula a niveles de pH más altos (menos ácidos). Sin estar limitado por ninguna teoría, se cree que el grupo amino o guanidino libre de un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones confiere la actividad biológica deseada a niveles de pH más altos. Se ha descubierto que un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación es inesperadamente más potente a niveles de pH por encima de aproximadamente pH 3. En consecuencia, se cree que un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones será útil para indicaciones en las que la exposición prolongada a antimicrobianos es ventajosa, tal como, por ejemplo, infecciones microbianas. A diferencia de algunos fármacos formulados a un pH inferior a aproximadamente 3, que provocan una irritación de contacto inaceptable en las vías de administración tópica, inhalatoria o intravesical, un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones, es compatible con las vías de administración tópica, inhalatoria e intravesical. Además, un compuesto de Fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con algunas realizaciones es eficaz contra bacterias de crecimiento lento, ya que un compuesto o sal del mismo exhibe, en un corto período de tiempo, un alto nivel de actividad biológica a un pH más alto (mecanismo antimicrobiano de acción rápida).

Aspectos y realizaciones adicionales se desprenderán de la Descripción Detallada y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se dirige a un compuesto que tiene la fórmula:



Fórmula (III)

35

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El nombre químico del compuesto de Fórmula (III) es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de sodio. La fórmula molecular del compuesto de

Fórmula (III) es $C_{17}H_{29}N_3Na_2O_{10}P_2$. El peso molecular del compuesto de Fórmula (III) es de 543,11 Da. El compuesto de Fórmula (III) también se denomina en el presente documento Nu-8, Compuesto (III) o Cmpd 1, términos que se utilizan indistintamente en el presente documento. En algunas realizaciones, Nu-8 incluye una ribosa, dos grupos fosfato, dos grupos butilo y una citosina.

- 5 Un compuesto de la presente divulgación se describe con referencia a un compuesto específico ilustrado en el presente documento. Además, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede existir en cualquier número de formas o derivados diferentes, todos dentro del alcance de la presente divulgación. Formas alternativas o derivados, incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y metabolitos activos, tautómeros y formas sólidas, incluyendo sin limitación diferentes 10 formas cristalinas, sólidos polimórficos o amorfos, incluyendo hidratos y solvatos de los mismos, y otras formas.

A menos que se especifique lo contrario, la memoria descriptiva del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación incluye sales farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto. Así, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables o puede formularse como sales farmacéuticamente 15 aceptables. Las formas de sal farmacéuticamente aceptables contempladas de la presente divulgación incluyen, sin limitación, mono, bis, tris, tetrakis, etcétera. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación no son tóxicas en las cantidades y concentraciones en las que se administran dichas sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de tales sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación puede facilitar el uso farmacológico alterando las características físicas del compuesto o de la sal 20 farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación sin impedir que ejerza su efecto fisiológico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable", con respecto a las sales y los componentes de la formulación, tales como portadores, excipientes y diluyentes, se refiere a aquellas sales y componentes que no son nocivos para un paciente y que son compatibles con otros 25 ingredientes, principios activos, sales o componentes. Farmacéuticamente aceptable incluye "veterinariamente aceptable" y, por lo tanto, incluye las aplicaciones en mamíferos humanos y no humanos de forma independiente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales utilizadas habitualmente para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. Dichas sales incluyen, por ejemplo, las sales fisiológicamente aceptables enumeradas en 30 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P. H. Stahl y C. G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, Nueva York, 2002, que son conocidos por el artesano experto. La formación de sales puede producirse en una o más posiciones que tengan protones lábiles. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación incluyen tanto sales de adición de ácido como sales de adición de base.

35 En algunas realizaciones, las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de la presente divulgación pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o un ácido orgánico. Ejemplos de tales ácidos inorgánicos incluyen, sin limitación, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos apropiados incluyen sin limitación las clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, ejemplos 40 de los cuales son fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, maleíco, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, pantoténico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, sulfanílico, mesílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algénico, beta-hidroxibutírico, malónico, galáctico y galacturónico, por citar algunos. Las sales ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables también incluyen, acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, 45 cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, glioceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrobromuro, hidrocloruro, hidroxinaftoato, yoduro, isetonato, lactato, lactobionato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, hidrogenosulfato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato y sales de trietioduro, entre otros.

50 En algunas realizaciones, las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de la presente divulgación incluyen, sin limitación, sales metálicas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales orgánicas hechas de N,N'-dibencileno-diamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina, lisina, arginina y procaína. Todas estas sales pueden prepararse por medios convencionales a partir del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo 55 de la presente divulgación tratando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación con el ácido o la base adecuados. Las sales básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de dietanolamina, amonio, etanolamina, piperazina y trietanolamina, por nombrar algunas. En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable de la presente divulgación comprende un catión monovalente o un catión divalente.

En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable de la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en una sal de amonio, una sal de calcio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio y una sal de cobalto. En algunas realizaciones, la sal de amonio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato de amonio. En algunas 5 realizaciones, la sal de calcio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato de calcio. En algunas realizaciones, la sal de sodio es ((2R,3S,SR)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato de sodio. En algunas realizaciones, la sal de potasio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato de potasio. En algunas 10 realizaciones, la sal de magnesio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato de magnesio. En algunas realizaciones, la sal de cobalto es cobalto ((2R,3S,SR)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofurano-2-il)metilbutilfosfato.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación pueden prepararse mediante técnicas 15 estándar conocidas en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Por ejemplo, la forma de base libre del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede disolverse en un disolvente adecuado, tal como una solución acuosa o acuoso-alcohólica que contenga el ácido adecuado y, a continuación, aislarse evaporando la solución. En otro ejemplo, se puede preparar una sal 20 haciendo reaccionar la base libre y el ácido en un disolvente orgánico. Si el compuesto particular es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica apropiada.

Además de los compuestos de la presente divulgación, la presente divulgación también incluye profármacos (por ejemplo, profármacos farmacéuticamente aceptables), derivados metabólicos activos (metabolitos activos) y sus sales farmacéuticamente aceptables, que sin embargo no forman parte de la invención.

Los profármacos son compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que, cuando se 25 metabolizan en condiciones fisiológicas o cuando se convierten por solvólisis, producen el compuesto activo deseado. Típicamente, el profármaco es inactivo, o menos activo que el compuesto activo, pero puede proporcionar una o más propiedades ventajosas de manipulación, administración y/o metabólicas. Algunos profármacos se activan enzimáticamente para producir el compuesto activo o un compuesto puede someterse 30 a una reacción química adicional para producir el compuesto activo. Los profármacos pueden pasar de la forma profármaco a la forma activa en un solo paso o pueden tener una o más formas intermedias que dichas formas tienen actividad o pueden ser inactivas.

Como se describe en The Practice of Medicinal Chemistry, Ch. 31-32 (Ed. Wermuth, Academic Press, San 35 Diego, California, 2001), los profármacos pueden dividirse conceptualmente en dos categorías no excluyentes, que incluyen los profármacos bioprecursores y los profármacos portadores. Generalmente, los profármacos bioprecursores son compuestos inactivos o de baja actividad en comparación con el correspondiente compuesto farmacológico activo que contienen uno o más grupos protectores y se convierten en una forma activa por metabolismo o solvólisis. Tanto la forma activa del fármaco como los productos metabólicos liberados deben tener una toxicidad aceptablemente baja. Típicamente, la formación del compuesto activo del fármaco 40 implica un procedimiento o reacción metabólica que es uno de los siguientes tipos:

Reacciones oxidativas: Las reacciones oxidativas se ejemplifican sin limitación mediante reacciones como la oxidación de alcohol, carbonilo y funcionalidades ácidas, hidroxilación de carbonos alifáticos, hidroxilación de 45 átomos de carbono alicíclicos, oxidación de átomos de carbono aromáticos, oxidación de dobles enlaces carbono-carbono, oxidación de grupos funcionales que contienen nitrógeno, oxidación de silicio, fósforo, arsénico y azufre, N-dealquilación oxidativa, O- y S-dealquilación oxidativa, desaminación oxidativa, así como otras reacciones oxidativas.

Reacciones reductoras: Las reacciones reductoras se ejemplifican sin limitación mediante reacciones tales como la reducción de funcionalidades carbonílicas, la reducción de funcionalidades alcohólicas y dobles 50 enlaces carbono-carbono, la reducción de grupos funcionales que contienen nitrógeno y otras reacciones de reducción.

Reacciones sin cambio del estado de oxidación: Reacciones sin cambio en el estado de oxidación se ejemplifican sin limitación por reacciones tales como hidrólisis de ésteres y éteres, escisión hidrolítica de 55 enlaces simples carbono-nitrógeno, escisión hidrolítica de heterociclos no aromáticos, hidratación y deshidratación en enlaces múltiples, nuevos enlaces atómicos resultantes de reacciones de deshidratación, deshalogenación hidrolítica, eliminación de molécula de haluro de hidrógeno, y otras reacciones similares.

Los profármacos transportadores son compuestos farmacológicos que contienen una fracción transportadora, por ejemplo, que mejora la captación y/o la administración localizada a un lugar de acción. De manera deseable, para dicho profármaco transportador, la unión entre la fracción del fármaco y la fracción de transporte es un 60 enlace covalente, el profármaco es inactivo o menos activo que el compuesto del fármaco, y el profármaco y cualquier fracción de transporte de liberación son aceptablemente no tóxicos. En el caso de los profármacos

en los que la fracción transportadora está destinada a mejorar la absorción, la liberación de la fracción transportadora debe ser rápida. En otros casos, es deseable utilizar una fracción que proporcione una liberación lenta, por ejemplo, ciertos polímeros u otras fracciones, como las ciclodextrinas. Estos profármacos portadores suelen ser ventajosos para los fármacos administrados por vía oral. En algunos casos, la fracción 5 transportadora permite la administración selectiva del fármaco. Por ejemplo, el fármaco puede conjugarse con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los profármacos portadores pueden, por ejemplo, utilizarse para mejorar una o más de las siguientes propiedades: aumento de la lipofilia, aumento de la duración de los efectos farmacológicos, aumento de la especificidad del lugar, disminución de la toxicidad y las reacciones adversas, y/o mejora de la formulación del fármaco (por ejemplo, estabilidad, solubilidad en agua, supresión de una 10 propiedad organoléptica o fisicoquímica indeseable). Por ejemplo, la lipofilia puede aumentarse por esterificación de grupos hidroxilo con ácidos carboxílicos lipofílicos, o de grupos ácido carboxílico con alcoholes, por ejemplo, alcoholes alifáticos. Wermuth, supra.

Los metabolitos, por ejemplo, los metabolitos activos, se solapan con los profármacos descritos anteriormente, 15 por ejemplo, los profármacos bioprecursors. Así, dichos metabolitos son compuestos farmacológicamente activos o compuestos que se metabolizan posteriormente en compuestos farmacológicamente activos que son derivados resultantes de procedimientos metabólicos en el organismo de un sujeto. Entre ellos, los metabolitos activos son compuestos derivados farmacológicamente activos. En el caso de los profármacos, el compuesto profármaco suele ser inactivo o de menor actividad que el producto metabólico. En el caso de los metabolitos activos, el compuesto original puede ser un compuesto activo o un profármaco inactivo. Por ejemplo, en algunos 20 compuestos, uno o más grupos alcoxi pueden metabolizarse en grupos hidroxilo conservando la actividad farmacológica y/o los grupos carboxilo pueden esterificarse, por ejemplo, mediante glucuronidación. En algunos casos, puede haber más de un metabolito, donde un metabolito(s) intermedio(s) se metaboliza(n) aún más para proporcionar un metabolito activo. Por ejemplo, en algunos casos un compuesto derivado resultante de la glucuronidación metabólica puede ser inactivo o de baja actividad y puede metabolizarse más para 25 proporcionar un metabolito activo.

Los metabolitos del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación pueden identificarse mediante técnicas rutinarias conocidas en la técnica, y sus actividades pueden determinarse mediante pruebas como las descritas en Bertolini et al., 1997, J. Med. Chem., 40:2011-2016; Shan et al., 1997, J Pharm Sci 86(7):756-757; Bagshawe, 1995, Drug Dev. Res., 34:220-230; Wermuth, supra.

30 Los expertos en la técnica entienden que algunos compuestos pueden presentar tautomería. En tales casos, las fórmulas presentadas en el presente documento sólo representan expresamente una de las posibles formas tautoméricas. Por lo tanto, debe entenderse que el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación pretende representar cualquier forma tautomérica del compuesto representado y no debe limitarse meramente a la forma tautomérica específica representada por el dibujo del compuesto.

35 En el caso de los agentes que son sólidos, los expertos en la técnica entienden que los compuestos y las sales pueden existir en diferentes formas cristalinas o polimórficas, o pueden formularse como cocristales, o pueden estar en forma amorfía, o pueden ser cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, parcialmente cristalinos, parcialmente amorfos, o mezclas de polimorfos), todos los cuales se pretende que estén dentro del alcance de la presente divulgación y fórmulas especificadas. Mientras que las sales se forman por adición 40 ácido/base (es decir, una base libre o un ácido libre del compuesto de interés forma una reacción ácido/base con una base de adición correspondiente o un ácido de adición, respectivamente, dando lugar a una interacción de carga iónica), los cocristales son una nueva especie química que se forma entre compuestos neutros, dando lugar al compuesto y a una especie molecular adicional en la misma estructura cristalina.

45 En algunos casos, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se compleja con un ácido o una base, incluyendo sin limitación sales de adición de base, tales como, por ejemplo, amonio, dietilamina, etanolamina, etilendiamina, dietanolamina, t-butilamina, piperazina, meglumina; sales de adición de ácidos, tales como, por ejemplo, acetato, acetilsalicilato, besilato, camsilato, citrato, formato, fumarato, glutarato, hidroclorato, maleato, mesilato, nitrato, oxalato, fosfato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato y tosilato; y aminoácidos tales como, por ejemplo, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina.

55 Además, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación pretende abarcar formas hidratadas o solvatadas, así como formas no hidratadas o no solvatadas. Otros ejemplos de solvatos incluyen sin limitación el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación en combinación con un disolvente adecuado, tal como isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético o etanolamina, y similares.

60 En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto protonado" se refiere al compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación que se protonada mediante la adición de protones (o iones de hidrógeno cargados positivamente) a los sitios

aceptores de protones del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los sitios aceptores de protones incluyen los grupos fosfato del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, así como cualquier sitio aceptor de protones adicional en los grupos ribosa o butilo del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación.

A medida que aumenta el número de sitios aceptores de protones que se protonan en el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, el pH obtenido cuando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se disuelve en agua que tiene un pH de 7 disminuye y, por lo tanto, la cantidad de protonación del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del

5 mismo de la presente divulgación puede determinarse midiendo el pH de soluciones de agua después de la adición del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. El pH indica la concentración de iones hidrógeno de una solución. Las soluciones con una alta concentración de iones de hidrógeno tienen un pH bajo y son, por tanto, ácidas, mientras que las soluciones con una baja concentración de iones de hidrógeno tienen un pH alto y son, por tanto, básicas. En algunas realizaciones, los compuestos

10 de la presente divulgación son protonados de manera que cuando se disuelven en agua (pH 7) dichos compuestos forman una solución acuosa que tiene un pH de menos de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 1. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza con valores numéricos, debe entenderse que incluye la(s) cantidad(es) especificada(s) y variaciones

15 del 20%, 10%, 5%, 1%, 0,5% y 0,1% de la cantidad especificada. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de menos de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de aproximadamente pH 5 a

20 aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones,

25 el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de

30 aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 1. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 5. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua de

35 aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 4.

En algunas realizaciones, la protonación puede lograrse incubando el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación en presencia de un ácido fuerte. Aunque el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede protonarse mediante la adición de protones a los sitios reactivos del compuesto, son posibles otras modificaciones del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y se pretende que queden englobadas por el término compuesto protonado tal como se utiliza en el presente documento. En algunas realizaciones, las formas protonadas de los compuestos de la presente divulgación pueden generarse sometiendo los compuestos purificados, parcialmente purificados o crudos a un entorno de pH bajo (por ejemplo, ácido). En algunas realizaciones, los compuestos purificados o crudos pueden protonarse con ácido, incluyendo ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido acético.

