



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 374 779**

21 Número de solicitud: 201000349

51 Int. Cl.:

**C07K 7/62** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**22.02.2012**

71 Solicitante/s: **Universidad de Barcelona  
Centro de Patentes de la UB. Baldiri Reixac, 4  
08028 Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Rabanal Anglada, Francesc;  
Cajal Visa, Yolanda;  
García Subirats, María y  
Rodríguez Núñez, Montserrat**

74 Agente: **Segura Cámara, Pascual**

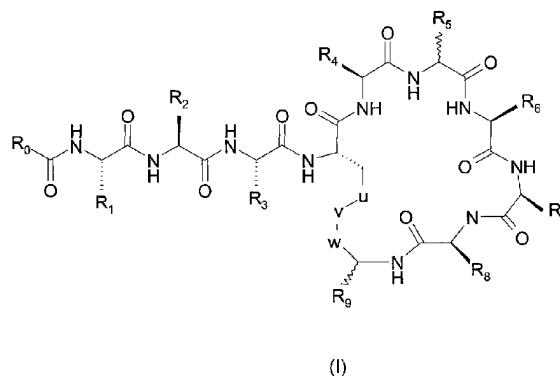
54 Título: **Compuestos peptídicos útiles como agentes antibacterianos.**

57 Resumen:

Compuestos peptídicos útiles como agentes antibacterianos.

Los compuestos de fórmula (I), donde: R<sub>0</sub> es (C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>)-alquilo ramificado, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, o fenil-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-; m = 6-10; x = 1-3; R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente de la fórmula GF-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; con n = 1-4; y GF = -NH<sub>2</sub> o -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>OH; R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente entre H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alquilo lineal o ramificado, -(CH<sub>2</sub>)-R<sub>10</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub> y -CH-(CH<sub>3</sub>)-OH; R<sub>9</sub> es CONH<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)(OH) o CONHR<sub>11</sub>; R<sub>10</sub> es fenilo, 3-indolilo, 4-imidazolilo, 4-hidroxifenilo, α o β-naftilo o 2-, 3- o 4-piridilo; R<sub>11</sub> es una secuencia peptídica específica; u es CH<sub>2</sub> o S; v es NH o S; w es CH<sub>2</sub> o CO; con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es CONH<sub>2</sub>, entonces (a) R<sub>5</sub> o R<sub>6</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), o (b) R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son H; o (c) la configuración del C unido a R<sub>9</sub> es S o (d) la configuración del C unido a R<sub>5</sub> es R; y con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)OH, entonces R<sub>8</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 3 y GF es -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, y R<sub>7</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 2 y GF es NH<sub>2</sub>, se ha encontrado

que son útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas.



(I)

## DESCRIPCIÓN

Compuestos peptídicos útiles como agentes antibacterianos.

5 La presente invención está relacionada con compuestos que son activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, su procedimiento de preparación, composiciones farmacéuticas que los contienen, y su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

10 **Estado de la técnica**

El hecho de que ciertos microorganismos patógenos se hayan convertido en resistentes a las terapias antibióticas es un problema grave en la salud pública. Parte de este problema radica en el hecho de que ciertas bacterias y otros microorganismos infecciosos son extraordinariamente capaces de desarrollar resistencia a los antibióticos. Otra causa principal se debe al uso deficiente de los antibióticos en medicina, veterinaria y agricultura.

20 Existe una preocupación a nivel mundial por la creciente prevalencia de infecciones causadas por bacterias multiresistentes, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, los *Enterococcus* resistentes a vancomicina y ciertas bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. Dichas infecciones son muy difíciles de controlar y una causa constante de enfermedad y mortandad. Los antibióticos convencionales actúan habitualmente sobre una o más proteínas o receptores diana y la resistencia genética aparece a una frecuencia que depende de muchos factores, tales como el número de dichas proteínas o receptores diana.

25 La continua aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales está llevando a enormes esfuerzos dirigidos al desarrollo de nuevos fármacos que actúen en la membrana bacteriana, como los péptidos antimicrobianos ("anti-microbial peptides", AMP). Los péptidos antimicrobianos ofrecen una nueva clase de agentes terapéuticos a los cuales las bacterias no son capaces de desarrollar resistencia genética, puesto que actúan principalmente sobre el componente lipídico de las membranas celulares. Entre dichos compuestos, la polimixina B (PxB), que se halla aprobada para su uso clínico, esta adquiriendo una nueva relevancia terapéutica y está empezando a ser considerado como un representante de la clase de antibióticos activos contra bacterias multiresistentes.

30 Las polimixinas, en particular la polimixina B, constituyen una familia de antibióticos descubierta en 1947 con una elevada actividad contra bacterias Gram-negativas. La polimixina B es un lipopéptido antibiótico aislado de *Bacillus polymyxa*. Su estructura básica consiste en un ciclo peptídico policatiónico del cual pende un tripéptido unido a una cadena de ácido graso. La polimixina B ha resurgido en la práctica médica durante los últimos años y su uso continuará en aumento debido al escaso desarrollo de nuevos antibióticos por parte de las compañías farmacéuticas y a la creciente prevalencia mundial de infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gram-negativas multiresistentes ("multidrug resistant", MDR). La polimixina B y otros miembros de la familia de las polimixinas son fármacos que se utilizan como último remedio para tratar infecciones causadas por bacterias multiresistentes y algunas veces son el único antibiótico activo disponible. Además, la resistencia a polimixina es rara y en general, adaptativa y, por tanto, reversible. La polimixina B es también capaz de inhibir la actividad biológica del lipopolisacárido (LPS) bacteriano por medio de la unión de alta afinidad al lípido A, siendo así el agente de elección para el tratamiento del shock séptico inducido por LPS. Desgraciadamente, la polimixina B no presenta actividad contra bacterias Gram-positivas o anaeróbicas. Además, las polimixinas son de uso limitado debido a que presentan cierta nefrotoxicidad y neurotoxicidad.

35 Por todo ello, existe todavía la necesidad de encontrar nuevos agentes antibacterianos activos no sólo contra bacterias Gram-negativas sino también contra bacterias Gram-positivas.

