



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 355**

51 Int. Cl.:
C07K 7/64 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02807965 .5**
86 Fecha de presentación : **02.10.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1549670**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Peptidomiméticos fijados a una matriz con actividad antimicrobiana.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **Polyphor Ltd.**
Gewerbstrasse 14
4123 Allschwil, CH
Universität Zürich

72 Inventor/es: **Vrijbloed, Jan Wim;**
Obrecht, Daniel;
Locioro, Sergio;
Gombert, Frank;
Ludin, Christian;
Robinson, John Anthony;
Lederer, Alexander y
Shankamma, Shivaprasad

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 305 355 T3

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

DESCRIPCIÓN

Peptidomiméticos fijados a una matriz con actividad antimicrobiana.

5 La presente invención da a conocer peptidomiméticos con estructura de horquilla β fijados sobre una matriz, los cuales incorporan una cadena fijada sobre matriz de 12 residuos de α -aminoácido que, dependiendo de sus posiciones en la cadena, son Gly o Pro, o de determinados tipos, tal como se definen a continuación, siendo, como mínimo, uno de estos residuos del tipo de las glicinas N-sustituídas. Estos peptidomiméticos con estructura de horquilla β fijados sobre una matriz presentan una actividad antimicrobiana de amplio espectro. Además, la presente invención da a conocer
10 eficientes procedimientos de síntesis mediante los cuales se pueden preparar estos compuestos, si se desea, en formato de librería paralela. Estos peptidomiméticos con estructura de horquilla β exhiben una eficacia, una biodisponibilidad y una vida media mejoradas y, lo que es más importante, un balance significativamente mejorado entre la actividad antibacteriana, por un lado, y la hemólisis de glóbulos rojos por el otro.

15 El creciente problema de la resistencia microbiana a los antibióticos establecidos ha estimulado un vivo interés en el desarrollo de agentes antimicrobianos novedosos con nuevos modos de acción (H. Breithaupt, Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1165-1169). Una clase emergente de antibióticos se basa en péptidos catiónicos de procedencia natural (T. Ganz, R. I. Lehrer, Mol. Medicine Today 1999, 5, 292-297; R. M. Epand, H. J. Vogel, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 11-28). Estos péptidos incluyen péptidos con puentes disulfuro con estructura de horquilla β y de hoja β (tal como las *protegrinas* [V. N. M.; O. V. Shamova, H. A. Komeva, R. I. Lehrer, FEBS Lett. 1993, 327, 231-236], las *taquiplesinas* [T. Nakamura, H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, Y. Shimomishi, Y.J. Biol. Chem. 1988, 263, 16709-16713], y las *defensinas* [R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, Annu. Rev. Immunol. 1993, 11, 105-128], péptidos anfipáticos α -helicoidales (por ejemplo, *cecropinas*, *dermaseptinas*, *magaininas* y *melitinas* [A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Biopolymers 2000, 55, 4-30]), así como otros péptidos
20 lineales y en estructura de bucle. Aunque todavía no se conocen plenamente los mecanismos de acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos, su lugar principal de interacción es la membrana celular microbiana (H. W. Huang, Biochemistry 2000, 39, 8347-8352). Tras la exposición a estos agentes, la membrana celular sufre permeabilización, a la que sigue una rápida muerte celular. Sin embargo, actualmente no se pueden detallar mecanismos más complejos de acción, por ejemplo, que incluyen la señalización mediada por receptores (M. Wu, E. Maier, R. Benz, R. E. Hancock, Biochemistry 1999, 38, 7235-7242).
30

Las actividades antimicrobianas de muchos de estos péptidos catiónicos habitualmente se correlacionan con sus estructuras secundarias preferentes, observadas en solución acuosa o en entornos similares a la membrana (N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 29-54). Estudios estructurales por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) han puesto de manifiesto que los péptidos catiónicos tales como la *protegrina* 1 (A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, A. Eur. J. Biochem. 1996, 237, 575-583; R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. L. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, J. Feigon, J. Chem. Biol. 1996, 3, 543-550) y la *taquiplesina* I (K. Kawano, T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada, S. J. Iwanaga, S. J. Biol. Chem. 1990, 265, 15365-15367) adoptan conformaciones de horquilla β bien definidas, debido al efecto de restricción de dos puentes disulfuro. En análogos a la *protegrina* con ausencia de uno o de los dos enlaces disulfuro, la estabilidad de la conformación en horquilla β disminuye, y la actividad antimicrobiana se reduce (J. Chen, T. J. Falla, H. J. Liu, M. A. Hurst, C. A. Fujii, D. A. Mosca, J. R. Embree D. J. Loury, P. A. Radcliff, C. C. Chang, L. Gu, J. C. Fiddes, Biopolymers 2000, 55, 88-98; S. L. Harwig, A. Waring, H. J. Yang, Y. Cho, L. Tan, R. I. Lehrer, R. J. Eur. J. Biochem. 1996, 240, 352-357; M. E. Mangoni, A. Aumelas, P. Charnet, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, FEBS Lett. 1996, 383, 93-98; H. Tamamura, T. Murakami, S. Noriuchi, K. Sugihara, A. Otaka, W. Takada, T. Ibuka, M. Waki, N. Tamamoto, N. Fujii, Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 853-858). Se han obtenido observaciones similares en análogos de la *taquiplesina* I (H. Tamamura, R. Ikoma, M. Niwa, S. Funakoshi, T. Murakami, N. Fujii, Chem. Pharm. Bull. 1993, 41, 978-980) y en miméticos en bucle de horquilla de la *defensina* de conejo NP-2 (S. Thennarasu, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1999, 254, 281-283). Estos resultados ponen de manifiesto que la estructura de horquilla β juega un papel importante en la actividad antimicrobiana y la estabilidad de estos péptidos de tipo *protegrina*. En el caso de los péptidos catiónicos que prefieren estructuras α -helicoidales, la estructura anfifílica de la hélice parece jugar un papel clave en la determinación de la actividad antimicrobiana (A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, A. Biopolymers 2000, 55, 4-30). La gramicidina S es un péptido de esqueleto cíclico con una estructura en horquilla β bien definida (S. E. Hull, R. Karlsson, P. Main, M. M. Woolfson, E. J. Dodson, Nature 1978, 275, 206-275) que exhibe una potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, R. E. Hancock, R. S. Hodges, Int. J. Peptide Prot. Res. 1996, 47, 460-466). Sin embargo, la elevada actividad hemolítica de la gramicidina S ha impedido su utilización generalizada como antibiótico. Recientes estudios estructurales por RMN han indicado que la elevada actividad hemolítica se correlaciona aparentemente con la naturaleza altamente anfipática de esta molécula cíclica de tipo horquilla β , pero que es posible disociar las actividades antimicrobianas y hemolítica modulando la conformación y la anfifilia (L. H. Kondejewski, M. Jelokhani-Niaraki, S. W. Farmer, B. Lix, M. Kay, B. D. Sykes, R. E. Hancock, R. S. Hodges, J. Biol. Chem. 1999, 274, 13181-13192; C. McInnes, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, B. D. Sykes, J. Biol. Chem. 2000, 275, 14287-14294).
50
55
60

