



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 301 691**

(51) Int. Cl.:

C07C 275/14 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/17 (2006.01)

C07C 275/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02785516 .2**

(86) Fecha de presentación : **02.10.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1432677**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

(54) Título: **Oligómeros de ureas, su procedimiento de preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen.**

(30) Prioridad: **02.10.2001 FR 01 12659**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

(73) Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

(72) Inventor/es: **Guichard, Gilles François Roger;
Briand, Jean-Paul;
Semetey, Vincent y
Neuberg, Patrick**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Oligómeros de ureas, su procedimiento de preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a nuevos oligómeros de ureas, a su procedimiento de preparación y a las composiciones farmacéuticas que los contienen.

La gran diversidad funcional entre las proteínas está íntimamente ligada a la estructura terciaria y/o cuaternaria extremadamente sofisticada de estas últimas, pero se basa en un conjunto de ladrillos estructurales elementales extremadamente reducido, es decir las hélices, las láminas y los codos, siendo estos elementos estructurales a su vez determinados por la secuencia de aminoácidos, es decir por la estructura primaria de la proteína.

Recientemente, los trabajos de Seebach (Seebach, D.; Matthews, J.L., Chem. Commun., 1997, 2015), de Gellman (Appela, D.H. *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1997, 118, 13071-13072) y de Hannessian (Hannessian, S. *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 8569-8570) han revelado que unos oligo- β o γ -péptidos (ω -péptidos) de tamaño pequeño, compuestos exclusivamente por ácidos α - o β -aminados eran capaces de formar, en disolución y en fase sólida, unas estructuras secundarias únicas, estables y predecibles, del tipo hélice o láminas, parecidas a las estructuras proteicas. En la referencia de Gellman (Gellman, S.H., Acc. Chem. Res., 1998, 31, 173-180), estos oligopéptidos se denominan "foldámeros".

La resistencia de estos oligopéptidos a la proteólisis hacen de ellos unos buenos candidatos prometedores en la química medicinal para el descubrimiento de nuevas actividades biológicas, y para interferir con los procesos de reconocimiento proteína-proteína.

Actualmente, existen muy pocos datos sobre las propiedades estructurales y biológicas de oligómeros enantiopuros que no contienen ninguna función amida en su esqueleto.

La invención tiene por objetivo proporcionar unas moléculas no peptídicas, que comprenden unas cadenas laterales de aminoácidos, susceptibles de adoptar una estructura helicoidal independiente de la estructura primaria de dichas moléculas, es decir independiente de las cadenas laterales.

La invención tiene asimismo por objetivo proporcionar unas moléculas susceptibles de adoptar una conformación helicoidal, y capaces de imitar las hélices naturales activas.

La invención tiene asimismo por objeto el uso de estos nuevos oligómeros para la preparación de medicamentos cuyas propiedades farmacológicas se deben en particular a la interacción de estos oligómeros con las membranas celulares.

La invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general:



en la que

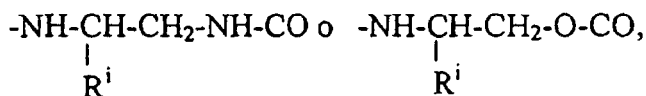
- n está comprendido entre 6 y 20,

- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,

siendo R_a la fluoresceína o un grupo alquilo (C1-C10), alquenoilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH, un grupo maleimida,

con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,

- A representa indiferentemente un grupo



* siendo R' un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alquenoilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

ES 2 301 691 T3

* siendo i un número entero comprendido entre 1 y n ,

- Y es un grupo NR_bR_c , teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R' ,

para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades bacterianas, fúngicas o citotóxicas.

La invención se refiere asimismo a los compuestos de fórmula general:



en la que

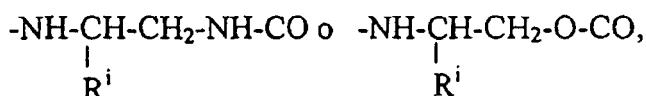
- n está comprendido entre 6 y 20,

- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,

siendo R_a la fluoresceína o un grupo alquilo (C1-C10), alquenilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH , alquilo (C1-C4), NH_2 , CN , trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH , un grupo maleimida,

con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,

- A representa indiferentemente un grupo

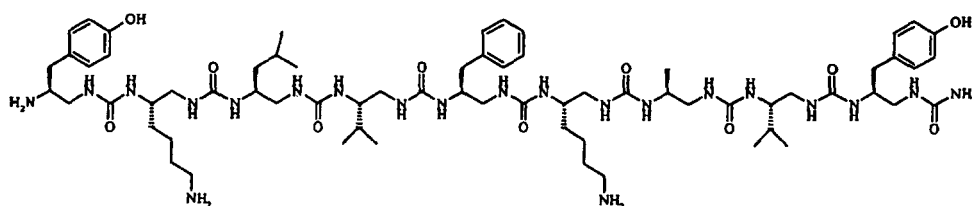
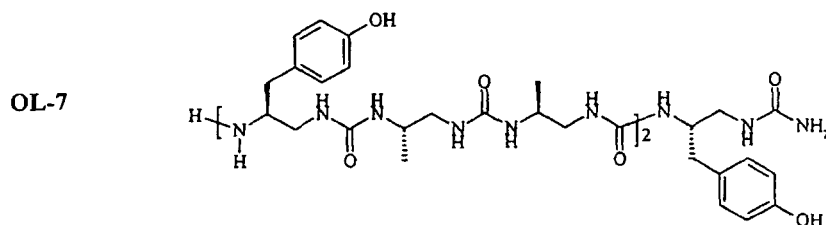


* siendo R^i un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alquenilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH , amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN , trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

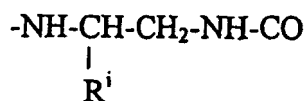
* siendo i un número entero comprendido entre 1 y n .

- Y es un grupo NR_bR_c , teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R' ,

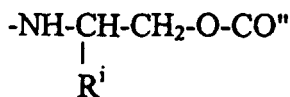
con la condición de que estén excluidos los compuestos que responden a las fórmulas siguientes:



La expresión "A representa indiferentemente un grupo

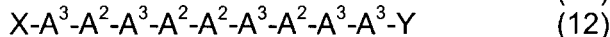
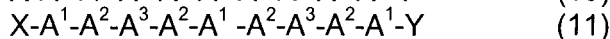
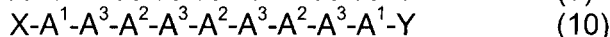
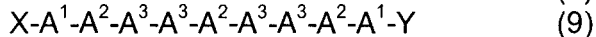
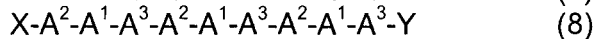
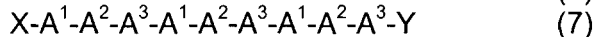
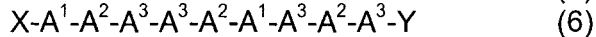
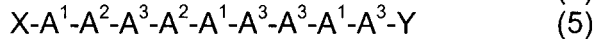
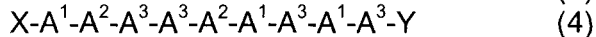
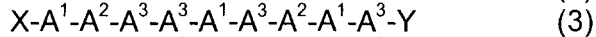
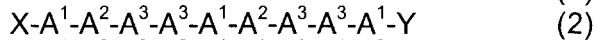
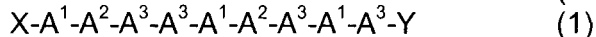
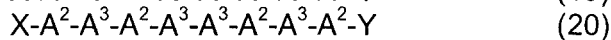
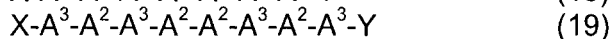
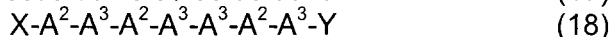
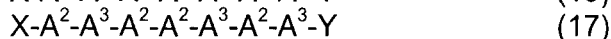
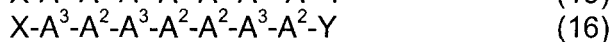
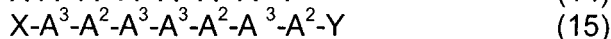
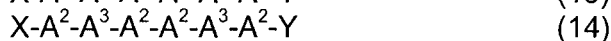


o



significa que el grupo A, en la cadena (A)_n, es de manera aleatoria uno de los grupos definidos anteriormente.

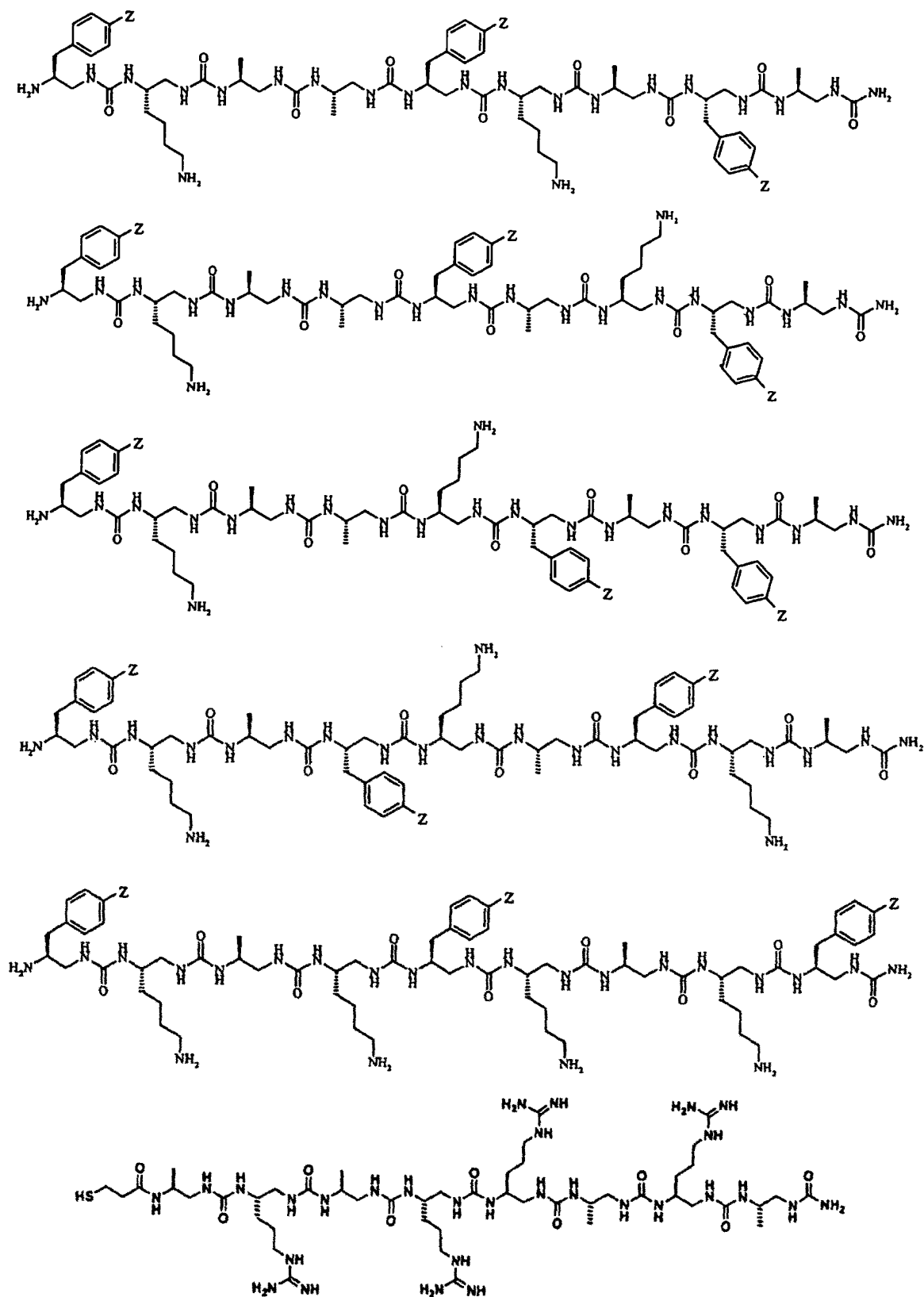
La invención se refiere a los compuestos tal como se han definido anteriormente, caracterizados porque n es igual a 6, 7, 8 ó 9, y porque responden a las siguientes fórmulas:

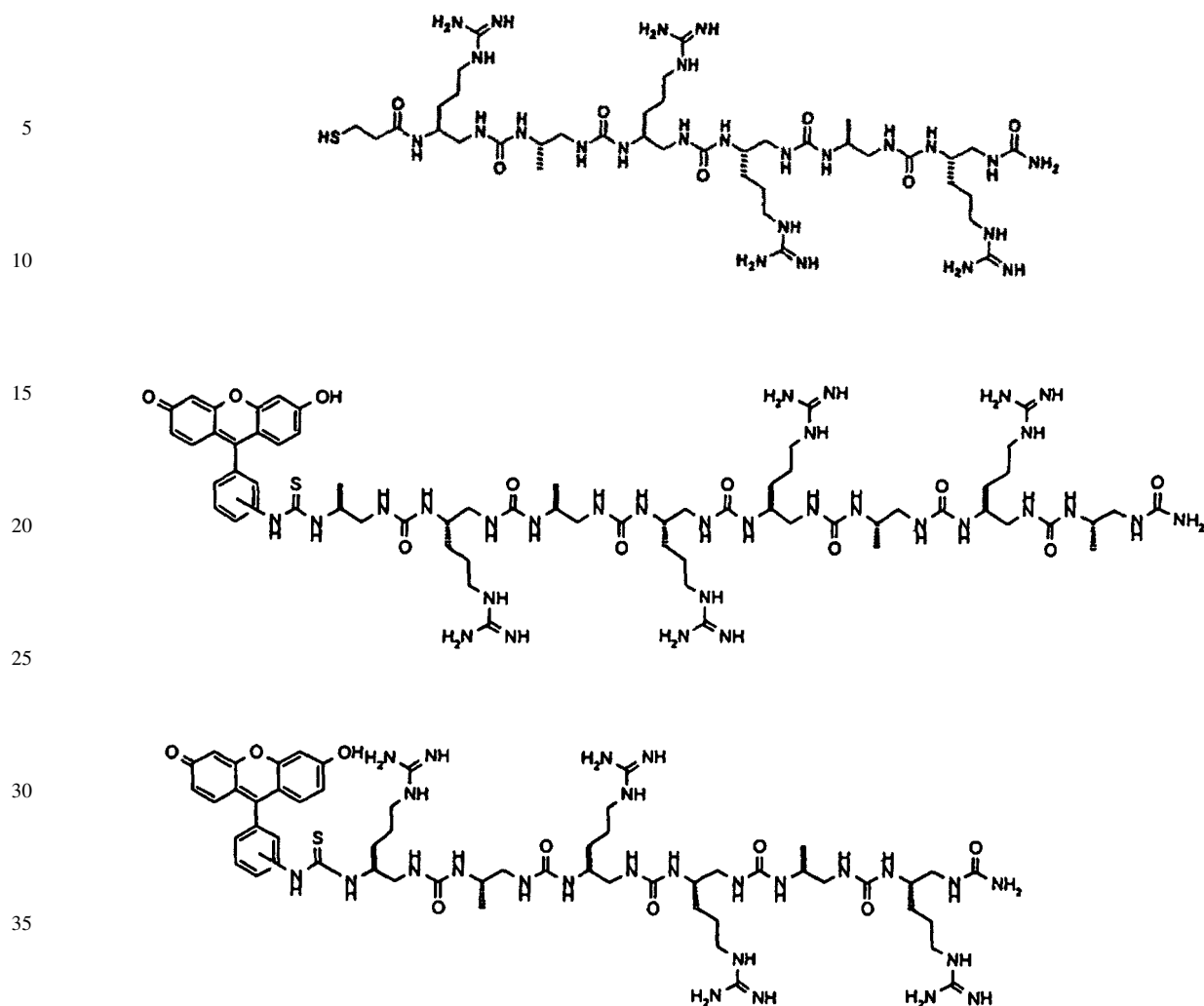


en las que:

- X e Y son tal como se han definido anteriormente,
- A¹ corresponde al grupo A tal como se ha definido anteriormente, en el que R' representa una cadena lateral aromática, tal como un grupo bencilo que corresponde a la cadena lateral de la fenilalanina, 4-hidroxi bencilo que corresponde a la cadena lateral de la tirosina o (3-indolil)metilo que corresponde a la cadena lateral del triptófano,
- A² corresponde al grupo A tal como se ha definido anteriormente, en el que R' representa una cadena básica que corresponde a la lisina (-(CH₂)₄-NH₂), la arginina (-(CH₂)₃NH-C(=NH)NH₂) o la ornitina (-(CH₂)₃-NH₂), o un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un grupo amidina, NH₂, guanidina,
- A³ corresponde al grupo A tal como se ha definido anteriormente, en el que R' representa una cadena lateral hidrófoba de tipo metilo que corresponde a la cadena lateral de la alanina, isopropilo que corresponde a la cadena lateral de la valina, isobutilo que corresponde a la cadena lateral de la leucina y sec-butilo que corresponde a la cadena lateral de la isoleucina.