Otros procedimientos para preparar un compuesto protonado de la presente divulgación conocidos por el artesano experto se contemplan igualmente dentro del alcance de la presente divulgación. En algunas realizaciones, una vez que los compuestos de la presente divulgación han sido protonados, dichos compuestos pueden separarse de cualquier componente no deseado como, por ejemplo, el exceso de ácido. El artesano experto conocería muchas formas de separar los compuestos de los componentes no deseados, incluyendo, pero no limitándose al uso de un intercambiador de cationes H⁺ (por ejemplo, H⁺-SCX). En algunas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación pueden someterse a cromatografía tras la protonación. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se ejecuta sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno) (por ejemplo, PRP-1 o 3 de Hamilton y PLRP de Polymer Lab) tras la protonación.

En algunas realizaciones, los compuestos protonados de la presente divulgación pueden utilizarse directamente. En algunas realizaciones, los compuestos protonados de la presente divulgación pueden procesarse adicionalmente para eliminar cualquier exceso de ácido o sal, por ejemplo, mediante precipitación, cromatografía en fase inversa, diafiltración o filtración en gel. En algunas realizaciones, los compuestos protonados de la presente divulgación pueden concentrarse por liofilización, evaporación de disolventes y similares. En algunas realizaciones, cuando se suspenden en agua o solución salina, los compuestos de la

presente divulgación generalmente exhiben un pH de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 5 dependiendo del nivel de protonación/acidificación, que se determina por la cantidad de ácido que se utiliza en el procedimiento de acidificación. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación pueden protonarse pasando por una columna de intercambio catiónico cargada con iones hidrógeno.

- 5 La utilización de dos grupos butilo en el compuesto de la presente divulgación impide o limita la degradación sustancial por nucleasa, incluyendo sin limitación la degradación por exonuclease, del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los grupos butilo se colocan para proteger la ribosa del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. El porcentaje de degradación ácida puede determinarse mediante HPLC analítica para evaluar la 10 pérdida de moléculas funcionales o mediante otros procedimientos adecuados. La degradación ácida se mide generalmente en función del tiempo. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación también son resistentes a las nucleasas, lo que permite que dichos compuestos mantengan la actividad (por ejemplo, la estabilidad del pH) en un entorno *in vivo*. El porcentaje de degradación de los compuestos de la 15 presente divulgación en un entorno que contenga una nucleasa puede determinarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, como, por ejemplo, la espectroscopía de masas. La degradación de las nucleasas se mide generalmente en función del tiempo. En algunas realizaciones, se emplea un compuesto de referencia para determinar el grado o la velocidad de degradación del ácido o la nucleasa. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación son 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 500% o 750% más estables que un compuesto de referencia.
- 20 Un compuesto de la presente divulgación de acuerdo con algunas realizaciones es útil como antimicrobiano que tiene actividad contra cualquier microbio. En el presente documento, los términos "microbio", "microbiano" y similares se refieren a bacterias, hongos, protozoos, virus, levaduras y similares. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antimicrobiano" se refiere al compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación que tiene la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de un microbio, o de atenuar la gravedad de una infección microbiana. Una lista no limitativa de las bacterias contra las que es 25 eficaz el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación incluye, sin limitación, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias de crecimiento lento y bacterias de crecimiento ácido rápido, y cualquier especie incluida en los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Listeria*, *Streptomyces*, *Chlamydia*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Arachnid*, *Mycobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Dermatophilus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptococcus*, *Pneumococcus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Kurthia*, *Nocardia*, *Serratia*, *Rothia*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Helicobacter*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Yersinia*, y *Haemophilus*.
- 30 Una lista no limitativa de los hongos contra los que el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es eficaz incluye, sin limitación, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, *Pityrosporum orbiculare*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, y *Trichophyton tonsurans*. Una lista no limitativa de los virus contra los que es eficaz el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación incluye, sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del herpes simple (VHS), el citomegalovirus (CMV), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la gripe.
- 35 El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es útil en aplicaciones médicas terapéuticas y no terapéuticas. Posibles pero no cubiertas por la presente invención son aplicaciones médicas no terapéuticas, por ejemplo, el efecto antimicrobiano del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación permite el uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación para la esterilización (por ejemplo, esterilización de la piel de un paciente o de una superficie u objeto, tal como, por ejemplo, un instrumento quirúrgico), o higienización (por ejemplo, la limpieza de una superficie, instrumento, para dejar la superficie libre de concentraciones indeseables de microorganismos causantes de enfermedades). Posibles, pero no cubiertas por la presente 40 invención son aplicaciones, en las que, los compuestos de la presente divulgación son eficaces para combatir la contaminación microbiana de cultivos de laboratorio, consumibles (por ejemplo, preparaciones de alimentos o bebidas), dispositivos médicos, aparatos hospitalarios o procedimientos industriales. Las aplicaciones terapéuticas del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se describen en el presente documento.
- 45 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a un preparado farmacéutico que contiene el compuesto de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y es adecuado para su administración a un paciente con fines terapéuticos. Como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un organismo vivo que se trata con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, incluyendo sin limitación cualquier mamífero como, por ejemplo, seres humanos, otros primates (por ejemplo, monos, chimpancés, etc.), animales de compañía (por ejemplo, perros, 50 gatos, caballos, etc.), animales de granja (por ejemplo, cabras, ovejas, cerdos, vacas, etc.), animales de terapia, y otros animales.
- 55 La presente divulgación también proporciona métodos de uso. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "método de uso" se refiere a un procedimiento que incluye la administración de un compuesto de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente para tratar una condición médica. Como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un organismo vivo que se trata con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, incluyendo sin limitación cualquier mamífero como, por ejemplo, seres humanos, otros primates (por ejemplo, monos, chimpancés, etc.), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, caballos, etc.), animales de granja (por ejemplo, cabras, ovejas, cerdos, vacas, etc.), animales de terapia, y otros animales.
- 60

laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, etc.), y animales salvajes y de zoológico (por ejemplo, lobos, osos, ciervos, etc.).

En algunas realizaciones, la composición incluye al menos el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, incluyendo además sin limitación uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. El portador, excipiente o diluyente puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "portador" incluye sin limitación carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, tales como lactosa, glucosa o sacarosa, tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, lípidos, liposomas, nanopartículas, líquidos fisiológicamente aceptables como disolventes o para suspensiones, incluyendo, por ejemplo, soluciones estériles de agua para inyección (WFI), solución salina, solución de dextrosa, solución de Hank, solución de Ringer, aceites vegetales, aceites minerales, aceites animales, polietilenglicos, parafina líquida, y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "excipiente" generalmente incluye, sin limitación, cargas, aglutinantes, desintegrantes, deslizantes, lubricantes, agentes complejantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes y tensioactivos, que pueden elegirse para facilitar la administración del compuesto por una vía particular. Los excipientes adecuados también pueden incluir, por ejemplo, dióxido de silicio coloidal, gel de sílice, talco, silicato de magnesio, silicato de calcio, aluminosilicato de sodio, trisilicato de magnesio, celulosa en polvo, celulosa macrocristalina, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica reticulada, benzoato de sodio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, ácido esteárico, estearato de aluminio, estearato de calcio, estearato de magnesio, estearato de zinc, estearil fumarato de sodio, syloid, estearowet C, óxido de magnesio, almidón, glicolato sódico de almidón, monoestearato de glicerilo, dibehenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, aceite de semilla de algodón hidrogenado, aceite de semilla de ricino, aceite mineral, polietilenglicol (por ejemplo, PEG 4000-8000), polioxietilenglicol, poloxámeros, povidona, crospovidona, croscarmelosa sódica, ácido algínico, caseína, copolímero de ácido metacrílico y divinilbenceno, docusato sódico, ciclodextrinas (por ejemplo, 2-hidroxipropil-delta-ciclodextrina), polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80), cetrímidra, TPGS (d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 succinato), lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, éteres de polietilenglicol, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicoles, o un éster de ácidos grasos de sorbitán polioxialquíleno (por ejemplo, éster polioxietilénico de sorbitán Tween[®]), ésteres polioxietilénicos de ácidos grasos de sorbitán, ésteres polioxietilénicos de ácidos grasos de sorbitán, por ejemplo un éster sorbitánico de ácido graso de un ácido graso como el oleico, esteárico o palmítico, manitol, xilitol, sorbitol, maltosa, lactosa, lactosa monohidratada o lactosa deshidratada por atomización, sacarosa, fructosa, fosfato cálcico, fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, sulfato cálcico, dextratos, dextrano, dextrina, dextrosa, acetato de celulosa, maltodextrina, simeticona, polidextrosem, quitosano, gelatina, HPMC (hidroxipropilmetilcelulosas), HPC (hidroxipropilcelulosa), hidroxietilcelulosa, y similares.

Como el artesano experto entiende, cualquier diluyente conocido en la técnica puede utilizarse de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el diluyente es soluble en agua. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el diluyente es insoluble en agua. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diluyente" incluye sin limitación agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa, glicerol, etanol, solución tamponada de acetato de sodio o de amonio, o similares, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen al menos un principio activo adicional. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "principio activo" se refiere a un compuesto terapéuticamente activo, así como a cualquier profármaco del mismo y a sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de los profármacos. Los principios activos adicionales pueden combinarse con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y pueden administrarse por separado o en la misma composición farmacéutica. La cantidad de principios activos adicionales a administrar puede ser determinada por un experto en la materia basándose en la terapia con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica humana. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición farmacéutica humana" se refiere a una composición farmacéutica destinada a ser administrada a un ser humano.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para su administración a un paciente por cualquier medio adecuado, incluyendo sin limitación aquellos medios utilizados para administrar antimicrobianos convencionales. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse utilizando cualquier vía aplicable que sería considerada por un experto, incluyendo, sin limitación, inyección o infusión oral, intravenosa ("IV"), intravesical, subcutánea ("SC"), intramuscular ("IM"), intraperitoneal, intradérmica, intraocular, inhalación (e intrapulmonar), intranasal, transdérmica, epicutánea, subdérmica, tópica, mucosa, nasal, oftálmica, impresión en la piel, intravaginal, intrauterina, intracervical y rectal. Dichas formas de dosificación deben permitir que el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación llegue a las células objetivo. Otros factores son bien conocidos en la

técnica e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y las formas de dosificación que retrasan que un compuesto o composición ejerza sus efectos. Las técnicas y fórmulas en general pueden encontrarse en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a edición, Lippincott, Williams and Wilkins, Filadelfia, Pa., 2005.

- 5 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están adaptadas para la administración tópica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración tópica" se refiere a la administración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación a la superficie cutánea de un paciente, de modo que el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación atraviese la capa cutánea. La administración transdérmica y la
10 administración transmucosa también se engloban dentro del término administración tópica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transdérmico" se refiere al paso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación a través de al menos una capa de piel de un paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, "transmucoso" se refiere al paso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación a través de una membrana mucosa de un paciente. A menos
15 que se indique o implique lo contrario, los términos "administración tópica", "administración transdérmica" y "administración transmucosa" se utilizan indistintamente en el presente documento.

Se conocen bien en la técnica diversos sistemas de administración tópica para administrar compuestos bioactivos a los microbios de un paciente. Tales sistemas incluyen, sin limitación, lociones, cremas, geles, aceites, ungüentos, soluciones, suspensiones, emulsiones y similares mediante la elección de portadores apropiados en la técnica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en forma de gel que incluye un alcohol polihídrico.
20

Los portadores adecuados incluyen, sin limitación, aceites vegetales o minerales, vaselina blanca (por ejemplo, parafina blanda blanca), grasas o aceites de cadena ramificada, grasas animales y alcohol de alto peso molecular (por ejemplo, superior a C12). En algunas realizaciones, los portadores se seleccionan de manera que el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación sea soluble. En algunas realizaciones, también pueden incluirse emulsionantes, estabilizantes, humectantes y antioxidantes, así como agentes que imparten color o fragancia, si se desea. En algunas realizaciones, puede emplearse un disolvente o cosolvente orgánico, tal como etanol o propanol, en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la evaporación del disolvente deja un residuo en la superficie tratada para inhibir la reinfección. En algunas realizaciones, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permeabilizar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el arte e incluyen, sin limitación, sales biliares y derivados del ácido fusídico. En algunas realizaciones, pueden utilizarse detergentes para facilitar la permeación. En algunas realizaciones, las cremas para administración tópica se formulan a partir de una mezcla de aceite mineral, cera de abeja autoemulsionable y agua, en la que se mezcla el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, disuelto en una pequeña cantidad de disolvente (por ejemplo, un aceite). El sistema específico de administración tópica utilizado depende de la localización de los microbios.
25
30
35

En algunas realizaciones, también pueden añadirse otros materiales a las composiciones farmacéuticas tópicas de la presente divulgación para obtener efectos hidratantes adicionales y mejorar la consistencia de la composición farmacéutica. Ejemplos de tales compuestos incluyen, sin limitación, cera de ésteres cetílicos, alcohol estearílico, alcohol cetílico, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, quaternium-15, humectantes, fluidos volátiles de metilsiloxano y polidiorganosiloxano-polioxialquíleno. Véase, por ejemplo, Pat. de EE. UU. Nos. 5,153,230 y 4,421,769. Si se desea que la composición farmacéutica tenga efectos limpiadores adicionales en algunas realizaciones, pueden añadirse sustancias químicas como lauril sulfato sódico o una sal metálica de un ácido carboxílico.
40
45

En algunas realizaciones, una amplia variedad de emolientes no volátiles es útiles en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. En McCutcheon's, Vol. 2 Functional Materials, Edición para Norteamérica, (1992), pp. 137-168, y en CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), pp. 137-168, y CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), que enumera los Skin-Conditioning Agents en pp. 572-575 y Skin Protectants en p. 580. En algunas realizaciones, los emolientes no volátiles incluyen siliconas, hidrocarburos, ésteres y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, los ésteres incluyen ésteres de ácidos grasos monofuncionales y difuncionales que se han esterificado con alcoholes y polioles (es decir, alcoholes que tienen dos o más grupos hidroxilo). En algunas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se utilizan ésteres de cadena larga de ácidos grasos de cadena larga (es decir, ácidos grasos C10-40 esterificados con alcoholes grasos C10-40). Ejemplos no limitantes de ésteres útiles en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen sin limitación aquellos seleccionados del grupo que consiste en adipato de diisopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, propionato de miristilo, diestearato de etilenglicol, palmitato de 2-ethylhexilo, neopentanoato de isodecilo, benzoato de alcohol C12-15, maleato de di-2-ethylhexilo, palmitato de cerilo, miristato de miristilo, estearato de estearilo, estearato de cetilo, behenato de behenilo y mezclas de los mismos.
50
55
60

Ejemplos de emolientes de silicona útiles en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, sin limitación, polialquilsiloxanos, polialquilsiloxanos cíclicos y polialquilarilsiloxanos. Los polialquilsiloxanos comercialmente disponibles adecuados incluyen los polidimetilsiloxanos, que también se conocen como dimeticonas, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen la serie Vicasil™ vendida por General Electric Company y la serie DowCorning™ 200 vendida por Dow Corning Corporation. Los polialquilsiloxanos disponibles comercialmente incluyen ciclometiconas (fluído Dow Corning™ 244), fluido Dow Corning™ 344, fluido Dow Corning™ 245 y fluido Dow Corning™ 345), entre otros. Un trimetilsiloxisilicato adecuado disponible comercialmente se vende como mezcla con dimeticona como fluido Dow Corning™ 593. También son útiles en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación los dimeticonoles, que son dimetilsiliconas terminadas en hidroxilo. Los dimeticonoles adecuados disponibles comercialmente se venden normalmente como mezclas con dimeticona o ciclometicona (por ejemplo, los fluidos Dow Corning™ 1401, 1402 y 1403). Entre los polialquilarilsiloxanos comercialmente disponibles se incluyen el fluido de metilfenilo SF1075 (vendido por General Electric Company) y el fluido de feniltrimeticona 556 Cosmetic Grade (vendido por Dow Corning Corporation).