65 Recientemente se ha dado a conocer un nuevo péptido cíclico antimicrobiano RTD-1 a partir de leucocitos de primates (Y.-Q. Tang, J. Yuan, G. Ósapay, K. Ósapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Oellette, M. E. Selsted, Science 1999, 286, 498-502). Este péptido contiene tres puentes disulfuro que constriñen el esqueleto cíclico del péptido en una geometría de horquilla. La disociación de los tres enlaces disulfuro provoca una pérdida significativa de la

actividad antimicrobiana. También se han dado a conocer análogos de *protegrinas* (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300) y *taquiplesinas* (J.-P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, Biochemistry 2000, 39, 7159-7169; N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 267, 783-790) que contienen un esqueleto cíclico del péptido, así como múltiples puentes disulfuro a efectos de reforzar una estructura anfífilica en horquilla. En estos casos, la eliminación de todas las limitaciones por cistina no siempre provoca una gran pérdida de la actividad antimicrobiana, pero modula la selectividad membranolítica (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300). Un aspecto clave en el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos catiónicos es la selectividad. Las *protegrinas* y *taquiplesinas* de procedencia natural ejercen una actividad hemolítica significativa contra los glóbulos rojos humanos. Este es también el caso para análogos de *protegrina* tales como IB367 (J. Chen, T. J. Falla, H. J. Liu, M. A. Hurst, C. A. Fujii, D. A. Mosca, J. R. Embree, D. J. Loury, P. A. Radcliff, C. C. Chang, L. Gu, J. C. Fiddes, Biopolymers 2000, 55, 88-98; C. Chang, L. Gu, J. Chen, US-Pat: 5,916,872, 1999). Esta elevada actividad hemolítica esencialmente imposibilita su utilización *in vivo*, y representa una seria desventaja en aplicaciones clínicas. Además, la actividad antibiótica de los análogos frecuentemente disminuye significativamente a medida que aumenta la concentración salina, de tal modo que en condiciones *in vivo* (aproximadamente 100-150 mM NaCl) la actividad antimicrobiana se puede ver gravemente reducida. Antes de que se pueda considerar el uso intravenoso, la toxicidad general, la actividad de enlace de proteínas en el suero sanguíneo y la estabilidad de proteasa son serios problemas que deben ser tratados adecuadamente.

La *protegrina* I exhibe una actividad potente y similar contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como contra hongos tanto en ensayos con baja concentración salina como en ensayos con alta concentración salina. Esta amplia actividad antimicrobiana, combinada con un modo rápido de acción y su capacidad de eliminar bacterias resistentes a otras clases de antibióticos las hacen objetivos atractivos para el desarrollo de antibióticos clínicamente útiles. La actividad contra bacterias Gram-positivas es típicamente mayor que contra bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la *protegrina* I también exhibe una elevada actividad hemolítica contra los glóbulos rojos humanos, y en consecuencia, una baja selectividad con respecto a las células microbianas. Experimentos CD orientados (W. T. Heller, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang, Biochemistry 1998, 37, 17331-17338) indican que la *protegrina* I puede existir en dos estados diferentes cuando interactúa con las membranas, y que estos estados se ven muy influenciados por la composición lipídica. Algunos estudios de análogos cíclicos de *protegrina* (J.-P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300) han revelado que un aumento de la rigidez conformacional, a consecuencia de la ciclación del esqueleto y de múltiples puentes disulfuro, puede conferir una selectividad membranolítica que disocia la actividad antimicrobiana de la actividad hemolítica, por lo menos en la serie de compuestos estudiados.

La *protegrina* I es un péptido lineal con 18 residuos, con un terminal carboxilo amidado y dos puentes disulfuro. La *taquiplesina* I contiene 17 residuos, presenta también un terminal carboxilo amidado y contiene dos puentes disulfuro. Los análogos de *protegrina* y *taquiplesinas* de esqueleto cíclico recientemente descritos contienen típicamente 18 residuos y hasta tres puentes disulfuro (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300; J. P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, Biochemistry 2000, 39, 7159-7169; N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 267, 783-790).

La *catelicidina*, un péptido catiónico lineal de tipo helicoidal con 37 residuos, y sus análogos, se están investigando actualmente como agentes terapéuticos por inhalación frente a la *enfermedad pulmonar fibrosis quística (CF)* (L. Saiman, S. Tabibi, T. D. Starner, P. San Gabriel, P. L. Winokur, H. P. Jia, P. B. McGray, Jr., B. F. Tack, Antimicrob. Agents y Chemother. 2001, 45, 2838-2844; R. E. W. Hancock, R. Lehrer, Trends Biotechnol. 1998, 16, 82-88). Más del 80% de los pacientes de CF sufren una infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* (C. A. Demko, P. J. Biard, P. B. Davies, J. Clin. Epidemiol. 1995, 48, 1041-1049; E. M. Kerem, R. Gold, H. Levinson, J. Pediatr. 1990, 116, 714-719).

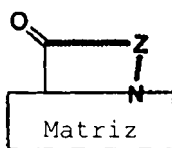
En los compuestos descritos a continuación se introduce una nueva estrategia a efectos de estabilizar las conformaciones en horquilla β en miméticos de péptidos catiónicos de esqueleto cíclico que exhiben actividad antimicrobiana. Esto implica transplantar la secuencia de horquilla catiónica e hidrofóbica a una matriz, cuya función consiste en forzar al esqueleto peptídico en bucle a adoptar una geometría en horquilla. La rigidez de la horquilla se puede ver afectada adicionalmente introduciendo un puente disulfuro. Los péptidos miméticos en horquilla enlazados con una matriz han sido descritos en la bibliografía (D. Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, Adv. Med Chem. 1999, 4, 1-68; J. A. Robinson, Syn. Lett. 2000, 4, 429-441), pero hasta el momento no se habían evaluado dichas moléculas para el desarrollo de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, ahora se ha establecido la capacidad de generar peptidomiméticos con estructura de horquilla β utilizando métodos sintéticos combinatorios y paralelos (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, Helv. Chim. Acta. 2000, 83, 3097-3112). Además, la incorporación de determinados elementos de estructura peptídica en miméticos de horquilla enlazados a una matriz no ha sido evaluada anteriormente para el desarrollo de péptidos antimicrobianos.