Unos compuestos ventajosos según la invención son unos compuestos tal como se han definido anteriormente, que responden a las fórmulas siguientes:





en las que Z representa un átomo de hidrógeno o un grupo OH.

La invención se refiere asimismo a unos compuestos tal como se han definido anteriormente, caracterizados porque al menos 10%, ventajosamente de 10% a 50%, de los sustituyentes R' son unas cadenas laterales de aminoácidos con carácter básico.

La expresión "cadenas laterales de aminoácidos con carácter básico" designa unas cadenas que comprenden al menos uno o varios grupos que tienen la posibilidad de aceptar un protón, según la definición de Bronsted. Por ejemplo, estos grupos pueden ser unas aminas (primaria, secundaria o terciaria), unas amidas, unas amidinas, unas benzamidinas, unas guanidinas, unos imidazoles, unas imidazolinas o unas piridinas.

Unos compuestos ventajosos de la invención son unos compuestos tal como se han definido anteriormente, caracterizados porque las cadenas laterales de aminoácidos con carácter básico comprenden unos grupos de aminas primaria, secundaria o terciaria, unos grupos imidazol, guanidina, amidina o benzamidina.

Las moléculas que portan las cadenas laterales mencionadas anteriormente, con la exclusión de cualquier cadena cargada negativamente de tipo aspartato o glutamato, son catiónicas y por lo tanto atraídas de manera electrostática por las superficies microbianas cargadas negativamente. En el caso de las bacterias Gram-, las moléculas pueden interactuar inicialmente con la pared rica en lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa. En el caso de las bacterias Gram+, la superficie está cargada negativamente debido a la presencia de ácidos teicoico y teicurónico y unos grupos carboxilo de los restos de aminoácidos en los peptidoglucanos. Una vez alcanzada la membrana citoplásmica, las moléculas catiónicas pueden interactuar entonces con las cabezas cargadas negativamente de los fosfolípidos de la pared exterior (Tossi *et al.*, Biopolymers, 2000, **55**, 4-30).

La invención se refiere a unos compuestos que poseen una estructura en hélice y que responden a la fórmula general siguiente:

$$X - (A)_n - Y, \quad (I)$$

en la que

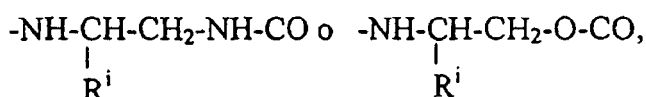
- n está comprendido entre 6 y 20,

- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,

siendo R_a un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH, un grupo maleimida, la fluoresceína,

con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,

- A representa indiferentemente un grupo



* siendo R' un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

* siendo i un número entero comprendido entre 1 y n.

- Y es un grupo NR_bR_c , teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R' ,

presentando dicha hélice las características siguientes:

- es de paso regular a la derecha, comprendido entre 4,9 Å y 5,3 Å, y en particular igual a 5 Å,
- comprende de 2,4 a 2,6 residuos por vuelta y en particular 2,5 residuos por vuelta,
- su diámetro interior calculado a partir de los centros de los átomos está comprendido entre 3,8 Å y 4,6 Å, y en particular es igual a 4,2 Å,
- su diámetro interior calculado a partir de la superficie de Van der Waals está comprendido entre 1,4 Å y 1,8 Å, en particular es igual a 1,6 Å.

Mediante el término “residuo”, se designa el grupo A tal como se ha definido anteriormente.

La expresión “diámetro interior calculado a partir de los centros de los átomos” significa que, en una parte regular de la estructura, modelizada a partir de los datos obtenidos mediante resonancia magnética nuclear, se puede definir un diámetro entre dos átomos diametralmente opuestos, conociendo el eje de la hélice. La distancia obtenida se mide entonces a partir del centro de los átomos.

La expresión “diámetro interior calculado a partir de la superficie de Van der Waals” significa que, en una parte regular de la estructura, se puede definir, conociendo el eje de la hélice, un diámetro entre dos átomos seleccionados diametralmente opuestos. La distancia obtenida es entonces la distancia previamente calculada disminuida de los rayos de Van der Waals de los dos átomos seleccionados. A título de ejemplo, se pueden dar los rayos de Van der Waals de los átomos siguientes: 1,2 Å para el átomo de hidrógeno; 1,5 Å para el átomo de oxígeno; 1,6 Å para el átomo de nitrógeno; 1,7 Å para el átomo de carbono y 1,8 Å para el átomo de azufre.

Se ha constatado que la estructura en hélice de los compuestos de la invención resulta en parte de la existencia de dos uniones hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo CO del residuo i y los dos átomos de hidrógeno de los grupos NH del residuo i+3 y $N'H$ del residuo i+2 respectivamente. Para más claridad, el átomo de nitrógeno situado entre el grupo CH_2 y el grupo CO está representado por N' .

Estas uniones hidrógeno, entre, por una parte, el átomo de oxígeno del grupo CO del residuo i y del átomo de hidrógeno del grupo NH del residuo i+3, y, por otra parte, entre el átomo de oxígeno del grupo CO del residuo i del átomo de hidrógeno del grupo $N'H$ del residuo i+2, conllevan la formación de ciclos de 12 a 14 átomos. En efecto, la unión hidrógeno entre el grupo CO del residuo i y del átomo de hidrógeno del grupo NH del residuo i+3 cierra un ciclo de 14 átomos mientras que la unión hidrógeno entre el grupo CO del residuo i y el átomo de hidrógeno del grupo $N'H$ del residuo i+2 cierra un ciclo de 12 átomos.

Es posible correlacionar la estructura en hélice observada mediante RMN en el metanol y en la piridina con una señal característica de dicroísmo circular (DC).

El dicroísmo circular representa una fuente de información considerable sobre la estructura de las macromoléculas biológicas tales como las proteínas o el ADN (G.D. Fasman, Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, Plenum press, NY, 1996). El dicroísmo circular es la medida en función de la longitud de onda de la capacidad de una molécula ópticamente activa para absorber de manera diferente los dos constituyentes (girando a la izquierda (Eg) y girando a la derecha (Ed)) de un haz luminoso polarizado. La actividad óptica está por lo tanto relacionada con la anisotropía óptica del medio estudiado. La combinación de la absorción diferencial (dicroísmo circular) y de la diferencia de velocidad de transmisión de la luz polarizada derecha e izquierda (actividad óptica) en la región espectral en la que se manifiesta una banda de absorción ópticamente activa se denomina efecto Cotton (Pierre Crabbé, Applications de la dispersión rotatoire optique et du dichroïsme circulaire optique en chimie organique, Gauthier-Villars, Paris, 1968).

En el metanol, se observa un efecto *Cotton* intenso que corresponde posiblemente a la forma helicoidal (máximo a 205 nm) para el heptámero y para el nonámero en el metanol, y una ausencia de señal para unos oligómeros más cortos: un hexámero cuyo residuo 1 no está acilado (ausencia de grupo carbonilo que puede estar introducido en una unión hidrógeno con el residuo 3) no da prácticamente ninguna señal a esta longitud de onda. En el caso del heptámero, el estudio de la señal a 205 nm en función de la temperatura indica que éste es poco sensible a un aumento de la temperatura y sugiere que la estructura secundaria persiste hasta 60°C, y que el mecanismo de despliegue no es cooperativo (se obtiene una recta de pendiente negativa). Calentando un compuesto, se desestabiliza la estructura poco a poco, y probablemente la desnaturalización completa de la molécula pasa por un gran número de estados intermedios parcialmente replegados: se habla entonces de efecto no cooperativo.

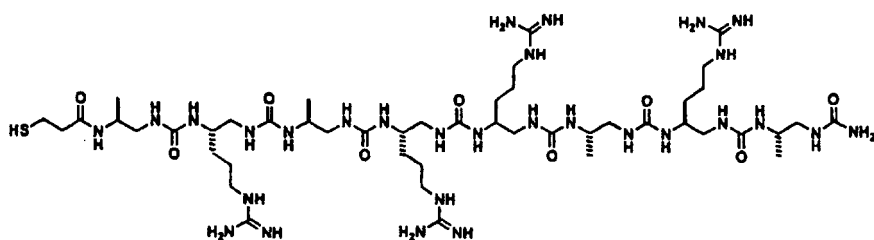
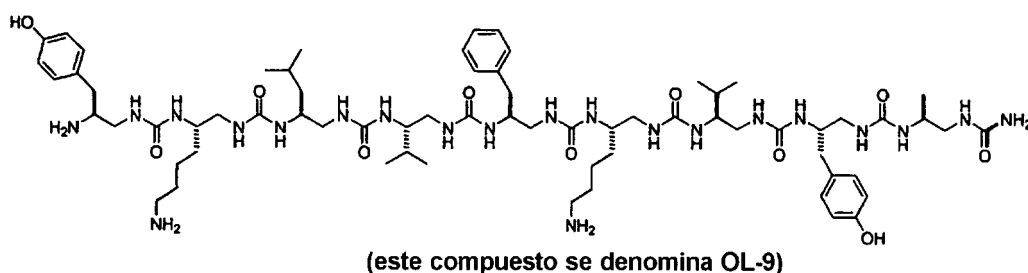
En el trifluoroetanol, la señal característica desaparece mientras que en el agua subsiste una parte de la señal a 205 nm, lo que sugiere que la estructura en hélice está en parte presente en el agua.

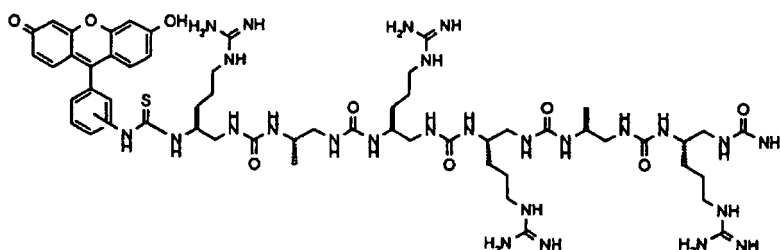
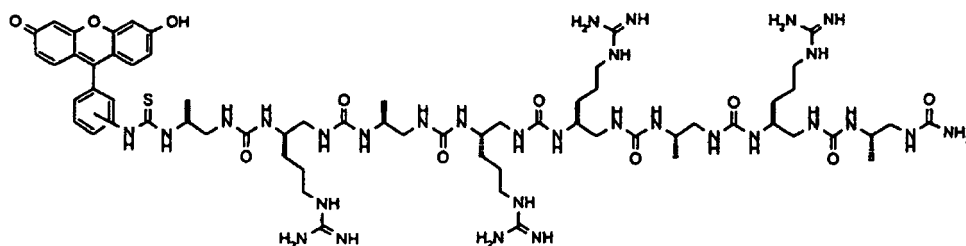
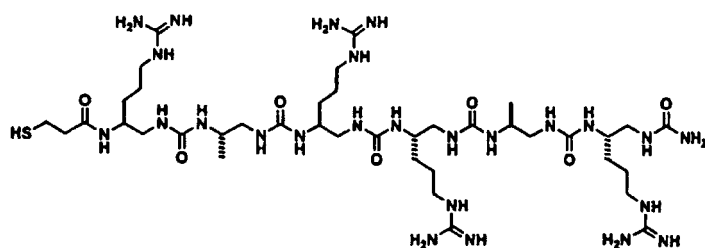
Asimismo, se ha constatado que era necesario un mínimo de seis residuos para obtener un compuesto en hélice. Sin embargo, en el caso de seis residuos (n=6), es ventajoso, incluso necesario, proteger el grupo NH terminal mediante un grupo acilo a fin de estabilizar la estructura de la hélice.

El término “compuestos que poseen una estructura en hélice” designa al mismo tiempo unos compuestos cuya estructura helicoidal es total y unos compuestos cuya estructura helicoidal es parcial.

Una estructura helicoidal parcial se define cuando, o bien una parte solamente de la molécula adopta las características estructurales de la hélice, o bien cuando existe un equilibrio dinámico entre la forma helicoidal y otros estados conformacionales. Esto se puede observar mediante diferentes técnicas que incluyen la RMN en disolución, o bien el dicroísmo circular. La estabilidad de la hélice se puede medir asimismo mediante unos estudios térmicos.

La invención se refiere asimismo a los compuestos tal como se han definido anteriormente y que responden a una de las siguientes fórmulas:





La invención se refiere asimismo a una composición que contiene al menos un compuesto tal como se ha definido anteriormente, y al menos un disolvente, teniendo dicho disolvente la propiedad de conferir a las moléculas de dicho compuesto una forma helicoidal, incluso parcialmente, en el caso de un equilibrio conformacional entre las moléculas de dicho compuesto en forma helicoidal y las moléculas de dicho compuesto en forma no helicoidal, y siendo seleccionado en particular de entre los alcoholes, la piridina, el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido, el agua en presencia o no de micelas o de lípidos, y siendo ventajosamente seleccionado de entre el agua en presencia o no de micelas, el metanol, el etanol, el isopropanol, el trifluoroetanol, el hexafluoroisopropanol, el dimetilsulfóxido o cualquier mezcla de estos disolventes.

