(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
16 de octubre de 2014 (16.10.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/167160 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 7/62 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070286

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de abril de 2014 (10.04.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201330519 12 de abril de 2013 (12.04.2013) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSITAT DE BARCELONA** [ES/ES]; Centre de Patents de la UB, Baldiri Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES). **FUNDACIÓ CLÍNIC PER A LA RECERCA BIOMÈDICA** [ES/ES]; Rosselló 149-153, E-08036 Barcelona (ES). **HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA** [ES/ES]; Villarroel 170, E-08036 Barcelona (ES).

(72) Inventores: **RABANAL ANGLADA, Francesc**; Torres Vilaró 56, E-08859 Begues (Barcelona) (ES). **CAJAL VISA, Yolanda C.**; Torres Vilaró 56, E-08859 Begues (Barcelona) (ES). **GRAU CAMPISTANY, Ariadna**; Sabino Arana 60, E-08028 Barcelona (ES). **VILA ESTAPÉ, Jordi**; Santa Anna 2, 1r 2a, E-08901 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona) (ES). **VILA FARRÉS, Xavier**; Santa Anna 2, 1r 2a, E-08901 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona) (ES).

(74) Mandatario: **SEGURA CÁMARA, Pascual**; Centre de Patents de la UB, Baldiri Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES).

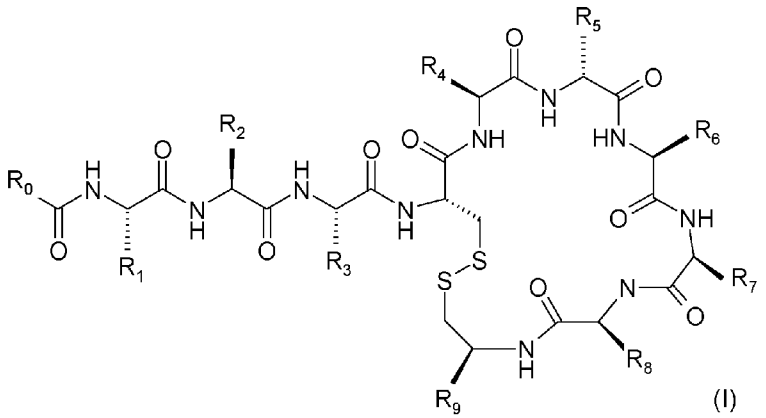
(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PEPTIDE COMPOUNDS SUITABLE FOR USE AS ANTIBIOTIC AGENTS

(54) Título : COMPUESTOS PEPTÍDICOS ÚTILES COMO AGENTES ANTIBIÓTICOS



(I)

(57) Abstract: The invention relates to compounds of formula (I), wherein R_0 is a CH_3-$(CH_2)_m$- radical, wherein m is an integer between 4 and 10; R_1, R_3, R_4, R_7 and R_8 are independently selected radicals which have the following formula: GF-(CH_2)n-; wherein n is an integer between 1 and 4; and GF is a radical selected among the group that consists of -NH_2 and -NH-C(=NH)-NH_2; R_2 is a -$CH(CH_3)$(OH), the CH of R_2 being in either of the two configurations, R or S in the formula (I), giving rise to the corresponding epimers or to a mixture thereof; R_5 is a -(CH_2)-R_{10} radical; R_6 is a straight or branched C4-alkyl radical; R_9 is a radical selected among -$CONH_2$ and -COOH; and R_{10} is a phenyl radical substituted with 1 to 5 identical substituents selected from the group that consists of F and $(C_1$-$C_2)$-alkyl, said compounds having been shown to be useful in the treatment of bacterial infections.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2014/167160 A1

Declaraciónes según la Regla 4.17:

— *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

Los compuestos de fórmula (I), donde R0 es un radical CH_3-$(CH_2)_m$-, donde m es un número entero entre 4 y 10; R_1 R_3, R_4, R_7 y R_8 son radicales seleccionados independientemente que tienen la fórmula siguiente: GF-(CH_2)n-; 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 -CH(CH_3)(OH) estando en la fórmula (I) el CH del R_2 en cualquiera de las dos configuraciones, R o S, dando lugar a los correspondientes epímeros o a una mezcla de los mismos; R_5 es un radical -(CH_2)-R_{10}; R_6 es una radical C4-alquilo lineal o ramificado; R9 es un radical seleccionado entre -$CONH_2$ y -COOH; y R_{10} es un radical fenilo sustituido con uno a 5 sustituyentes iguales seleccionados del grupo que consiste en F y (C_1-C_2)-alquilo, se ha encontrado que son útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Compuestos peptídicos útiles como agentes antibióticos

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.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El hecho de que ciertos microorganismos patógenos se hayan convertido en resistentes a las terapias antibióticas es un problema grave de 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.