50

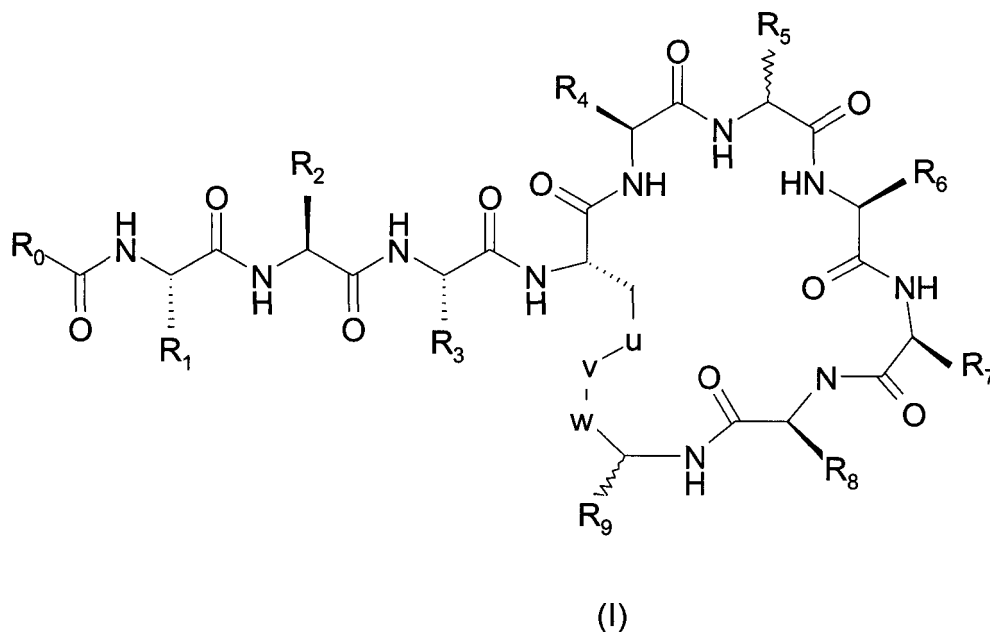
**Explicación de la invención**

55 Los inventores han encontrado algunos compuestos peptídicos con actividad antibiótica que actúan sobre el componente lipídico de las membranas bacterianas y que son activos tanto contra bacterias Gram-positivas como contra Gram-negativas. Estos compuestos se basan en la estructura de la polimixina natural. Sin embargo y a diferencia de las polimixinas, dichos compuestos son activos no sólo contra bacterias Gram-negativas sino también en Gram-positivas en el rango micromolar. Esto es ventajoso puesto que pueden actuar en respuesta a infecciones causadas por ambos tipos de bacteria.

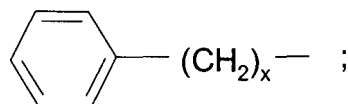
60

65

Así, un aspecto de la presente invención está relacionado con proporcionar compuestos de fórmula (I),



30 donde: R<sub>0</sub> es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en: (C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>)-alquilo ramificado, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, CH<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, y

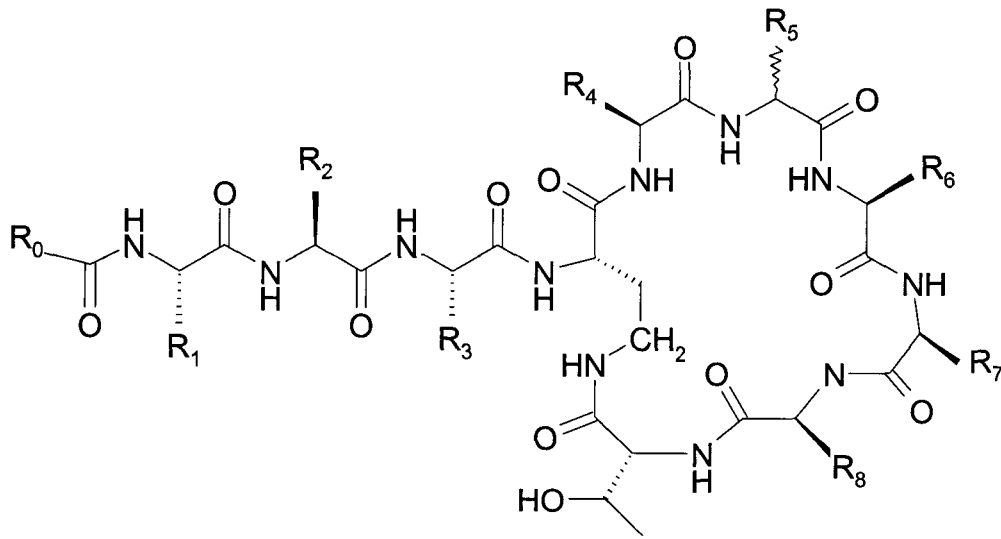


45 m es un entero entre 6 y 10; x es un entero entre 1 y 3; R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, y R<sub>8</sub> son radicales seleccionados independientemente que tienen la fórmula siguiente: GF-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; donde n es un entero entre 1 y 4; y GF es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en -NH<sub>2</sub> y -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>OH; R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son radicales seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alquilo lineal o ramificado, -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub> y -CH(CH<sub>3</sub>)(OH); R<sub>9</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en CONH<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)(OH) y CONHR<sub>11</sub>; R<sub>10</sub> es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en fenilo, 3-indolilo, 4-imidazolilo, 4-hidroxifenilo, α o β-naftilo y 2-, 3- o 4-piridilo; R<sub>11</sub> es una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en Ala-Leu-Arg, Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg, Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp, Lys-Val-Leu, Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu, Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, Orn-Orn-Orn, Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, y Glu-(γ-espermidina)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr; u es CH<sub>2</sub> o S; v es NH o S; w es CH<sub>2</sub> o CO; con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es CONH<sub>2</sub>, entonces se da una de las siguientes condiciones: (a) R<sub>5</sub> o R<sub>6</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), (b) R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son H; (c) la configuración del C unido a R<sub>9</sub> es S (cadena lateral de D-cisteína) o (d) la configuración del C unido a R<sub>5</sub> es R; y con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)OH (cadena lateral de treonina), entonces R<sub>8</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 3 y GF es -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, y R<sub>7</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 2 y GF es NH<sub>2</sub>.

55 En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos anteriormente mencionados donde R<sub>2</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH).

ES 2 374 779 A1

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde u es CH<sub>2</sub>, v es NH, w es CO, R<sub>9</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH) y la configuración del C unido a R<sub>9</sub> es S. Estos compuestos tienen la fórmula (Ia).