La estructura es extremadamente estable y bien definida en la piridina o bien en el metanol. En agua, las mediciones realizadas mediante dicroísmo circular sugieren que la estructura helicoidal puede ser parcial debido a que la señal a 205 nm es menos intensa que en el metanol. Sin embargo, la estructura se puede medir asimismo mediante unos estudios térmicos.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación en fase sólida de los compuestos de fórmula (I) tal como se han definido anteriormente, a partir de monómeros pre-activados de fórmula GP-A-W, en la que:

- GP es un grupo protector seleccionado de entre Fmoc, Teoc, ftalimida, Alloc, BOC y Cbz,
- A es tal como se ha definido anteriormente,
- W procede del grupo W-H seleccionado de entre: N-hidroxisuccinimida, fenol, pentafluorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dicloro-6-nitrofenol, hidroxí-1,2,3-benzotriazol, 1-oxo-2-hidroxidihidrobenzo-triazina (HODhbt), 7-aza-1-hidroxí-benzotriazol (HOAt), 4-aza-1-hidroxibenzotriazol (4-HOAt), imidazol, tetrazol, y resina WANG, y es preferentemente N-hidroxisuccinimida o p-nitrofenol,

caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) una etapa de acoplamiento de GP-A-W tal como se ha definido anteriormente sobre la función amina de un soporte, permitiendo dicha etapa el injerto del grupo -A-GP sobre dicha función amina de dicho soporte,

- b) una etapa de escisión del grupo GP en condiciones apropiadas,
- c) la repetición secuencial de las etapas a) y b) hasta que n grupos hayan sido injertados sobre dicho soporte,
- d) una etapa de introducción de los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 , siendo R_a tal como se ha definido anteriormente,
- e) una etapa de escisión del compuesto de fórmula (I) del soporte mediante unos medios apropiados, que permite el desenganche de la resina y la liberación del grupo Y, tal como se ha definido anteriormente.

Mediante la expresión “monómero pre-activado” se designa un derivado de ácido carbámico o de ácido carbónico capaz de reaccionar con unas aminas primarias o secundarias, en presencia o no de una base en un disolvente orgánico, y generalmente a temperatura ambiente, para dar respectivamente una urea o un carbamato.

Se recuerda que los grupos protectores Fmoc, Teoc, Alloc, BOC y Cbz corresponden respectivamente a los grupos fluorenilmetoxycarbonilo, trimetilsililetiloxycarbonilo, aliloxycarbonilo, terc-butiloxycarbonilo y benciloxycarbonilo.

La etapa de acoplamiento del procedimiento de preparación mencionado anteriormente en fase sólida se efectúa en medio orgánico (DMF, THF, CH_2Cl_2 , NMP), mediante la adición de una disolución del monómero preactivado (1 a 20 equivalentes con relación a la cantidad de amina libre sobre la resina), en presencia o no de un catalizador, tal como el hidroxibenzotriazol, a una suspensión de resina en el disolvente. Esta etapa puede ser seguida o no por la adición de una base orgánica (DIEA, NMM, piridina, Et_3N , colidina, lutidina, etc.).

La etapa de escisión se elige en función del grupo protector GP. En el caso del grupo Fmoc, éste se puede desproteger mediante una disolución al 20% de piperidina en el DMF. En el caso del grupo Teoc, éste se puede desproteger mediante una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio en THF. Estas técnicas son habituales y están ampliamente descritas en: “Protecting Groups” de P.J. Kocienski (Ediciones Thieme).

Después, el oligómero se alarga mediante la repetición de las etapas de acoplamiento y de escisión, hasta el último residuo A de la secuencia.

Después de la desprotección del último grupo GP, los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 pueden ser introducidos, llegado el caso, mediante la reacción de la amina sobre la resina con, por ejemplo, un cloruro de acilo (R_aCOCl), un anhídrido mixto (R_aOCOOR_a), un isocianato (R_aNCO) o un cloruro de sulfanilo (R_aSO_2Cl) en condiciones habituales.

La etapa de escisión se puede efectuar mediante el tratamiento de la resina en medio ácido mediante unas mezclas bien conocidas usadas para la síntesis peptídica, tal como una mezcla TFA/ H_2O /triisopropilsilano (9,5/2,5/2,5).

Un procedimiento de preparación ventajoso según la invención es un procedimiento de preparación tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la etapa a) se puede efectuar en presencia o no de una base terciaria tal como DIEA, colidina, NMM o lutidina, y en presencia o no de un catalizador tal como HOBt.

Por definición, DIEA designa la diisopropiletilamina, NMM designa la N-metilmorfolina y HOBt el 1-hidroxibenzotriazol.

La invención se refiere asimismo al procedimiento de preparación tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la etapa a) se puede efectuar en un disolvente tal como el DMF, CH_2Cl_2 , THF o N-metilpirrolidona.

Un procedimiento de preparación ventajoso según la invención es un procedimiento de preparación tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el grupo GP es un grupo Fmoc.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación en fase líquida de los compuestos de fórmula (I) tal como se han definido anteriormente, a partir de monómeros preactivados de fórmula GP-A-W, en la que:

- GP es un grupo protector seleccionado de entre Fmoc, Alloc, BOC y Cbz,
 - A es tal como se ha definido anteriormente,
 - W procede del grupo W-H seleccionado de entre: N-hidroxisuccinimida, fenol, pentafluorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dicloro-6-nitrofenol, hidroxí-1,2,3-benzotriazol, 1-oxo-2-hidroxi-1,2,3-benzotriazol (HODhbt), 7-aza-1-hidroxi-benzotriazol (HOAt), 4-aza-1-hidroxi-benzotriazol (4-HOAt), imidazol y tetrazol, y es preferentemente N-hidroxisuccinimida o p-nitrofenol,
- caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) una etapa de acoplamiento de GP-A-W tal como se ha definido anteriormente sobre la función amina del grupo A del derivado H-A-Y,

- b) una etapa de escisión del grupo GP en condiciones apropiadas,
- c) la repetición secuencial de las etapas a) y b) hasta que n grupos A hayan sido injertados sobre la función amina mencionada anteriormente,
- d) una etapa de introducción de los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 , siendo R_a tal como se ha definido anteriormente,
- e) una etapa de escisión del compuesto de fórmula (I) mediante unos medios apropiados.

La etapa de acoplamiento del procedimiento de preparación mencionado anteriormente en fase líquida se efectúa en medio orgánico (DMF, THF, CH_2Cl_2 , NMP), mediante la adición de una disolución del monómero preactivado (1 a 1,5 equivalentes con relación a la cantidad de amina primaria o secundaria del derivado H-A-Y de partida). Esta etapa puede estar seguida o no por la adición de una base orgánica (DIEA, NMM, piridina, Et_3N , colidina, lutidina, etc.). Esta etapa está seguida de una cromatografía sobre capa fina. Al final de la reacción, se añade una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y después de diclorometano, por ejemplo. La fase orgánica se lava con una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y después con una disolución de NaCl saturado. Se puede lavar eventualmente la fase orgánica en medio ácido (HCl 1 N o KHSO_4 1 N). La fase orgánica se recupera, se seca sobre MgSO_4 y el disolvente se evapora para dar el compuesto esperado. Si el producto bruto contiene impurezas, se puede purificar mediante cromatografía sobre sílice con un sistema de disolvente apropiado.

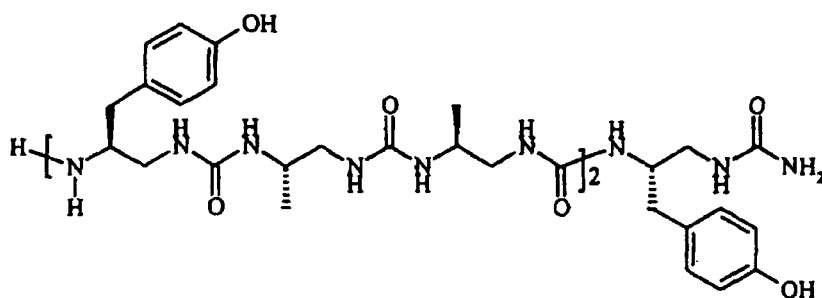
La etapa de escisión corresponde a la desprotección del grupo protector GP. En el caso del grupo BOC, éste se puede desproteger mediante TFA. En el caso del grupo Teoc, éste se puede desproteger mediante una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio en THF. Estas técnicas son habituales y están ampliamente descritas en “Protecting Groups” de P.J. Kocienski (Ediciones Thieme).

El oligómero se alarga a continuación mediante la repetición de las etapas de acoplamiento y de escisión, hasta el último residuo A de la secuencia.

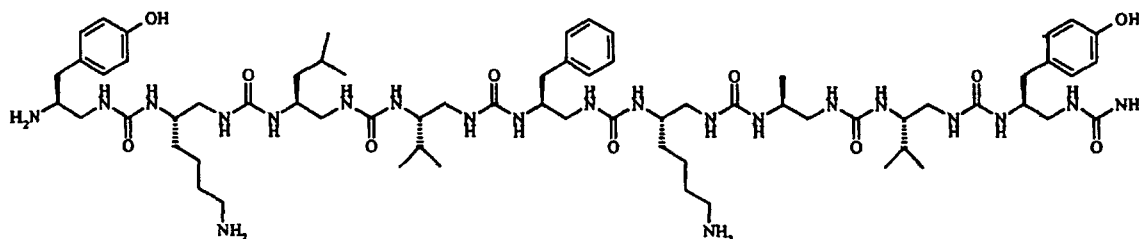
Después de la desprotección del último grupo GP, se pueden introducir los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 , llegado el caso, mediante la reacción de la amina desprotegida con, por ejemplo, un cloruro de acilo (R_aCOCl), un anhídrido mixto (R_aOCOOR_a), un isocianato (R_aNCO) o un cloruro de sulfanilo (R_aSO_2Cl) en condiciones habituales. El compuesto final se puede purificar mediante cromatografía sobre sílice (fase normal o fase inversa).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de los compuestos tal como se han definido anteriormente, mediante la puesta en contacto de uno de los compuestos tal como se han definido anteriormente o de uno de los compuestos de fórmula (VIId) o (VIId), con un disolvente tal como el metanol, el etanol, el trifluoroetanol, el hexafluoroisopropanol, el agua, o con unos tampones biológicos, tales como unos tampones fosfato salinos o no, o con un medio micelar o lipídico.

Los compuestos de fórmula (VIIc) son unos compuestos denominados OL-7, y que responden a la fórmula siguiente:



Los compuestos de fórmula (VIIId) son unos compuestos que responden a la fórmula siguiente:



ES 2 301 691 T3

La invención se refiere al uso de los compuestos tal como se han definido anteriormente para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades bacterianas, fúngicas o citotóxicas, y en particular de infecciones fúngicas tales como las aspergilosis y las candidosis, y de infecciones bacterianas resistentes.

5 Mediante la expresión “enfermedades bacterianas” se designan las infecciones emergentes asociadas con las siguientes bacterias:

- *Legionella*, bacteria asociada a la enfermedad del legionario,
- 10 • *Escherichia coli* O157:H7: descubierta en 1982, esta bacteria que se transmite normalmente mediante alimentos contaminados, ha sido el origen de brotes de síndromes hemolíticos y urémicos,
- *Borrelia burgdorferi*: detectada en los Estados Unidos en 1982, fue identificada como la causa de la enfermedad de Lyme,
- 15 • *Vibrio cholerae* O139: nueva cepa asociada con un cólera epidémico,
- *Helicobacter pylori*: bacteria asociada a una úlcera gastrointestinal.

20 Se designan asimismo las infecciones asociadas a unas bacterias que se vuelven resistentes a una gama cada vez más extendida de antibióticos. Así, en numerosas regiones, los antibióticos de primera intención, poco costosos, han perdido su eficacia contra las infecciones relacionadas con las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pneumococcus*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* (asociada a un choque tóxico estafilocócico) y *Moraxella catarrhalis*.

25 Mediante la expresión “enfermedades fúngicas” se designan las infecciones provocadas por los siguientes hongos patógenos: *Candida albicans*, asociada a la candidosis, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus parasiticus*, asociadas a la aspergilosis, y *Neurospora crassa*.

30 Las enfermedades fúngicas comprenden las enfermedades causadas por los hongos patógenos, en particular los de la familia de los *fungi imperfecti*, en particular los *moniliales* o también los de la familia de los *hypocreales* o la de los *sphaeriales*.

35 Mediante la expresión “enfermedades citotóxicas” se designan en particular los cánceres, y en particular los tumores del aparato digestivo (hígado, intestino, esófago, páncreas, etc.), del aparato urogenital (útero, próstata, riñón, vejiga, etc.), de las glándulas endocrinas, del ojo, de la piel, de mama, de los huesos, del sistema nervioso, del tórax (pulmón, etc.).

40 La invención se refiere a una composición farmacéutica caracterizada porque comprende, a título de sustancia activa, uno al menos de los compuestos tal como se han definido anteriormente, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

45 Una composición farmacéutica ventajosa según la invención es una composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente, caracterizada porque contiene por dosis unitaria de 10 a 2.000 mg de uno de los compuestos tal como se han definido anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, rectal o tópica.

50 Como composiciones sólidas para la administración oral, se pueden usar unos comprimidos, píldoras, polvos (en particular en cápsulas de gelatina o comprimidos) o gránulos. En estas composiciones, el producto activo según la invención se mezcla con uno o varios diluyentes inertes, tales como el almidón, la celulosa, la sacarosa, la lactosa o la sílice. Estas composiciones pueden comprender asimismo otras sustancias, por ejemplo uno o varios lubricantes tales como el estearato de magnesio o el talco, un colorante, un revestimiento (gragea) o un barniz.

55 Como composiciones líquidas para la administración oral, se pueden usar unas disoluciones, unas suspensiones, unas emulsiones, unos jarabes y unos elixires farmacéuticamente aceptables que contienen unos diluyentes inertes tales como el agua, el etanol, el glicerol, los aceites vegetales o el aceite de parafina. Estas composiciones pueden asimismo comprender otras sustancias, por ejemplo unos productos humectantes, edulcorantes, espesantes, aromatizantes o estabilizantes.

60 Las composiciones estériles para la administración parenteral pueden ser, preferentemente, unas disoluciones acuosas o no acuosas, unas suspensiones o unas emulsiones. Como disolvente o vehículo, se puede usar el agua, el propilenglicol, un polietilenglicol, unos aceites vegetales, en particular el aceite de oliva, unos ésteres orgánicos convenientes. Estas composiciones pueden asimismo contener unos adyuvantes, en particular unos agentes humectantes, isotonzantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. La esterilización se puede realizar de diferentes maneras, por ejemplo por filtración aséptica, incorporando a la composición unos agentes esterilizantes, mediante irradiación o mediante calentamiento. Asimismo, se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles, que se pueden disolver en el momento del uso en un medio estéril inyectable.

Las composiciones para la administración rectal son los supositorios o las cápsulas rectales, que contienen, además de la sustancia activa, unos excipientes tales como la manteca de cacao, unas glicerinas semi-sintéticas o unos polietilenglicoles.

- 5 Las composiciones estériles para la administración tópica pueden ser, por ejemplo, unas cremas, unas pomadas, unas lociones, unos colirios, unos colutorios, unas gotas nasales o aerosoles.

Los modos de administración preferidos son la vía parenteral y la vía oral.

- 10 Las dosis farmacológicas dependen del efecto deseado y de la duración del tratamiento; están generalmente comprendidas entre 0,001 mg/kg/día y 100 mg/kg/día, y preferentemente entre 1 y 20 mg/kg/día.

Estas cantidades se pueden administrar en una o varias dosis.