Los hidrocarburos adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen sin limitación hidrocarburos de cadena recta y ramificada que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los hidrocarburos de cadena recta y ramificada tienen de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los hidrocarburos de cadena recta y ramificada tienen de aproximadamente 16 a aproximadamente 22 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de tales materiales hidrocarbonados incluyen dodecano, escualano, colesterol, 5 poliisobuteno hidrogenado, docosano (es decir, un hidrocarburo C22), hexadecano, e isohexadecano (un hidrocarburo comercialmente disponible vendido como Permethyl™ 101A por Presperse, South Plainsfield, N.J.), entre otros.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas tópicas de la presente divulgación incluyen propilenglicol. En algunas realizaciones, el propilenglicol actúa como tensioactivo y ayuda a la penetración, contacto y absorción del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el propilenglicol sirve como conservante. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen un tensioactivo no iónico, tal como, por ejemplo, polisorbato. Dicho tensioactivo proporciona un mejor contacto superficial de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación con la mucosa (como la mucosa vaginal) al reducir aún más la tensión superficial.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas tópicas de la presente divulgación también pueden formularse con una fase lipofílica, tales como, por ejemplo, emulsiones y dispersiones liposomales. En algunas realizaciones, las formulaciones liposomales pueden prolongar el tiempo de circulación del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, aumentar la permeabilidad del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y mejorar la eficacia general del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación como antimicrobiano. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede combinarse con un lípido, lípido catiónico o lípido aniónico. En algunas realizaciones, la emulsión o suspensión liposomal resultante junto con las cualidades estabilizadoras del pH del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación pueden aumentar eficazmente la semivida in vivo de la actividad de una composición farmacéutica de la presente divulgación. Ejemplos de lípidos aniónicos adecuados para su uso con las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, cardiolipina, dimiristoil, dipalmitoil, dioleoil fosfatidil colina, fosfatidil glicerol, palmitoiloilofosfatidil colina, fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, fosfatidil serina, fosfatidil inositol y formas aniónicas de colesterol.

En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se incorpora en liposomas. En algunas realizaciones, se utilizan lípidos neutros, colesterol y/o polietilenenglicol (PEG) en dichos liposomas. En algunas realizaciones, la composición liposomal se compone de fosfatidilcolina de soja parcialmente hidrogenada (PHSC), colesterol, PEG metoxi-terminado (mPEG), y/o fosfatidil-etanolamina distearoyl (DSPE). Los liposomas pueden prepararse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, la administración tópica es a través de aerosoles nasales o supositorios (rectales o vaginales). Los supositorios se preparan mezclando el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación con un vehículo lipídico tal como aceite de Theobroma, manteca de cacao, glicerina, gelatina, polioxietilenoglicoles y similares. En algunas realizaciones, la administración tópica comprende un parche o apósito transdérmico tal como un vendaje impregnado con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y opcionalmente uno o más portadores, excipientes o diluyentes conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, dichos apósitos incluyen, sin limitación, películas semipermeables, espumas, hidrocoloides e hisopos de alginato cálcico. En algunas realizaciones, la administración de la dosificación será continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están adaptadas para la administración oral. Como se utiliza en el presente documento, el término "administración oral" se refiere a la administración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación a la boca de un paciente para su ingestión en el tracto gastrointestinal. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse en formas de dosificación oral convencionales que incluyen, sin limitación, cápsulas, comprimidos, polvos y preparaciones líquidas tales como suspensiones, soluciones, elixires, jarabes, gotas concentradas y similares. En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede combinarse con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y opcionalmente procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener, por ejemplo, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras, cápsulas blandas, soluciones (por ejemplo, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas), y similares. En algunas realizaciones, los excipientes adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas orales de la presente divulgación incluyen, sin limitación, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, glucosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparados de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, carboximetilcelulosa sódica (CMC) y/o polivinilpirrolidona (PVP o povidona); y excipientes oleosos, incluyendo aceites vegetales y animales, como aceite de girasol, aceite de oliva o aceite de hígado de bacalao. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas orales de la presente divulgación también pueden contener agentes desintegrantes, tales como, por ejemplo, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal de los mismos como alginato de sodio; un lubricante, tal como talco o estearato de magnesio; un plastificante, tal como glicerol o sorbitol; un agente edulcorante, tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo; un agente aromatizante natural o artificial, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza; o colorantes o pigmentos, que pueden utilizarse para la identificación o caracterización de diferentes dosis o combinaciones. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas orales de la presente divulgación también pueden contener núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. En algunas realizaciones, pueden utilizarse soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente, por ejemplo, goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que pueden usarse por vía oral incluyen, sin limitación, cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina ("gelcaps"), así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En algunas realizaciones, las cápsulas a presión pueden contener el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En algunas realizaciones que incluyen cápsulas blandas, el compuesto activo puede disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, polietilenglicoles líquidos y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están adaptadas para la administración por inhalación. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración por inhalación" se refiere a la administración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación mediante el paso a través de la nariz o la boca del paciente durante la inhalación y el paso del compuesto a través de las paredes de los pulmones del paciente. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para administración por inhalación pueden formularse como polvo seco o una solución, suspensión o aerosol adecuados. En algunas realizaciones, los polvos y las soluciones pueden formularse con aditivos adecuados conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los polvos pueden incluir una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. En algunas realizaciones, las soluciones pueden comprender propilenglicol, agua estéril, etanol, cloruro sódico y otros aditivos, tal como, por ejemplo, ácido, álcali y sales tampón. En algunas realizaciones, dichas soluciones o suspensiones pueden administrarse por inhalación a través de un pulverizador, bomba, atomizador, nebulizador y similares. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para administración por inhalación también pueden usarse en combinación con otras terapias inhaladas, incluyendo sin limitación corticosteroides tales como, por ejemplo, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona, budesonida y furoato de mometasona; agonistas beta como, por ejemplo, albuterol, salmeterol y formoterol; agentes anticolinérgicos tales como, por ejemplo, bromuro de ipratropio o tiotropio vasodilatadores tales como, por ejemplo, treprostinal e iloprost; enzimas tales como, por ejemplo, ADNasa; proteínas terapéuticas; anticuerpos inmunoglobulina; un oligonucleótido tal como, por ejemplo, ADN o ARN de cadena simple o doble, ARNs; antibióticos tales como, por ejemplo, tobramicina; antagonistas de receptores muscarínicos; antagonistas de leucotrienos; antagonistas de citoquinas; inhibidores de proteasas; cromoglicato sódico; nedocril sódico; y cromoglicato sódico.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están adaptadas para la administración intravesical. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración intravesical" se refiere a la administración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la

presente divulgación directamente en la vejiga de un paciente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a través de un catéter. En algunas realizaciones, la sonda es una sonda uretral.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación están adaptadas para administración parenteral. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración parenteral"

5 se refiere al compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación que se inyecta o infunde en un paciente e incluye sin limitación intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e inyección e infusión intraesternal. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente
10 divulgación adecuadas para administración parenteral pueden formularse en soluciones líquidas estériles, incluyendo sin limitación tampones o soluciones fisiológicamente compatibles, tales como, por ejemplo, solución salina, solución de Hank o solución de Ringer. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para administración parenteral pueden prepararse como dispersiones en soluciones no acuosas, tales como, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, etanol,
15 polietilenglicos líquidos, triacetina, aceites vegetales y similares. En algunas realizaciones, las soluciones también pueden contener un conservante, tal como, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para administración parenteral pueden formularse en forma sólida, incluyendo, por ejemplo, formas
20 liofilizadas, y redisolverse o suspenderse antes de su uso. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a través de una aguja.

Posibles de hacer, pero no cubiertos por la presente invención son procedimientos y composiciones de pretratamiento de un catéter con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, por ejemplo, para prevenir una infección después de que el catéter se inserta en un paciente. Posible de hacer, pero no cubierto por la presente invención es un procedimiento, que incluye recubrir un catéter
25 con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación antes de insertar el catéter en un paciente. Posible de proporcionar, pero no cubierto por la presente invención es una composición que comprende un catéter recubierto con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. Dichos procedimientos y composiciones pueden utilizarse como tratamiento profiláctico de una infección en un paciente.

30 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y similares se refieren a la administración de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad eficaz para prevenir, aliviar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección (es decir, indicación) y/o prolongar la supervivencia del paciente tratado. En algunas realizaciones, "tratar", "tratamiento", "terapia" y términos similares también incluyen, sin limitación, reducir o eliminar la infección en un paciente.

35 Se administra una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación a un paciente que lo necesite. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz", en el contexto de la administración, se refiere a la cantidad de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación que, cuando se administra a un paciente, es suficiente para prevenir, aliviar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección (es decir, indicación) y/o prolongar la
40 supervivencia del paciente tratado. Dicha cantidad debería provocar pocos o ningún efecto adverso en el paciente tratado. Del mismo modo, dicha cantidad no debería producir efectos tóxicos en el paciente tratado, o éstos deberían ser escasos. Como comprenderán quienes estén familiarizados con la técnica, la cantidad de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación variará en función de diversos factores, entre los que se incluyen, sin limitación, la actividad del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del
45 mismo de la presente divulgación (*in vitro*, por ejemplo, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación frente al objetivo, o la actividad *in vivo* en modelos de eficacia animal), los resultados farmacocinéticos en modelos animales (por ejemplo, vida media biológica o biodisponibilidad), el tipo de paciente tratado, la edad, el tamaño, el peso y el estado físico general del paciente, el trastorno asociado al paciente y el régimen de dosificación empleado en el tratamiento.

50 Una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación que debe administrarse a un paciente que lo necesite puede cuantificarse determinando microgramos del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kilogramo de peso corporal del paciente. Preferentemente, la cantidad del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación administrada a un paciente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente
55 1000 miligramos (mg) del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kilogramo (kg) de peso corporal del paciente, o la cantidad del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación administrada a un paciente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kg de peso corporal del paciente, o la cantidad del compuesto o de la sal
60 farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación administrada a un paciente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 mg del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kg de peso corporal del paciente, o la cantidad del compuesto o de la sal

farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación administrada a un paciente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kg de peso corporal del paciente, o la cantidad del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación administrada a un paciente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación por kg de peso corporal del paciente. Como comprenderán los expertos en la técnica, pueden utilizarse dosis múltiples.

Un compuesto de la presente divulgación se administra como un régimen de dosis múltiple. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "régimen de dosis múltiples" se refiere a un periodo de tiempo de tratamiento de más de un día. Preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 2 días, de hasta aproximadamente 3 días, de hasta aproximadamente 4 días, de hasta aproximadamente 5 días, de hasta aproximadamente 6 días, de hasta aproximadamente 7 días, de hasta aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente un mes, de hasta aproximadamente dos meses, de hasta aproximadamente tres meses, de hasta aproximadamente cuatro meses, de hasta aproximadamente cinco meses, o de hasta aproximadamente seis meses. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Un compuesto de la presente divulgación se administra como parte de un régimen de tratamiento crónico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "régimen de tratamiento crónico" se refiere al tratamiento con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación durante un periodo de tiempo prolongado a lo largo de la vida de un paciente. Preferiblemente, el tratamiento crónico es de por vida.

Alternativamente, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se administra como dosis única. Preferiblemente, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación se administra como una dosis unitaria única. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dosis unitaria" es una cantidad predeterminada del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación. La cantidad del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es generalmente igual a la dosis del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación que se administraría a un paciente o una fracción conveniente de dicha dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosificación. Los términos "dosis única" y "dosis unitaria única" incluyen variantes en las que la composición puede administrarse como aplicación única y administrarse como aplicaciones múltiples.

El compuesto de la presente divulgación también puede usarse en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales para tratar la misma enfermedad o afección. Dicho uso combinado incluye la administración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y uno o más principios activos adicionales en momentos diferentes, o la coadministración del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y uno o más principios activos adicionales. La dosificación puede modificarse para el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación o uno o más principios activos adicionales utilizados en combinación, por ejemplo, reducción de la cantidad dosificada en relación con el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación o uno o más principios activos adicionales utilizados solos, por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. La coadministración incluye la administración simultánea del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y un principio activo adicional en la misma forma farmacéutica, la administración simultánea del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y un principio activo adicional en formas farmacéuticas separadas, y la administración separada del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación y un principio activo adicional.

Se entiende que el uso en combinación incluye el uso con uno o más principios activos adicionales u otro procedimiento médico en el que el uno o más principios activos adicionales u otro procedimiento médico pueden administrarse en momentos diferentes (por ejemplo, en poco tiempo, tal como en horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4-24 horas, etc.), o en un plazo más largo (por ejemplo, 1-2 días, 2-4 días, 4-7 días, 1-4 semanas, etc.)) que un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación, o al mismo tiempo que un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación. El uso en combinación también incluye el uso con uno o más principios activos adicionales u otro procedimiento médico que se administra una vez o con poca frecuencia, tal como la cirugía, junto con un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación administrado en un plazo breve o más largo antes o después de la administración del uno o más principios activos adicionales o de la finalización del otro procedimiento médico.

Un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación y uno o más principios activos adicionales pueden administrarse por una vía de administración diferente o por la misma vía de administración. El uso en combinación para cualquier vía de administración incluye la administración de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación y uno o más principios activos adicionales administrados juntos por la misma vía de administración en cualquier composición farmacéutica, incluyendo las composiciones farmacéuticas en las que los dos compuestos están unidos químicamente de tal manera que

dichos compuestos mantienen su actividad terapéutica cuando se administran. Uno o más principios activos adicionales pueden coadministrarse con un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación. El uso en combinación por coadministración incluye la administración de coformulaciones o formulaciones de compuestos unidos químicamente, o la administración de dos o más compuestos en formulaciones separadas con poco tiempo de diferencia (por ejemplo, en una hora, 2 horas, 3 horas, hasta 24 horas, etc.), administrados por la misma vía o por vías diferentes. La coadministración de formulaciones separadas incluye la coadministración mediante la administración a través de un dispositivo, por ejemplo, el mismo dispositivo inhalador, la misma jeringa, etc., o la administración desde dispositivos separados con poco tiempo de diferencia. Las coformulaciones de un compuesto o composición farmacéutica de la presente divulgación y uno o más principios activos adicionales administrados por la misma vía incluyen la preparación de los materiales juntos de forma que puedan administrarse mediante un dispositivo, incluyendo los compuestos separados combinados en una formulación, o compuestos que se modifican de forma que los compuestos se unen químicamente, pero siguen manteniendo su actividad biológica. Tales compuestos unidos químicamente pueden tener un enlace que se mantiene sustancialmente *in vivo*, o el enlace puede romperse *in vivo*, separando los dos componentes activos.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección. El tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "infección" se refiere a cualquier infección microbiana del cuerpo de un paciente. La infección incluye la invasión del cuerpo de un paciente por un microbio y su posterior multiplicación en el organismo del paciente.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una infección de una úlcera de la extremidad inferior. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "extremidad inferior" se refiere a una extremidad inferior del cuerpo de un paciente, incluyendo sin limitación la cadera, el muslo, la pierna, el tobillo y el pie. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "úlcera" se refiere a una herida abierta que se encuentra en cualquier parte de la extremidad inferior de un paciente.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una infección de una úlcera de pie diabético. Si, por ejemplo, el paciente padece diabetes de tipo I o diabetes de tipo II. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "úlcera del pie diabético" se refiere a una herida abierta localizada en cualquier parte del pie de un paciente. Por ejemplo, la herida se localiza en el talón, la parte media del pie y/o la parte delantera del pie del paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar", en el contexto de una úlcera del pie diabético, también incluye, sin limitación, reducir o eliminar la infección en un paciente, lo que, en algunas realizaciones, tiene como resultado limitar la progresión del tamaño, el área y/o la profundidad de la úlcera del pie; reducir el tamaño, el área y/o la profundidad de la úlcera del pie; aumentar la tasa de cicatrización y/o reducir el tiempo hasta la cicatrización; cicatrización de la úlcera del pie (aproximadamente 100% de epitelización sin drenaje); y/o disminución de la incidencia de amputación o ralentización del tiempo hasta la amputación.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración es tópica. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una loción, pasta, gel, crema, pomada, aceite u otra composición viscosa. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente un mes, de hasta aproximadamente dos meses, de hasta aproximadamente tres meses, o de hasta aproximadamente cuatro meses. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección del tracto urinario. El tratamiento comprende preferentemente la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tracto urinario" se refiere a los órganos del cuerpo de un paciente que producen, almacenan y descargan orina e incluye, sin limitación, los riñones, los uréteres, la vejiga y la uretra. Tal como se en el presente documento, el término "infección del tracto urinario" se refiere a una infección del tracto urinario de un paciente e incluye, sin limitación, una infección del tracto urinario no complicada y una infección del tracto urinario complicada. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "infección urinaria no complicada" se refiere a una infección por un microbio de un tracto urinario estructural y funcionalmente normal de un paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "infección urinaria complicada" se refiere a una infección por un microbio de un tracto urinario estructural y funcional anormal de un paciente. Preferiblemente, la infección urinaria complicada es una

infección urinaria asociada al catéter. Tal como se utiliza aquí, el término "infección urinaria asociada a catéter" se refiere a una infección urinaria complicada que se produce en un paciente que tiene un catéter urinario permanente.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración es intravesical.