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 vancomincina y ciertas bacterias Gram-negativas como Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli. 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.

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 constituyen 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, está adquiriendo una nueva relevancia terapéutica y está empezando a ser considerado como un representante de la clase de antibióticos activos contra bacterias multiresistentes.

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 la 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.

Más recientemente, se han descrito algunos compuestos lipídicos basados en la estructura de la polimixina natural que tienen actividad antibiótica y actúan sobre el componente lipídico de las membranas bacterianas y que son activos tanto contra bacterias Gram-postivas como contra Gran negativas (cf. WO2010029196 y WO2011110716).

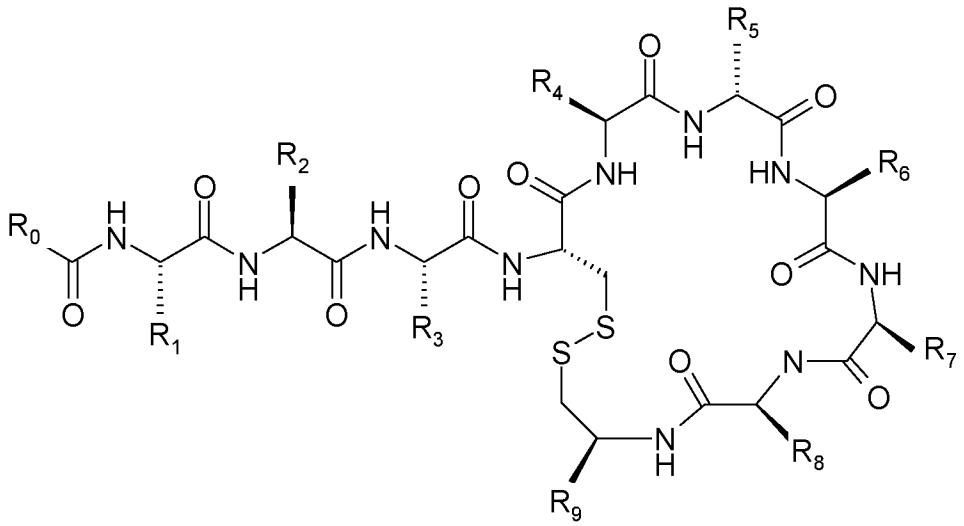
De lo que se conoce en el estado de la técnica se deriva que la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos activos no sólo contra bacterias Gram-negativas sino también contra bacterias Gram-positivas es un campo activo y que todavía existe la necesidad de encontrar compuestos con actividad contra bacterias resistentes.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han encontrado nuevos 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.

Estructuralmente estos compuestos se caracterizan por contener algunos sustituyentes específicos de entre los mencionados en la solicitud WO2011110716 y por la presencia de un fenilo modificado con átomos de flúor o grupos metilo. Inesperadamente, estos compuestos presentan una actividad mayor frente a determinadas bacterias que la que presentan los compuestos más cercanos del estado de la técnica descritos en la WO2011110716 y además son activos frente a bacterias resistentes a algunos antibióticos convencionales.

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



(I)

donde: R_0 es un radical CH_3-$(CH_2)_m$-, donde m es un número entero entre 4 y 10; R_1, R_3, R_4, R_7 y R_8 son radicales seleccionados independientemente que tienen la fórmula siguiente: GF-$(CH_2)_n$-; 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 $-CH(CH_3)(OH)$ estando en la fórmula (I) el CH del R_2 en cualquiera de las dos configuraciones, R o S, dando lugar a los correspondientes epímeros o a una mezcla de los mismos; R_5 es un radical $-(CH_2)-R_{10}$; R_6 es una radical C_4-alquilo lineal o ramificado; R_9 es un radical seleccionado entre $-CONH_2$ y -COOH; y R_{10} es un radical fenilo sustituido con uno a 5 sustituyentes iguales seleccionados del grupo que consiste en F, (C_1-C_2)-alquilo y CF_3.