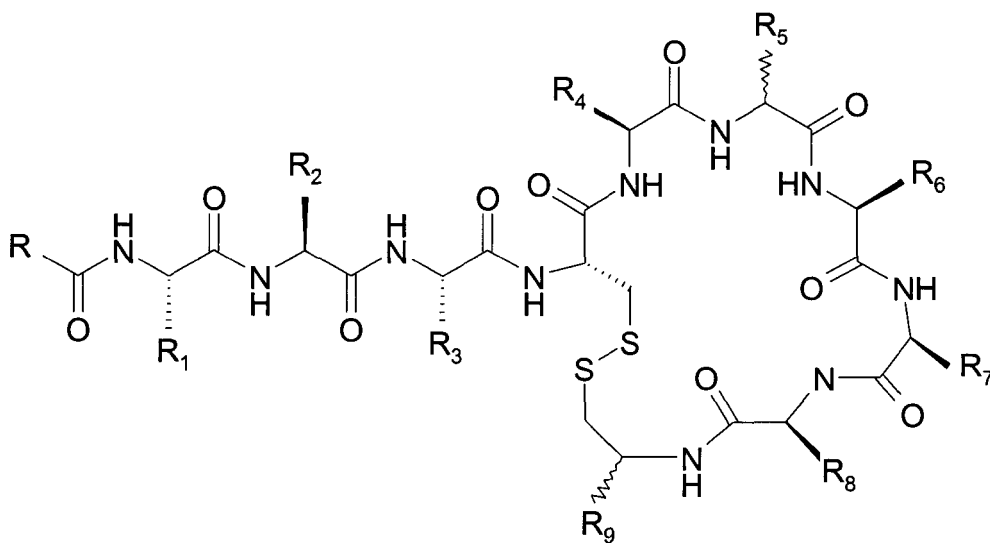
(Ia)

En una realización más preferida, el compuesto de fórmula (Ia) es el nonaoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Thr], (Ia<sub>1</sub>).

Por el término “ciclo(4-10)” se entiende un macrociclo en el que el carboxilo terminal de la treonina en posición 10 forma un enlace amida con la cadena lateral del Dab en posición 4.

La configuración de los D-aminoácidos se ha indicado con una D. Cuando no se indica la configuración se entiende que se trata de un L-aminoácido.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde u es S, v es S y w es CH<sub>2</sub>, que tienen la fórmula (Ib).



(Ib)

## ES 2 374 779 A1

En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (Ib) son aquéllos compuestos donde  $R_0$  es  $\text{CONHR}_{11}$  y  $R_{11}$  es una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en Ala-Leu-Arg, Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg, Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp, Lys-Val-Leu, Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu, Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, Orn-Orn-Orn, Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, Glu( $\gamma$ -espermida)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, y Glu(Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr)- $\gamma$ -espermida.

En otra realización todavía más preferida, los compuestos de fórmula (Ib) se seleccionan de la siguiente lista:

- nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Ala-Leu-Arg, (Ib<sub>1</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg, (Ib<sub>2</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp], (Ib<sub>3</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Lys-Val-Leu, (Ib<sub>4</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu, (Ib<sub>5</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, (Ib<sub>6</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Orn-Orn-Orn, (Ib<sub>7</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Arg-Cys]-Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, (Ib<sub>8</sub>); y  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Arg-Cys]-Glu( $\gamma$ -espermida)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, (Ib<sub>9</sub>).

Por el término “ciclo(S-S)” se entiende un macrociclo formado por un puente disulfuro entre las dos cisteínas.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (Ib), se seleccionan de la siguiente lista:

- nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>10</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>11</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>12</sub>); y  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>13</sub>).

Resultados especialmente buenos se han encontrado con los péptidos que tienen una D-cisteína en posición 10. En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (Ib), se seleccionan entre nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>11</sub>); y nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>13</sub>). En otra realización todavía más preferida, el compuesto de fórmula (Ib) es nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>13</sub>).

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (Ib) son aquéllos en los que  $R_6$  es  $-(\text{CH})(\text{CH}_3)(\text{OH})$ .

En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (Ib), se seleccionan de la siguiente lista:

- nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>14</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>15</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>16</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>17</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>18</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>19</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>20</sub>);  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>21</sub>);

## ES 2 374 779 A1

decanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Trp-Thr-Dab-Dab-Cys], (Ib<sub>22</sub>);

decanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>23</sub>);

5 decanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>24</sub>); y

dodecanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>25</sub>).

10 En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (Ib) son aquéllos en los que R<sub>5</sub> o R<sub>6</sub> son hidrógeno.

En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (Ib) se seleccionan de la siguiente lista:

15 nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Gly-Gly-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>26</sub>);

nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Gly-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>27</sub>);

nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Gly-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>28</sub>);

20 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Gly-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>29</sub>); y

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Gly-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>30</sub>).

25 En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (Ib) se seleccionan de la siguiente lista:

octanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>31</sub>);

(S)-6-metil heptanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>32</sub>);

30 (S)-6-metil octanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>33</sub>);

octanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>34</sub>);

35 (S)-6-metil heptanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>35</sub>); y

(S)-6-metil octanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>36</sub>).

40 Los compuestos de fórmula (I) más preferidos son los de la siguiente lista:

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Thr], (Ia<sub>1</sub>);

45 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp, (Ib<sub>3</sub>);

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, (Ib<sub>6</sub>); y

50 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys], (Ib<sub>13</sub>).

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por síntesis en fase sólida Fmoc/tBu. El procedimiento de preparación para cada aminoácido comprende las etapas siguientes: (i) varios lavados de la resina con N,N-dimetilformamida (DMF); (ii) tratamiento con 20% de piperidina/DMF; (iii) lavado con DMF varias veces; 55 (iv) acilación con el aminoácido Fmoc protegido y 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato/diisopropiletilamina (HBTU/DIEA) en DMF; (v) lavado con DMF varias veces y posteriormente en diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) varias veces; y (vi) lavado con DMF varias veces.

60 Los péptidos obtenidos por los procedimientos anteriores pueden purificarse por HPLC preparativa, mediante lo cual puede obtenerse una pureza superior al 90%, preferiblemente superior al 95%.

Así, los compuestos de la presente invención se preparan fácilmente por síntesis química según el procedimiento mencionado anteriormente mientras que la polimixina comercial se obtiene por fermentación.

65 Otro aspecto de la presente invención son los compuestos de fórmula (I), para uso como agentes antibacterianos contra bacterias Gram-positivas. Entre las bacterias Gram-positivas médicamente relevantes se encuentran varias de género bien conocido tales como *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Mycoplasma* y *Actinobacteria*.