5 Preferiblemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una solución o suspensión líquida. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 2 días, de hasta 10 aproximadamente 3 días, de hasta aproximadamente 4 días, hasta aproximadamente 5 días, hasta aproximadamente 6 días, hasta aproximadamente 7 días o hasta aproximadamente 14 días. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de tratamiento crónico. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

15 Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

20 La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección pulmonar en un paciente que lo necesite. El tratamiento comprende preferentemente la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "infección pulmonar" se refiere a una infección de uno o ambos pulmones de un paciente. En algunas realizaciones, la infección pulmonar surge de una afección pulmonar. En el presente documento, el término "afección pulmonar" se refiere tanto a las enfermedades y disfunciones del sistema respiratorio inducidas por infección como a las no inducidas por infección.

25 Ejemplos no limitantes de afecciones pulmonares incluyen sin limitación afecciones genéticas, afecciones adquiridas, afecciones primarias, afecciones secundarias, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, bronquiolitis, neumonía, bronquitis, enfisema, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, alergias, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón primario, cáncer de pulmón metastásico, bronquiectasia, displasia broncopulmonar, bronquitis crónica, enfermedades crónicas de 30 las vías respiratorias inferiores, crup, edema pulmonar de altura, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, linfangioleiomomatosis, síndrome de dificultad respiratoria neonatal, parainfluenza, derrame pleural, pleuresía, neumotórax, hipertensión pulmonar primaria, psitacosis, edema pulmonar secundario a diversas causas, embolia pulmonar, hipertensión pulmonar secundaria a diversas causas, insuficiencia respiratoria secundaria a diversas causas, apnea del sueño, 35 sarcoidosis, tabaquismo, estridor, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedades infecciosas, SARS, tuberculosis, infección por psitacosis, fiebre Q, parainfluenza, virus respiratorio sincitial, combinaciones de las mismas, y afecciones causadas por cualquiera de las anteriores o por una combinación de las mismas.

40 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección pulmonar derivada de la fibrosis quística. El tratamiento comprende preferentemente la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el presente documento, el término "fibrosis quística" hace referencia a una enfermedad genética que provoca la producción de una mucosidad anormalmente espesa que causa infecciones pulmonares y daños en los pulmones, el sistema digestivo y otros órganos del cuerpo del paciente.

45 Preferiblemente, la administración es por inhalación. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una solución líquida, suspensión o polvo seco. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente un mes, de hasta aproximadamente dos meses, de hasta aproximadamente tres meses, de hasta aproximadamente cuatro meses, de hasta aproximadamente cinco meses, de hasta aproximadamente seis meses, de hasta aproximadamente siete meses, o de hasta aproximadamente ocho meses. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

55 Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

60 En algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la neumonía. El tratamiento comprende preferentemente la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o de una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "neumonía" se refiere a una infección por un microbio de uno o ambos pulmones de un paciente que provoca la inflamación del tejido pulmonar. Preferiblemente, la neumonía es una neumonía adquirida por ventilación mecánica. En el presente documento, el término "neumonía adquirida por ventilación mecánica" se refiere a la neumonía que surge cuando un paciente está conectado a una máquina de ventilación mecánica. La neumonía adquirida por ventilación mecánica incluye la neumonía que se produce más de 48 horas después de que el paciente haya sido intubado y haya recibido ventilación mecánica.

Preferiblemente, la administración es por inhalación. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una solución líquida, suspensión o polvo seco. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 7 días, de hasta aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente 21 días, de hasta aproximadamente un mes o de hasta aproximadamente dos meses. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección en una herida por quemadura. El tratamiento comprende preferentemente la administración al paciente de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "herida por quemadura" se refiere a una lesión por quemadura en el cuerpo de un paciente que implica daños en la piel del paciente y posiblemente en los tejidos subyacentes a la piel del paciente. Existen tres tipos principales de niveles de quemadura conocidos por un experto en la técnica, incluyendo, sin limitación, quemaduras de primer, segundo y tercer grado. Preferiblemente, se proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una infección en una quemadura de primer, segundo y/o tercer grado.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración es tópica. Preferentemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en loción, gel, crema, pomada, aceite, solución, suspensión, emulsión u otra composición viscosa. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 2 días, de hasta aproximadamente 3 días, de hasta aproximadamente 4 días, de hasta aproximadamente 5 días, de hasta aproximadamente 6 días, de hasta aproximadamente 7 días, de hasta aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente 21 días, de hasta aproximadamente un mes, o de hasta aproximadamente dos meses. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la otitis externa en un paciente que lo necesite. El tratamiento comprende preferentemente la administración de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente. En el presente documento, el término "otitis externa" se refiere a una infección del conducto auditivo externo de un paciente.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración es tópica, directamente en el conducto auditivo externo del paciente. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una solución líquida, suspensión, loción, pasta, gel, crema, pomada, aceite u otra composición viscosa. Preferiblemente, se administra al paciente al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 7 días, de hasta aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente 21 días, o de hasta un mes. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de la vaginosis bacteriana. El tratamiento

comprende preferentemente la administración de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "vaginosis bacteriana" se refiere a una infección de la vagina de una paciente causada por un crecimiento excesivo de las bacterias que se encuentran de forma natural en la vagina.

5 Preferiblemente, el paciente es una mujer. Preferiblemente, la administración es tópica. Preferentemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una loción, gel, crema, pomada, aceite, solución, suspensión, emulsión u otra composición viscosa. Preferiblemente, se administra al paciente 10 al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 7 días, de hasta aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente 21 días, o de hasta un mes. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

15 Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

La presente divulgación también proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento del impétigo. El tratamiento comprende preferentemente la administración de una cantidad eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente. Tal 20 como se utiliza en el presente documento, el término "impétigo" se refiere a una infección de la piel de un paciente que da lugar a vesículas, pústulas, costras amarillentas y similares.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano. Preferiblemente, la administración es tópica. Preferentemente, la administración se lleva a cabo utilizando el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una loción, gel, crema, pomada, aceite, solución, suspensión, emulsión u otra composición viscosa. Preferiblemente, se administra al paciente 25 al menos un principio activo adicional. Preferiblemente, la administración se lleva a cabo como un régimen de dosis múltiples. Más preferiblemente, el régimen de dosis múltiples es un período de tiempo de hasta aproximadamente 2 días, de hasta aproximadamente 3 días, de hasta aproximadamente 4 días, de hasta aproximadamente 5 días, de hasta aproximadamente 6 días, de hasta aproximadamente 7 días, de hasta 30 aproximadamente 14 días, de hasta aproximadamente 21 días, o de hasta un mes. Pueden utilizarse otros períodos de tiempo.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo una o más veces al día. Más preferiblemente, la administración se lleva a cabo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

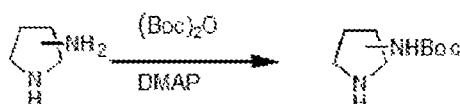
EJEMPLOS

35 A continuación se describen Ejemplos relacionados con la presente divulgación, así como Ejemplos comparativos, no cubiertos por la presente invención. En la mayoría de los casos, pueden utilizarse técnicas alternativas.

EJEMPLO COMPARATIVO 1

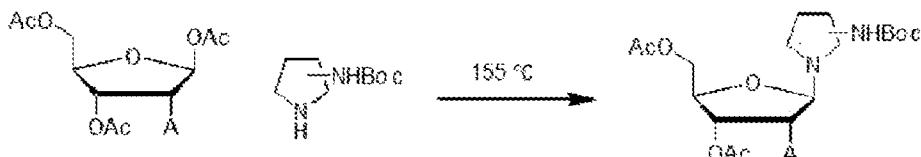
40 Esquema general de síntesis de un compuesto de fórmula (II) que tiene una fracción heterocíclica que contiene nitrógeno amino sustituido

Paso 1. Protección del heterociclo que contiene nitrógeno amino sustituido.



Un nitrógeno amino sustituido que contiene heterociclo se trata con dicarbonato de *di-tert-butilo*((BOC)₂O) en presencia de una base tal como 4-(dimetilamino) piridina (DMAP) en un disolvente orgánico tal como metanol 45 para proteger con Boc el nitrógeno amino exocíclico.

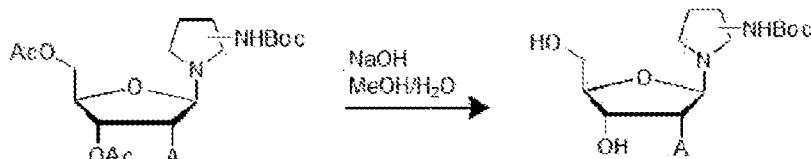
Paso 2. Glicosilación de nucleobases



El heterociclo que contiene nitrógeno amino sustituido protegido con Boc preparado en el Paso 1 se acopla en condiciones térmicas a un derivado de ribosa/desoxiribosa protegido con acetilo que es electrófilo en el carbono anomérico.

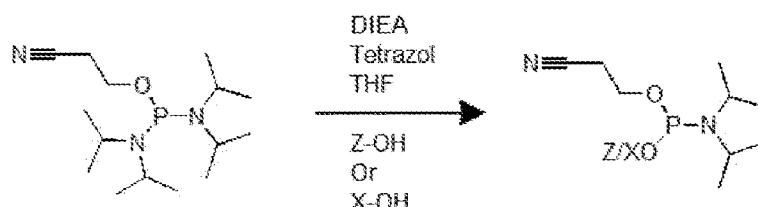
Paso 3. Desprotección del grupo acetilo

5



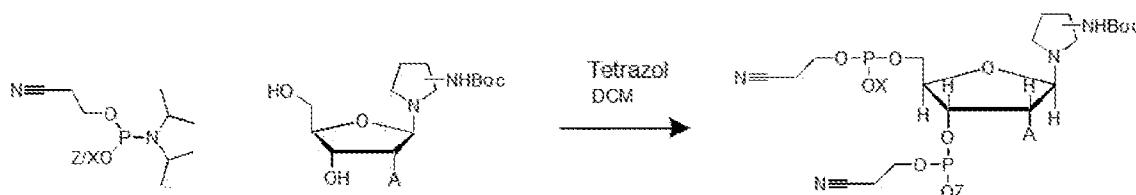
La nucleobase glicosilada preparada en el Paso 2 se trata con NaOH, MeOH y H₂O para desproteger el grupo protector acetilo y proporcionar los grupos hidroxi primario y secundario.

Paso 4. Preparación del reactivo de fosfilación



- 10 El Paso 4 puede ocurrir como precursor del Paso 5 y es un procedimiento independiente de los Pasos 1-3. Se hace reaccionar un alcohol con la fosfinamida en THF con tetrazol como catalizador en presencia de *N,N*-diisoletoiletilamina(DIEA).

Paso 5. Fosfilación



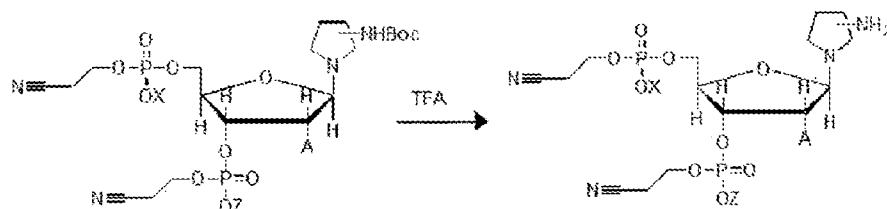
- 15 La especie nucleobase protegida con Boc preparada en el Paso 3 se bisfosfinila con el reactivo fosfilante preparado en el Paso 4 y tetrazol como catalizador en diclorometano (DCM).

Paso 6. Oxidación



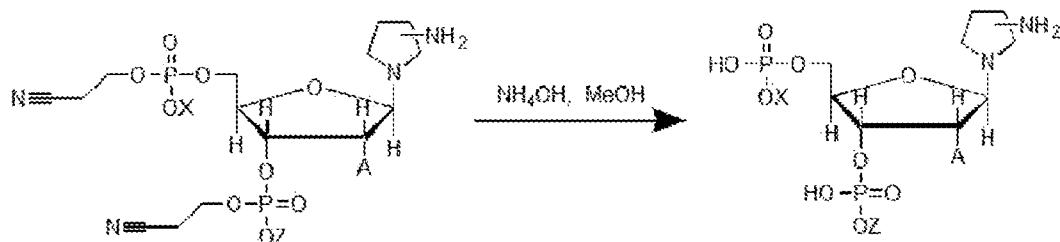
- 20 El bisfosfonato se genera por oxidación del compuesto bisfosfinilado preparado en el paso 5 con *tert*-butilhidroperóxido (TBTH) en presencia de decano.

Paso 7. Desprotección del heterociclo con nitrógeno amino sustituido.



La eliminación del grupo protector Boc del heterociclo que contiene nitrógeno amino sustituido preparado en el Paso 6 se lleva a cabo en DCM en presencia de ácido trifluoroacético (TFA).

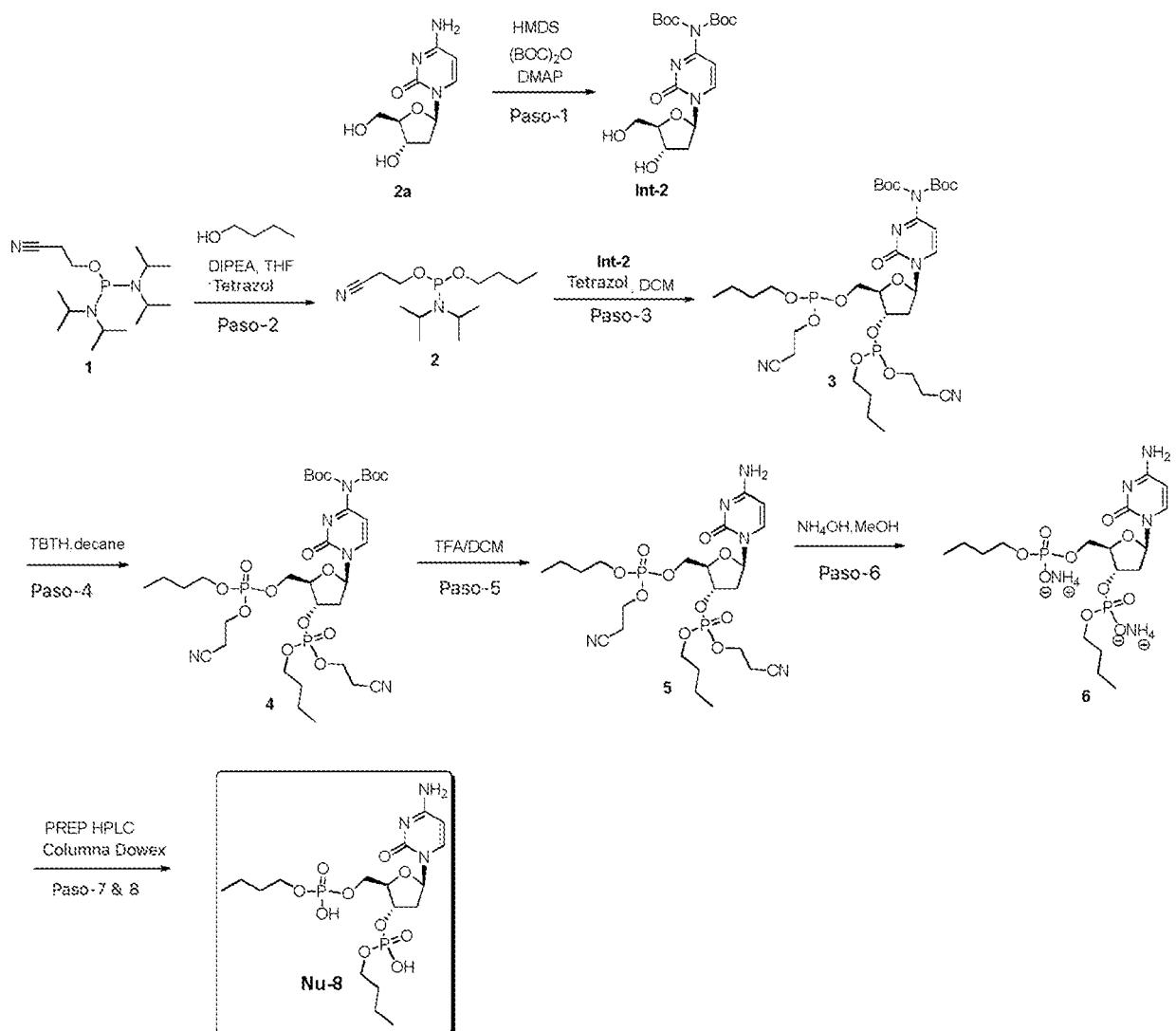
Paso 8. Desprotección del fosfodiéster



- 5 La hidrólisis del grupo protector β -cianoetilo del fosfodiéster preparado en el Paso 7 con hidróxido de amonio metanólico (NH_4OH , MeOH) proporciona el compuesto objetivo.