Estos procedimientos permiten la síntesis y el cribado de grandes librerías de miméticos de horquilla, lo que a su vez facilita considerablemente los estudios de actividad estructural, y en consecuencia el descubrimiento de nuevas moléculas con una potente actividad antimicrobiana y una baja actividad hemolítica con respecto a los glóbulos rojos humanos. Además, la presente estrategia permite sintetizar peptidomiméticos con estructura de horquilla β con nuevas selectividades frente a diferentes tipos de patógenos, por ejemplo frente a diversas cepas de *pseudomonas* resistentes a múltiples fármacos. Los peptidomiméticos de horquilla β obtenidos mediante el enfoque descrito en el presente documento pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, como antibióticos de amplio espectro.

ES 2 305 355 T3

Los peptidomiméticos con estructura de horquilla β según la presente invención son compuestos de fórmula general:

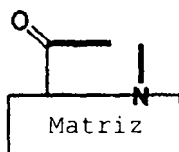
5



10

(I)

15 en la que



20

25 es un grupo que presenta una de las fórmulas $^D\text{Pro-}^L\text{Pro}$ y $^L\text{Pro-}^D\text{Pro}$

R^{20} es H; alquilo; alquenilo; o aril-alquilo inferior;

30

R^{33} es H; alquilo, alquenilo; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{55}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{34}\text{R}^{63}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{COR}^{64}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{PO}(\text{OR}^{60})_2$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{SO}_2\text{R}^{62}$; o $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{C}_6\text{H}_4\text{R}^8$;

R^{34} es H; alquilo inferior; arilo, o aril-alquilo inferior;

35

R^{33} y R^{34} conjuntamente pueden formar: $-(\text{CH}_2)_{2-6}$ -; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -; $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2$ -; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{57}(\text{CH}_2)_2$ -;

40

R^{37} es H; F; Br; Cl; NO_2 ; CF_3 ; alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{55}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{33}\text{R}^{34}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{OCONR}^{33}\text{R}^{75}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{20}\text{CONR}^{33}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{COOR}^{57}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{PO}(\text{OR}^{60})_2$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{SO}_2\text{R}^{62}$; o $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{C}_6\text{H}_4\text{R}^8$;

R^{50} es H; alquilo inferior; o aril-alquilo inferior;

45

R^{55} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; aril-alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{57}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{34}\text{R}^{63}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{COR}^{64}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{COOR}^{57}$; o $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$;

50

R^{56} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; aril-alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{57}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{34}\text{R}^{63}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{COR}^{64}$; o $-(\text{CH}_2)_o(\text{CHR}^{61})_s\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$;

R^{57} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; arilo alquilo inferior; o heteroarilo alquilo inferior;

55

R^{58} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; o heteroaril-alquilo inferior;

R^{59} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; o heteroaril-alquilo inferior; o

60

R^{58} y R^{59} conjuntamente pueden formar: $-(\text{CH}_2)_{2-6}$ -; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -; $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2$ -; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{57}(\text{CH}_2)_2$ -;

R^{60} es H; alquilo inferior; alquenilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior;

65

R^{61} es alquilo; alquenilo; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_m\text{OR}^{55}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{33}\text{R}^{34}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o\text{COOR}^{37}$; $-(\text{CH}_2)_o\text{NR}^{58}\text{R}^{59}$; o $-(\text{CH}_2)_o\text{PO}(\text{COR}^{60})_2$;

ES 2 305 355 T3

R⁶² es alquilo inferior; alqueno inferior; arilo, heteroarilo; o aril-alquilo inferior;

R⁶³ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo, heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; -COR⁶⁴; -COOR⁵⁷; -CONR⁵⁸R⁵⁹; -SO₂R⁶²; o -PO(OR⁶¹)₂; o

R³⁴ y R⁶³ conjuntamente pueden formar: -(CH₂)₂₋₆-; -(CH₂)₂O(CH₂)₂-; -(CH₂)₂S(CH₂)₂-; o -(CH₂)₂NR⁵⁷(CH₂)₂-;

R⁶⁴ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sOR⁶⁵; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sSR⁶⁶; o -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sNR³⁴R⁶³; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sOCOR⁷⁵R⁸²; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR⁷⁸R⁸²;

R⁶⁵ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo, aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; -COR⁵⁷; -COOR⁵⁷; o -CONR⁵⁸R⁵⁹;

R⁶⁶ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; o -CONR⁵⁸R⁵⁹;

m es 2-4; o es 0-4; p es 1-4; q es 0-2; r es 1 ó 2; s es 0 ó 1;

Z es una cadena de 12 residuos α -aminoácido, contándose las posiciones de dichos residuos aminoácido en dicha cadena empezando por el aminoácido N-terminal, siendo dicho los residuos aminoácidos, dependiendo de su posición en las cadenas, Gly, o Pro, o uno de entre los tipos

C: -NR²⁰CH(R⁷²)CO-;

D: -NR²⁰CH(R⁷³)CO-;

E: -NR²⁰CH(R⁷⁴)CO-;

F: -NR²⁰CH(R⁸⁴)CO-; y

H: -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)₄₋₇-CH(CO-)-NR²⁰-; -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)_pSS(CH₂)_p-CH(CO-)-NR²⁰-; -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)_pNR²⁰CO(CH₂)_p-CH(CO-)-NR²⁰-; y -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)_pNR²⁰CONR²⁰(CH₂)_p-CH(CO-)-NR²⁰-;

I: -NR⁸⁶CH₂CO-;

K: -NR⁸⁷CH₂CO-;

R⁷² es H, alquilo inferior; alqueno inferior; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sOR⁸⁵; o -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sSR⁸⁵;

R⁷³ es -(CH₂)_oR⁷⁷; -(CH₂)_rO(CH₂)_oR⁷⁷; -(CH₂)_rS(CH₂)_oR⁷⁷; o -(CH₂)_rNR²⁰(CH₂)_oR⁷⁷;