## ES 2 374 779 A1

En una realización preferida, las bacterias Gram-positivas se seleccionan entre *Micobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*. En una realización particular, las bacterias Gram-positivas se seleccionan entre *Micobacterium phlei* ATCC41423, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

5 Este aspecto de la invención se puede formular también como el uso de un compuesto como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-positivas en un mamífero, incluyendo un humano.

10 La invención también está relacionada con un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un mamífero, incluyendo un humano, que sufre o es susceptible a infecciones bacterianas causada por bacterias Gram-positivas, en particular a las infecciones mencionadas anteriormente, dicho método comprendiendo la administración al mencionado paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de compuestos de la presente invención, junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

15 Es también parte de la invención los compuestos de fórmula (I) como se han definido anteriormente para su uso como agentes antibacterianos contra bacterias Gram-negativas. Las bacterias Gram-negativas médicamente relevantes comprenden *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii*.

20 En una realización preferida, las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter sp*. En una realización particular, las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre *Salmonella typhimurium* 14028, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Escherichia coli* 8739 y *Acinetobacter sp* ATCC 5798. Este aspecto de la invención puede ser también formulado como el uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-negativas en un mamífero, incluyendo un humano.

30 La invención también está relacionada con un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un mamífero, incluyendo un humano que sufra o es susceptible a infecciones bacterianas causada por bacterias Gram-negativas, en particular a alguna de las infecciones mencionadas anteriormente, el método comprendiendo la administración al mencionado paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos de fórmula (I) como se han definido anteriormente, junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

35 Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar análogamente a otros agentes antibacterianos conocidos. Estos se pueden utilizar solos o en combinación con otros compuestos bioactivos apropiados. En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) se pueden utilizar en el tratamiento de bacteremias y/o septicemia consecuencia de infecciones por bacterias Gram-negativas, administrados solos o en combinación con antibióticos convencionales. En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención se usan por vía tópica, o bien por vía oral para la descontaminación del tracto digestivo previa a cirugía.

40 Como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos presentan la ventaja de que pueden actuar sobre un espectro amplio de bacterias y debido a que aparentemente se cree que actúan sobre la membrana, pueden resultar más efectivos que otros antibióticos que actúan sobre un receptor o enzima frente a la resistencia a los antibióticos.

45 Un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos de fórmula (I), junto con cantidades apropiadas de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

50 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por combinación de los compuestos de fórmula (I) de la presente invención con excipientes o portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables, siguiendo prácticas farmacéuticas estándar.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de manera adecuada para la enfermedad que se desea tratar, por ejemplo por vía oral, parenteral, inhalatoria, rectal, transdérmica o tópica. En el uso terapéutico para tratar o combatir infecciones bacterianas en pacientes como los humanos y otros animales que pudieren ser diagnosticados con infecciones bacterianas, dichos compuestos o composiciones farmacéuticas, preferentemente, se administran a una dosis para obtener o mantener una concentración, o sea, una cantidad o nivel en sangre del componente activo en el paciente que sigue el tratamiento que sea efectiva como antibacteriano. Generalmente, dicha cantidad o dosis que sea efectiva como antibacteriano se encontrará en el intervalo aproximado de 0.1 a 100 mg/Kg, más preferentemente alrededor de 3.0 a 50 mg/Kg de peso corporal/día. Se entiende que las dosis pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente, la severidad de la infección bacteriana a tratar y del compuesto particular que se use.

60 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

## Ejemplos

## Abreviaciones

5 Boc, *tert*-butoxicarbonilo; Dab: ácido 2,4-diaminobutírico; DIEA, *N,N*-diisopropiletilamina; Dde, *N*-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo]; DIPCDI, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida; DMF, *N,N*-dimetilformamida; ES, electrospray; Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; HATU, 2-(7-Aza-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato; HBTU, 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato; HOBt, 1-hidroxibenzotriazol; HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia; MALDI-TOF, ionización por desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo; MS, espectrometría de masas; MIC, concentración mínima inhibitoria; Pbf, 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo; PM, peso molecular; TFA, ácido trifluoroacético; Trt, tritilo.

## Métodos generales

15 Se ha empleado el protocolo general de síntesis en fase sólida Fmoc/tBu para preparar los compuestos de los ejemplos.

20 El protocolo de síntesis Fmoc/tBu para cada ciclo sintético consiste en las etapas siguientes: (i) lavado de la resina con DMF (5 x 30 s); (ii) tratamiento con 20% de piperidina/DMF (1 x 1 min + 2 x 10 min, desprotección Fmoc); (iii) lavado con DMF (5 x 30 s); (iv) acilación con el aminoácido Fmoc protegido (3 veces de exceso) y HBTU/DIEA (3:6 veces de exceso, respectivamente) en la cantidad mínima de DMF; (v) lavado con DMF (5 x 30 s) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 30 s); (vi) prueba de Kaiser (con una muestra de resina peptídica); (vii) lavado con DMF (5 x 30 s).

25 El método general de desanclaje y desprotección de los péptidos consistió en un tratamiento con TFA/tioanisol/1,2-ethanoditiol/triisopropilsilano/agua (70:10:10:1:3.5, 3 h). La solución de TFA se filtró y la resina se lavó con dos porciones adicionales de TFA puro (0.5 mL) que se juntaron con la primera fracción acidolítica. La solución resultante se añadió sobre éter frío (TFA:éter en proporción 1:20) para precipitar el péptido. El crudo peptídico se lavó con éter tres veces, éste se decantó y el sólido se seco al aire.

30 Cada crudo peptídico se disolvió a continuación en una solución de DMSO en agua al 10% a una concentración aproximada de 1 mM o ligeramente inferior para la formación del enlace disulfuro. La solución se agitó en sistema abierto durante 12-36 h. La ciclación tuvo lugar por oxidación al aire que se siguió por HPLC y MS.

35 La purificación se llevó a cabo por HPLC preparativa. En los Ejemplos se empleó un equipo a Varian Pro-star 200 prep-system con una columna Varian Load&lock C18 (250 x 2'5 mm, 10 μm) y se eluyó en gradiente con mezclas de H<sub>2</sub>O-acetonitrilo-0.1% TFA y detección UV a 220 nm.

40 Los péptidos se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF en un espectrómetro de masas VOYAGER-DE (PerSeptive Biosystems).

45 La homogeneidad de los péptidos purificados se comprobó por HPLC analítica empleando columnas Merck or Kromasil C18 de fase reversa (4 x 250 mm, 5 μm de diámetro de partícula y una medida de poro de 120 Å). La elución se llevó a cabo a 1 ml·min<sup>-1</sup> con mezclas de H<sub>2</sub>O- 0.1% TFA y acetonitrilo-0.1% TFA y detección UV a 220 nm.