EJEMPLO 2

Síntesis de Nu-8



10 **Paso 1. Protección de la amina (Bloque de construcción clave intermedia)**

La citidina 2a se añade a hexametildisilazano (HMDS), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), trifluorometanosulfonato de trimetilsililo y dicarbonato de di-tert-butilo ((BOC)₂O) en metanol para proteger los átomos de nitrógeno de 2a generando el compuesto Int-2 protegido con BOC.

Paso 2. Preparación del reactivo de fosfilación(Bloque de construcción clave intermedia)

- 5 El n-butanol se hace reaccionar con la fosfinamida 1 en THF con tetrazol como catalizador en presencia de *N,N-diisoletiamina*(DIEA). El producto bruto se cromatografía sobre alúmina neutra eludiendo con hexano y después con acetato de etilo al 2% en hexano. La fracción pura se combina (por TLC) y se evapora al vacío hasta obtener un residuo.

Paso 3. Acoplamiento de intermediarios clave

- 10 La especie Int-2 protegida con BOC se bisfosfinila con el reactivo 2 en disolvente diclorometano (DCM)/dimetilformamida (DMF) y tetrazol como catalizador para producir 3. La mezcla de reacción se concentra hasta obtener un residuo y el producto bruto se oxida inmediatamente en el siguiente paso.

Pasos 4 y 5. Oxidación y desprotección de aminoácidos

- 15 El producto bruto 3 se oxida con *tert-butilhidroperóxido* (TBTH) en presencia de decano para generar la especie bis-fosfonato 4. La eliminación de los grupos BOC se lleva a cabo en DCM en presencia de ácido trifluoroacético (TFA) para obtener 5. El producto bruto se cromatografía sobre gel de sílice eludiendo con acetato de etilo. Las fracciones puras (por TLC) se combinan y se evaporan al vacío hasta obtener un residuo.

Paso 6. Desprotección del fosfodiéster

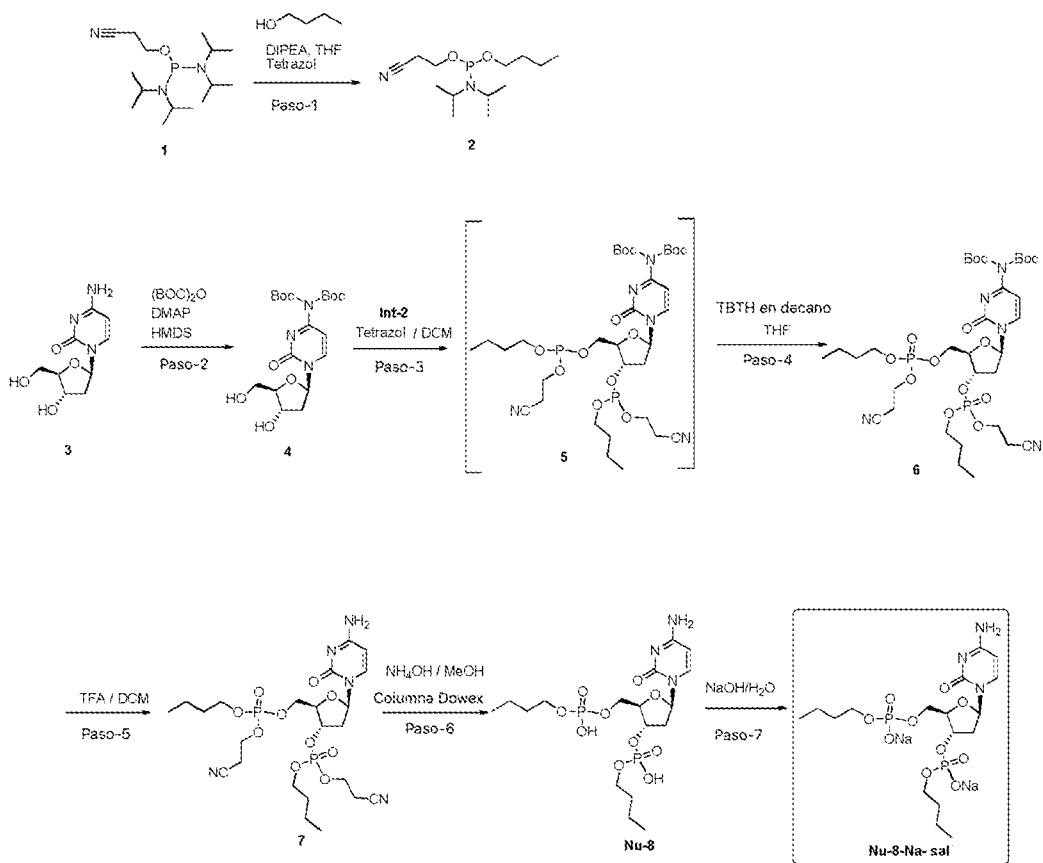
La hidrólisis de 5 con hidróxido de amonio metanólico (NH₄OH, MeOH) da la sal de amonio (I) bruta(6).

20 **Pasos 7 y 8. Depuración**

Se lleva a cabo la purificación mediante HPLC preparativa de 6 y la conversión al ácido libre con resina Dowex 50WX8-200. La evaporación del eludido acuoso proporciona (I) que se diluye con agua purificada para proporcionar una solución al 20% a su pH ambiente.

EJEMPLO 3

25 **Síntesis de la sal sódica de Nu-8**



Síntesis del compuesto-2

A una disolución de compuesto-1 (1,0 kg, 3,3222 mol) en THF (6 L) se añade DIEA (1,370 mL, 8,3055 mol) y tetrazol (230 g, 3,3222 mol) seguido de n-butanol (275 mL, 2,99 mol) en THF (6 L) gota a gota durante 12 h. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El progreso de la reacción se controla por TLC y una vez completada la reacción, se filtra el sólido. El filtrado se evapora a presión reducida a 40 °C para obtener el compuesto bruto. El compuesto bruto se disuelve en acetato de etilo (5 L). La capa orgánica se lava con agua (3 L) y salmuera (2 L). La capa orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el compuesto bruto. El compuesto bruto se purifica mediante cromatografía en columna sobre lumina básica (Al₂O₃), eludiendo con 0 - 2 % EtOAc en éter de petróleo para obtener el Compuesto-2 (700 g, 76,92 %) como líquido amarillo pálido. H-NMR (400 MHz, cloroformo-d) δ 4,18 - 4,07 (m, 1H), 4,02 (q, J = 6,6 Hz, 1H), 3,93-3,74 (m, 4H), 2,65 (td, J = 6,5, 3,6 Hz, 2H), 1,31 - 1,23 (m, 4H), 1,18 (dd, J = 6,8, 3,8 Hz, 12H), 0,93 (td, J = 7,4, 3,1 Hz, 3H). LC-MS: 275 (M + H).

Síntesis del compuesto-4

A la solución de compuesto-3 (300 g, 1,321 mol) en hexametildisilazano (638 g, 3,964 mol) se añade DMAP (16,11 g, 0,132 mol) seguido de TMSOTf (7,22 g, 0,039 mol) a 0 °C y la mezcla de reacción resultante se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez completado el material de partida, se añade Boc-anhídrido (1,4 L, 6,605 mol) a 0 °C durante 1 h y la mezcla de reacción se agita durante 16 h a temperatura ambiente. A la reacción se añade metanol (3 L) seguido de trietilamina (1,5 L) se añade a 0 °C durante 1 h y la mezcla de reacción se agita durante 20 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida para obtener el compuesto bruto. El compuesto bruto se diluye con acetato de etilo (3 L) y se lava con agua (1,0 L) y solución de salmuera (1,0 L); la capa orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el compuesto bruto. El compuesto crudo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (malla 100-200) eludiendo compuesto 0 - 3 % MeOH en DCM para obtener Compuesto-4 (180 g, 31,89 %) como sólido blanquecino. H-RMN (300 MHz, DMSO-d6) δ 8,41 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,06 (t, J = 6,2 Hz, 1H), 5,28 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 5,07 (q, J = 4,6, 4,0 Hz, 1H), 4,21 (q, J = 4,1 Hz, 1H), 3,87 (q, J = 3,7 Hz, 1H), 3,71 - 3,49 (m, 2H), 2,32 (m, 1H), 2,03 (dt, J = 13,0, 6,2 Hz, 1H), 1,49 (s, 18H). LC-MS: 275 (M + H).

Síntesis del compuesto-6

A una solución agitada de compuesto-4 (180 g, 0,421 mol) en THF (1,0 L) se añade DIEA (348 mL, 2,105 mol) y tetrazol (176 g, 2,526 mol) a 0 °C. A la mezcla de reacción resultante se añade una solución de compuesto-2 (519 g, 1,896 mol) en THF (800 mL) gota a gota a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez completada la reacción, se añade peróxido de tert-butilo en decano (505 mL, 5 M) gota a gota a 0 °C y la mezcla de reacción se agita durante 6 h a temperatura ambiente. La reacción se controla por TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentra a 40 °C y se diluye con acetato de etilo (3 L) y se lava con agua (1 L) y solución de salmuera (1 L). La capa orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el compuesto bruto (350 g bruto). El compuesto bruto se purifica por cromatografía en columna mediante columna de gel de sílice (malla 100-200) eludiendo con MeOH al 0 - 5 % en DCM. Todas las fracciones pures recogidas se concentran para obtener el Compuesto-6 puro (220 g, 64,83 %) en forma de líquido rojo vinoso. H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,19 (dd, J = 7,6, 1,3 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,13 (t, J = 10,5 Hz, 1H), 4,99 (s, 1H), 4,44 (s, 1H), 4,26 - 3,96 (m, 10H), 3,00 - 2,84 (m, 4H), 2,57 - 2,79 (m, 2H), 1,70 - 1,54 (m, 4H), 1,50 (s, 18H), 1,35 (m, 4H), 0,88 (qd, J = 7,5, 2,5 Hz, 6H); LC-MS: 806 (M + H).

15 Síntesis del compuesto-7

A una solución de Compuesto-6 (220 g, 0,273 mol) en DCM (4,4 L) se añade TFA (210 mL, 2,732 mol) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se monitoriza por TLC. Una vez completada la reacción, el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el compuesto bruto. El compuesto bruto se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (malla 230-400). El compuesto se eludió con MeOH al 0-10% en DCM. Todas las fracciones pures recogidas se concentran para obtener el Compuesto-7 puro (170 g, 84,67 %) como un líquido amarillo pálido. H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,61 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 13,9 Hz, 2H), 6,19 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 5,74 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 4,96 (s, 1H), 4,10 - 3,93 (m, 11H), 2,93 (q, J = 6,2 Hz, 4H), 2,29 (d, J = 13,1 Hz, 2H), 1,61 (h, J = 7,1 Hz, 4H), 1,35 (p, J = 7,3 Hz, 4H), 0,89 (dq, J = 7,9, 4,2 Hz, 6H); LC-MS: 606 (M + H).

25 Síntesis de Nu-8

A una solución agitada de Compuesto-7 (720 g, 1,1900 mol) en MeOH (5,0 L) se añade amoníaco acuoso (600 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se monitoriza mediante TLC. Una vez finalizada la reacción, se evapora el MeOH a presión reducida y se lava la capa acuosa con DCM (1,5 L). La capa acuosa se hace pasar por resina Dowex-H⁺. El agua se elimina a presión reducida para obtener Nu-8 (260 g, 43,84 %) como sólido blanquecino. H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,94 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,97 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,08 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 5,95 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 4,76 (q, J = 5,8 Hz, 1H), 4,15 (q, J = 4,1 Hz, 1H), 4,08 (s, 1H), 3,83 (m, 6H), 2,43 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 1,67 - 1,44 (m, 4H), 1,44 - 1,26 (m, 4H), 0,95 - 0,82 (m, 6H), LC-MS: 500,15 (M + H).

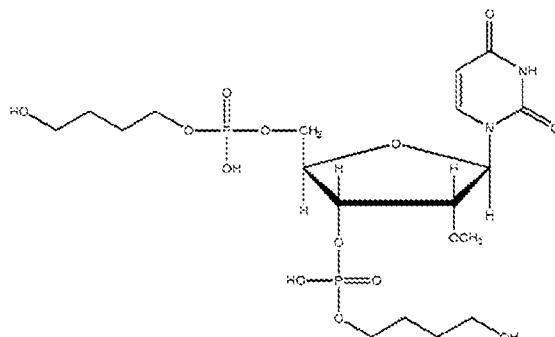
Síntesis de la sal sódica de Nu-8

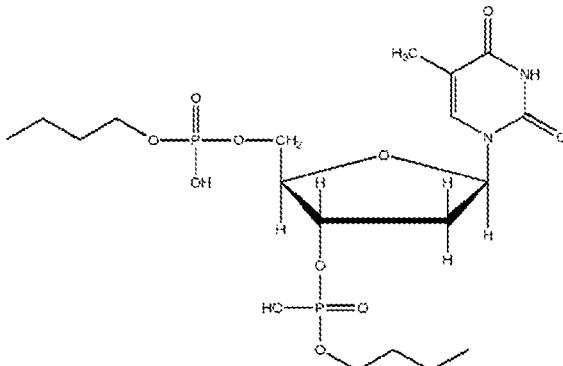
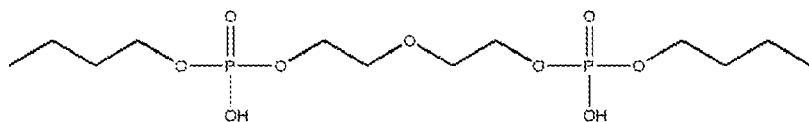
35 A una disolución agitada de compuesto-Nu-8 (260 g, 0,478 mol) en agua (2,6 L), se añade gota a gota NaOH 1 N (950 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se monitoriza por TLC. Una vez finalizada la reacción, se lava la capa acuosa con DCM (1,5 L). La capa acuosa se evapora a presión reducida para obtener la sal sódica de Nu-8 (265 g, 93%) como sólido blanquecino. H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,81 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,2 (bs, 1H), 7,0 (bs, 1H), 6,16 (t, J = 4 Hz, 1H), 5,71 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,69 (bs, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,71 (m, 1H), 3,8 (m, 4H), 2,2 (q, 1H), 1,89-1,96 - 1,44 (m, 1H), 1,49 - 1,39 (m, 4H), 1,34- 1,23 (m, 4H), 0,88 - 0,84 (m, 6H).