R⁷⁴ es -(CH₂)_pNR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pNR⁷⁷R⁸⁰; -(CH₂)_pC(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pNR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pN=C(NR⁷⁸R⁸⁰)NR⁷⁹R⁸⁰; -(CH₂)_pC₆H₄NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC₆H₄NR⁷⁷R⁸⁰; -(CH₂)_pC₆H₄(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC₆H₄C(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC₆H₄C(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC₆H₄NR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pC₆H₄N=C(NR⁷⁸R⁸⁰)NR⁷⁹R⁸⁰; -(CH₂)_rO(CH₂)_mNR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_mNR⁷⁷R⁸⁰; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_mNR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_mN=C(NR⁷⁸R⁸⁰)NR⁷⁹R⁸⁰; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC₆H₄CNR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC₆H₄C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC₆H₄C(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC₆H₄C(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rO(CH₂)_pC₆H₄NR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_mNR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_mNR⁷⁷R⁸⁰; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_mNR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_mN=C(NR⁷⁸R⁸⁰)NR⁷⁹R⁸⁰; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC₆H₄CNR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC₆H₄C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC₆H₄(=NOR⁵⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC₆H₄(=NNR⁷⁸R⁷⁹)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_rS(CH₂)_pC₆H₄NR⁸⁰C(=NR⁸⁰)NR⁷⁸R⁷⁹; -(CH₂)_pNR⁸⁰COR⁶⁴; -(CH₂)_pNR⁸⁰CO R⁷⁷; -(CH₂)_pNR⁸⁰CONR⁷⁸R⁷⁹; o -(CH₂)_pC₆H₄NR⁸⁰CONR⁷⁸R⁷⁹;

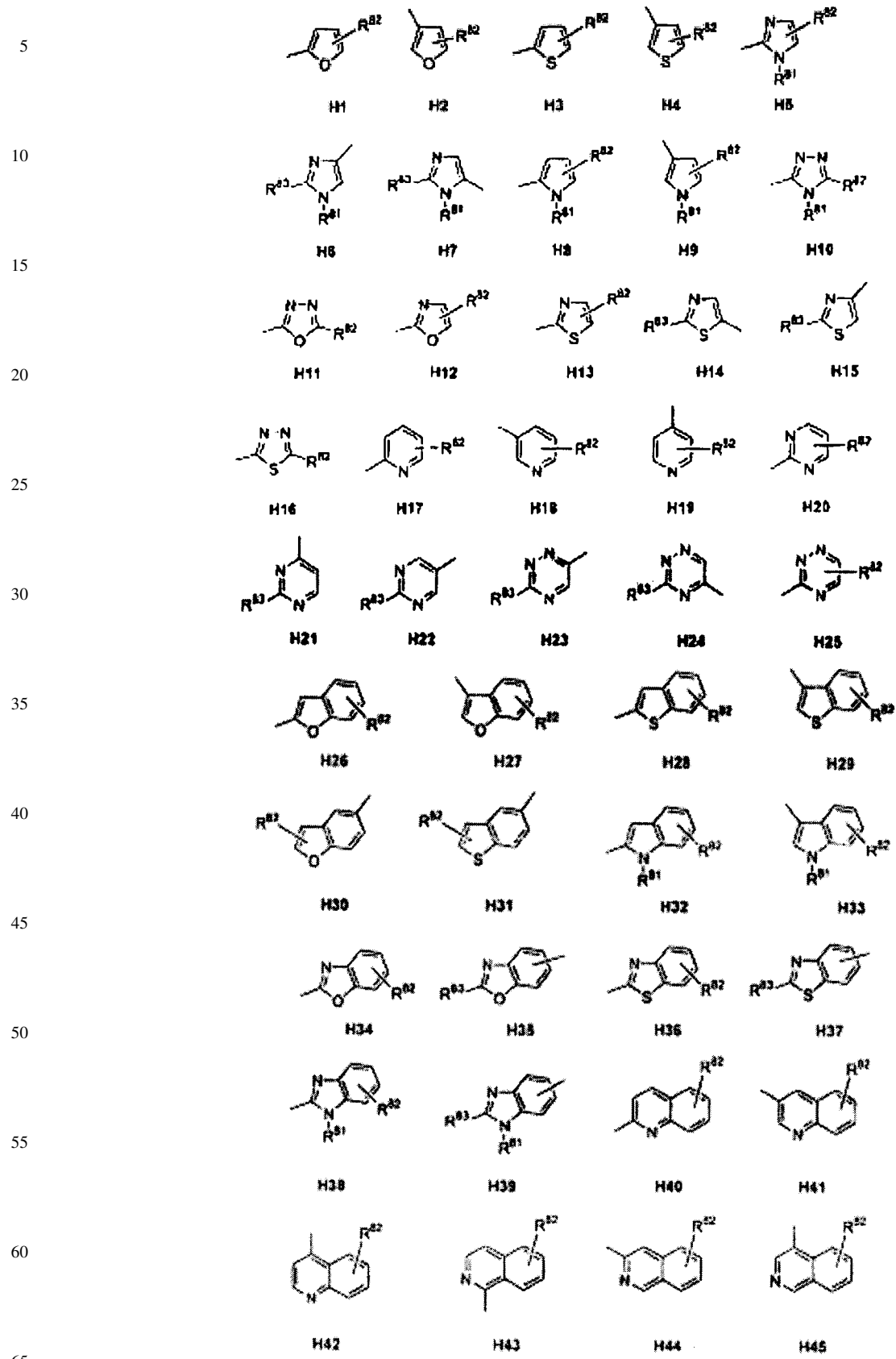
R⁷⁵ es alquilo inferior; alqueno inferior; o aril-alquilo inferior; o

R³³ y R⁷⁵ conjuntamente pueden formar: -(CH₂)₂₋₆-; -(CH₂)₂O(CH₂)₂-; -(CH₂)₂S(CH₂)₂-; o -(CH₂)₂NR⁵⁷(CH₂)₂-; o

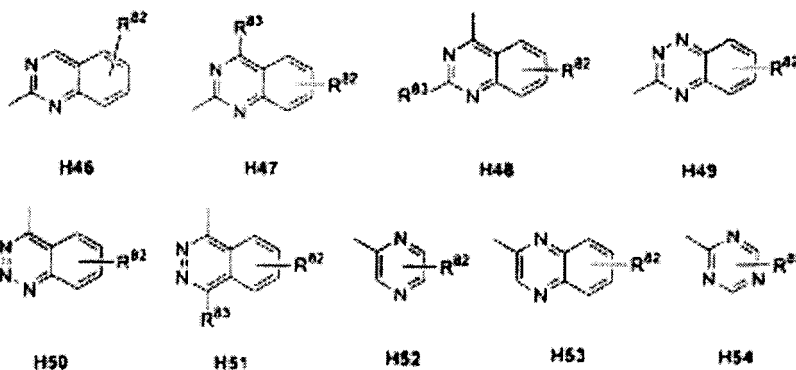
R⁷⁵ y R⁸² conjuntamente pueden formar: -(CH₂)₂₋₆-; -(CH₂)₂O(CH₂)₂-; -(CH₂)₂S(CH₂)₂-; o -(CH₂)₂NR⁵⁷(CH₂)₂-;