- 15 Una composición farmacéutica ventajosa según la invención es una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto tal como se ha definido anteriormente, denominado OL-9, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

- 20 Según otro modo de realización, la invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica caracterizada porque comprende, a título de vector farmacéutico, uno al menos de los compuestos según la invención en asociación con una sustancia farmacéuticamente activa.

La invención se refiere asimismo al uso de un compuesto según la invención como vector farmacéutico.

- 25 Mediante la expresión "vector farmacéutico" se designa un compuesto según la invención que favorece el paso de las sustancias con las que se encuentra en asociación a través de membranas o de tegumentos biológicos, en particular la membrana citoplásmica, el envoltorio nuclear o la piel.

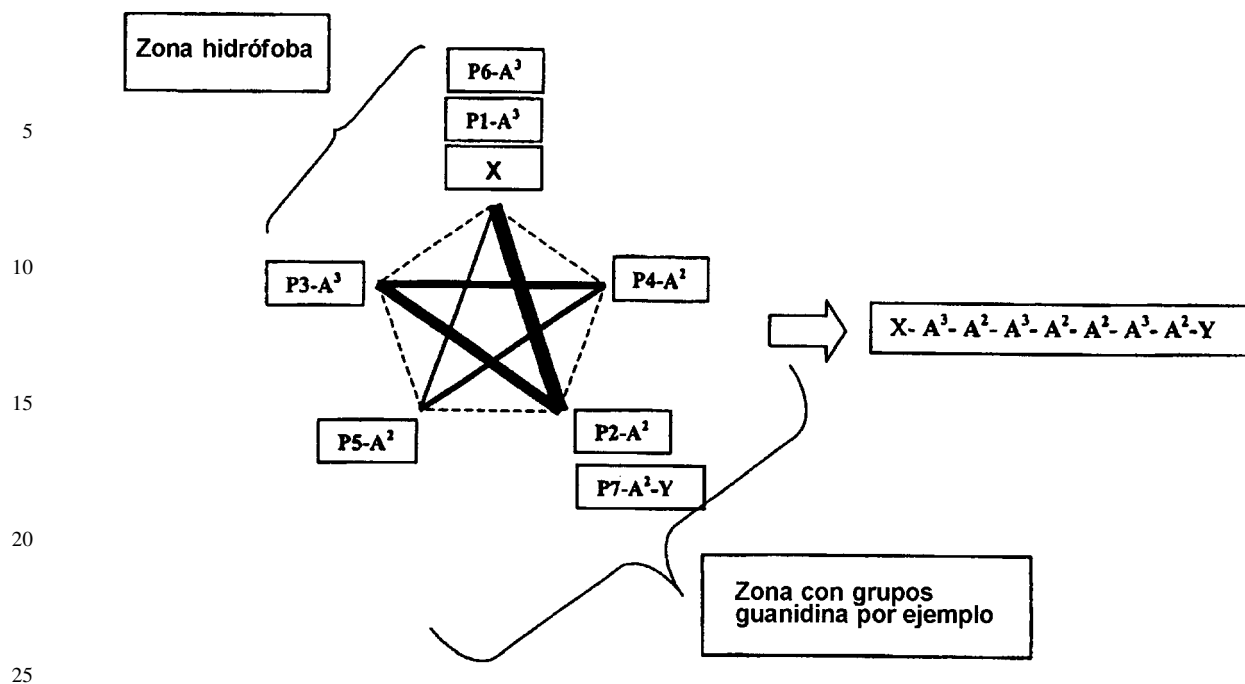
- 30 Ciertos oligómeros de la invención tienen la capacidad de interactuar con las membranas y penetrar en las células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. Esta propiedad puede hacer de ellos unos compuestos interesantes para facilitar la penetración de moléculas de interés terapéutico, como los péptidos o los oligonucleótidos, a través de los tejidos, en particular la piel, de las membranas celulares o también a través del núcleo de estas células. Esta propiedad es útil para permitir el aumento de la biodisponibilidad de los péptidos de interés. El péptido puede estar asociado a su vehículo de manera covalente o estar simplemente mezclado con éste. En el caso de una unión covalente, se preferirá una unión química potencialmente hidrolizable, en particular una unión éster, oxima o amida, o una unión química que se puede reducir, en particular un puente disulfuro. La capacidad del vehículo para asegurar su función está relacionada con la presencia de un cierto número de residuos básicos, preferentemente un grupo amina, guanidina o benzamida. Un número ventajoso de residuos que aseguran la función del vehículo es $n=4-10$. El número de residuos básicos estará ventajosamente comprendido entre 40% y 100%.

- 40 En efecto, se conoce en la técnica anterior que unos péptidos que presentan un número mínimo de residuos arginina consecutivos (oligo-Arg) se pueden internalizar en las células y servir de vehículo para unas moléculas seleccionadas, unos péptidos o unos principios activos (P.A. Wender *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2000 nov. 21;97(24):13003-8). Se ha demostrado que la capacidad de transporte de una molécula puede depender de la posición relativa de las argininas en la secuencia peptídica (J. Rothbard *et al.* J Med Chem 2002 agosto 15;45(17):3612-8). En el caso de una estructura helicoidal, se ha demostrado que el posicionamiento de las argininas en una misma cara de la hélice que conduce así a una hélice anfipática puede mejorar las propiedades de transporte (A. Ho *et al.* Cancer Res 2001 enero 15;61(2):474-7). La concepción de los compuestos ventajosos de la invención se puede racionalizar gracias al conocimiento de la estructura helicoidal descrita en la invención, y cuya proyección en un plano perpendicular al eje de la hélice se puede usar para visualizar el carácter anfipático de los compuestos. A continuación, se propone un ejemplo de concepción de hélice anfipática en base a la estructura helicoidal 2.5 descrita en la invención. Los grupos A^2 y A^3 se definen como anteriormente, conteniendo A^2 preferentemente un grupo guanidina, benzamidina o amida, e indicando P1 la posición del residuo en la secuencia:

55

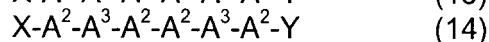
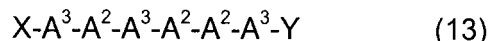
60

65

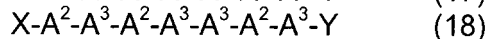
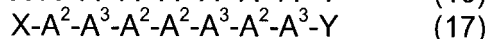
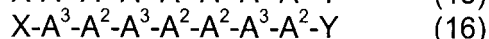
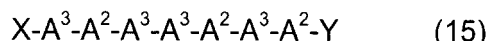


Las siguientes secuencias definidas anteriormente se pueden usar para la internalización celular:

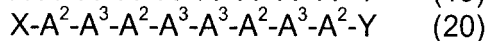
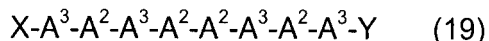
- Hexámeros



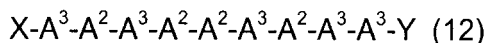
- Heptámeros



- Octámero



- Nonámero

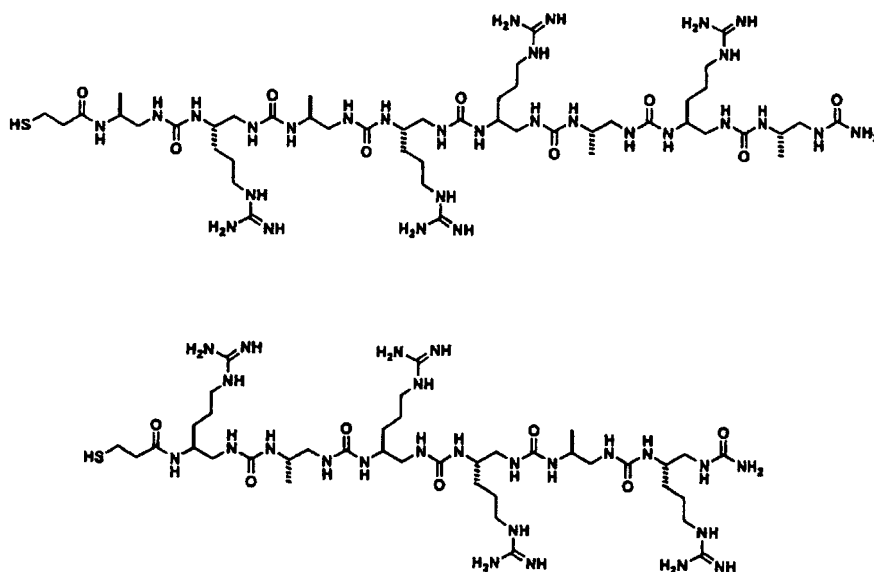


La elección del grupo X es importante y comprende ventajosamente:

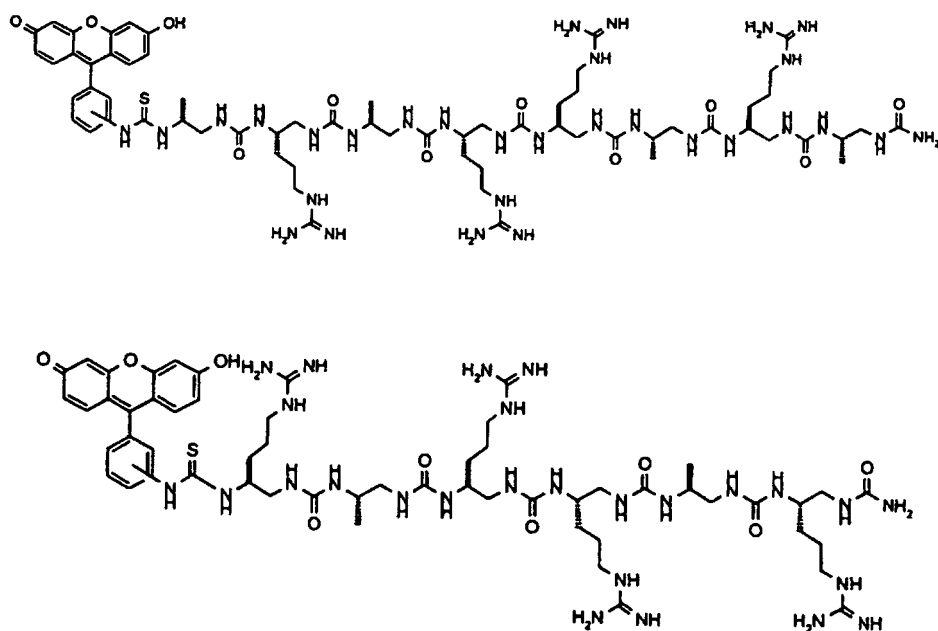
- 1) una funcionalidad que permite la ligación (unión) posterior a la molécula (principio activo, péptido, oligonucleótido) que se trata de hacer penetrar en las células, o
- 2) el grupo X puede asimismo ser el producto de la reacción del FITC (fluorescein isothiocyanate, producto comercial Ref. 46950 en Fluka) sobre la amina del residuo siguiente. Este derivado es útil para demostrar que el oligómero estudiado posee realmente unas propiedades de internalización celular.

A continuación, se representan 4 ejemplos:

Elección 1) grupo tiol que permite el anclaje a otra molécula que comprende a su vez grupo tiol o nucleimida:



Elección 2) función fluoresceína para un ensayo de internalización celular:



Descripción de las figuras

La Figura 1 representa la variación de los desplazamientos químicos de los protones NH del oligómero OL-7 en función de la temperatura (en K).

Se recuerda la fórmula de un residuo para los oligómeros según la invención:



La curva con los cuadros negros corresponde al protón del residuo 2 (Ala); la curva con los triángulos negros corresponde al protón del residuo 3 (Val); la curva con los círculos negros corresponde al protón del residuo 4 (Tyr); la curva con los cuadros blancos corresponde al protón del residuo 5 (Ala); la curva con los triángulos blancos corresponde al protón del residuo 6 (Val); la curva con los círculos blancos corresponde al protón del residuo 7 (Tyr).

ES 2 301 691 T3

La Figura 2 representa la variación de los desplazamientos químicos de los protones N'H del oligómero OL-7 en función de la temperatura (en K). La curva con los círculos grises corresponde al protón del residuo 1 (Tyr); la curva con los cuadros negros corresponde al protón del residuo 2 (Ala); la curva con los triángulos negros corresponde al protón del residuo 3 (Val); la curva con los círculos negros corresponde al protón del residuo 4 (Tyr); la curva con los cuadros blancos corresponde al protón del residuo 5 (Ala); la curva con los triángulos blancos corresponde al protón del residuo 6 (Val); la curva con los círculos blancos corresponde al protón del residuo 7 (Tyr).

Para cada una de las curvas de las Figuras 1 y 2, se ha efectuado una regresión lineal. Estas regresiones lineales permiten obtener la pendiente de las rectas y corresponden a los coeficientes de temperatura (véanse las tablas 1 y 2). Estos valores informan sobre la accesibilidad del protón frente al disolvente, y de su introducción en uniones hidrógeno. Cuanto más bajo es el valor absoluto de esta cifra (en particular inferior a 4) más accesible es el protón al disolvente, y más susceptible es de introducirse en una unión hidrógeno. Estas mediciones permiten por lo tanto verificar que los protones centrales del oligómero se introducen más en una unión hidrógeno que los protones terminales.

La Figura 3 representa el estudio por dicroísmo circular del compuesto OL-7 en diferentes disolventes, es decir en metanol, en agua y en trifluoroetanol. Las curvas de esta figura representan θ en función de la longitud de onda en nm.

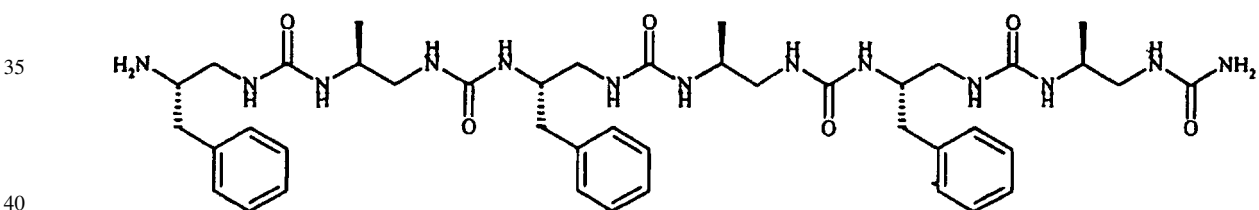
θ es la elipticidad molar y se expresa en $^{\circ}\text{cm}^2\text{.dmol}^{-1}$.

θ puede ser positiva o negativa, y su valor está relacionado con la estructura secundaria de los oligómeros. Este fenómeno (efecto Cotton) es extremadamente bien conocido para los péptidos y para otros tipos de oligómeros no naturales.

La curva con los triángulos negros corresponde al compuesto OL-7 estudiado en el metanol; la curva con los círculos negros corresponde al compuesto OL-7 estudiado en el trifluoroetanol, y la curva con los cuadros negros corresponde al compuesto OL-7 estudiado en agua.

La Figura 4 representa el estudio por dicroísmo circular de los compuestos OL-6 (hexámero), OL-7 y OL-9 en metanol.

El compuesto OL-6 responde a la fórmula siguiente:



Las curvas de esta figura representan θ (elipticidad molar en $^{\circ}\text{cm}^2\text{.dmol}^{-1}$) en función de la longitud de onda en nm.

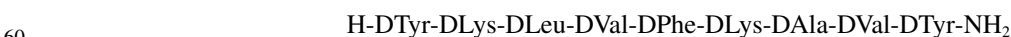
La curva con los círculos negros corresponde al compuesto OL-6; la curva con los cuadros negros corresponde al compuesto OL-7 y la curva con los triángulos negros corresponde al compuesto OL-9.