En una realización particular, en la fórmula (I) el CH del R_2 está en una de las dos configuraciones, R o S,

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos anteriormente mencionados donde R_{10} es un radical fenilo sustituido con uno a 5 sustituyentes iguales seleccionados del grupo que consiste en F y CH_3.

En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_{10} es un fenilo sustituido con átomos de flúor. En una realización todavía más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde
R_{10} es un fenilo sustituido con grupos metilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde m es un número entero entre 5 y 10.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde m es un número entero entre 7 y 10; n es un entero entre 1 y 3; R_6 es una radical CH_3-$(CH_2)_3$-; y R_9 es un radical -$CONH_2$.
En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_0 es un radical CH_3-$(CH_2)_8$-.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_1, R_3, R_4, R_7, y R_8 son radicales iguales de fórmula -CH_2-CH_2-NH_2.

Los compuestos más preferidos de fórmula (I) se seleccionan de entre los siguientes:

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(p-fluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys],

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(pentafluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys], y

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(4-metil)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys].

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.

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

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; (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_2Cl_2) varias veces; y (vi) lavado con DMF varias veces.

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

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 Micobacterium phlei, Staphylococcus aureus, Enterococus faecalis y Staphylococcus aureus resistente a metilicina (MRSA).

En una realización particular, las bacterias Gram-positivas se seleccionan entre Micobacterium phlei ATCC41423, Staphylococcus aureus ATCC 29213, Enterococus faecalis ATCC 29212 y Staphylococcus aureus resistente a metilicina ATCC 43300.

En una realización preferida, la bacteria Gram-positiva es MRSA.

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.

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 causadas por bacterias Gram-positivas, en particular a las infecciones

mencionadas anteriormente, el método comprende la administración al mencionado paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

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 Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Acinetobacter sp.

En una realización particular, las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Escherichia coli ATCC 25922 y Acinetobacter sp ATCC 5798.

En una realización preferida, la bacteria Escherichia coli se selecciona del grupo que consiste en Escherichia coli NDM-1, Escherichia coli VAL-10, Escherichia coli VAL-5 y Escherichia coli MAC21A y la bacteria Pseudomonas aeruginosa se selecciona del grupo que consiste en Pseudomonas aeruginosa 38a y Pseudomonas aeruginosa 38b.

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.

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 causadas por bacterias Gram-negativas, en particular a las infecciones mencionadas anteriormente, el método comprende la administración al mencionado paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) como se han definido anteriormente, junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

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 otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) se pueden utilizar en el tratamiento de bacteremias y/o septicemia consecuencia de infecciones por bacterias Gram-positivas, administrados solos o en combinación con antibióticos convencionales.

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.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular de compuesto administrado según esta invención será por supuesto determinada por las condiciones particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la ruta de administración, la condición particular que se está tratando, y las consideraciones similares.

La expresión "excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a materiales farmacéuticamente aceptables, composiciones o vehículos. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. Debe ser también apto para el uso en contacto con tejidos u órganos de humanos y animales sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica, immunogenicidad u otros problemas o complicaciones acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

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.

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 para la descontaminación del tracto digestivo previa a cirugía, parenteral, inhalatoria, rectal, transdérmica o tópica.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía parenteral o por vía tópica.

En el uso terapéutico para tratar o combatir infecciones bacterianas dichos compuestos o composiciones farmacéuticas, preferentemente, se administran a una dosis para obtener o mantener una concentración que sea efectiva como antibacteriano. Por ejemplo, por vía parenteral 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.