ES 2 305 355 T3

R⁷⁷ es R⁸⁸; o un grupo heteroarilo que presenta una de las fórmulas



ES 2 305 355 T3



R⁷⁸ es H; alquilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior;

R⁷⁸ y R⁸² conjuntamente pueden formar: $-(\text{CH}_2)_{2-6}-$; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$; $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2-$; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{57}(\text{CH}_2)_2-$;

R⁷⁹ es H; alquilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior; o

R⁷⁸ y R⁷⁹, conjuntamente, pueden ser $-(\text{CH}_2)_{2-7}-$; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{57}(\text{CH}_2)_2-$;

R⁸⁰ es H; o alquilo inferior;

R⁸¹ es H; alquilo inferior; o aril-alquilo inferior;

R⁸² es H; alquilo inferior; arilo; heteroarilo; o aril-alquilo inferior; ;

R⁸³ y R⁸² conjuntamente pueden formar: $-(\text{CH}_2)_{2-6}-$; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$; $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2-$; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{57}(\text{CH}_2)_2-$;

R⁸³ es H; alquilo inferior; arilo; o $-\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$;

R⁸⁴ es $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{78}$; $-(\text{CH}_2)_m(\text{CHR}^{61})_s\text{SR}^{78}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{80}\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$; o $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{80}\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$;

R⁸⁵ es alquilo inferior; o alqueno inferior;

R⁸⁶ es R⁷⁴; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{-C(=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; X es $-\text{O}-$, $-\text{NR}^{20}-$, $-\text{S}-$, $-\text{OCOO}-$, u es 1-3, t es 1-6, v es 1-3;

R⁸⁷ es R⁸⁴; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{OR}^{78}$; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{-CONR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{-NR}^{80}\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_u\text{-X}_l\text{-(CH}_2)_v\text{SR}^{78}$; X es $-\text{O}-$, $-\text{NR}^{20}-$, $-\text{S}-$, $-\text{OCOO}-$, u es 1-3, t es 1-6, v es 1-3;

R⁸⁸ es fenilo, p-hidroxifenilo, 2-naftilo, 1-naftilo, 4-clorofenilo, 3-clorofenilo, 2-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 4-fluorofenilo, 3-fluorofenilo, 2-fluorofenilo, p-benziloxifenilo, p-bifenilo o p-benzoilfenilo,

con la condición de que, en dicha cadena Z de 12 residuos de α -aminoácido, los residuos aminoácido de las posiciones 1 a 12 sean:

- P1: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F, o el residuo es Pro;
- P2: de tipo E o de tipo D;
- P3: de tipo C, o el residuo es Pro;
- P4: de tipo E o de tipo F o de tipo I o de tipo K;
- P5: de tipo E o de tipo D o de tipo C o de tipo I o de tipo K o de tipo F, o el residuo es Gly o Pro;
- P6: de tipo E o de tipo F, o de tipo I o de tipo K o de tipo D, o el residuo es Gly;
- P7: de tipo E o de tipo F o de tipo I o de tipo C;
- P8: de tipo D o de tipo C, o el residuo es Pro;

ES 2 305 355 T3

- P9: de tipo E o de tipo D o de tipo F;
- P10: de tipo D o de tipo C o el residuo es Pro;
- 5 - P11: de tipo E o de tipo D o de tipo C; y
- P12: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F, o el residuo es Pro; o
- 10 - P4 y P9 y/o P2 y P11, conjuntamente, pueden formar un grupo de tipo H; y en P6 y P7 también son posibles los isómeros D;

con la condición adicional de que dicha cadena de 12 residuos de α -aminoácido contiene, como mínimo, un residuo de tipo I o de tipo K;

15 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, estos peptidomiméticos de horquilla β se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende

- 20 (a) acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra en posición 5, 6 ó 7, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 25 (b) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más cerca del residuo aminoácido N-terminal, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 30 (d) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que el residuo aminoácido N-terminal se ha introducido;
- 35 (f) acoplar el producto obtenido de este modo con
 - (fa) un derivado apropiadamente N-protegido de ^LPro o ^DPro
 - 40 (fb) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo; y
 - (fc) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de ^DPro y, respectivamente, ^LPro;
- 45 (g) eliminar el grupo protector de N el producto obtenido en la etapa (fc);
- (h) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra en posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 50 (i) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (j) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más allá de la posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 55 (k) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- 60 (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos aminoácido se han introducido;
- (m) si se desea, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;
- 65 (o) separar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;
- (p) ciclar el producto disociado del soporte sólido;

ES 2 305 355 T3

- (q) se desea, formar uno o dos enlaces entre hebras entre las cadenas laterales de residuos aminoácido apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;
- 5 (r) eliminar todos los grupos protectores presentes en los grupos funcionales de todos los miembros de la cadena de residuos aminoácido y, si se desea, cualquier grupo o grupos que puedan estar adicionalmente presentes en la molécula;
- (s) si se desea, guanidinizar todos los grupos amino de cadena lateral presentes en la cadena de residuos aminoácido; y
- 10 (t) si se desea, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable, o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo, en el correspondiente compuesto libre de fórmula I, o en otra sal diferente farmacéuticamente aceptable.

15 Alternativamente, los peptidomiméticos según la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende

- (a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado
- 20 (a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-protegido de ^LPro o ^DPro
- (a'b) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo; y
- 25 (a'c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de ^DPro y, respectivamente, ^LPro;
- (b') eliminar el grupo protector de N del producto obtenido en la etapa (a'c);
- 30 (c') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más cerca del residuo aminoácido N-terminal, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- (d') eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- 35 (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más allá de la posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 40 (f) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que todos los residuos aminoácido se han introducido;
- 45 (h') si se desea, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;
- (i') separar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;
- 50 (j') ciclar el producto disociado del soporte sólido;
- (k') se desea, formar uno o dos enlaces entre hebras entre las cadenas laterales de residuos aminoácido apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;
- 55 (l') eliminar todos los grupos protectores presentes en los grupos funcionales de todos los miembros de la cadena de residuos aminoácido y, si se desea, cualquier grupo o grupos que puedan estar adicionalmente presentes en la molécula;
- (m') si se desea, guanidinizar todos los grupos amino de cadena lateral presentes en la cadena de residuos aminoácido; y
- 60 (n') si se desea, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable, o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo, en el correspondiente compuesto libre de fórmula I, o en otra sal diferente farmacéuticamente aceptable.