## Ejemplo 1

50 *Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp ((Ib<sub>3</sub>), compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), y R<sub>9</sub> = Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp)*

55 Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

60 Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/<sup>t</sup>Bu en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno. Se utilizó la resina Fmoc-Rink (600 mg, 0.282 mmoles, f = 0.47 mmol/g). Los aminoácidos de la secuencia se introdujeron según un protocolo estándar de síntesis en fase sólida Fmoc/<sup>t</sup>Bu como se ha descrito anteriormente. Una vez la secuencia se completó, se acopló el ácido nonanoico (134 μl, 0.85 mmoles, 3 veces de exceso) con HBTU/DIEA (3 y 6 veces de exceso, respectivamente) en la cantidad mínima de DMF. Una vez concluida la reacción, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 30 s). El peso del crudo peptídico tras el desanclaje y desprotección según el método indicado anteriormente fue de 300 mg (rendimiento 90%). La purificación por HPLC preparativa rindió 30 mg de péptido puro (rendimiento 10%).

## ES 2 374 779 A1

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; ESI: m/z 528.95 ([M+5H<sup>+</sup>]<sup>5+</sup>), 660.90 ([M+4H<sup>+</sup>]<sup>4+</sup>), 440.95 ([M+6H<sup>+</sup>]<sup>6+</sup>), 881.00 ([M+3H<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>). PM encontrado= 2639.75 (PM esperado 2639.39).

5

### Ejemplo 2

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu (Ib<sub>6</sub>), compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), y R<sub>9</sub> = Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu

15 Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

20

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; ESI: m/z 550.15 ([M+4H<sup>+</sup>]<sup>4+</sup>), 440.15 ([M+5H<sup>+</sup>]<sup>5+</sup>), 733.35 ([M+3H<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>). PM encontrado = 2196.6 (PM esperado 2197.04).

### 25 Ejemplo 3

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys] (Ib<sub>13</sub>) compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab) y R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, y R<sub>11</sub> = H

35 Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-D-Cys(Trt)-OH.

35

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

40 Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1336.68 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1359.49 ([M+Na]<sup>+</sup>, 17%).

### Ejemplo 4

45 Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys] (Ib<sub>16</sub>), compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), (cadena lateral de Thr), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, R<sub>11</sub> = H

50

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-D-Phe-OH.

55 Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1324.24 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1347.45 ([M+Na]<sup>+</sup>, 16%).

60

65

## ES 2 374 779 A1

### Ejemplo 5

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Gly-Arg-Dab-Cys] (Ib), compuesto de fórmula (Ib<sub>31</sub>) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -H, (cadena lateral de Gly), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, y R<sub>11</sub> = H

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1280.59 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1284.45 ([M+Na]<sup>+</sup>, 18%).

### Ejemplo 6

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Thr] (Ia<sub>1</sub>), compuesto de fórmula (Ia) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de D-Phe), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), y R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab)

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Dab(Dde)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc<sup>t</sup>Bu en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno. Se utilizó la resina cloruro de clorotritilo (800 mg, 0.48 mmoles, f = 0.6 mmol/g). Los aminoácidos de la secuencia se introdujeron según un protocolo estándar de síntesis en fase sólida Fmoc/Bu como se ha descrito anteriormente. El aminoácido puente Dab<sup>4</sup> se introdujo como Fmoc-Dab(Dde)-OH. Una vez se completó la secuencia, se introdujo el ácido nonanoico (228 μl, 1.44 mmoles, 3 veces de exceso) activándolo con HBTU/DIEA (3 y 6 veces de exceso, respectivamente) en la mínima cantidad de DMF. Una vez concluida la reacción, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 30 s).

El péptido protegido se trató con hidrazina (1% en DMF) para desproteger el grupo Dde. El péptido se desancló de la resina con un tratamiento suave con TFA (1% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) manteniendo intactos el resto de los grupos protectores (de tipo tBu y Pbf). La ciclación entre Dab<sup>4</sup> y la Thr<sup>10</sup> en C-terminal se llevó a cabo en DMF:CHCl<sub>3</sub> (1:1, concentración de péptido 0.3 M) con HATU:HOBt:DIEA (1.1:1.1:2.2 equiv.) a temperatura ambiente durante 48 h. El crudo peptídico cíclico y protegido se purificó en columna de sílica y a continuación se trató con la solución acidolítica TFA/tioanisol/1,2-ethanoditiol/triisopropilsilano/agua (70:10:10:1:3.5; 3 h) para eliminar el resto de grupos protectores. El peso del crudo peptídico obtenido fue de 130 mg (rendimiento 21%). La purificación por HPLC preparativa rindió 11 mg de péptido puro (rendimiento 8.5%).

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) 91.8%; MALDI-TOF: m/z 1316.89 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1297.98 ([M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 68%) 1339.65 ([M+Na]<sup>+</sup>, 19%).

### Ejemplo 7

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys] (Ib<sub>12</sub>); compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = -CH<sub>2</sub>Ph (cadena lateral de Phe), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, y R<sub>11</sub> = H

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1336.30 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1358.40 ([M+Na]<sup>+</sup>, 15%).

## ES 2 374 779 A1

### Ejemplo 8

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Gly-Leu-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>30</sub>), compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = H (cadena lateral de Gly), R<sub>6</sub> = -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de Leu), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, y R<sub>11</sub> = H

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1246.03 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%).

### Ejemplo 9

Preparación de nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys], (Ib<sub>21</sub>), compuesto de fórmula (Ib) con R<sub>0</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>2</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>5</sub> = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cadena lateral de D-Leu), R<sub>6</sub> = -CH(CH<sub>3</sub>)OH, (cadena lateral de Thr), R<sub>7</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=NH)-NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Arg), R<sub>8</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (cadena lateral de Dab), R<sub>9</sub> = CONHR<sub>11</sub>, y R<sub>11</sub> = H

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc<sup>t</sup>Bu sobre resina Fmoc-Rink como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >95%; MALDI-TOF: m/z 1291.70 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 1312.76 ([M+Na]<sup>+</sup>, 16%).