La Figura 5 representa los resultados de los ensayos de hemólisis efectuados sobre el compuesto OL-9 según la invención.

Esta gráfica representa la densidad óptica en función de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ del compuesto ensayado.

La curva con los triángulos blancos corresponde al cloruro de cetilpiridinio (este compuesto sirve de control interno); la curva con los cuadros negros corresponde al péptido de control D; la curva con los triángulos negros corresponde al péptido de control L, y la curva con los círculos negros corresponde al compuesto OL-9.

El péptido de control D se representa mediante la siguiente secuencia:

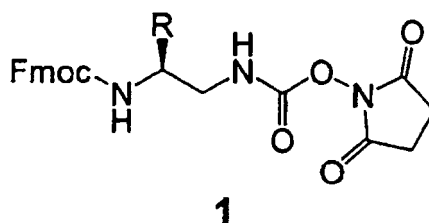


El péptido de control L se representa mediante la siguiente secuencia:



Ejemplos*Preparación de los compuestos de la invención, en particular OL-9 y OL-7*

Los oligómeros de la invención, y en particular OL-9 y OL-7, se han sintetizado en fase sólida a partir de una resina Rink-amida (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido-4-metilbencihidrilamina) comercial en una escala de 50 μ moles a partir de los carbamatos de succinimidilo 1 que portan las cadenas laterales de Ala, Val, Leu, Phe, Tyr(tBu), Lys(Boc), Arg(PMC) o Arg(Pbf); (preparados según Guichard *et al.*, Tetrahedron Lett., 2000, 41, 1553-1557).



1	R
a	Me
b	iPr
c	iBu
d	Bn
e	Bn(OtBu)
f	(CH ₂) ₄ NHBoc

Se añade el carbamato 1 deseado (4 equivalentes) en 2 ml de DMF a una suspensión de la resina mencionada anteriormente en DMF (2 ml) seguido por N-metilmorfolina (1 equivalente). Se deja que la reacción se realice durante 90 minutos y se vuelve a empezar, después de la filtración de la resina. El grupo Fmoc se escinde a continuación mediante tratamiento con 20% de piperidina en DMF. Las técnicas de lavado y de filtración de la resina así como de desprotección del grupo Fmoc son las usadas habitualmente en síntesis peptídica en fase sólida. El conjunto de la operación (acoplamiento y desprotección del Fmoc) se repite varias veces con los carbamatos 1 que poseen las cadenas laterales de los residuos siguientes en la secuencia para dar, después de la escisión de la resina (TFA, agua/triisopropilsilano: escisión estándar usada en síntesis peptídica en fase sólida en estrategia Fmoc) los productos OL-7 y OL-9 brutos, con una pureza respectivamente de 65% y 32% (determinadas mediante HPLC). El producto puro se caracteriza mediante espectrometría de masa (MALDI-MS) y mediante HPLC.

*Resultados***OL-7:**

- Tiempo de retención HPLC: 14,58 min. (A: 0,1% TFA en H₂O; B: 0,08% TFA en CH₃CN, 5-65% B en 20 minutos)(TFA = ácido trifluoroacético).
- MS (MALDI-TOF): 1051,5 [M+H]⁺

OL-9:

- Tiempo de retención HPLC: 15,2 min. (A: 0,1 % TFA en H₂O; B: 0,08% TFA en CH₃CN, 5-65% B en 20 minutos) (TFA = ácido trifluoroacético).
- MS (MALDI-TOF): 1393,1 [M+H]⁺

El estudio conformacional de los dos oligómeros OL-7 y OL-9, sintetizados en fase sólida, se ha efectuado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bi-dimensional inicialmente en piridina-*d*₅ (en piridina, las señales de los protones NH están mejor dispersadas que en cloroformo o en metanol, y la atribución de las señales está facilitada) y después en metanol deuterado CD₃OH.

La atribución de las resonancias así como la determinación de la secuencia se ha realizado mediante unos experimentos DQF-COSY, TOCSY y ROESY.

ES 2 301 691 T3

Se recuerda por definición que DQF-COSY (Double Quantum filtered correlated spectroscopy), TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) y ROESY (Rotating frame overhauser effect spectroscopy) son técnicas habituales de espectroscopia.

Se ha extraído un cierto número de datos importantes para la determinación de la estructura secundaria de los espectros monodimensionales y de los experimentos COSY.

Las tablas 1 y 2 siguientes indican los coeficientes de temperatura (en ppb.K^{-1}) calculados para los protones de los grupos NH y N'H de los residuos 1 a 7 del compuesto OL-7 (véanse las Figuras 1 y 2), y de los residuos 1 a 9 del compuesto OL-9.

TABLA 1

residuo	N'H	NH
1	- 5,3	
2	- 4,8	- 8,2
3	- 3,6	- 5,6
4	- 3,8	- 3,6
5	- 3,8	- 2,5
6	- 3,5	- 1,5
7	- 4,7	- 2,1

TABLA 2

residuo	N'H	NH
1	- 7,8	
2	- 6,7	- 8,7
3	- 3,25	- 5,2
4	- 5	- 2,4
5	- 5	- 0,8
6	- 4,2	- 1,2
7	- 4,75	- 1,88
8	- 3,75	- 1,1
9	- 5	- 2,5

Estas cifras se establecen a partir de las curvas de desplazamientos químicos en función de la temperatura calculando las pendientes de las rectas obtenidas mediante regresión lineal.

Estos coeficientes de temperatura se expresan en ppb.K^{-1} y se anotan $\delta\Delta/\delta T$.

La medición de los coeficientes de temperatura (calentamiento hasta aproximadamente 100°C para OL-7) sobre estas dos moléculas sugiere que los protones NH de los residuos 4-7 para OL-7 y 4-9 para OL-9 son poco accesibles al disolvente, y están potencialmente unidos mediante uniones hidrógeno ($-\Delta\delta/\Delta T < 2,5$ para el nonámero) (con la excepción en general de los dos residuos N-terminales para los cuales los coeficientes de temperatura son superiores a 5). Los protones N'H de los residuos centrales tienen unos coeficientes de temperaturas más negativos ($3,5 < -\Delta\delta/\Delta T < 3,8$ para los residuos 3 a 7 en el caso del oligómero OL-7); por lo tanto, son probablemente más accesibles al disolvente y por lo tanto se introducen menos en uniones hidrógeno que cada uno de los NH correspondientes en el seno de cada función urea.

Además, las constantes de acoplamiento $J(\text{NH}, {}^{\beta}\text{CH})$ son elevadas (con la excepción de los dos residuos N-terminales, las constantes son del orden de 9-10 Hz) y poco sensibles a los cambios de temperatura (véanse las tablas 3 y 4 siguientes).

ES 2 301 691 T3

TABLA 3

Estudio de la variación de las constantes de acoplamiento $^3J(\text{NH}, ^\beta\text{CH})$ en Hz para los residuos 2 a 7 de OL-7 en función de la temperatura

Temperatura (K)	Residuos					
	2	3	4	5	6	7
368	-	10,1	10,3	10,1	10,3	8,5
360	-	10,3	10,3	10,3	10,5	8,9
346	-	10,1	10,3	10,3	10,3	9,1
332	9,9	10,3	10,3	10,5	10,3	9,3
322	-	10,7	10,5	10,5	10,5	9,3
312	-	10,5	10,5	10,5	10,7	-
302	9,3	10,3	10,7	10,5	10,7	8,7
288	9,3	10,3	10,7	10,5	10,7	8,7

TABLA 4

Estudio de la variación de las constantes de acoplamiento $^3J(\text{NH}, ^\beta\text{CH})$ en Hz para los residuos 2 a 9 de OL-9 en función de la temperatura

Temperatura (K)	Residuos							
	2	3	4	5	6	7	8	9
308	9,5	10,1	11,3	10,4	10,1	10,1	10,7	7,9
332	-	9,8	10,4	9,8	10,4	10,4	10,1	8,9

Por otra parte, los dos protones geminales sobre el $^\alpha\text{C}$ presentan unas diferencias significativas de desplazamiento químico ($1,3 < \Delta\delta < 1,6$ ppm para los residuos centrales 3-6 y $\Delta\delta = 1,0$ -1,1 ppm para los residuos 2 y 7). Esta diferencia que refleja una disposición espacial bien definida y distinta para cada uno de los dos protones diastereotópicos portados por el $^\alpha\text{C}$ permanece constante sobre la totalidad del intervalo de temperatura.

En el caso del oligómero OL-7, un examen minucioso de los valores de las constantes $^3J(^{\alpha}\text{CH}_2, \text{N}'\text{H})$ y $^3J(^{\beta}\text{CH}, ^{\alpha}\text{CH}_2)$ para el residuo 3 a 332K (véase la tabla 5 siguiente), revela que el protón $^{\alpha}\text{CH}$ menos desblindado posee una constante de acoplamiento elevada con $\text{N}'\text{H}$ (10Hz) y débil con $^{\beta}\text{CH}$ (2,5 Hz), lo que implica que este protón está en una disposición prácticamente *antiperiplanar* con relación a $\text{N}'\text{H}$ y *sinclinal* con relación a $^{\beta}\text{CH}$.

TABLA 5

Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento para los protones del residuo 3 del compuesto OL-7

Protón	δ (ppm)	J (Hz)
NH	6,64	$^3J(\text{NH}, ^\beta\text{CH}) = 10$
$^\beta\text{CH}$	4,02	$^3J(^{\beta}\text{CH}, ^{\alpha}\text{CH}^{\text{Si}}) = 2,5$; $^3J(^{\beta}\text{CH}, ^{\alpha}\text{CH}, ^{\alpha}\text{CH}^{\text{Re}}) = 11$
$^{\alpha}\text{CH}^{\text{Re}}$	2,53	$^2J(^{\alpha}\text{CH}^{\text{Re}}, ^{\alpha}\text{CH}^{\text{Si}}) = 14$
$^{\alpha}\text{CH}^{\text{Si}}$	3,96	
N'H	6,66	$^3J(\text{N}'\text{H}, ^{\alpha}\text{CH}^{\text{Si}}) = 10$; $^3J(\text{N}'\text{H}, ^{\alpha}\text{CH}^{\text{Re}}) = 3,5$

A continuación, la atribución estereoespecífica se ha realizado suponiendo que los protones $^{\alpha}\text{CH}$ con una amplia constante de acoplamiento $^3J(^{\alpha}\text{CH}_2, \text{N}'\text{H})$ en el espectro COSY son los protones $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Si}}$. Estos datos indican que los oligómeros OL-7 y OL-9 adoptan una estructura secundaria estable y bien definida en disolución.

Para obtener una información más precisa sobre la estructura secundaria, se han grabado unos espectros ROESY con un tiempo de mezclado de 300 ms. Se puede observar un número importante de correlaciones NOE inter-residuos $i/(i+2)$ en la piridina para OL-7 y OL-9, pero asimismo en el metanol con, en particular, unas correlaciones intensas $^{\beta}\text{CH}_i/\text{NH}_{i+2}$, $^{\beta}\text{CH}_i/\text{N}'\text{H}_{i+2}$ repetidas a lo largo de la secuencia (véase la tabla 6 siguiente).

ES 2 301 691 T3

Se recuerda que las correlaciones NOE corresponden a la medición del efecto “overhauser” entre dos protones (K. Wüthrich, NMR of proteins and nucleic acids, 1986, J. Wiley & Sons, Inc).

TABLA 6

NOE inter-residuos para OL-7 en la piridina- d_5 a 332K

	átomo H (residuo i)	átomo H (residuo j)	NOE ^[a]	K = j-i
10	N'H (1)	NH (2)	s	1
	α H _{Si} (1)	NH (4)	w	3
	β CH (1)	N'H (3)	m	2
15	N'H (2)	NH (3)	s	1
	β CH (2)	N'H (3)	m	1
	β CH (2)	NH (4)	m	2
	β CH (2)	N'H (4)	m	2
20	N'H (3)	NH (4)	s	1
	α H _{Si} (3)	N'H (5)	s	2
	β CH (3)	NH (5)	s	2
	β CH (3)	N'H (5)	s	2
25	β CH (3)	α H _{Re} (5)	s	2
	γ CH (3)	α H _{Re} (5)	w	2
	δ CH (3)	α H _{Re} (5)	s	2
30	N'H (4)	NH (5)	s	1
	β CH (4)	NH (6)	m	2
	β CH (4)	N'H (6)	s	2
	N'H (5)	NH (6)	s	1
35	α H _{Si} (5)	NH (7)	w	2
	α H _{Si} (5)	N'H (7)	m	2
	β CH (5)	NH (7)	s	2
	β CH (5)	N'H (7)	m	2
40	β CH (5)	α H _{Re} (7)	m	2
	γ CH (5)	α H _{Re} (7)	m	2
	N'H (6)	NH (7)	s	1
45	β CH (6)	N'H (7)	w	1

[a] fuerte (s), <2,8 Å; medio (m), <3,8 Å; débil (w), <5,5 Å.

Esta repetición de las correlaciones NOE a lo largo de la secuencia está en acuerdo con una hélice de tipo 2.5-(P) ya propuesta en el caso de los γ -péptidos. Se recuerda que una hélice 2.5-(P) es una hélice recta (P) que comprende 2,5 residuos por vuelta.

Las NOE identificadas en el espectro registrado en la piridina se han clasificado por categoría de distancias en función del volumen de los picos. En base a estas imposiciones de distancia y a las informaciones sobre ciertos ángulos de torsión del esqueleto derivadas de las constantes de acoplamiento 3J , se ha realizado una modelización molecular mediante recocido simulado y un estudio mediante dinámica molecular sobre el heptámero OL-7 en colaboración con el grupo de Didier Rognan (UMR CNRS-ULP 7081, Estrasburgo). Este estudio ha confirmado la estructuración en hélice de este oligómero y la estabilidad de la estructura obtenida.

Se trata de una hélice recta que posee un paso de aproximadamente 5 Å y un número de residuos por vuelta de hélice de aproximadamente 2,5. La hélice se estabiliza a lo largo de la secuencia mediante una red de uniones hidrógeno intramoleculares entre el C=O de un residuo i y los dos NH (N'H y NH) de una misma función urea que corresponde a los residuos i+2 e i+3 respectivamente. La unión hidrógeno C=O_i-----NH_{i+3} (que cierra un pseudociclo de 14 átomos) está estadísticamente más presente que la unión hidrógeno C=O_i-----N'H_{i+2} (que cierra un pseudociclo de 12 átomos).

En base al estudio RMN en metanol que confirma la estructura en este disolvente, se ha efectuado un estudio mediante dicroísmo circular (DC) en metanol pero asimismo en agua y en trifluoroetanol (véase la Figura 3). Este

estudio ha revelado una señal característica de la forma helicoidal (máximo a 205 nm) para el heptámero y para el nonámero en el metanol, y una ausencia de señal para unos oligómeros más cortos (véase la Figura 4): un hexámero no da prácticamente ninguna señal a esta longitud de onda. Por lo tanto, se puede deducir que es necesario un mínimo de 7 uniones urea para la formación de la hélice en metanol.