65 La introducción de un residuo aminoácido de tipo I o K se puede llevar a cabo alternativamente por acoplamiento con un agente de acetilación que contiene un grupo saliente, tal como ácido bromoacético, cloroacético o yodoacético, seguido del desplazamiento nucleofílico con una amina de fórmula H_2NR^{86} y, respectivamente, H_2NR^{87} que, si es necesario, está apropiadamente protegida.

ES 2 305 355 T3

Los peptidomiméticos según la presente invención también pueden ser enantiómeros de los compuestos de fórmula I. Estos enantiómeros se pueden preparar mediante una modificación de los procedimientos descritos anteriormente en los que se utilizan enantiómeros de todos los materiales de partida quirales.

5 Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “alquilo”, individualmente o en combinaciones, designa radicales hidrocarburo saturados, de cadena lineal o ramificada con hasta 24, preferentemente hasta 12 átomos de carbono. De manera similar, el término “alquenilo” designa radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada con hasta 24, preferentemente hasta 12 átomos de carbono, que contienen, como mínimo, uno o, dependiendo de la longitud de la cadena, hasta cuatro enlaces dobles olefínicos. El término “inferior” designa radicales y compuestos con hasta 6
10 átomos de carbono. Así, por ejemplo, el término “alquilo inferior” designa radicales hidrocarburo saturados de cadena lineal o ramificada con hasta 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, ter-butilo y similares.

El término “arilo” designa radicales hidrocarburo aromáticos carbocíclicos que contienen uno o dos anillos de seis miembros, tales como fenilo o naftilo, que pueden estar sustituidos por hasta tres sustituyentes tales como Br, Cl, F, CF₃, NO₂, OH, NH₂, alquilo inferior o alquenilo inferior. El término “heteroarilo” designa radicales heterocíclicos aromáticos que contienen uno o dos anillos de cinco y/o seis miembros, conteniendo por lo menos uno de ellos hasta tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S y N, y estando opcionalmente sustituido o sustituidos dicho anillo o anillos; ejemplos representativos de dichos radicales heteroarilo opcionalmente sustituidos se han indicado anteriormente en relación con la definición de R⁷⁷.

Las matrices constituyen bloques constructivos que presentan un terminal N y un terminal C orientados en el espacio de tal modo que la distancia entre los dos grupos puede estar dentro del intervalo 4,0-5,5 Å. Una cadena peptídica Z esta enlazada al terminal C y al terminal N de la matriz a través de sus correspondientes terminales N y C, de tal modo que la matriz y la cadena forman una estructura cíclica tal como la representada en la fórmula I. En un caso como el representado, en el que la distancia entre los terminales N y C de la matriz está comprendida dentro del intervalo 4,0-5,5 Å, la matriz induce la red de enlaces H necesaria para la formación de una conformación en horquilla β en la cadena peptídica Z. De este modo, matriz y cadena peptídica forman un mimético de horquilla β.

La conformación en horquilla β es altamente relevante para la actividad antibiótica de los miméticos de horquilla β según la presente invención. Las propiedades estabilizadoras de la conformación en horquilla β de las matrices (a) a (p) juegan un papel clave no sólo para la actividad antibiótica, sino también para el proceso de síntesis definido anteriormente, ya que la incorporación de las matrices cerca de la mitad de los precursores peptídicos lineales protegidos o al principio de los mismos aumenta los rendimientos de ciclación.

35 La cadena peptídica Z de los miméticos de horquilla β descritos en el presente documento se definen generalmente en términos de residuos aminoácido pertenecientes a uno de los siguientes grupos:

- Grupo C: -NR²⁰CH(R⁷²)CO-; “hidrofóbico: tamaño pequeño a mediano”
- 40 Grupo D: -NR²⁰CH(R⁷³)CO-; “hidrofóbico: grande, aromático o heteroaromático”
- Grupo E: -NR²⁰CH(R⁷⁴)CO-; “polar-catiónico” y “derivado de urea”
- Grupo F: -NR²⁰CH(R⁸⁴)CO-; “polar no cargado”
- 45 Grupo H: -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)₄₋₇-CH(CO-)-NR²⁰-; -NR²⁰-CH(CO-)-(CH₂)_pSS(CH₂)_p-CH(CO-)-NR²⁰-; -NR²⁰-CH(CO-)-(-(CH₂)_p)NR²⁰CO(CH₂)_pCH(CO-)-NR²⁰-; y -NR²⁰-CH(CO-)-(-(CH₂)_p)NR²⁰CONR²⁰(CH₂)_pCH(CO-)-NR²⁰-; “enlace entre hebras”
- 50 Grupo I: -NR⁸⁶CH₂CO-; “polar-catiónico”
- Grupo K: -NR⁸⁷CH₂CO-; “polar no cargado”

Además, Pro también puede ser un residuo aminoácido de la cadena Z, con la excepción de las posiciones en las que son posibles los enlaces entre hebras (H).

El grupo C comprende residuos aminoácido con grupos de cadena lateral hidrofóbicos de tamaño pequeño a mediano según la definición general del sustituyente R⁷². Residuo hidrofóbico se refiere a una cadena lateral de aminoácidos que no está cargada a pH fisiológico y es repelida por una solución acuosa. Además, habitualmente estas cadenas laterales no contienen grupos donadores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias y las correspondientes sales protonadas de las mismas, tioles, alcoholes, fosfonatos, fosfatos, ureas o tioureas. Sin embargo, pueden contener grupos aceptores de enlace de hidrógeno, tales como éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias, fosfonatos y fosfatos de alquilo o arilo, o aminas terciarias. Los aminoácidos de tamaño pequeño a mediano genéticamente codificados incluyen alanina, isoleucina, leucina, metionina y valina.

El grupo D comprende residuos aminoácido con grupos de cadena lateral aromáticos y heteroaromáticos según la definición general para el sustituyente R⁷³. Residuo aminoácido aromático se refiere a un aminoácido hidrofóbico que

ES 2 305 355 T3

presenta una cadena lateral que contiene, como mínimo, un anillo que presenta un sistema conjugado electrón π (grupo aromático). Además, puede contener grupos donadores de enlace de hidrógeno tales como (aunque sin limitarse a los mismos) amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias y las correspondientes sales protonadas de las mismas, tioles, alcoholes, fosfonatos, fosfatos, ureas o tioureas, y grupos aceptores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias, fosfonatos y fosfatos de alquilo o arilo, o aminas terciarias. Los aminoácidos aromáticos genéticamente codificados incluyen fenilalanina y tirosina.