### Ejemplo 10

#### Ensayo de actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los lipopéptidos sintéticos se determinó en placas estériles de 96 pocillos (Corning Costar 3598 microtiter plates) con un volumen final de 200 μL como se indica a continuación: alícuotas (100 μL) de una suspensión de bacterias a una concentración de 105 unidades formadoras de colonias/mL en medio de cultivo (MH, Muller Hinton Broth, Difco, USA) a pH 7.4, se adicionaron a 100 μL de solución de lipopéptido preparada a partir de una disolución madre en agua de 1 mg/mL, en diluciones seriadas a doble dilución en MH a pH 7.4 (Jorgensen & Turnide, 2003).

La inhibición de crecimiento bacteriano se determinó a partir de la absorbancia a 492 nm en un instrumento Absorbance Microplate reader ELx 800 (Bio-tek Instruments) tras incubación a 37°C durante 24-48 h. La actividad antibacteriana se expresó como CMI, la concentración a la cual no se detecta crecimiento tras las 24-48 h de incubación.

Los microorganismos se cultivaron en *Tryptycase Soy Broth* (Pronadisa, Barcelona), incubando a 37°C hasta observar crecimiento bacteriano. A continuación, se sembrarán en *Tryptycase Soy Agar* (Pronadisa, Barcelona) y se incubaron a 37°C hasta observar la formación de colonias. Los microorganismos se conservaron en criobolas (EAS laboratoire, France) a -20°C.

Las cepas de las bacterias usadas para llevar a cabo el test de actividad antibacteriana se obtuvieron de: the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA):

*Escherichia coli* ATCC 8739

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

*Salmonella typhimurium* ATCC14028

*Acinetobacter sp* ATCC 5798

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

*Mycobacterium phlei* ATCC41423

*Micrococcus luteus* ATCC 9341

## ES 2 374 779 A1

Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

TABLA 1

*Actividad antibacteriana (CMI) en Gram positivos expresada en µg/ml*

Compuesto (µg/ml)	<u>Micobacterium</u> <u>phlei</u>	<u>Micrococcus</u> <u>luteus</u>	<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>
(Ia <sub>1</sub> )	8-16	16	32
(Ib <sub>3</sub> )	16	8-16	16
(Ib <sub>6</sub> )	>32	8	16
(Ib <sub>13</sub> )	8-16	8	16
PxB P1004 (comparativo)	32	32	>32

TABLA 2

*Actividad antibacteriana (CMI) en Gram negativos expresada en µg/ml*

Compuesto (µg/ml)	<u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> <u>14028</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> <u>9027</u>	<u>Escherichia</u> <u>coli 8739</u>	<u>Acinetobacter</u> <u>sp ATCC</u> <u>5798</u>
(Ia <sub>1</sub> )	8-16	4	4	8
(Ib <sub>3</sub> )	16	>32	16	4
(Ib <sub>6</sub> )	>32	>32	>32	8-16
(Ib <sub>13</sub> )	16	4	8	16
PxB (comparativo)	1	2	1-2	0.5

Control (polimixina B): (S)-6-metiloctanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Dab-Thr].

El peso molecular de los compuestos de la invención es mayor que el de la PxB, lo que significa que la actividad antibacteriana CMI expresada en unidades micromolares en lugar de µg/ml es mayor.

Así, los resultados anteriores se han expresado en unidades micromolares lo que permite una mejor comparación de los resultados obtenidos.

# ES 2 374 779 A1

TABLA 3

Actividad antibacteriana (CMI) en Gram positivos expresada en Unidades micromolares

Compuesto (microM)	<u>Micobacterium phlei</u>	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
(Ia <sub>1</sub> )	6.08-12.16	12.16	24.32
(Ib <sub>3</sub> )	6.06	3.03-6.06	6.06
(Ib <sub>6</sub> )	>14.56	3.64	7.28
(Ib <sub>13</sub> )	5.99-11.98	5.99	11.98
PxB P1004 (comparativo)	26.90	26.90	>26.90

TABLA 4

Actividad antibacteriana (CMI) en Gram negativos expresada en un unidades micromolares

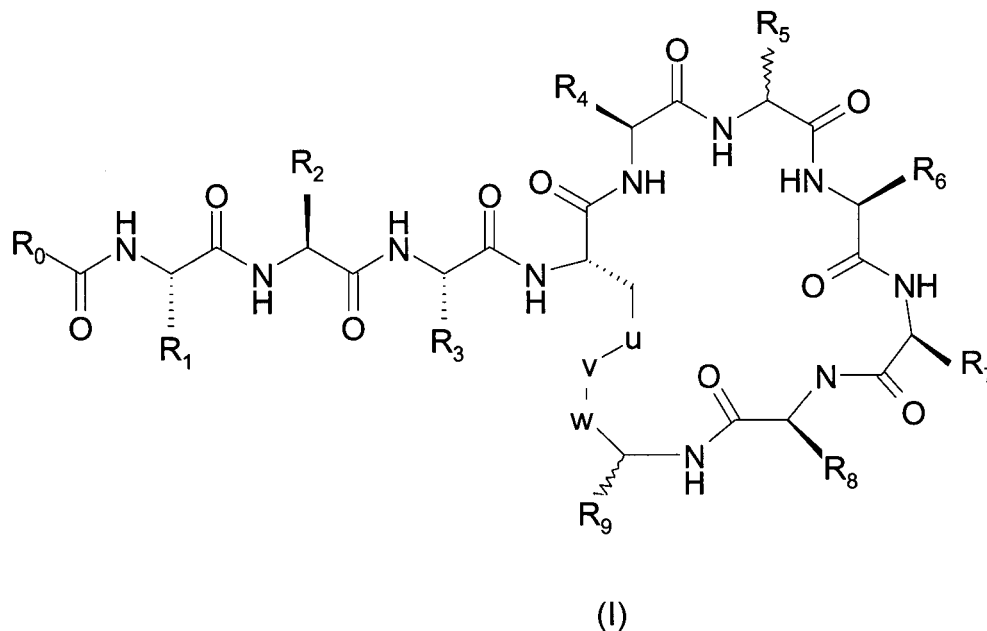
Compuesto (microM)	<u>Salmonella typhimurium 14028</u>	<u>Pseudomonas aeruginosa 9027</u>	<u>Escherichia coli 8739</u>	<u>Acinetobacter sp ATCC 5798</u>
(Ia <sub>1</sub> )	6.08-12.16	3.04	3.04	6.08
(Ib <sub>3</sub> )	6.06	>12.12	6.06	1.51
(Ib <sub>6</sub> )	>14.56	>14.56	>14.56	3.64-7.28
(Ib <sub>13</sub> )	11.98	2'99	5.99	11.98
PxB (comparativo)	0.84	1.68	0.84-1.68	0.42

Asimismo, cabe destacar que los mejores resultados se han encontrado con modelos que tienen actividad terapéutica. Así, el *Acinetobacter sp ATCC 5798* es un modelo del *Acinetobacter baumannii* que es una de las bacterias más problemáticas en infecciones nosocomiales, el *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias importantes por la resistencia que genera a los antibióticos, y el *Micobacterium phlei* es un modelo no patógeno del agente causal de la tuberculosis, *Micobacterium tuberculosis*.