En el caso del oligómero OL-9, el estudio de la señal a 205 nm en función de la temperatura indica que éste es poco sensible a un aumento de la temperatura, y sugiere que la estructura secundaria persiste hasta 60°C, y que el mecanismo de despliegue es no cooperativo (se obtiene una recta de pendiente negativa). En el trifluoroetanol, la señal característica desaparece mientras que en agua subsiste una parte de la señal a 205 nm.

La presencia de una señal fuerte a 205 nm característica de la estructura secundaria en hélice sugiere que el dicroísmo circular se puede usar ventajosamente para identificar rápidamente la presencia de una estructura secundaria en unos oligómeros de urea de secuencia variada.

Ensayo de hemólisis

Principio del ensayo

Un compuesto que actúa sobre las membranas de bacterias puede perturbar potencialmente las membranas de células de mamífero. Los glóbulos rojos o eritrocitos sirven de modelo de células eucariotas en las que el grado de la permeación membranaria es fácilmente evaluado mediante la medición de la cantidad de hemoglobina liberada a través de los poros de las membranas fragilizadas y cuya concentración es directamente proporcional a la densidad óptica a 450 nm.

Uso del ensayo

Los eritrocitos se preparan a partir de sangre de simio tomada recientemente (macaco). La sangre heparinizada se centrifuga y se lava tres veces con PBS frío, y se resuspende a 10% (v/v) en el PBS. A 90 µl de suspensión de glóbulos rojos se añaden 10 µl de una disolución acuosa de los productos a ensayar. Los eritrocitos se incuban durante una hora a 37°C. La suspensión se centrifuga a fin de recuperar el sobrenadante que es más o menos rojo según el grado de hemólisis. La concentración de hemoglobina liberada en el sobrenadante se mide mediante densidad óptica a 450 nm. En el control negativo, los glóbulos rojos se incuban en ausencia de producto y muestran una DO de 0. La hemólisis al 100% se obtiene con 100 µg de cloruro de cetilpiridinio por ml de suspensión. El grado de hemólisis se evalúa con relación al control positivo para las diferentes concentraciones de los productos ensayados.

Resultados

Los resultados del ensayo de hemólisis se resumen en la gráfica de la Figura 5.

Se observa que para una concentración de 1 mg/ml, OL-9 conduce al 10% de hemólisis mientras que los péptidos de control L y D con las mismas cadenas laterales conducen respectivamente, a la misma concentración, a aproximadamente el 50% y a más del 60% de hemólisis. Por lo tanto, se puede concluir que los péptidos naturales son relativamente tóxicos para las células eucariotas, mientras que el oligómero OL-9, que muestra una actividad antimicrobiana, es poco o nada tóxico para las células eucariotas a unas dosis del orden de 1 mg/ml.

Ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana y/o antifúngica

Principio del ensayo

Los compuestos ensayados pertenecen todos a la clase poliureas y se han obtenido en el seno del laboratorio por vía química. Se han realizado unos ensayos de inhibición de crecimiento de bacterias y de hongos en unos ensayos líquidos. La actividad específica de cada molécula se expresa mediante la concentración mínima inhibidora de crecimiento de las bacterias y/o hongos, anotada CMI. La CMI es un valor específico para cada compuesto, y varía en función de los organismos ensayados. Se debe observar que los valores de la CMI siguen una progresión logarítmica, lo que se debe a una dilución dos a dos de los compuestos ensayados en una serie de ensayos. Las moléculas ensayadas se han presentado en forma de sales solubles en agua, y así el medio de cultivo de los microorganismos.

Uso del ensayo

Para la realización de los ensayos, se han usado placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 90 µl de una suspensión de bacterias diluidas en medio PB (Poor Broth, Difco) para obtener una concentración final de 1 mDO. Se añaden a los ensayos 10 µl del compuesto en disolución en agua estéril con unas concentraciones comprendidas entre 1 mg/ml y 2 µg/ml. Las placas se agitan a 29°C durante 24 horas. El crecimiento de las bacterias se mide mediante la medición de la turbidez del medio de cultivo mediante la medición de la DO a 595 nm. El valor de la CMI corresponde a la concentración de las sustancias a ensayar en la que no se observa ningún crecimiento de bacterias (DO = 0).

Los ensayos antifúngicos se realizan de manera similar con ½ PDB (Potato dextrose broth, Difco) como medio de cultivo, y 10.000 esporas por ml de cultivo. Es necesario un control óptico con microscopio de óptica inversa en

ES 2 301 691 T3

el caso de los hongos para evaluar la formación de los micelios de los hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*). La CMI se determina después de 48 horas de cultivo a 29°C, y corresponde a la concentración en la que no se observa ninguna formación de micelios.

- 5 Se han usado unos controles internos. Se trata del cloruro de cetilpiridinio y del bromuro de decualinio, antisépticos habituales (Merck index).

Resultados

- 10 Oligómero 9 (OL-9)

$$\text{M.W. (+ 3 TFA)} = 1732,82 \text{ g.mol}^{-1}$$

- 15 Péptido L (control)

$$\text{M.W. (+ 3 TFA)} = 1472,44 \text{ g.mol}^{-1}$$

Concentración de inhibición mínima	Bacterias	
	OL-9	Péptido L (control)
<i>E. coli</i> D363	4,1 µg/ml 2,4 µM	3,8 µg/ml 2,6 µM
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,1 µg/ml 4,7 µM	> 121 µg/ml
<i>Salmonella cloacae</i>	4,1 µg/ml 2,4 µM	3,8 µg/ml 2,6 µM
<i>Micrococcus luteus</i>	4,1 µg/ml 2,4 µM	3,8 µg/ml 2,6 µM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,5 µg/ml 19 µM	121 µg/ml 82 µM
<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 100 µg/ml	121 µg/ml 82 µM
<i>Neurospora crassa</i>	23,5 µg/ml 18 µM	30 µg/ml 20 µM

- 45 Las concentraciones de los compuestos ensayados en una serie de ensayos están comprendidas entre 100 µg/ml de cultivo y 0,2 µg/ml. Unas actividades comprendidas entre unos valores de 10 y 50 µg/ml se consideran como débiles. Unos compuestos con unas actividades entre 0,1 y 10 µg tienen unas actividades del mismo orden de magnitud que unos antibióticos comerciales. Los mejores de los compuestos ensayados tienen una actividad de 3 µg/ml con un amplio espectro de actividades.

- 50 Resulta de este estudio que el oligómero OL-9 posee un espectro amplio de actividad antibacteriana (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*) y que esta familia de oligómeros no naturales y sus análogos oxigenados (oligocarbamatos) representan unos candidatos interesantes para la elaboración de nuevos antibióticos.

Ensayo de evaluación de la capacidad de internalización de los oligómeros

- 60 Las oligoureas se disuelven en un tampón fosfato (PBS, pH = 7,2), su concentración se determina mediante absorción de la fluoresceína a 490 nm. El pesaje de la muestra seguido de su disolución en un volumen conocido de tampón PBS permite establecer con precisión la concentración del vehículo. Las concentraciones determinadas mediante espectroscopia UV son coherentes con las cantidades medidas manualmente. Se ha usado la línea de células T Jurkat, cultivada en 10 µl de suero de ternera fetal en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para todas las mediciones de internalización celular. Se añaden unas cantidades variables de oligómeros a 3×10^5 células en un volumen total de 200 µl en unos pocillos de placas de microtitulación, y se incuban durante 3 minutos a 23°C. Las placas se centrifugan, las células se aíslan y se lavan 3 veces con PBS frío, y después se resuspende en PBS que contiene 0,1% de yoduro de propidio. Entonces, las células se analizan mediante citometría en flujo con fluorescencia (Faxscan, Becton Dickinson), y se excluyen del análisis las células marcadas con yoduro de propidio.

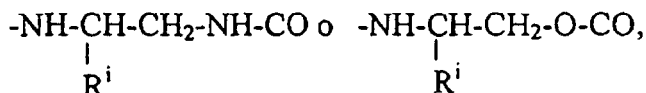
REIVINDICACIONES

1. Uso de los compuestos de fórmula general:



en la que

- n está comprendido entre 6 y 20,
- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,
siendo R_a la fluoresceína o un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH, un grupo maleimida,
con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,
- A representa indiferentemente un grupo



* siendo R' un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

* siendo i un número entero comprendido entre 1 y n.

- Y es un grupo NR_bR_c , teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R^i ,

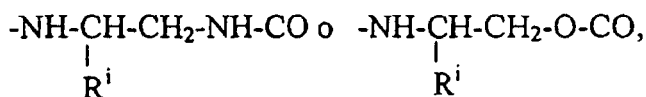
para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades bacterianas, fúngicas o citotóxicas, y en particular de infecciones fúngicas tales como las aspergilosis y las candidosis, y de infecciones bacterianas resistentes.

2. Compuestos de fórmula general:



en la que

- n está comprendido entre 6 y 20,
- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,
siendo R_a la fluoresceína o un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH, alquilo (C1-C4), NH_2 , CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH, un grupo maleimida,
con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,
- A representa indiferentemente un grupo



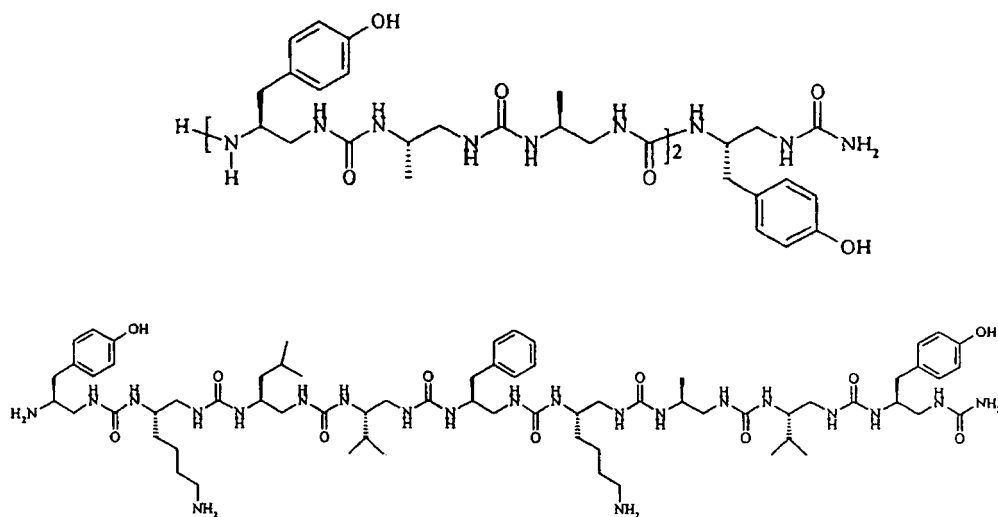
* siendo R' un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquino (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo

dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO₂, OH, amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH₂, CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

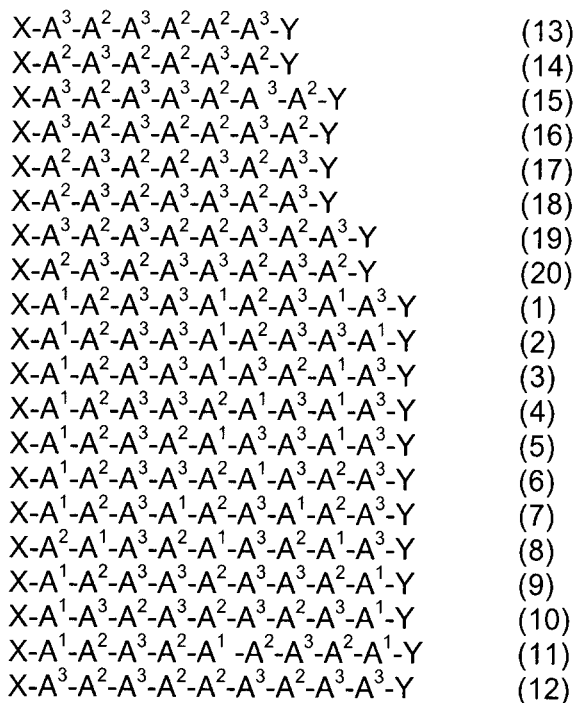
* siendo i un número entero comprendido entre 1 y n.

- Y es un grupo NR_bR_c, teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R',

con la condición de que estén excluidos los compuestos que responden a las fórmulas siguientes:



3. Compuestos según la reivindicación 2, **caracterizados** porque n es igual a 6, 7, 8 ó 9, y porque responden a las siguientes fórmulas:



en las que:

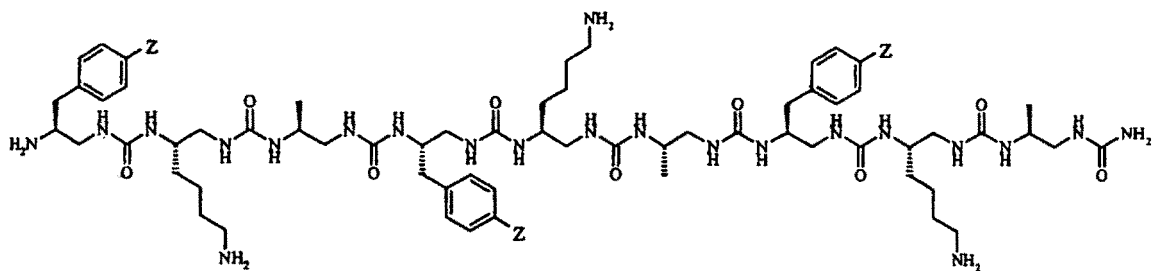
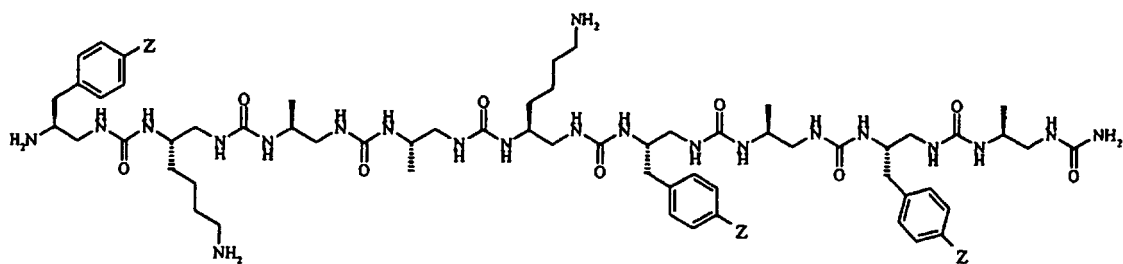
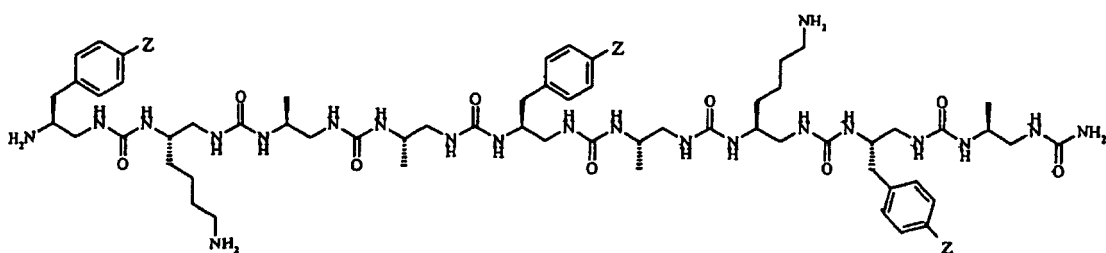
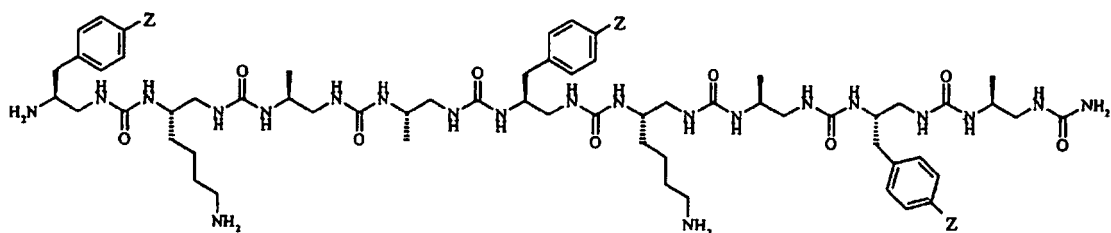
- X y Y son tal como se han definido en la reivindicación 2,