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: Boc, tert-butoxicarbonilo; Dab: ácido 2,3-diaminobutírico; DIEA, N,N-diisopropiletilamina; DIPCDI, N,N'-diisopropilcarbodiimida; DMF, N,N-dimetillformamida; DMSO, dimetilsulfoxido; Fmoc, 9-fluorenylmetoxicarbonilo; HATU, 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato; HBTU, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato; HOBt, 1-hidroxibenzotriazol; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; MALDI-TOF, ionización por desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo; MS, espectrometría de masas; CMI, concentración mínima inhibitoria; MW, peso molecular; tBu, tert-butilo; TFA, ácido trifluoroacético; Trt, tritilo; MHB: Múller-Hinton broth.

Métodos generales

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

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_2Cl_2 (5 x 30 s); (vi) prueba de Kaiser (con una muestra de resina peptídica); (vii) lavado con DMF (5 x 30 s).

El método general de desanclaje y desprotección de los péptidos consistió en un tratamiento con ácido trifluoroacético/1,2-etanoditiol/tioanisol/fenol/H_2O /triisopropilsilano (68.5/10/10/5/3.5/1, v/v, 3 ml/100 mg de resina, 3h) en un reactor. La solución de TFA se filtró y la resina se recogió. Se lavó con dos porciones adicionales de 0.5 ml de mezcla de TFA (0.5 mL) y los lavados se juntaron. 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.

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 y se siguió por HPLC y MS.

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 1 pulgada C18 (250 x 1 pulgada., 10 µm) y se eluyó en gradiente con mezclas de H_2O-acetonitrilo-0.05% TFA y detección UV a 220 nm.

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

La homogeneidad de los péptidos purificados se comprobó por HPLC analítica empleando columnas Merck o Kromasil C18 de fase reversa (4 x 250 mm, 5 µm de diámetro de partícula). La elución se llevó a cabo a 1 $ml \cdot min^{-1}$ con mezclas de H_2O-0.05% TFA y acetonitrilo-0.05% TFA y detección UV a 220 nm.

Ejemplo 1: Preparación de decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S-S*)[Cys-Dab-(p-fluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys] (compuesto de fórmula (I) con R_o = $CH_3(CH_2)_8$-, R_1 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_2 = $-CH(CH_3)OH$, (cadena lateral de Thr), R_3 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_4 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_5 =- CH_2 (*para*-fluoro)Ph (cadena lateral de D(p-fluoroPhe), R_6 = $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ (cadena lateral de

Nle), R7 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), y R_8 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab)

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-(para-fluoro)DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-DCys(Trt)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/^{t}Bu en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno. Se utilizó la resina Fmoc-Rink amida MBHA (300mg, 0.144 mmoles, f= 0.48mmol/g de resina). Los aminoácidos de la secuencia se introdujeron según un protocolo estándar de síntesis en fase sólida Fmoc/^{t}Bu como se ha descrito anteriormente. Una vez la secuencia se completó, se introdujo el ácido graso por medio de cloruro de decanoilo (110 µl, 0.576 mmol, 4 veces de exceso) con 3M DIEA (8 veces de exceso) en la cantidad mínima de DMF. Una vez concluida la reacción, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y CH_2Cl_2 (5 x 30 s).

El peso del crudo peptídico tras el desanclaje y desprotección según el método indicado anteriormente fue de 170mg (rendimiento 72%). La purificación por HPLC preparativa rindió 28 mg de péptido puro (rendimiento 16%).

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >98%; MALDI-TOF: m/z 1257.29 ([M+H$^+$], 32%), 1279.29 ([M+Na$^+$], 100%). MW 1256.29.

Ejemplo 2: Preparación de decanoil-Dab-Thr-Dab-cyclo(*S-S*)[Cys-Dab-(pentafluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys], (compuesto de fórmula (I) con R_0 = $CH_3(CH_2)_8$-, R_1 =$-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_2 = $-CH(CH_3)OH$, (cadena lateral de Thr), R_3 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_4 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_5 =$-CH_2$(*pentafluoro*)Ph (cadena lateral de pentafluoroDPhe), R_6 = $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ (cadena lateral de Nle), R_7 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), y R_8 = $-CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab)

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-pentafluoroDPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-DCys(Trt)-OH.

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/^{t}Bu sobre resina Fmoc-Rink Amida MBHA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

El peso del crudo peptídico tras el desanclaje y formación del enlace disulfuro fue 240 mg (rendimiento 94%). La purificación por HPLC preparativa proporcionó 45 mg de péptido puro (rendimiento 19%).