EJEMPLO 4

Estudios comparativos de las propiedades físicas de los compuestos de comparación Bifosfocina® Compuestos Nu-2, Nu-4 y Nu-5, frente al compuesto inventivo Nu-8

45 A continuación se muestran las estructuras de los compuestos conocidos de Bisfosfocina® Nu-2, Nu-4 y Nu-5:



Nu-2**Nu-4****Nu-5**

Se realizan estudios de pH para mostrar el pH de Nu-8 en comparación con los compuestos de Bisfosfocina® Nu-2, Nu-4 y Nu-5. Se prepara una solución de Nu-2 de 20 mg/mL diluyendo 2 mL de una solución de Nu-2 de 250 mg/mL con 23 mL de agua desionizada. Las soluciones Nu-4 y Nu-5 de 20 mg/mL se preparan de la misma manera. Se pesan 401.65 mg de Nu-8 en un matraz aforado de 5 mL y se diluyen con agua desionizada hasta el volumen. Se prepara una solución de Nu-8 de 20 mg/mL diluyendo 5 mL de una solución de Nu-8 de 80,3 mg/mL con 15 mL de agua desionizada. Los valores de pH de 4 Nu-2, Nu-4, Nu-5 y Nu-8 a 20 mg/mL se miden con un pH-metro calibrado. Los resultados se muestran en la TABLA 2. También se muestra en la TABLA 2 un resumen de otras propiedades físicas de Nu-8 y los compuestos de referencia Nu-2, Nu-4 y Nu-5.

TABLA 2

	Nu-2	Nu-4	Nu-5	Nu-8
pH (solución al 2%)	0,99	0,94	0,93	1,49
pKa	2,3	2,3	2,28	3,2
Solubilidad	-	-	-	137
Pow	0,0407	0,0592	0,048	0,0662

Nu-8 preparado en una solución acuosa al 2% proporciona la solución más básica (pH más alto) en comparación con los compuestos de referencia Nu-2, Nu-4 y Nu-5. Sin querer estar atado a ninguna teoría en particular, se cree que la presencia de un grupo amino exocíclico libre en la estructura de Nu-8 altera el pH de Nu-8 en solución, lo que a su vez causó que Nu-8 actuara más rápidamente y fuera más potente a niveles de pH más altos que las Bisfosfocinas® Nu-2, Nu-4 y Nu-5.

Además, las mediciones de pKa muestran que Nu-8 tiene la constante de dissociación ácida más baja en comparación con las Bisfosfocinas® Nu-2, Nu-4 y Nu-5, que es una medición de la dissociación de la molécula en ion(es) de hidrógeno y la base conjugada correspondiente. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que Nu-8 no tiene tantos protones ácidos en su estructura que puedan disociarse en solución como iones de hidrógeno en comparación con el número de protones ácidos presentes en los compuestos de referencia de Bisfosfocina® Nu-2, Nu-4 y Nu-5. Los compuestos Bisfosfocina® de referencia tienen protones ácidos, tales como protones hidroxilo y protones éster metílico, que pueden disociarse en solución.

En resumen, Nu-8 preparado en una solución acuosa al 2% proporciona la solución más básica (pH más alto) y actúa más rápidamente y es más potente a niveles de pH más altos en comparación con los compuestos de referencia Nu-2, Nu-4 y Nu-5.

EJEMPLO 5

Uso de Nu-8 en el tratamiento de *Helicobacter Pylori* en ratones**Animales**

La cepa de ratón utilizada en este estudio es la C57BL6 de 5-6 semanas de edad y 18 - 22 gramos de peso. Los ratones se alojan de cinco en cinco en una jaula con libre acceso a comida y agua de acuerdo con las directrices de los NIH.

5

Cepa bacteriana

Una cepa bacteriana de *Helicobacter pylori* SS1 (CagA+, VacA+) se adapta para el modelo de ratón a partir de un aislado clínico humano y se valida en este modelo de infección.

Infección

10 6 días antes de la infección, una cepa congelada se extiende en una o dos placas de agar Columbia 5% sangre de oveja y las placas se incuban microaerófilamente durante 72 horas a 37 °C. Después de 72 horas, el crecimiento en placa se subcultiva en cinco placas de agar Columbia 5% sangre de oveja y se incuba como antes. Tras otras 72 horas de incubación, se retiran las placas y se suspende el crecimiento de la placa en solución salina estéril al 0,9% hasta alcanzar una DO de 1,5 - 2,0 a 530 nm. Esta DO es aproximadamente igual a 1,0e+09 CFU/mL, que se utiliza para infectar oralmente a los ratones en los 3 días de infección. Para infectar a los ratones, se les dosifica por vía oral 0,25 mL de las 1,0e+09 CFU/mL mediante una aguja de alimentación forzada de 20 - 22 G. Los ratones sólo necesitan ayunar antes de la primera infección.

15

Tratamiento

20 Una semana después de la infección, los ratones son tratados con Nu-8. Las terapias antibióticas de dosis múltiples se administran por vía oral a 0,2 mL/dosis. Los antibióticos se administran 2 veces al día y se mantienen durante 7 días. Al grupo de control se le administra el vehículo solo.

25

Muestreo

25 La comida se retira de las jaulas 18 horas antes de la eutanasia de los animales y cada jaula está claramente etiquetada de que los animales están siendo ayunados experimentalmente. Los ratones son eutanasiados (CO₂ y dislocación cervical). Una vez eutanasiados los ratones, se extrae cada estómago cortando el esófago por la parte superior del estómago y el duodeno por la región pilórica. El estómago extirpado se coloca en una placa de Petri estéril y el contenido luminal se enjuaga con 1X PBS estéril. Cada estómago enjuagado se coloca en un tubo Falcon de 14 ml que contiene 2 ml de PBS 1X y se guarda en hielo. Cada estómago se homogeneiza, se diluye 10 veces en serie en 1X PBS, se siembra en agar Columbia con 3,5% de sangre de caballo ± el suplemento antibiótico selectivo DENT y se incuba microaerófilamente durante 5 días a 37 °C. A continuación, se cuentan las colonias. A continuación, se cuentan las colonias.

30

Respuesta a la dosis

35 Nu-8 se administra a diversas dosis (mg/kg), por vía oral, dos veces al día durante 7 días. Las formulaciones, la concentración y los volúmenes de dosis para el tratamiento se establecen antes de la dosificación. El grupo de control positivo consiste en un régimen de terapia triple (omeprazol, amoxicilina y claritromicina). En el control negativo se utilizó una solución dosificadora sin fármacos. El calendario de trabajo figura en ;a TABLA 3. El programa de inoculación y tratamiento se muestra en la TABLA 4.

TABLA 3

40

Grupo	Compuesto	Dosis	Volumen de dosis del cono	Régimen	# animales ^a
1	Nu-8	0,2 mg	1 mg/mL, 0,2 mL	PO; bid × 7 días	16
2		1,0 mg	5 mg/mL, 0,2 mL		16
3		2,0 mg	10 mg/mL, 0,2 mL		16
4	PrevPac	31 mg/kg	31 mg/kg	bid × 7 días	16

5	Vehículo	na	na	bid × 7 días	5
6	Control de infecciones	na	na	bid × 7 días	20
^ 8 animales cada uno para los criterios de valoración terapéuticos y de recaída					

TABLA 4

Día	Procedimiento
-11	Infección
-10	
-9	Infección
-8	
-7	Infección
0	Muestra de tratamiento y de control
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	Muestra del día 7
14	Muestra del día 14

Resultados

- 5 Los ratones se infectan en tres días con inóculos de 6,16, 6,6 y 6,37 \log_{10} UFC. Una semana después de la última infección (Día 0 - inicio del tratamiento) los títulos estomacales medios son de 6,74 \log_{10} UFC. Los recuentos se mantienen constantes durante las dos semanas siguientes, con títulos medios para los grupos de control no tratados de 6,86 y 6,66 \log_{10} UFC en los días 7 y 14, respectivamente (véase la TABLA 5, que muestra los títulos estomacales medios de *H. pylori* SS1 en ratones tras el tratamiento con Nu-8 y Prevpac). Nu-8 muestra una respuesta a la dosis con niveles estomacales bacterianos de 5,62, 5,21 y 4,74 en el Día 7 y 6,2, 5,67 y 5,81 \log_{10} CFU en el Día 14 para las soluciones de dosis de 1, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Prevpac (por ejemplo, claritromicina, omeprazol y amoxicilina) reduce los títulos bacterianos a 3,22 \log_{10} UFC en el Día 7, que repuntan a 6,19 \log_{10} UFC en el Día 14. Aunque el tratamiento con Nu-8 es menos eficaz que el régimen de terapia triple en el Día 7, Nu-8 muestra menos rebote en el Día 14 (7 días después de la última dosis administrada) que Prevpac con recuentos más bajos para los grupos de dosis de 5 y 10 mg/mL (ver TABLA 5). En resumen, estos resultados respaldan el uso de Nu-8 como tratamiento a largo plazo de las infecciones por *H. pylori*, resultados que cabría esperar contra otras bacterias gramnegativas.
- 10
- 15

TABLA 5

Grupo	Prueba	Dosis	Vol de dosis de cono	Régimen	Puntos temporales	Log10	SD
1	Cp,[pim (I)	0,2 mg	1 mg/mL, 0,2 mL	PO, bid por 7 días	+7 días	5,62	0,60
2					+14 días	6,2	0,86
		1,0 mg	5 mg/mL, 0,2 mL		+7 días	5,21	0,26

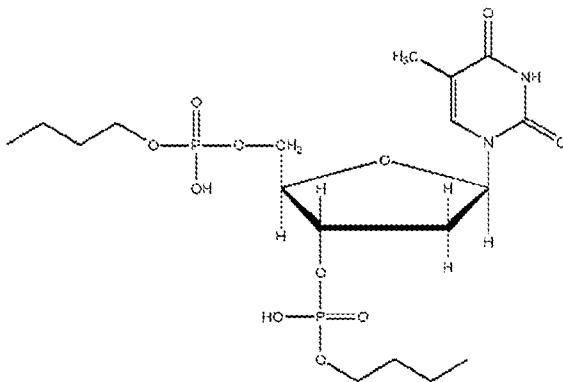
				PO, <i>bid</i> por 7 días	+14 días	5,67	0,23			
3		2 mg	10 mg/mL, 0,2 mL	PO, <i>bid</i> por 7 días;	+7 días	4,74	0,68			
					+14 días	5,81	0,74			
					+7 días	3,22	0,52			
4	PREVPAC	31 mg/kg	31 mg/kg	PO, <i>bid</i> por 7 días	+14 días	6,19	0,69			
					+7 días	6,59	0,12			
5	Vehículo tratado	na	na	PO, <i>bid</i> por 7 días	0 días	6,74	0,37			
	Controles no tratados				+7 días	6,86	0,54			
					+14 días	6,66	0,76			

EJEMPLO 6

Perfiles citológicos bacterianos para evaluar la relación estructura-actividad del compuesto inventivo Nu-8 comparado con el compuesto comparativo Bisfosfocina® y los compuestos comparativos Nu-3, Nu-4 y Nu-5

5

A continuación se muestra la estructura del compuesto conocido de Bisfosfocina® Nu-3:



Nu-3

Procedimientos y materiales

Este estudio de perfiles citológicos bacterianos (PCB) utiliza procedimientos y materiales descritos previamente por Nonejuie, P., Burkart, M., Pogliano, K., Pogiano, J. (2013). Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 110(40):16169-16174. doi: 10.1073/pnas.1311066110.

10 Las cepas de tipo silvestre de *E. coli* ATCC 25922 o *P.aeruginosa* K2732 se cultivan en medios ricos (caldo de lisogenia 2x sin tamponar [LB]) a 30 C hasta una OD₆₀₀~0,4. A continuación, estos cultivos se dividen y cada muestra se trata con la concentración adecuada de Nu-8 en LB sin tamponar o tamponada (mezcla finalOD₆₀₀~0,1). Las células expuestas sin Nu-8 se tamponan a pH 4 con ácido fosfórico.

15 La BCP se realiza en medio LB tamponado a pH 4. Se mide la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Nu-3, Nu-4, Nu-5 y Nu-8 frente a cada cepa bacteriana. Como sabe cualquier experto en la técnica, las concentraciones inhibitorias mínimas son la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo tras una incubación de una noche. Las células se tratan con cada uno de los Nu-3, Nu-4, Nu-5 y Nu-8 a tres concentraciones diferentes (1, 0,5 y 0,25x MIC) y las muestras se recogen a los 30 min y a las 2 y 4 h para la obtención de imágenes. La viabilidad celular se evalúa en tres puntos temporales (5 minutos y 4 y 24 h después del inicio del tratamiento).

20 Para obtener imágenes de *E.coli*, las células tratadas se tiñen con 1 µg/mL de FM4-64, 2 µg/mL de DAPI y 0,5 µM de SYTOXGreen (Molecular Probes/Invitrogen). Las muestras de *P.aeruginosa* se tiñen con 0,5 µM de SYTOX Green, 28 µg/mL de DAPI y 4,5 µg/mL de FM 4-64. Las células se transfieren a una almohadilla de agarosa (20% LB, 1% de agarosa) para obtener imágenes como se describe en Pogliano, J., Osborne, N., Sharp, M. D., Abanes-De Mello, A., Perez, A., Sun, Y.-L. and Pogliano, K. (1999), A vital stain for studying

membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. *Microbiología Molecular*, 31: 1149-1159. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01255.x.

Resultados

Los resultados de BCP indican que cada uno de Nu-3, Nu-4, Nu-5 y Nu-8 afecta a la envoltura celular tanto en *E. coli* (ATCC 25922) como en *P. aeruginosa* (K2732). El tratamiento con Nu-3, Nu-4, Nu-5 y Nu-8 provoca la condensación del ADN en las concentraciones de tratamiento más altas (pH 4 tamponado) para *E. coli* (ATCC 25922). Nu-4, Nu-5 y Nu-8 aumentan la permeabilidad de la membrana celular (pH 4 tamponado o en LB sin tamponar) tanto para *E. coli* (ATCC 25922) como para *P. aeruginosa* (K2732), mientras que Nu-3, Nu-4 y Nu-5 provocan deformaciones de la pared celular (LB sin tamponar) para *E. coli* (ATCC 25922). El tratamiento con Nu-8 manifiesta una reducción rápida y marcada de la viabilidad celular y su efecto es superior al de Nu-3, Nu-4 y Nu-5. Concretamente, Nu-8 reduce la viabilidad celular a < 10² CFU/mL en cuestión de minutos a partir de una CFU/mL inicial de 10⁹. Nu-3, Nu-4 y Nu-5 también reducen las CFU/mL a < 10²⁻³ a un ritmo más lento a las pocas horas del tratamiento.

En resumen, estos resultados apoyan el uso de Nu-8 en el tratamiento de infecciones en las cuales se prefiere un mecanismo antimicrobiano de acción rápida, tales como, por ejemplo, infecciones del tracto urinario e infecciones bacterianas asociadas con úlceras de pie diabético, entre otras.

EJEMPLO 7

Compuestos comparativos de Bisfosfocina® Nu-3 y Nu-5 y compuesto inventivo Nu-8: Eficacia antimicrobiana a incrementos de pH contra *E. coli* y *P. aeruginosa*

Las pruebas de CMI se llevan a cabo utilizando los procedimientos de microdilución en caldo (caldo Mueller Hinton) pertinentes para cada grupo de organismos, de acuerdo con lo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 3-7). Las placas MIC se preparan de acuerdo con el CLSI (3-7). Para preparar las placas de ensayo, se utilizan manipuladores de líquidos automatizados para realizar diluciones en serie y transferencias de líquidos. Los manipuladores de líquidos automatizados utilizados en este estudio incluyen el Multidrop 384 (Labsystems, Helsinki, Finlandia) y el Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton CA). La solución se diluye al pH deseado utilizando ácido cítrico 1 M o tampón NaOH 1 M. Se prepara un inóculo estandarizado de cada organismo de prueba de acuerdo con los procedimientos CLSI (3, 5-7) para igualar un estándar McFarland de 0,5 en los medios apropiados, seguido de una dilución adicional de 1:20 (1:10 para anaerobios).

A continuación, se inoculan las placas con 10 µl de la suspensión diluida de 0,5 McFarland utilizando el Biomek 2000 de baja a alta concentración de fármaco, lo que da como resultado una concentración final de aproximadamente 5 × 10⁵ CFU/mL por pocillo. Se incuba una placa sin inocular para evaluar la solubilidad del fármaco en los medios de prueba. Las placas se apilan de 3 a 4 alturas, se cubren con una tapa estéril en la placa superior y se incuban de 18 a 24 horas de acuerdo con CLSI. La MIC se registra como la concentración más baja del compuesto respectivo que inhibió el crecimiento visible del organismo.