Residuo aminoácido heteroaromático se refiere a un aminoácido hidrofóbico que presenta una cadena lateral que contiene, como mínimo, un anillo que presenta un sistema conjugado π que incorpora, como mínimo, un heteroátomo tal como (aunque sin limitarse a los mismos) O, S y N, según la definición general para el sustituyente R⁷⁷. Además, estos residuos pueden contener grupos donadores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias y las correspondientes sales protonadas de las mismas, tioles, alcoholes, fosfonatos, fosfatos, ureas o tioureas, y grupos aceptores de enlace de hidrógeno tales como (aunque sin limitarse a los mismos) éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias, fosfonatos y fosfatos de alquilo o arilo, o aminas terciarias. Los aminoácidos heteroaromáticos genéticamente codificados incluyen triptófano e histidina.

El grupo E comprende aminoácidos que contienen cadenas laterales con residuos polar-catiónicos, derivados de acilamino y urea, según la definición general para el sustituyente R⁷⁴. Polar-catiónico se refiere a una cadena lateral básica que está protonada a pH fisiológico. Los aminoácidos polar-catiónicos genéticamente codificados incluyen arginina, lisina e histidina. La citrulina es un ejemplo de residuo aminoácido derivado de la urea.

El grupo F comprende aminoácidos que contienen cadenas laterales con residuos polares no cargados según la definición general para sustituyente R⁸⁴. Residuo polar no cargado se refiere a una cadena lateral hidrofílica que no está cargada a pH fisiológico, pero que no es repelida por soluciones acuosas. Estas cadenas laterales contienen típicamente grupos donadores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias y las correspondientes sales protonadas de las mismas, tioles, alcoholes, fosfonatos, fosfatos, ureas o tioureas. Estos grupos pueden formar redes de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. Además pueden contener también grupos aceptores de enlace de hidrógeno tales como (aunque sin limitarse a los mismos) éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias, fosfonatos y fosfatos de alquilo o arilo, o aminas terciarias. Los aminoácidos polares no cargados genéticamente codificados incluyen asparagina, cisteína, glutamina, serina y treonina.

El grupo H comprende cadenas laterales preferentemente de (L)-aminoácidos en posiciones opuestas de la región de la hebra β que pueden formar un enlace entre hebras. El enlace más ampliamente conocido es el puente disulfuro, formado por cisteínas y homocisteínas situadas en posiciones opuestas de la hebra β . Se conocen diversos métodos para formar enlaces disulfuro, incluyendo los descritos por: J. P. Tam y otros, *Synthesis* 1979, 955-957; Stewart y otros, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Company, III., 1984; Ahmed y otros, *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 8477-8482; y Pennington y otros, *Peptides*, pág. 164-166, Giralt y Andreu, Eds., ESCOM Leiden, The Netherlands, 1990. Del modo más ventajoso, para el alcance de la presente invención, los enlaces disulfuro se pueden preparar utilizando grupos protectores acetamidometil (Acm) para la cisteína. Un enlace entre hebras bien establecido consiste en enlazar ornitinas y lisinas, respectivamente, con residuos de ácido glutámico y ácido aspártico situados en posiciones opuestas de la hebra β mediante la formación de un enlace amida. Los grupos protectores preferentes para los grupos amino de cadena lateral de ornitina y lisina son aliloxycarbonilo (Alloc) y alilésteres para el ácido aspártico y glutámico. Finalmente, los enlaces entre hebras también se pueden establecer enlazando los grupos amino de lisina y ornitina situados en posiciones opuestas de la hebra β con reactivos tales como N,N-carbonilimidazola, a efectos de formar ureas cíclicas.

El grupo I comprende glicina con el grupo amino sustituido por cadenas que contienen residuos polar-catiónicos según la definición general para el sustituyente R⁸⁶. Polar-catiónico se refiere a una cadena lateral básica que está protonada a pH fisiológico.

El grupo K comprende glicina con el grupo amino sustituido por cadenas que contienen residuos polares no cargados según la definición general para el sustituyente R⁸⁷. Residuo polar no cargado se refiere a una cadena lateral hidrofílica que no está cargada a pH fisiológico, pero que no es repelida por soluciones acuosas. Estas cadenas laterales contienen típicamente grupos donadores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) amidas primarias y secundarias, tioles, alcoholes o ureas. Estos grupos pueden formar redes de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. Además, también pueden contener grupos aceptores de enlace de hidrógeno, tales como (aunque sin limitarse a los mismos) éteres, tioéteres, ésteres o grupos amino terciarios.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las posiciones para los enlaces entre hebras son las posiciones P4 y P9 y/o P2 y P11 tomados conjuntamente.

Se conoce que estos enlaces entre hebras estabilizan las conformaciones en horquilla β y, de este modo, constituyen un importante elemento estructural para el diseño de los miméticos de horquilla β .

Los residuos aminoácido preferentes (distintos de los de tipo I y K) en la cadena Z son los derivados de los α -aminoácidos naturales. A continuación se da una lista de aminoácidos que son adecuados, o cuyos residuos son

ES 2 305 355 T3

adecuados, para los propósitos de la presente invención, correspondiéndose las abreviaciones con la práctica habitual adoptada generalmente:

	código de tres letras		código de una letra
5	Ala	L-alanina	A
	Arg	L-arginina	R
	Asn	L-asparagina	N
10	Asp	ácido L-aspártico	D
	Cys	L-cisteína	C
15	Glu	ácido L-glutámico	E
	Gln	L-glutamina	Q
	Gly	glicina	G
20	His	L-histidina	H
	Ile	L-isoleucina	I
	Leu	L-leucina	L
25	Lys	L-lisina	K
	Met	L-metionina	M
	Phe	L-fenilalanina	F
30	Pro	L-prolina	P
	^D Pro	D-prolina	Dp
	Ser	L-serina	S
35	Thr	L-treonina	T
	Trp	L-triptófano	W
	Tyr	L-tirosina	Y
40	Val	L-valina	V

Otros α -aminoácidos adecuados, o cuyos residuos son adecuados, para los propósitos de la presente invención incluyen:

45	Cit	L-citrulina
	Orn	L-ornitina
	tBuA	L-t-butilalanina
50	Sar	sarcosina
	Pen	L-penicilamina
	t-BuG	L-ter-butilglicina
55	4AmPhe	L-para-aminofenilalanina
	3AmPhe	L-meta-aminofenilalanina
	2AmPhe	L-ortho-aminofenilalanina
60	Phe (mC(NH ₂)=NH)	L-meta-amidinofenilalanina
	Phe (pC(NH ₂)=NH)	L-para-amidinofenilalanina
	Phe (mNHC(NH ₂)=NH)	L-meta-guanidinofenilalanina
65	Phe (pNHC(NH ₂)=NH)	L-para-guanidinofenilalanina
	Phg	L-fenilglicina