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >99%; MALDI-TOF: m/z 1328.44 ($[M+H]^+$,100%), 1350.43 ($[M+Na]^+$, 40%). MW 1327.48.

Ejemplo 3: Preparación de decanoil-Dab-Thr-Dab-cyclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(4-metil)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys], (compuesto de fórmula (I) con R_0 = $CH_3(CH_2)_8$-, R_1 =-$CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_2 = -$CH(CH_3)OH$, (cadena lateral de Thr), R_3 = -$CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_4 = -$CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), R_5 =-CH_2(4-methyl)Ph (cadena lateral de (4-metil)DPhe), R_6 = -$CH_2CH_2CH_2CH_3$ (cadena lateral de Nle), R_7 = -$CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab), y R_8 = -$CH_2CH_2NH_2$ (cadena lateral de Dab)

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-(4-metil)DPhe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-DCys(Trt)-OH

Se llevo a cabo la síntesis manual según un protocolo estándar Fmoc/^{t}Bu sobre resina Fmoc-Rink Amida MBHA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

El peso del crudo peptídico tras el desanclaje y formación del enlace disulfuro fue 265 mg (rendimiento 88%). La purificación por HPLC preparativa proporcionó 56 mg de péptido puro (rendimiento 21%).

Caracterización del péptido purificado: Homogeneidad (por integración del área de la traza de HPLC) >99%; MALDI-TOF: m/z 1252.66 ($[M+H]^+$,100%), 1273.95 ($[M+Na]^+$, 20%). MW 1251.58

Ejemplo 4: Ensayo de actividad antibacteriana

Cf. Jorgensen J.H., Turnide J.D., Antibacterial susceptibility test: dilutions and diffusion methods. In: Murray PR, Baron, E.J., Jorgensen, J.H. Pfaller, M.A., Yorken, R.H., eds. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press Washington DC, p. 1108 (2003).

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 200µL como se indica a continuación: alícuotas (100 μL) de una suspensión de bacterias a una concentración de 10^5 unidades formadoras de colonias/mL en medio de cultivo (MH, Muller Hinton Broth, Difco, USA) a pH 7.4, se adicionaron a 100µL 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 ºC durante 18-20 h. La actividad antibacteriana se expresó como CMI, la concentración a la cual no se detecta crecimiento tras las 18-20 h de incubación.

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

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 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Acinetobacter sp ATCC 5798

Staphylococcus aureus ATCC 29213
Mycobacterium phlei ATCC 41423
Enterococus faecalis ATCC 29212
Staphylococcus aureus resistente a metilicina ATCC 43300

El ensayo en bacterias resistentes y multirresistentes fue esencialemte el mismo que descrito anteriormente con pequeños cambios: las muestras de volumen final de 100 uL se prepararon de la siguiente manera: alicuotas (50 uL) de la suspensión bacteriana a concentración 1.5 x 10^6 unidades formadoras de colonia por mL en medio MHB se ajustaron a pH 7.4 y se adicionaron 50 uL de solución de péptido antibiótico preparado

de un solución madre de 1024 mg/L en agua y se diluyó en factores de 2 de manera seriada en MHB de pH 7.4.

Las muestras de bacterias Gram-negativas resistentes y multirresistentes eran clínicas y no estandarizadas:

Cepas E. coli: NDM-1 (multirresistente); cepas VAL10, VAL5 y MAC21 muestran resistencia intermedia a quinolonas, concretamente: MAC21 y VAL10 a ácido nalidíxico, cotrimoxazole y ampicilina; y VAL 5 a ácido nalidíxico.

Cepas P. aeruginosa 38a and 36a son altamente resistentes (a Ceftazidime, Ciprofloxacina, Imipenem y Piperacillin-tazobactam).