Como se demuestra en la TABLA 6, la eficacia MIC de Nu-8 es mayor que la de los compuestos Nu-3 y Nu-5 de Bisfosfocina® a pH equivalente frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*. En concreto, la actividad antimicrobiana de Nu-8 es mejor que la de Nu-3 y Nu-5 en el intervalo de pH (pH 3-4) considerado importante para el uso clínico en varias vías de administración, tal como, por ejemplo, tópica, inhalatoria e intravesical.

40 **TABLA 6**

	pH 1	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
(MIC) mg/mL					
<i>E. coli</i>					
Nu-3	12,5	>100	--	>100	>100
Nu-5	6,25	100	--	100	100
Nu-8	9,8	37,5	75	>100	>100

(continuación)

	pH 1	pH 3	pH 4	pH 5	pH 7
<i>P. aeruginosa</i>					

Nu-3	12,5	>100	--	>100	>100
Nu-5	6,25	100	--	100	100
Nu-8	9,38	18,75	37,5	75	>100

EJEMPLO 8**Perfil citológico bacteriano del compuesto comparativo Nu-3 frente al compuesto inventivo Nu-8 contra bacterias Gram negativas y Gram positivas a pH 4, 5,5 y 7****5 Procedimientos y materiales**

Esta investigación de perfiles citológicos bacterianos (BCP) utiliza procedimientos y materiales descritos previamente por Nonejuie, P., Burkart, M., Pogliano, K., Pogiano, J. (2013). Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 110(40):16169-16174. doi: 10.1073/pnas.1311066110.

- 10 Para el recuento de células viables, las células se cultivan hasta una $OD_{600} \approx 0,4$ y se diluyen 1:1 en medios tamponados o no tamponados que contienen diversas concentraciones de compuestos. A continuación, se recogen las muestras y se diluyen en serie (1:10) en una placa de 96 pocillos. Se colocan cinco microlitros de cada pocillo en placas LB, se incuban a 30 °C y se cuentan las células viables al día siguiente.

15 Las muestras se recogen a los 10, 30, 120 y 240 min de exposición para el recuento de células viables y la obtención de imágenes. Para la obtención de imágenes, se tiñen 200 μl de células tratadas de *E. coli* y *S. aureus* por punto temporal con 0,8 $\mu\text{g/mL}$ de FM4-64, 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI y 0,4 μM de SYTOXGreen (Molecular Probes/Invitrogen). Las muestras de *P.aeruginosa* se tiñen con 0,4 μM de SYTOX Green, 28 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI y 1 $\mu\text{g/mL}$ de FM4-64. Las células se transfieren a una almohadilla de agarosa (20% LB, 1% de agarosa) para la obtención de imágenes.

- 20 Para los caldos de cultivo de Nu-3 y Nu-8 (a pH 4, 5,5 y 7), la concentración de caldo de cultivo es de 500 mg/mL. Para pH 4, los caldos de cultivo se preparan disolviendo Nu-3 en tampón citrato 25 mM y Nu-8 en ácido cítrico 350 mM. Para pH 5,5, los caldos de cultivo se preparan disolviendo Nu-3 en 25 mM de fosfato cítrico y Nu-8 en 25 mM de cítrico. Para pH 7, los caldos de cultivo se preparan disolviendo Nu-3 y Nu-8 en tampón fosfato Sorensen 25 mM. Se preparan soluciones 2X LB (caldo de lisogenia) con tampón citrato 50 mM para pH 4, tampón citrato-fosfato 50 mM para pH 5,5 y tampón fosfato Sorensen 50 mM para pH 7.

25 Resultados

Bajo las condiciones experimentales del procedimiento BCP realizado a pH 4 y superior, Nu-8 es más eficaz que Nu-3 (a concentraciones equimolares) contra *E.coli* de tipo silvestre (ATCC 25922), *P.aeruginosa* (PAO1; K2732), y *S. aureus* susceptible a la meticilina (ATCC 29213) al alterar rápidamente la viabilidad celular, el crecimiento celular y la permeabilidad celular en un intervalo de tiempos de exposición, concentraciones y en medios tamponados (Informe de Linnaeus Bioscience 10-2-2017). *E. coli* en cultivo a pH 4, 5,5 y 7 sin tratamiento no se ve afectada. El crecimiento celular de *E. coli*, la viabilidad celular y la permeabilidad celular hasta las 24 h del estudio se mantienen constantes en relación con parámetros similares ensayados a pH neutro. A pH 4, Nu-8 es más eficaz que Nu-3 a concentraciones similares (112,5 y 225 mg/mL) disminuyendo notablemente la viabilidad celular a los 10 min de tratamiento (la viabilidad celular disminuye de \log^{10^7} CFU/mL a $< \log 10^3$ CFU/mL), mientras que Nu-3 a 112,5 mg/mL ralentiza el crecimiento celular durante 240 min de tratamiento, lo que conduce a una menor viabilidad celular a las 24 h (retraso del crecimiento celular hasta 240 min 10^7 CFU/mL [pH 4 solo, crecimiento celular a 240 min 10^8 CFU/mL] disminuye a $10^{4.5}$ CFU/mL a las 24 h), y a 225 mg/mL reduce la viabilidad celular en 240 min ($<10^3$ CFU/mL). La viabilidad celular se produce antes de que se detecten cambios aparentes en la permeabilidad celular a los 10 min de tratamiento. A pH 5,5 y 7, Nu-8 altera la permeabilidad celular de *E. coli* y reduce la viabilidad y el crecimiento celular, mientras que Nu-3 es ineficaz.

45 *P.aeruginosa* a pH 4 solo se ve afectada rápidamente con una reducción del crecimiento y la viabilidad celular y un aumento de la permeabilidad celular máxima del 100% (dentro de 10 a 30 min del tratamiento). Sólo a pH 5,5 y 7, el crecimiento y la viabilidad celular, así como la permeabilidad celular, no se ven afectados (en relación con parámetros similares ensayados a pH neutro). Nu-3 y Nu-8 a pH 4 tienen en general un efecto aditivo al observado a pH 4 solo y reducen la viabilidad celular. Nu-8 a 56,5 mg/mL es más eficaz en la reducción de la viabilidad celular ($<10^3$ CFU/mL) en 30 min en relación con Nu-3 al doble de concentración (112,5 mg/mL), que reduce la viabilidad celular en 120 min ($<10^3$ CFU/mL). A 112,5 mg/mL, Nu-8 reduce la viabilidad celular en 10 min ($<10^3$ CFU/mL) por encima de lo que ocurre con un tratamiento similar con Nu-3, así como con pH 4 solo ($\sim 10^6$ CFU/mL a los 10 min). También a pH 5,5 y 7, Nu-8 a 112,5 mg/mL es más activo causando $<20\%$ de aumento en la permeabilidad celular y reducción en el crecimiento celular en relación con Nu-3 a 112,5 mg/mL, que produce poco cambio en la permeabilidad celular ($<6\%$) y ningún efecto en el crecimiento celular. A pH 7,

sólo Nu-8 (225 mg/mL) aumenta la permeabilidad celular (-37% con 10 min) que posteriormente no es persistente y el crecimiento celular es ligeramente inferior al que se produce sólo a pH 7.

S. aureus a pH 4 solo presenta un crecimiento celular y una viabilidad celular reducidos y un ligero aumento de la permeabilidad celular (<8%). Sólo con pH 5,5, el crecimiento celular se inhibe hasta 240 min y se recupera a las 24h, y la permeabilidad celular no se ve afectada. A pH 7, todos los parámetros celulares no se ven afectados. A pH 4, Nu-8 a 125 mg/mL aumenta ligeramente la permeabilidad celular (<4,3%) con una mayor actividad de eliminación (10^3 CFU/mL a los 240 min a partir de $10^{7.5}$ CFU/mL al inicio del estudio, y < 10^3 CFU/mL a las 24 h) en comparación con la viabilidad celular a pH 4 únicamente (~ 10^7 CFU/mL a los 240 min y 10^4 CFU/mL a las 24 h). Nu-3 a 125 mg/mL produce una baja permeabilidad celular (<10%) y una ligera reducción del crecimiento celular que se asemeja a la del pH 4 solo. A 250 mg/mL, Nu-8 reduce la viabilidad celular en 10 min (~ 10^4 CFU/mL) sin recuperación posterior (< 10^3 CFU/mL) y aumenta la permeabilidad celular (-60%). Nu-3 a 250 mg/mL es menos activo produciendo un ligero aumento de la permeabilidad celular (<10%) con una viabilidad celular reducida dentro de 240 min a 24 h (< 10^3 CFU/mL). A pH 5,5 y 7, tanto Nu-3 como Nu-8 (125 mg/mL y 250 mg/mL) reducen ligeramente el crecimiento celular hasta 24 h con un efecto mínimo sobre la permeabilidad celular (<5%).

En resumen, este estudio demuestra que Nu-8 superará a Nu-3 en un intervalo de pH 3-4 previsto para uso clínico.

EJEMPLO 9

Nu-8 Actividad antimicrobiana contra cepas comúnmente asociadas a bacterias

Las cepas bacterianas evaluadas en este estudio incluyen *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis/vulgaris*, *Citrobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (sólo MRSA) y *Enterococcus faecalis*. Las soluciones de ensayo Nu-8 se ajustan a pH 3,5 con ácido cítrico, y el MCI se evalúa de acuerdo con los procedimientos CLSI en caldo Mueller-Hinton suplementado convenientemente para facilitar el crecimiento de cepas específicas.

Las MICs del Nu-8 a pH 3,5 se miden en orina humana y de ratón y son comparables a las del Nu-8 en caldo Mueller Hinton en condiciones similares. La TABLA 7 muestra la CMI de Nu-8 frente a las cepas bacterianas identificadas en ella.

TABLA 7

Organismos de ensayo (# de aislados)	Nu-8 MIC (mg/mL) a pH 3,5 (MIC ₅₀ y MIC ₉₀)	
Gram-negativos		
	<i>Escherichia coli</i> (5)	37,5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5) (incluye)	37,5-75
	<i>Serratia marcescens</i> (5)	37,5-75
	<i>Proteus mirabilis/vulgaris</i> (5)	4,69-18,75
	<i>Especies de Citrobacter</i> (5)	18,75-37,5
	<i>Especies de Providencia</i> (5)	9,38-37,5
	<i>Morganella morganii</i> (5)	18,75
	<i>Haemophilus influenzae</i> (5)	4,69-9,38
Otros		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)	9,38-18,75 (18,75 y 18,75)
Gram-positivos		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (20) (SARM)	9,38-37,5 (18,75 y 37,5)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (5) (ambos VSE)	4,69-18,75
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (PRSP)	9,38-18,75

Las MICs también se determinan utilizando caldo de lisogenia (LB) a pH 4 como medio de crecimiento. En estas condiciones, Nu-8 es activo frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* con MICs de 54 y 27 mg/mL, respectivamente.

En resumen, estos resultados demuestran que Nu-8 es eficaz contra bacterias gramnegativas y grampositivas, lo que se considera importante para el uso clínico en diversas vías de administración, tal como, por ejemplo, tópica, inhalatoria e intravesical.

EJEMPLO 10

Evaluación inicial de la eficacia de Nu-8 contra *Escherichia Coli* en un modelo de infección del tracto urinario en ratones BALB/c

Los ratones BALB/c hembra (20-22 g) pedidos a Envigo se aclimatan a las condiciones de alojamiento y se manipulan de acuerdo con el Protocolo de Uso de Animales (AUP) número TP-08. Los animales son alimentados con dieta irradiada para roedores Teklad Global 2918 y agua ad libitum. Los ratones se alojan 6 por jaula en jaulas estáticas con mazorca de maíz irradiada Teklad 7902 de 1/8" dentro de salas limpias bioBubble® que proporcionan aire filtrado H.E.P.A al entorno de la burbuja a 100 cambios completos de aire por hora. El entorno se controla a una temperatura de $74^{\circ}\pm 4^{\circ}$ F y una humedad del 30-70%. Todos los procedimientos llevados a cabo en este experimento se realizan de conformidad con las leyes, reglamentos y directrices de los Institutos Nacionales de Salud y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de TransPharm Preclinical Solutions.

Un aislado clínico de *Escherichia coli* (cepa CFT073, TPPS 1041) se obtiene de la Universidad de Michigan.

El organismo se cultiva durante una noche a 37 °C en atmósfera ambiente en placas de agar tripticasa de soja suplementadas con un 5% de células sanguíneas de oveja. El cultivo se frota asépticamente y se transfiere a tubos de caldo de soja tripticasa. La densidad óptica se determina a 600 nm. El cultivo se diluye para proporcionar un inóculo de aproximadamente 7,5 log₁₀ CFU por ratón en un volumen de 30 µl. La instilación de la provocación bacteriana constituyó la hora 0 del estudio. Los recuentos del inóculo se estiman antes de la inoculación mediante densidad óptica y se confirman después de la inoculación mediante dilución y recuentos retrospectivos.

Una hora antes de la provocación bacteriana, se retira el agua de las jaulas de los animales. El día 0 a las 0 horas, se anestesia a los ratones con isoflurano y se extrae la orina de la vejiga aplicando una suave presión en el abdomen con el pulgar. Los ratones se infectan con bacterias mediante inyección transuretral en un volumen de 30 µl. El agua se devuelve a las jaulas inmediatamente después del desafío. El desafío se realiza en una sala quirúrgica BL2. El recuento final del inóculo de desafío demostró una carga suministrada de 7,8 log₁₀ organismos por ratón.

Nu-8 (Artículo de prueba) se prepara inmediatamente antes de cada dosificación. Nu-8 se disuelve en solución salina estéril y se ajusta a pH 3,5 con ácido fosfórico. A las 23 horas post-desafío, se retira el agua de las jaulas de los animales. Una hora más tarde, se anestesia a los ratones con isoflurano y se extrae la orina residual de la vejiga. Los ratones se tratan con el artículo de prueba o los controles mediante dosificación transuretral en un volumen de 30 µl de acuerdo con la TABLA 8 (que muestra el programa de desafío y tratamiento de los animales). La época de la cosecha es el momento en que se procesan los órganos de los ratones. Todos los tratamientos se administran en una sala quirúrgica BSL2. Inmediatamente después de la administración del tratamiento, se ocluye el orificio uretral con un adhesivo tisular de cianoacrilato.

TABLA 8

Grp	N	Desafío		Tratamiento				Tiempo de cosecha ^a
		E. Coli	ROA	Descripción	ROA	Dosis (mg/kg)	Tiempo de Dosis	
1	6	7,5 log ₁₀	Transuretral	Solución salina pH 3,5	Transuretral	NA	24 horas	60 min
2				Gentamicina		50		60 min
3				Nu-8 pH 3,5		1025		20 min
4				Nu-8 pH 3,5		1025		60 min

^aRelativo al desafío a las 0 horas

El criterio de valoración primario utilizado para evaluar el progreso de la infección es la carga bacteriana media por gramo de tejido de la vejiga urinaria. A los 60 o 20 minutos de la administración del tratamiento y de la oclusión uretral, los ratones son eutanasiados por asfixia con CO₂. La vejiga urinaria se extrae asépticamente,

se pesa y se homogeneiza en 1 mL de TSB utilizando un minibatidor. El homogeneizado resultante se diluye en serie (puro a 10-7) y se cultiva durante la noche a °C en placas de agar tripticasa de soja en atmósfera ambiente suplementadas con un 5% de células sanguíneas de oveja. Se enumeran las unidades formadoras de colonias (CFU) y se calcula la carga bacteriana total por gramo de homogeneizado de tejido de vejiga urinaria.

5

La media geométrica de CFU, junto con el error estándar de la media (SEM), se calculan utilizando Microsoft Excel y se preparan gráficos de barras para los datos utilizando GraphPad Prism v. 7.0. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizan comparando la carga bacteriana media geométrica de los diferentes grupos de tratamiento en Excel, utilizando una prueba t de Student asumiendo una varianza desigual. Los valores P de dos colas ≤0,05 se consideran significativos.