Estos resultados demuestran que los compuestos (I) muestran actividad antibacteriana a nivel micromolar tanto contra bacterias Gram-positivas como contra bacterias Gram-negativas (en este último caso, la CMI es ligeramente superior a la de la polimixina natural, pero la polimixina no muestra actividad contra bacterias Gram-positivas). En consecuencia, los nuevos compuestos presentan un espectro de actividad superior puesto que los antibióticos peptídicos disponibles (polimixina natural y daptomicina) son sólo activos contra un tipo de bacteria, Gram-negativas o Gram-positivas, respectivamente.

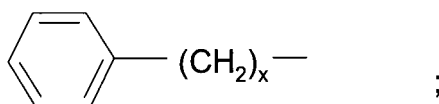
## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I),



donde:

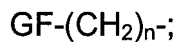
$R_0$  es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en:  $(C_8-C_{11})$ -alquilo ramificado,  $CH_3-(CH_2)_m-$ ,  $CH_3-O-(CH_2CH_2O)_2CH_2-$ , y



$m$  es un entero entre 6 y 10;

$x$  es un entero entre 1 y 3;

$R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son radicales seleccionados independientemente que tienen la fórmula siguiente:



donde  $n$  es un entero entre 1 y 4; y  $GF$  es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en  $-NH_2$  y  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ;

$R_2$  es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en  $-CH(CH_3)(OH)$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2NH_2$  y  $-CH_2OH$ ;

$R_5$  y  $R_6$  son radicales seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en  $H$ ,  $-(C_1-C_4)$ -alquilo lineal o ramificado,  $-(CH_2)-R_{10}$ ,  $-CH_2-CH_2-S-CH_3$  y  $-CH-(CH_3)-OH$ ;

$R_9$  se selecciona entre el grupo que consiste en  $CONH_2$ ,  $-CH(CH_3)(OH)$  y  $CONHR_{11}$ ;

$R_{10}$  es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en fenilo, 3-indolilo, 4-imidazolilo, 4-hidroxifenilo,  $\alpha$  o  $\beta$ -naftilo y 2-, 3- o 4-piridilo;

R<sub>11</sub> es una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en Ala-Leu-Arg, Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg, Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp, Lys-Val-Leu, Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu, Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, Orn-Orn-Orn, Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, Glu-( $\gamma$ -espermida)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, y Glu(Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr)- $\gamma$ -espermida;

u es CH<sub>2</sub> o S;

v es NH o S;

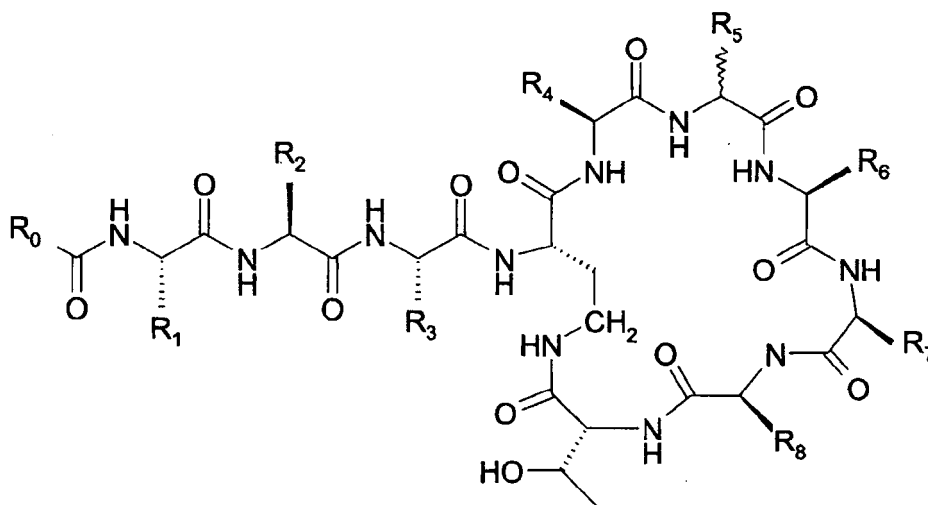
w es CH<sub>2</sub> o CO;

con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es CONH<sub>2</sub>, entonces

- (a) R<sub>5</sub> o R<sub>6</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH), o
- (b) R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son H; o
- (c) la configuración del C unido a R<sub>9</sub> es S o
- (d) la configuración del C unido a R<sub>5</sub> es R;

y con la condición de que cuando R<sub>9</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)OH, entonces R<sub>8</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 3 y GF es -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, y R<sub>7</sub> es GF(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es 2 y GF es NH<sub>2</sub>.

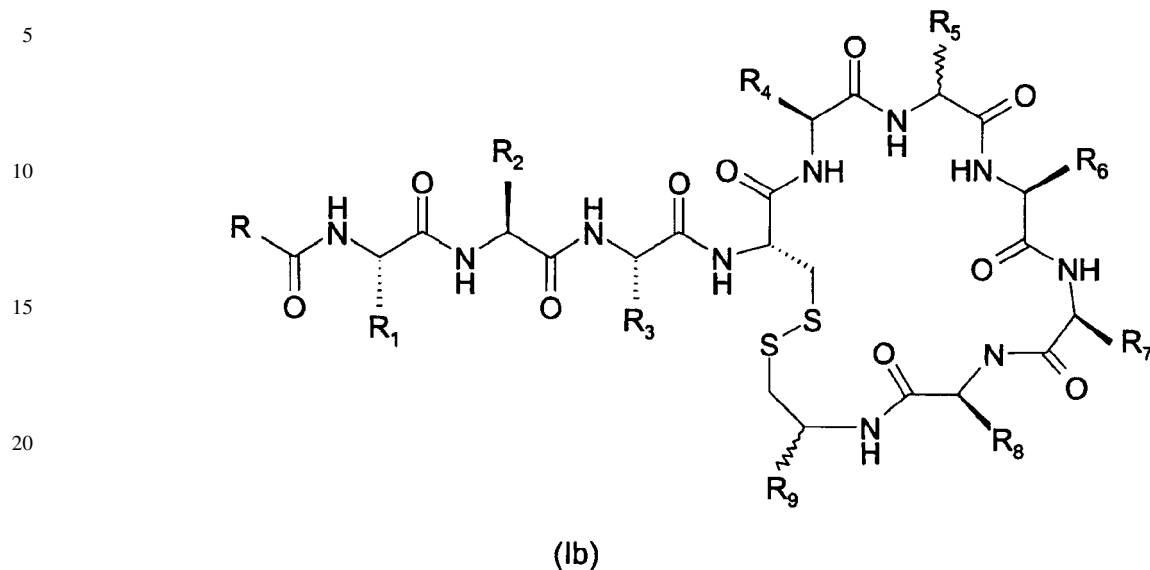
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde u es CH<sub>2</sub>, v es NH, w es CO, R<sub>9</sub> es -CH(CH<sub>3</sub>)(OH) y la configuración del C unido a R<sub>9</sub> es S, que tiene la fórmula (Ia).