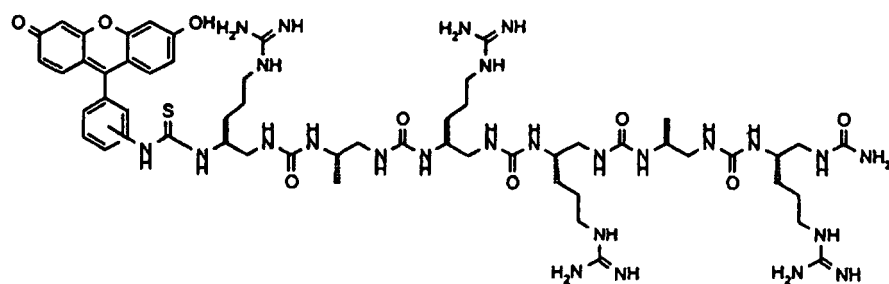
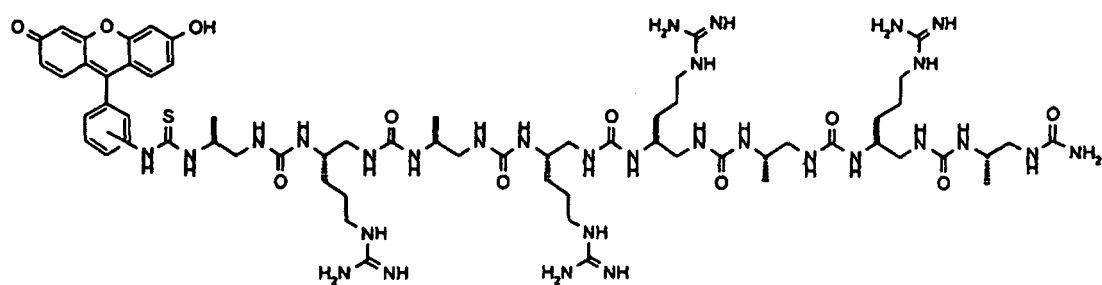
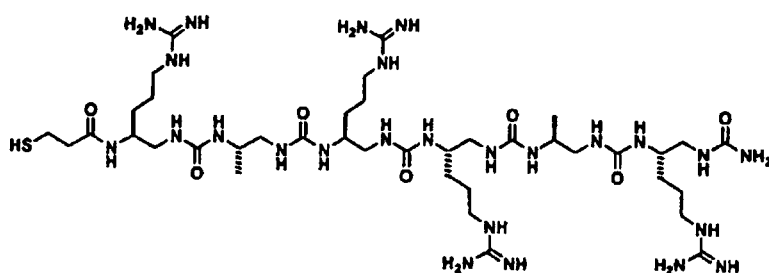
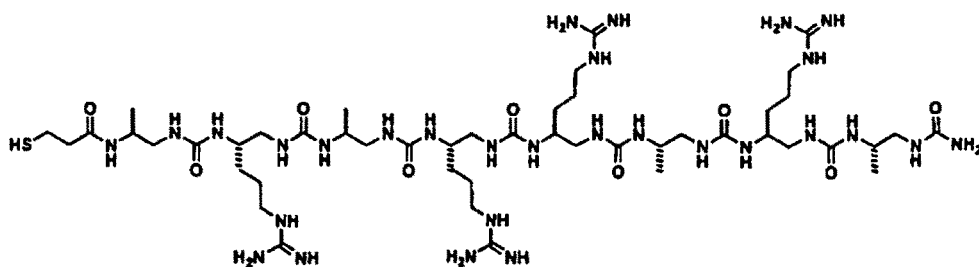
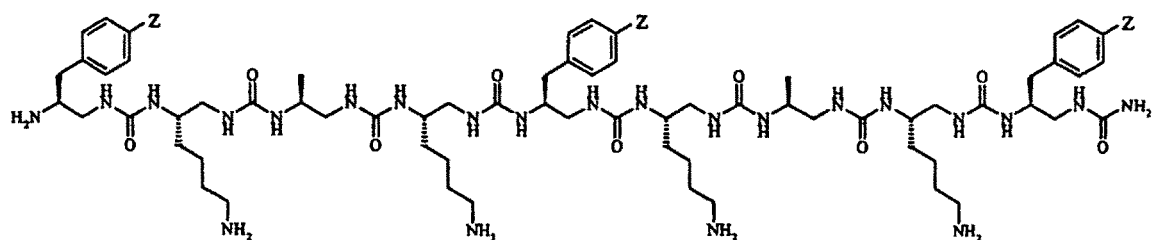
- A¹ corresponde al grupo A tal como se ha definido en la reivindicación 2, en el que R' representa una cadena lateral aromática, tal como un grupo bencilo que corresponde a la cadena lateral de la fenilalanina, 4-hidro-

xibencilo que corresponde a la cadena lateral de la tirosina o (3-indolil)metilo que corresponde a la cadena lateral del triptófano,

- A² corresponde al grupo A tal como se ha definido en la reivindicación 2, en el que R¹ representa una cadena básica que corresponde a la lisina $(-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2)$, la arginina $(-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2)$ o la ornitina $(-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2)$, o un grupo alquilo (C1-C10), alquenilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un grupo amidina, NH_2 , guanidina,
- A³ corresponde al grupo A tal como se ha definido en la reivindicación 2, en el que R¹ representa una cadena lateral hidrófoba de tipo metilo que corresponde a la cadena lateral de la alanina, isopropilo que corresponde a la cadena lateral de la valina, isobutilo que corresponde a la cadena lateral de la leucina y sec-butilo que corresponde a la cadena lateral de la isoleucina.

4. Compuestos según la reivindicación 3, que responden a las siguientes fórmulas:





en las que Z representa o bien un átomo de hidrógeno o bien un grupo OH.

ES 2 301 691 T3

5. Compuestos según una de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizados** porque al menos 10%, ventajosamente entre 10% y 50%, de los sustituyentes Rⁱ son unas cadenas laterales de aminoácidos con carácter básico.

6. Compuestos según la reivindicación 5, **caracterizados** porque las cadenas laterales de aminoácidos con carácter 5 básico comprenden unos grupos de aminas primaria, secundaria o terciaria, unos grupos imidazol, guanidina, amidina o benzamidina.

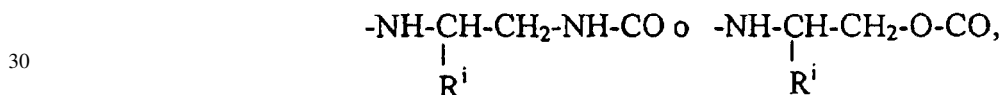
7. Compuestos que poseen una estructura en hélice y que responden a la fórmula general siguiente:

$$10 \qquad X - (A)_n = Y, \qquad (I)$$

en la que

- 15 - n está comprendido entre 6 y 20,
- X representa un átomo de hidrógeno, un grupo R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO , R_aSO_2 o R_aNHCS ,
- 20 siendo R_a un grupo alquilo (C1-C10), alquenilo (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14), heteroarilo (C1-C5), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO_2 , OH , alquilo (C1-C4), NH_2 , CN , trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina, un grupo SH , un grupo maleimida, la fluoresceína,
- con la condición de que X sea diferente de H cuando n es igual a 6,

- A representa indiferentemente un grupo

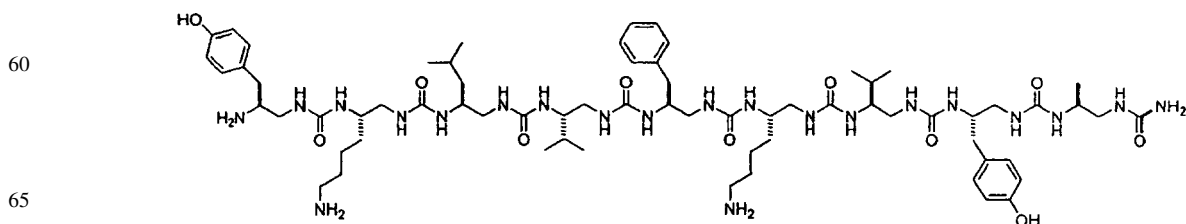


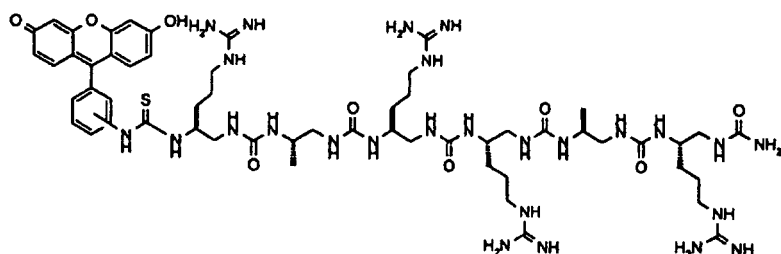
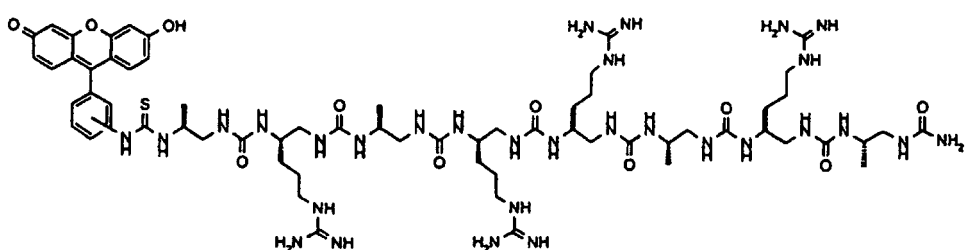
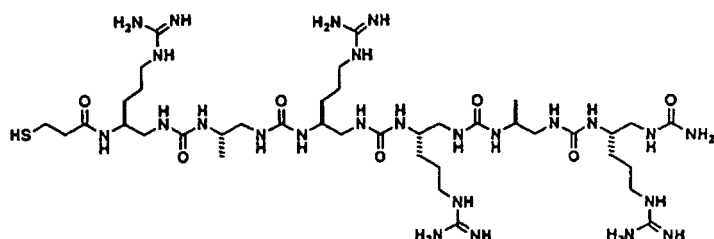
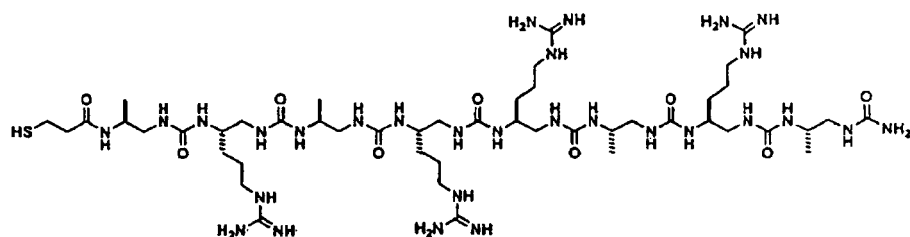
- 35 * siendo R' un átomo de hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo (C1-C10), alqueno (C1-C10), alquinilo (C1-C10), arilo (C5-C12), aralquilo (C5-C14) o heteroarilo (C1-C10), pudiendo dichos grupos estar no sustituidos o sustituidos por 1 a 6 sustituyentes seleccionados de entre: un átomo de halógeno, un grupo NO₂, OH, amidina, benzamidina, imidazol, alcoxi, alquilo (C1-C4), NH₂, CN, trihalometilo, aciloxi (C1-C4), dialquilamino (C1-C4), guanidina,

- * siendo i un número entero comprendido entre 1 y n .

- Y es un grupo NR_bR_c, teniendo R_b y R_c el significado indicado anteriormente para R',
presentando dicha hélice las siguientes características
- es de paso regular a la derecha, comprendido entre 4,9 Å y 5,3 Å, y en particular igual a 5 Å,
- comprende de 2,4 a 2,6 residuos por vuelta y en particular 2,5 residuos por vuelta,
- su diámetro interior calculado a partir de los centros de los átomos está comprendido entre 3,8 Å y 4,6 Å, y en particular es igual a 4,2 Å,
- su diámetro interior calculado a partir de la superficie de Van der Waals está comprendido entre 1,4 Å y 1,8 Å, en particular es igual a 1,6 Å.

8. Compuesto según la reivindicación 7, que responde a la siguiente fórmula:





9. Composición que contiene al menos un compuesto según la reivindicación 7, y al menos un disolvente, teniendo dicho disolvente la propiedad de conferir a las moléculas de dicho compuesto una forma helicoidal, incluso parcialmente, en el caso de un equilibrio conformacional entre las moléculas de dicho compuesto en forma helicoidal y las moléculas de dicho compuesto en forma no helicoidal, y siendo seleccionado en particular de entre los alcoholes, la piridina, el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido, el agua en presencia o no de micelas o de lípidos, y siendo ventajosamente seleccionado de entre el agua en presencia o no de micelas, el metanol, el etanol, el isopropanol, el trifluoroetanol, el hexafluoroisopropanol, el dimetilsulfóxido, o cualquier mezcla de dichos disolventes.

10. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende, a título de sustancia activa, uno al menos de los compuestos según una de las reivindicaciones 2 a 6, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, **caracterizada** porque contiene por dosis unitaria de 10 a 2.000 mg de uno de los compuestos según una de las reivindicaciones 2 a 6.

12. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende el compuesto según la reivindicación 8, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

13. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende, a título de vector farmacéutico, uno al menos de los compuestos según una de las reivindicaciones 2 a 8 en asociación con una sustancia farmacéuticamente activa.

ES 2 301 691 T3

14. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 2 a 8 como vector farmacéutico.

15. Procedimiento de preparación en fase sólida de los compuestos de fórmula (I) según la reivindicación 2, a partir de monómeros preactivados de fórmula GP-A-W, en la que:

- GP es un grupo protector seleccionado de entre Fmoc, Teoc, ftalimida, Alloc, BOC y Cbz,
- A es tal como se ha definido en la reivindicación 2,
- W procede del grupo W-H seleccionado de entre: N-hidroxisuccinimida, fenol, pentafluorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dicloro-6-nitrofenol, hidroxí-1,2,3-benzotriazol, 1-oxo-2-hidroxi-1,2,3-benzotriazina (HODhbt), 7-aza-1-hidroxí-benzotriazol (HOAt), 4-aza-1-hidroxibenzotriazol (4-HOAt), imidazol, tetrazol, y resina WANG, y es preferentemente N-hidroxisuccinimida o p-nitrofenol,

caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- f) una etapa de acoplamiento de GP-A-W tal como se ha definido anteriormente sobre la función amina de un soporte, permitiendo dicha etapa el injerto del grupo -A-GP sobre dicha función amina de dicho soporte,
- g) una etapa de escisión del grupo GP en condiciones apropiadas,
- h) la repetición secuencial de las etapas a) y b) hasta que n grupos A hayan sido injertados sobre dicho soporte,
- i) una etapa de introducción de los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 , siendo R_a tal como se ha definido en la reivindicación 2,
- j) una etapa de escisión del compuesto de fórmula (I) del soporte mediante unos medios apropiados, que permite el desenganche de la resina y la liberación del grupo Y, tal como se ha definido en la reivindicación 2.