10

A los 60 minutos postratamiento, los ratones del Grupo 1 tratados con vehículo mostraron una carga media de CFU en la vejiga de 5,3 log₁₀, mientras que los animales del Grupo 2 tratados con gentamicina mostraron 6,1 log₁₀ de CFU. A los 20 minutos del tratamiento, los ratones tratados con Nu-8 mostraron una disminución significativa de la carga media de CFU en la vejiga (2,9 log₁₀) en comparación con el grupo de control tratado con vehículo. A los 60 minutos, estos ratones mostraban una carga de 3,7 log₁₀ CFU.

15

En resumen, Nu-8 mostró una disminución estadísticamente significativa de *E. coli* en vejigas de animales en 20 minutos post-tratamiento, lo que confirma que Nu-8 es eficaz contra *E. Coli* en un modelo animal de infección del tracto urinario. Estos resultados constituyen un modelo predictivo para las terapias humanas.

EJEMPLO 11

20

Evaluación confirmatoria de la eficacia de Nu-8 contra *Escherichia Coli* en un modelo de infección del tracto urinario en ratones BALB/c

25

Los ratones BALB/c hembra (20-22 g) pedidos a Envigo se accliman a las condiciones de alojamiento y se manipulan de acuerdo con el Protocolo de Uso de Animales (AUP) número TP-08. Los animales son alimentados con dieta irradiada para roedores Teklad Global 2918 y agua ad libitum. Los ratones se alojan 6 por jaula en jaulas estáticas con mazorca de maíz irradiada Teklad 7902 de 1/8" dentro de salas limpias bioBubble® que proporcionan aire filtrado H.E.P.A al entorno de la burbuja a 100 cambios completos de aire por hora. El entorno se controla a una temperatura de 74° ± 4°F y una humedad del 30-70%. Todos los procedimientos llevados a cabo en este experimento se realizan de conformidad con las leyes, reglamentos y directrices de los Institutos Nacionales de Salud y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de TransPharm Preclinical Solutions.

30

Un aislado clínico de *Escherichia coli* (cepa CFT073, TPPS 1041) se obtiene de la Universidad de Michigan.

35

El organismo se cultiva durante una noche a 37 °C en atmósfera ambiente en placas de agar tripticasa de soja suplementadas con un 5% de células sanguíneas de oveja. El cultivo se frota asépticamente y se transfiere a tubos de caldo de soja tripticasa. La densidad óptica se determina a 600 nm. El cultivo se diluye para proporcionar un inóculo de aproximadamente 7,5 log₁₀ CFU por ratón en un volumen de 30 µl. La instilación de la provocación bacteriana constituyó la hora 0 del estudio. Los recuentos del inóculo se estiman antes de la inoculación mediante densidad óptica y se confirman después de la inoculación mediante dilución y recuentos retrospectivos.

40

Una hora antes de la provocación bacteriana, se retira el agua de las jaulas de los animales. El día 0 a las 0 horas, se anestesia a los ratones con isoflurano y se extrae la orina de la vejiga aplicando una suave presión en el abdomen con el pulgar. Los ratones se infectan con bacterias mediante inyección transuretral en un volumen de 3,0 µl. El agua se devuelve a las jaulas inmediatamente después del desafío. El desafío se realiza en una sala quirúrgica BL2. El recuento final del inóculo de desafío demostró una carga suministrada de 7,8 log₁₀ organismos por ratón.

45

Nu-8 (Artículo de prueba) se prepara inmediatamente antes de cada dosificación. Nu-8 se disuelve en solución salina estéril y se ajusta a pH 3,5 con ácido fosfórico. A las 23 horas post-desafío, se retira el agua de las jaulas de los animales. Una hora más tarde, se anestesia a los ratones con isoflurano y se extrae la orina residual de la vejiga. Los ratones se tratan con el artículo de prueba o los controles mediante dosificación transuretral en un volumen de 30 µl de acuerdo con la TABLA 9 (que muestra el programa de desafío y tratamiento de los animales). Todos los tratamientos se administran en una sala quirúrgica BSL2.

50

Inmediatamente después de la administración del tratamiento, el orificio uretral se ocluye utilizando superglue Locktite gel. Se coloca una gota de pegamento en el orificio uretral y se sujetó el orificio durante 5-10 segundos con unas pinzas de tejido para asegurarse de que el orificio uretral queda ocluido y el pegamento está seco. Los animales permanecieron anestesiados tras la oclusión uretral. Los ratones se rotan (de delante hacia atrás) cada 5 minutos mientras están anestesiados.

55

TABLA 9

Grp	N	Desafío		Tratamiento				Tiempo de cosecha ^a
		E. Coli	ROA	Descripción	ROA	Dosis (mg/kg)	Tiempo de Dosis	
1	6	7,5 log ₁₀	Transuretral	PBS pH 3,5	Transuretral	NA	24 horas	20 min

(continuación)

Grp	N	Desafío		Tratamiento				Tiempo de cosecha ^a
		E. Coli	ROA	Descripción	ROA	Dosis (mg/kg)	Tiempo de Dosis	
2				Nu-8 pH 3,5		205		20 min
3				Nu-8 pH 3,5		410		20 min
4				Nu-8 pH 3,5		820		10 min
5				Nu-8 pH 3,5		820		20 min

^aRelativo al desafío a las 0 horas

- 5 El criterio de valoración primario utilizado para evaluar el progreso de la infección es la carga bacteriana media por gramo de tejido de la vejiga urinaria. A los 10 o 20 minutos de la administración del tratamiento y de la oclusión uretral, los ratones son eutanasiados por asfixia con CO₂. Se diseña la cavidad abdominal para exponer la vejiga y se pinza la uretra cerca de la vejiga para evitar pérdidas de orina. Se tiene cuidado de no extraer la orina de la vejiga durante la extracción cortando la uretra distal a la lámpara. La vejiga (con orina) se extrae asépticamente y se transfiere a un vial previamente pesado con 1 mL de TSB. A continuación, se corta la vejiga para liberar la orina en el vial junto con el tejido. Se pesa el tejido y se homogeneiza con un minibatidor. El homogeneizado resultante se diluye en serie (de puro a 10⁻⁷), se coloca en placas duplicadas de 5 µL y se cultiva durante toda la noche a 37 °C en atmósfera ambiente en placas de agar de soja tripticasa suplementadas con 5% de células sanguíneas de oveja. El homogeneizado sin diluir (puro) también se coloca en un volumen de 100 µL para cada muestra. Se enumeran las unidades formadoras de colonias (CFU) y se calcula la carga bacteriana total por gramo de homogeneizado de tejido de vejiga urinaria.
- 10 15

La media geométrica de CFU, junto con el error estándar de la media (SEM), se calculan utilizando Microsoft Excel, y se preparan gráficos de barras para los datos utilizando GraphPad Prism v.7.0. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizan comparando la carga bacteriana media geométrica de los diferentes grupos de tratamiento en Excel, utilizando una prueba t de Student asumiendo una varianza desigual. Los valores P de dos colas ≤0,05 se consideran significativos.

20 A los 10 minutos post-tratamiento, los animales tratados con 820 mg/kg de Nu-8 mostraron una carga media de CFU en la vejiga de 6,3 log₁₀.

25 A los 20 minutos post-tratamiento, los ratones tratados con vehículo en el Grupo 1 demostraron un promedio de 6,8 log₁₀ CFU/g tejido. Los ratones que recibieron Nu-8 a 205, 410 y 820 mg/kg mostraron cargas bacterianas de 6,5, 5,0 y 5,4 log₁₀, respectivamente.

En resumen, Nu-8 mostró una disminución de *E. coli* en vejigas de animales en 20 minutos post-tratamiento, lo que confirma que Nu-8 es eficaz contra *E. Coli* en un modelo animal de infección del tracto urinario. Estos resultados constituyen un modelo predictivo para las terapias humanas.

30 EJEMPLO 12

Modelo de infección del tracto urinario (ITU) en ratas inducida por *Escherichia coli* con tratamiento transuretral

35 Ratas hembra Sprague-Dawley (n=6/grupo) son infectadas intrauretralmente con el tamaño de inóculo predeterminado de *E.coli*. En el momento especificado tras la infección con (dependiendo de la curva de crecimiento in vivo), los animales son anestesiados (ketamina/xilacina) y tratados mediante administración transuretral con solución salina neutra (grupo 1), solución salina pH 3,5 ajustada con ácido fosfórico (grupo 2), compuesto inventivo Nu-8 pH 3,5 a 103 y 207 mg/kg (grupos 3 y 4, respectivamente). Al ajustar el pH, se controla el volumen de ácido fosfórico añadido y posteriormente se determina la concentración final de la solución de dosis ajustada al pH. El objetivo es que la concentración final tras el ajuste del pH esté dentro del 10% de la dosis deseada, por lo que se informa de la concentración final tras el ajuste del pH. El volumen de

administración será de 300 µL. La TABLA 10 (Desafío animal y programa de tratamiento) resume los grupos de estudio.

TABLA 10

Grupo No	N	Tamaño del inóculo CFU/300 µL/rata (<i>E. coli</i> ATCC25922)		Tratamiento 4 h después de la 2ª infección (300 µL por vía intrauretral)	Procedimientos terminales (muestreo de orina directamente de la vejiga)
		1ª Infección	2ª Infección		
1	10	1×10 ⁸	1×10 ⁸	Solución salina de control pH neutro	60 minutos después del tratamiento

(continuación)

Grupo No	N	Tamaño del inóculo CFU/300 µL/rata (<i>E. coli</i> ATCC25922)		Tratamiento 4 h después de la 2ª infección (300 µL por vía intrauretral)	Procedimientos terminales (muestreo de orina directamente de la vejiga)
		1ª Infección	2ª Infección		
2	10			Solución salina de control pH 3,5	
3	10			Nu-8 pH 3,5; 103 mg/kg	
4	10			Nu-8 pH 3,5; 207 mg/kg	

5

Dos horas antes de cada infección se priva a los animales de agua. Cada animal se infecta dos veces con 24 horas de diferencia mediante la administración transuretral de 300 µL de suspensión bacteriana bajo anestesia ligera de ketamina y xilacina. Antes de la infección, se evacia la orina mediante presión digital, se introduce suavemente la cánula en la vejiga a través de la uretra y se introducen 300 µL de suspensión bacteriana en la vejiga. Despues de retirar suavemente la cánula de infección, se mantiene al animal en posición invertida durante 1 minuto y, a continuación, se introduce en una jaula.

10

Los animales de todos los grupos se sacrifican por desangramiento en anticoagulante K2EDTA (bajo anestesia de ketamina/xilazina) 60 minutos después del tratamiento, y se toman muestras de orina en condiciones estériles para la determinación de UFC.

15

La media log10 de CFU por mL de tejido vesical (tejido más orina) por grupo fue de 5,67, 5,53 y 4,60 Log 10 CFU/mL de tejido vesical para soluciones de pH 3,5 de solución salina, y dosis de Nu-8 de 103 mg/kg y 207 mg/kg a 60 min, respectivamente. El Log 10 CFU/mL de tejido vesical para el control salino a pH 7 fue de 5,51. Se observa una reducción estadísticamente significativa en los recuentos de CFU en el grupo tratado con Nu-8 a una dosis de 207 mg/kg de peso corporal en comparación con el grupo de control de solución salina pH3,5.

20

No hay diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de CFU entre los grupos tratados con Nu-8 y el grupo de control de pH 7 salino.

25

En resumen, este estudio en ratas confirma los estudios en ratones mostrados en los EJEMPLOS 10 y 11, todos los cuales demuestran que Nu-8 muestra una disminución estadísticamente significativa de *E. coli* en las vejigas de los animales en 20 minutos post-tratamiento. Los resultados de este estudio confirmán una vez más que Nu-8 es eficaz contra *E. Coli* en un modelo animal de infección del tracto urinario. Estos resultados constituyen un modelo predictivo para las terapias humanas.

EJEMPLO 13

Nu-8 Tratamiento del paciente humano con infección urinaria complicada

30

Se identifica a un paciente humano con una infección urinaria complicada. Una composición farmacéutica en forma de solución líquida que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra por vía intravesical al paciente a través de un catéter. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 14

Tratamiento DE Nu-8 de un paciente humano que tiene una infección pulmonar derivada de la fibrosis quística

Se identifica a un paciente humano con una infección pulmonar derivada de la fibrosis quística. Una composición farmacéutica en forma de solución líquida que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra por vía inhalatoria al paciente a través de un nebulizador. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 15

Tratamiento de Nu-8 de paciente humano con infección de úlcera de pie diabético

Se identifica a un paciente humano con una úlcera de pie diabético. Una composición farmacéutica en forma de gel que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra tópicamente al paciente en la localización de la úlcera del pie diabético. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 16

Tratamiento de Nu-8 de paciente humano con neumonía adquirida por ventilador

Se identifica a un paciente humano con neumonía adquirida por ventilación mecánica. Una composición farmacéutica en forma de solución líquida que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra por vía inhalatoria al paciente a través de un nebulizador. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 17

Tratamiento de Nu-8 de paciente humano con infección en una herida de quemadura

Se identifica a un paciente humano con una infección en una herida por quemadura. Una composición farmacéutica en forma de gel que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra tópicamente al paciente en el lugar de la herida por quemadura. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 18

Tratamiento de Nu-8 de pacientes humanos con impétigo

Se identifica a un paciente humano con impétigo. Una composición farmacéutica en forma de gel que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra tópicamente al paciente en la localización de las vesículas, pústulas y/o costras amarillentas. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 19

Tratamiento de Nu-8 de pacientes humanos con otitis externa

Se identifica a un paciente humano con otitis externa. Una composición farmacéutica en forma de solución líquida que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra por vía tópica directamente en el conducto auditivo externo del paciente. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

EJEMPLO 20

Tratamiento de Nu-8 de la paciente humana con vaginosis bacteriana

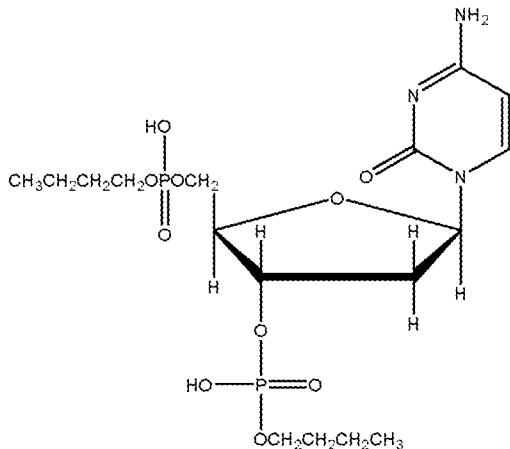
Se identifica a una paciente humana con vaginosis bacteriana. Una composición farmacéutica en forma de gel que contiene una cantidad eficaz de Nu-8 se administra por vía tópica sobre o dentro de la vagina de la paciente. Se controla al paciente hasta que los síntomas se alivian o mejoran, y la composición farmacéutica puede administrarse una o más veces adicionales si se determina que dicha administración es necesaria o útil para el tratamiento.

Aunque se han divulgado anteriormente algunas realizaciones, la presente invención no se limita a las realizaciones divulgadas. En su lugar, esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención utilizando sus principios generales. Además, la presente solicitud pretende abarcar las desviaciones de la presente divulgación que entren dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece esta invención y que estén dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



Fórmula (III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable de la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en una sal de amonio, una sal de calcio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio y una sal de cobalto.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la sal de amonio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de amonio
- 10 10 y/o en la que la sal de calcio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de calcio
y/o en la que la sal de sodio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de sodio
y/o en la que la sal de potasio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de potasio
y/o en la que la sal de magnesio es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de magnesio
y/o en la que la sal de cobalto es ((2R,3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3-((butoxidofosforil)oxi)tetrahidrofuran-2-il)metilbutilfosfato de cobalto.
- 15 20 4. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto protonado que tiene un pH cuando se disuelve en agua en el intervalo de pH 3 a pH 5, preferentemente en el intervalo de pH 3 a pH 4.
5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 incluye al menos un principio activo adicional.
7. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una úlcera de pie diabético.
- 30 8. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una infección urinaria complicada.
9. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una infección pulmonar derivada de la fibrosis quística.

10. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de la neumonía adquirida por ventilación mecánica.

11. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una infección en una herida por quemadura.

5 12. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de la otitis externa.

13. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de la vaginosis bacteriana.

10 14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento del impétigo.

15. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapia.

16. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una infección.