(Ia)

3. Compuesto según la reivindicación 2, que es el nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Aro-Dab-Thr].

4. Compuesto según la reivindicación 2, donde u es S, v es S y w es CH<sub>2</sub>, que tiene la fórmula (Ib).



5. Compuesto según la reivindicación 4, donde R<sub>11</sub> es una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en Ala-Leu-Arg, Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg, Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp, Lys-Val-Leu, Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu, Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu, Orn-Orn-Orn, Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, Glu-(γ-espermida)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr, y Glu(Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr)-γ-espermida.

6. Compuesto según la reivindicación 5, que se selecciona entre los siguientes:

- 35 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Ala-Leu-Arg;  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Ala-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg;  
40 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp;  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Lys-Val-Leu;  
45 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Lys-Val-Leu-Lys-Val-Leu;  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu;  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Orn-Orn-Orn;  
50 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Arg-Cys]-Gln-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr; y  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Arg-Cys]-Glu-(γ-espermida)-Arg-Gly-Arg-Ala-Glu-Glu-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Thr.

7. Compuesto según la reivindicación 4, que se selecciona entre los siguientes:

- 60 nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys];  
nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys];  
nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]; y  
65 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys].

## ES 2 374 779 A1

8. Compuesto según la reivindicación 7, que se selecciona entre los siguientes:

nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]; y

5 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys].

9. Compuesto según la reivindicación 4, que se selecciona entre los siguientes:

10 nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys];

nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys];

15 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys];

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys];

nonanoil-Arg-Thr-Arg-Cys-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys];

20 nonanoil-Arg-Thr-Dab-Cys-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys];

nonanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys];

25 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys];

decanoil-Arg-Thr-Arg-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Trp-Thr-Dab-Dab-Cys];

decanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Leu-Thr-Arg-Dab-Cys];

30 decanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Trp-Thr-Arg-Dab-Cys]; y

dodecanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-Phe-Thr-Arg-Dab-Cys].

35 10. Compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona entre los siguientes:

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(4-10)[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Thr];

40 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Gly-Arg-Val-Glu-Val-Leu-Tyr-Arg-Gly-Ser-Trp;

nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-Cys]-Leu-Met-Trp-Trp-Met-Leu; y

45 nonanoil-Arg-Thr-Dab-ciclo(S-S)[Cys-Dab-D-Phe-Leu-Arg-Dab-D-Cys].

11. Uso de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-positivas en un mamífero, incluyendo un humano.

50 12. Uso según la reivindicación 11, donde las bacterias Gram-positivas se seleccionan entre el grupo que consiste en *Micobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*.

55 13. Uso de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-negativas en una mamífero, incluyendo un humano.

60 14. Uso según la reivindicación 13, donde las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre el grupo que consiste en *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter sp.*

15. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000349

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.03.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CLAUSELL, A. et al.: "Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides". Journal of Physical Chemistry B, 2007, vol. 111, nº 3, páginas 551-563, página 552, tabla 1, página 553, figura 1.	1-15
A	CLAUSELL, A. et al.: "Membrane association and contact formation by a synthetic analogue of polymyxin B and its fluorescent derivatives". Journal of Physical Chemistry B, 2006, vol. 110, nº 9, páginas 4465-4471, página 4466, figura 1.	1-15
A	US 20020034520 A1 (PORRO) 21.03.2002, página 3, secuencias ID nº 15, 16 y 17.	1-15
A	VISSER, P.C. et al.: "Solid phase synthesis of polymyxin B1 and analogues via a safety-catch approach", J. Peptide Res. 2003, vol-61, páginas 298-306, página 303, tabla 1.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.01.2012

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K7/62** (2006.01)

**A61K38/12** (2006.01)

**A61P31/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CLAUSELL, A. et al.: "Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides". Journal of Physical Chemistry B, 2007, vol. 111, nº 3, páginas 551-563, página 552, tabla 1, página 553, figura 1.	
D02	CLAUSELL, A. et al.: "Membrane association and contact formation by a synthetic analogue of polymyxin B and its fluorescent derivatives". Journal of Physical Chemistry B, 2006, vol. 110, nº 9, páginas 4465-4471, página 4466, figura 1.	
D03	US 20020034520 A1 (PORRO)	21.03.2002
D04	VISSER, P.C. et al.: "Solid phase synthesis of polymyxin B1 and analogues via a safety-catch approach", J. Peptide Res. 2003, vol-61, páginas 298-306, página 303, tabla 1.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere a compuestos de fórmula I , compuestos péptidos cíclicos y su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en un mamífero, incluyendo un humano

Los documentos D1 y D2 se refieren al diseño de nuevos antibióticos basados en la estructura de la polimixina B. Se estudia la interacción de péptidos análogos sintéticos del lipopéptido natural antibiótico polimixina B (sp-B, sp-C, sp-D, spBw y spBpy) con las membranas externa e interna de las bacterias.

El documento D3 se refiere a la utilización de distintos péptidos como vacunas para la prevención de infección por bacterias Gram-negativas (ver página 3 Seq ID nº 15, 16 y 17), compuesto próximos a los de la reivindicación 4.

El documento D4 se refiere a la síntesis de polimixina B1 y análogos (ver página 303, tabla 1).

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados D1 a D4, tomados tanto de forma independiente como en combinación, divulgan los compuestos a los que hacen referencia las reivindicaciones 1-15.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-15 presentan novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P