16. Procedimiento de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la etapa a) se puede efectuar en presencia o no de una base terciaria tal como DIEA, colidina, NMM o lutidina, y en presencia o no de un catalizador tal como HOBt.

17. Procedimiento de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la etapa a) se puede efectuar en un disolvente tal como el DMF, CH_2Cl_2 , THF o N-metilpirrolidona.

18. Procedimiento de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el grupo GP es un grupo Fmoc.

19. Procedimiento de preparación en fase líquida de los compuestos de fórmula (I) según la reivindicación 2, a partir de monómeros preactivados de fórmula GP-A-W, en la que:

- GP es un grupo protector seleccionado de entre Fmoc, Alloc, BOC y Cbz,
- A es tal como se ha definido en la reivindicación 2,
- W procede del grupo W-H seleccionado entre: N-hidroxisuccinimida, fenol, pentafluorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dicloro-6-nitrofenol, hidroxí-1,2,3-benzotriazol, 1-oxo-2-hidroxi-1,2,3-benzotriazina (HODhbt), 7-aza-1-hidroxí-benzotriazol (HOAt), 4-aza-1-hidroxibenzotriazol (4-HOAt), imidazol y tetrazol, y es preferentemente N-hidroxisuccinimida o p-nitrofenol,

caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- f) una etapa de acoplamiento de GP-A-W tal como se ha definido anteriormente sobre la función amina del grupo A del derivado H-A-Y,
- g) una etapa de escisión del grupo GP en condiciones apropiadas,
- h) la repetición secuencial de las etapas a) y b) hasta que n grupos A hayan sido injertados sobre la función amina mencionada anteriormente,
- i) una etapa de introducción de los grupos R_aCO , R_aOCO , R_aNHCO o R_aSO_2 , siendo R_a tal como se ha definido en la reivindicación 2,
- j) una etapa de escisión del compuesto de fórmula (I) mediante unos medios apropiados.

ES 2 301 691 T3

20. Procedimiento de preparación de los compuestos según la reivindicación 7, mediante la puesta en contacto de uno de los compuestos definidos en la reivindicación 2 o de uno de los compuestos de fórmula (VIIc) o (VIId), con un disolvente tal como el metanol, el etanol, el trifluoroetanol, el hexafluoroisopropanol, el agua, o con unos tampones biológicos, tales como unos tampones fosfato salinos o no, o con un medio micelar o lipídico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

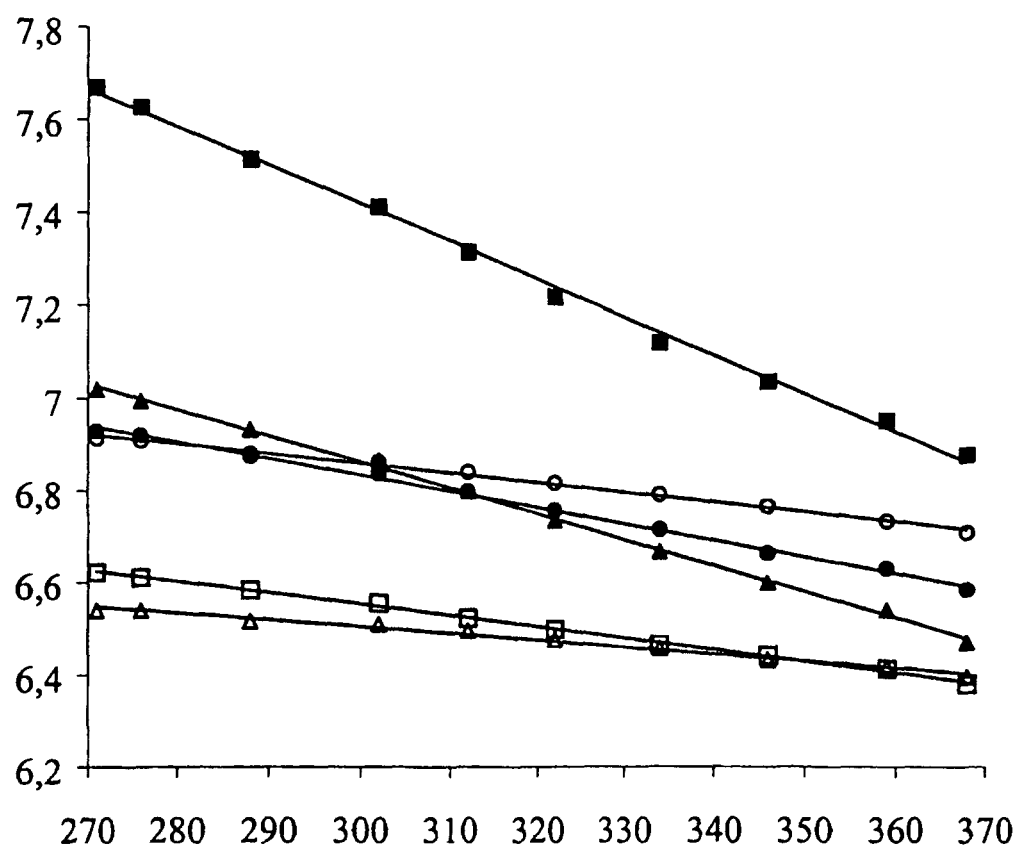


FIGURA 1

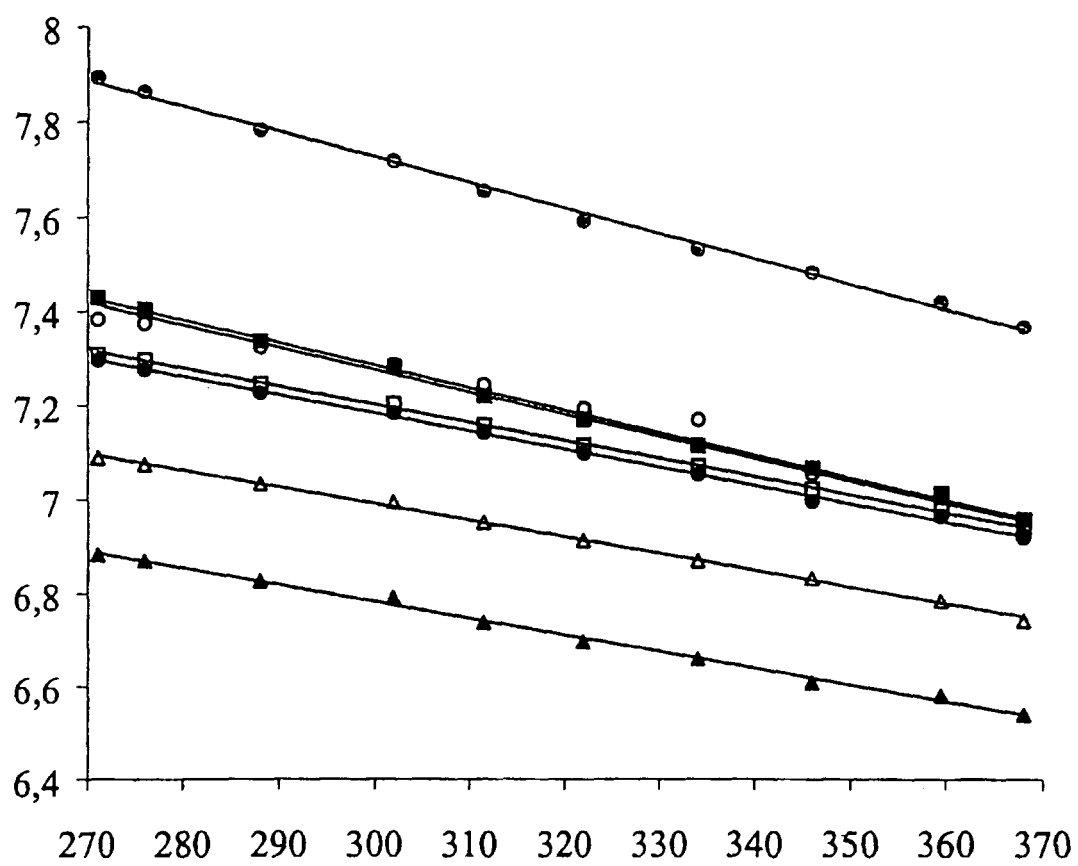


FIGURA 2

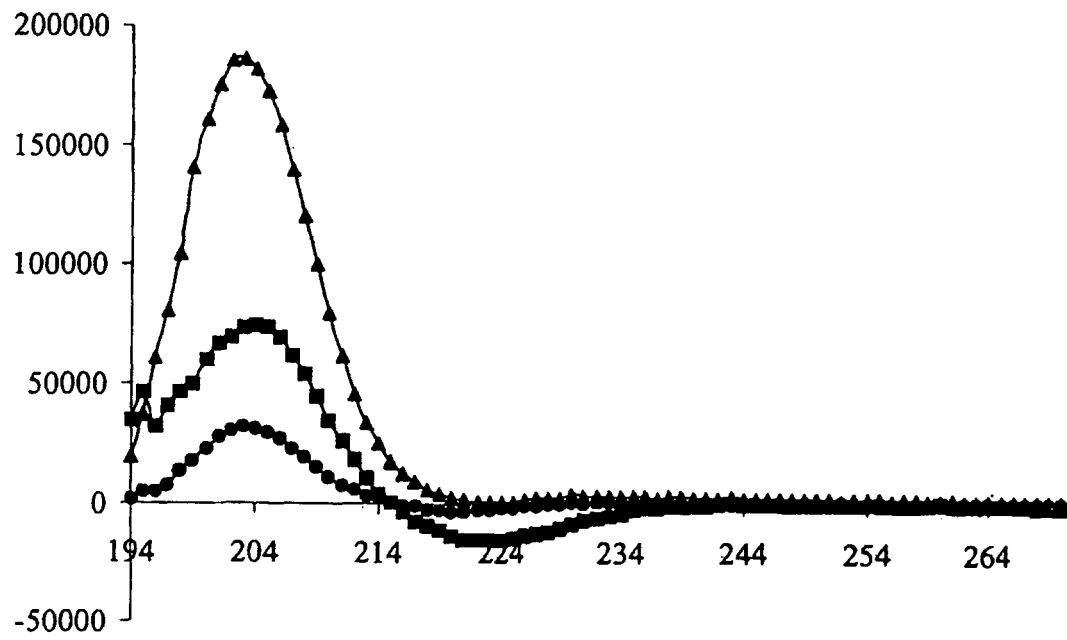


FIGURA 3

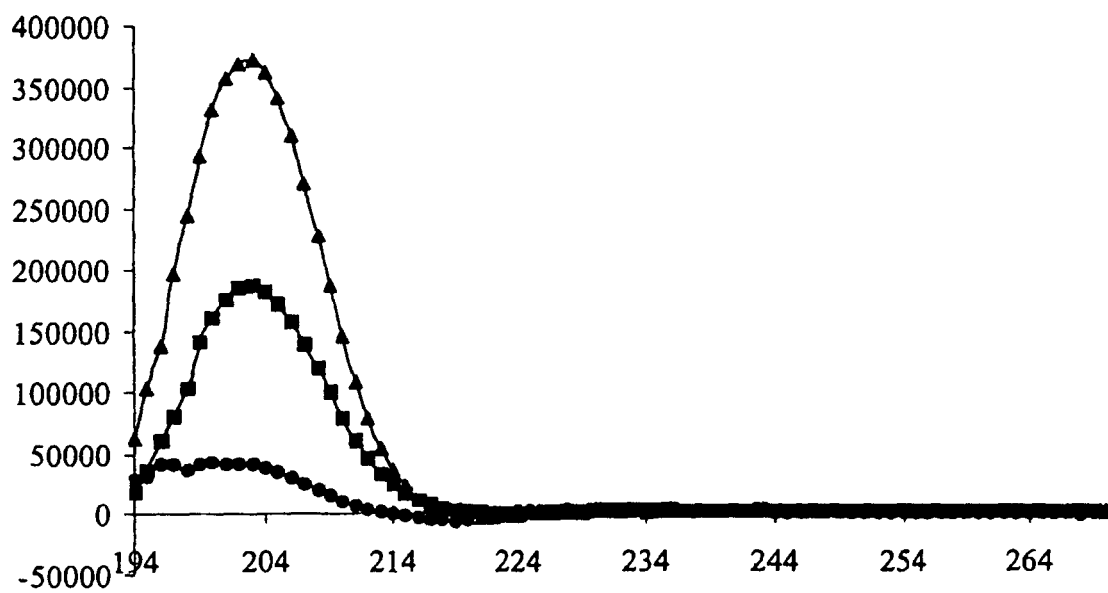


FIGURA 4

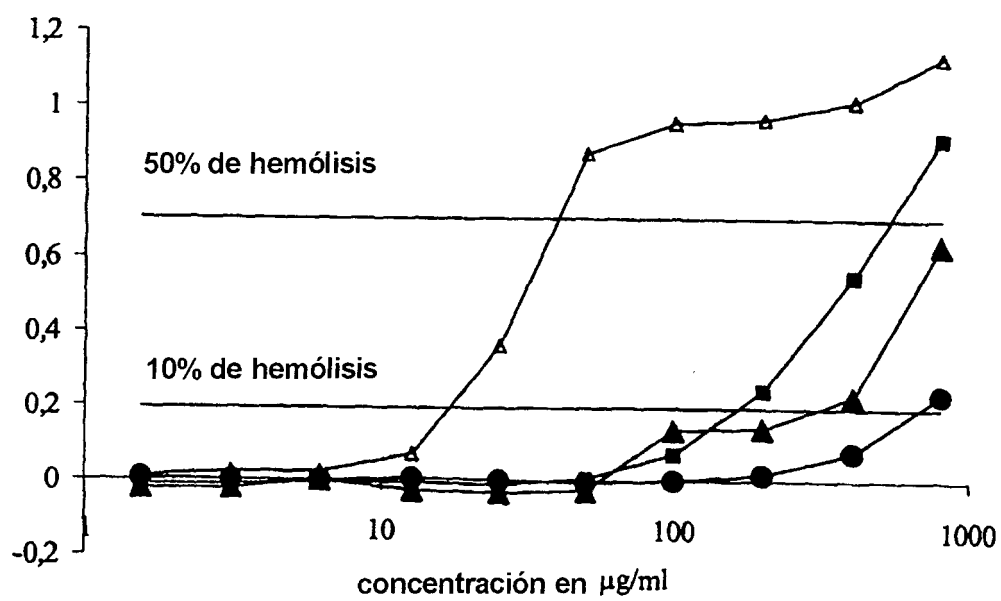


FIGURA 5