Panel de resistencia de: metalo-beta-lactamasa New Delhi (NDM-1): Resistencia a (MIC): Amoxicillina 256 mg/L; Amoxicillina clavulanato 32 mg/L ; Piperacillina/tazobactam 256 mg/L; Cefoxitina 256 mg/L; Cefotaxime 256 mg/L; Ceftazidime 256 mg/L; Cefepime 256 mg/L; Imipenem 8 mg/L; Meropenem 16 mg/L; Doripenem 6 mg/L; Ertapenem 24 mg/L; Aztreonam 256 mg/L; Gentamicina 8 mg/L; Amikacina 32 mg/L, Tobramicina 8 mg/L; Ciprofloxacina 32 mg/L. (cf: M. Solé et al., "First Description of an Escherichia coli Strain Producing NDM-1 Carbapenemase in Spain" Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 2011, vol. 55, pp. 4402-4404.

Los resultados de CMI obtenidos contra las bacterias ATCC mencionadas anteriormente se indican en la tabla 1.

Tabla 1:

Comp. (I)	E. faecalis	S.aureus	M. phlei	E. coli	P. aeruginosa	Acinetobacter sp
Ejemplo 3	8-16	8	4	2	2	2
Ejemplo 2	8-16	8	8	2-4	2	4-8
Ejemplo 1	16-32	4	2-4	4	2	4

Los resultados de CMI obtenidos contra bacterias resistentes se indican en la tabla 2 y en la tabla 3.

Tabla 2:

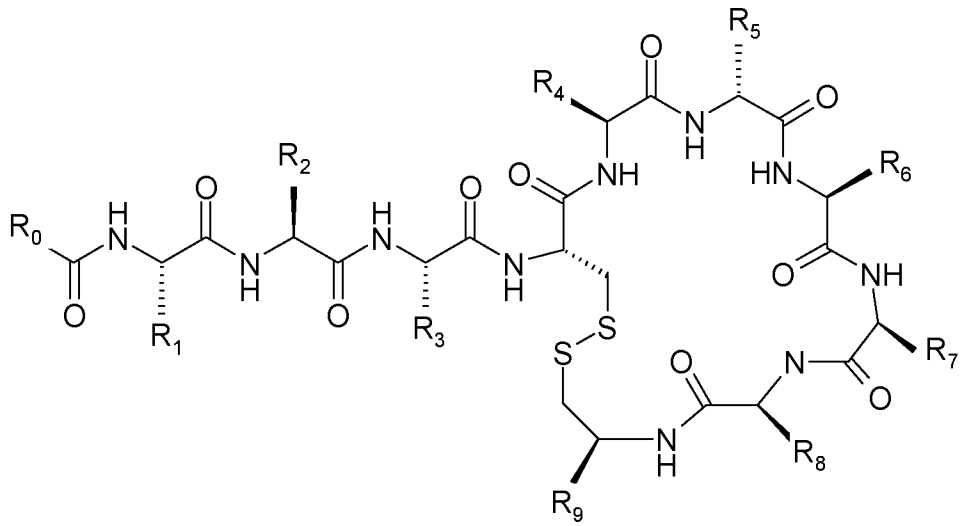
Comp. (I)	P. aeruginosa 38a	P. aeruginosa 36a	E. coli NDM-1	E. coli VAL10	E. coli VAL5	E. coli MAC21a
Ejemplo 3	2	<0.5	<0.5	1	<0.5	<0.5
Ejemplo 1	4	<0.5	<0.5	1	<0.5	<0.5

Tabla 3:

Comp. (I)	MRSA
Ejemplo 3	4
Ejemplo 2	4
Ejemplo 1	4

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I),



(I)

donde:

R_0 es un radical CH_3-$(CH_2)_m$-, donde m es un número entero entre 4 y 10;

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

GF-$(CH_2)_n$-;

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 $-CH(CH_3)(OH)$, estando en la fórmula (I) el CH del R_2 en cualquiera de las dos configuraciones, R o S, dando lugar a los correspondientes epímeros a una mezcla de los mismos;

R_5 es un radical -(CH_2)-R_{10};

R_6 es una radical C_4-alquilo lineal o ramificado;

R_9 es un radical seleccionado entre -$CONH_2$ y -COOH; y

R_{10} es un radical fenilo sustituido con uno a 5 sustituyentes iguales seleccionados del grupo que consiste en F, (C_1-C_2)-alquilo y CF_3.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R_{10} es un radical fenilo sustituido con uno a 5 sustituyentes iguales seleccionados del grupo que consiste en F y CH_3.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R_{10} es un fenilo sustituido con átomos de flúor.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R_{10} es un fenilo sustituido con grupos metilo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde m es un número entero entre 7 y 10; n es un entero entre 1 y 3; R_6 es una radical CH_3-$(CH_2)_3$-; y R_9 es un radical -$CONH_2$.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde R_0 es un radical CH_3-$(CH_2)_8$-.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde R_1, R_3, R_4, R_7 y R_8 son radicales iguales de fórmula -CH_2-CH_2-NH_2.

8. Compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona de entre los siguientes:

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(p-fluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys],

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(pentafluoro)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys], y

Decanoil-Dab-Thr-Dab-ciclo(*S*-*S*)[Cys-Dab-(4-metil)DPhe-Nle-Dab-Dab-DCys].

9. Uso de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, 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. Uso según la reivindicación 9, donde las bacterias Gram-positivas se seleccionan entre el grupo que consiste en Micobacterium phlei, Staphylococcus aureus, Enterococus faecalis y Staphylococcus aureus resistente a metilicina.

11. Uso según la reivindicación 10, donde la bacteria Gram-positiva es Staphylococcus aureus resistente a metilicina.

12. Uso de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana causada por bacterias Gram-negativas en una mamífero, incluyendo un humano.

13. Uso según la reivindicación 12, donde las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre el grupo que consiste en Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Acinetobacter sp.

14. Uso según la reivindicación 13, donde la bacteria Escherichia coli se selecciona del grupo que consiste en Escherichia coli NDM-1, Escherichia coli VAL-10, Escherichia coli VAL-5 y Escherichia coli MAC21A y donde la bacteria Pseudomonas aeruginosa se selecciona del grupo que consiste en Pseudomonas aeruginosa 38a y Pseudomonas aeruginosa 38b.

15. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, junto a excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2014/070286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, CAS, REGISTRY, ESPACENET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/029196 A1 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 18-03-2010, claims	1-15
A	WO 2011/110716 A2 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 15-09-2011	1-15
A	WO 2011/104378 A1 (NOVO NORDISK) 01-09-2011, claim 2	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26/06/2014	**(18/07/2014)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. Fernández Fernández Telephone No. 91 3495489

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2014/070286

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010029196 A1	18.03.2010	ES2334547 A1	11.03.2010
		ES2334547 B1	03.12.2010
WO2011110716 A2	15.09.2011	RU2012143143 A	20.04.2014
		JP2013521330 A	10.06.2013
		US2013053305 A1	28.02.2013
		EP2548883 A2	23.01.2013
		CN102939301 A	20.02.2013
		CA2792674 A1	15.09.2011
		ES2374779 A1	22.02.2012
		ES2374779 B1	27.12.2012
WO2011104378 A1	01.09.2011	US2013012432 A1	10.01.2013
		EP2539364 A1	02.01.2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070286

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/62 (2006.01)
A61K38/12 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2014/070286

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07K, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, CAS, REGISTRY, ESPACENET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2010/029196 A1 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 18-03-2010, reivindicaciones	1-15
A	WO 2011/110716 A2 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 15-09-2011	1-15
A	WO 2011/104378 A1 (NOVO NORDISK) 01-09-2011, reivindicación 2	1-15

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
26/06/2014	**18 de julio de 2014 (18/07/2014)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado M. Fernández Fernández Nº de teléfono 91 3495489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070286

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010029196 A1	18.03.2010	ES2334547 A1	11.03.2010
		ES2334547 B1	03.12.2010
WO2011110716 A2	15.09.2011	RU2012143143 A	20.04.2014
		JP2013521330 A	10.06.2013
		US2013053305 A1	28.02.2013
		EP2548883 A2	23.01.2013
		CN102939301 A	20.02.2013
		CA2792674 A1	15.09.2011
		ES2374779 A1	22.02.2012
		ES2374779 B1	27.12.2012
WO2011104378 A1	01.09.2011	US2013012432 A1	10.01.2013
		EP2539364 A1	02.01.2013

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070286

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C07K7/62 (2006.01)
A61K38/12 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)