ES 2 305 355 T3

	Cha	L-ciclohexilalanina
	C ₄ al	L-3-ciclobutilalanina
5	C ₅ al	L-3-ciclopentilalanina
	Nle	L-norleucina
	2-Nal	L-2-naftilalanina
10	1-Nal	L-1-naftilalanina
	4Cl-Phe	L-4-Clorofenilalanina
	3Cl-Phe	L-3-Clorofenilalanina
15	2Cl-Phe	L-2-Clorofenilalanina
	3,4Cl ₂ -Phe	L-3,4-Diclorofenilalanina
	4F-Phe	L-4-Fluorofenilalanina
20	3F-Phe	L-3-Fluorofenilalanina
	2F-Phe	L-2-Fluorofenilalanina
	Tic	ácido 1,2,3,4-
25		tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico
	Thi	L-β-2-tienilalanina
	Tza	L-2-tiazolilalanina
30	Mso	L-metionina sulfóxido
	AcLys	N-acetilisina
	Dpr	ácido 2,3-diaminopropiónico
35	A ₂ Bu	ácido 2,4-diaminobutírico
	Dbu	ácido (S)-2,3-diaminobutírico
	Abu	ácido γ-aminobutírico (GABA)
40	Aha	ácido ε-aminohexanoico
	Aib	ácido α-aminoisobutírico
	Y(Bzl)	L-O-benciltirosina
45	Bip	L-(4-fenil)fenilalanina
	S(Bzl)	L-O-bencilserina
	T(Bzl)	L-O-benciltreonina
50	hCha	L-homo-ciclohexilalanina
	hCys	L-homo-cisteína
	hSer	L-homo-serina
55	hArg	L-homo-arginina
	hPhe	L-homo-fenilalanina
	Bpa	L-4-benzoilfenilalanina
60	4-AmPyrr1	ácido (2S,4S)-4-amino- pirrolidina-L-carboxílico
	4-AmPyrr2	ácido (2S,4R)-4-amino- pirrolidina-L-carboxílico
65	4-PhePyrr1	ácido (2S,5R)-4-fenil-

ES 2 305 355 T3

		pirrolidina-L-carboxílico
	4-PhePyrr2	ácido (2S,5S)-4-fenil-
5		pirrolidina-L-carboxílico
	5-PhePyrr1	ácido (2S,5R)-5-fenil-
		pirrolidina-L-carboxílico
10	5-PhePyrr2	ácido (2S,5S)-5-fenil-
		pirrolidina-L-carboxílico
	Pro(4-OH)1	(4S)-L-hidroxiprolina
15	Pro(4-OH)2	(4R)-L-hidroxiprolina
	Pip	ácido L-pipecólico
	^D Pip	ácido D-pipecólico
20	OctG	L-octilglicina
	MePhe	L-N-metilfenilalanina
	MeNle	L-N-metilnorleucina
25	MeAla	L-N-metilalanina
	Melle	L-N-metilisoleucina
	MeVal	L-N-metilvalina
30	MeLeu	L-N-metilleucina
	BnG	N-bencilglicina
	(4-OH)BnG	N-4-hidroxi-bencilglicina
35	IaG	N-isoamilglicina
	IbG	N-isobutilglicina
	(EA)G	N-(2-aminoetil)glicina
40	(PrA)G	N-(3-amino-n-propil)glicina
	(BA)G	N-(4-amino-n-butil)glicina
	(PeA)G	N-(5-amino-n-pentil)glicina
45	(EGU)G	N-(2-guanidinoetil)glicina
	(PrGU)G	N-(3-guanidino-n-propil)glicina
	(BGU)G	N-(4-guanidino-n-butil)glicina
50	(PeGU)G	N-(5-guanidino-n-pentil)glicina
	(PEG ₃ -NH ₂)G	N-[(CH ₂) ₃ O-(CH ₂ -CH ₂ O) ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂]glicina
55	(Et-CONH ₂)G	N-(2-carbamoiletel)glicina
	(Et-OH)G	N-(2-hidroxietyl)glicina
	(CH ₂ -CONH ₂)G	N-(carbamoilmetyl)glicina
60	(n-Pr-NHCONH ₂)G	N-(3-ureil-n-propil)glicina
	(Et-SH)G	N-(2-mercaptoetyl)glicina

65

ES 2 305 355 T3

Los residuos particularmente preferentes para el grupo C son:

5	Ala	L-alanina
	Ile	L-isoleucina
	Leu	L-leucina
10	Met	L-metionina
	Val	L-valina
	tBuA	L-t-butilalanina
15	t-BuG	L-ter-butilglicina
	Cha	L-ciclohexilalanina
	C ₄ al	L-3-ciclobutilalanina
20	C ₅ al	L-3-ciclopentilalanina
	Nle	L-norleucina
	hCha	L-homo-ciclohexilalanina
25	OctG	L-octilglicina
	MePhe	L-N-metilfenilalanina
	MeNle	L-N-metilnorleucina
30	MeAla	L-N-metilalanina
	Melle	L-N-metilisoleucina
	MeVal	L-N-metilvalina
35	MeLeu	L-N-metilleucina
	BnG	N-bencilglicina
	(4-OH) BnG	N-4-hidroxi-bencilglicina
40	IaG	N-isoamilglicina
	IbG	N-isobutilglicina

45

50

55

60

65

ES 2 305 355 T3

Los residuos particularmente preferentes para el grupo D son:

	His	L-histidina
5	Phe	L-fenilalanina
	Trp	L-triptófano
	Tyr	L-tirosina
10	Phg	L-fenilglicina
	2-Nal	L-2-naftilalanina
	1-Nal	L-1-naftilalanina
15	4Cl-Phe	L-4-clorofenilalanina
	3Cl-Phe	L-3-clorofenilalanina
	2Cl-Phe	L-2-clorofenilalanina
20	3, 4Cl ₂ -Phe	L-3,4-diclorofenilalanina
	4F-Phe	L-4-fluorofenilalanina
	3F-Phe	L-3-fluorofenilalanina
25	2F-Phe	L-2-fluorofenilalanina
	Thi	L-b-2-tienilalanina
	Tza	L-2-tiazolilalanina
30	Y(Bzl)	L-o-benciltirosina
	Bip	L-bifenilalanina
	S(Bzl)	L-o-bencilserina
35	T(Bzl)	L-o-benciltreonina
	hPhe	L-homo-fenilalanina
40	Bpa	L-4-benzoilfenilalanina

Los residuos particularmente preferentes para el grupo E son:

	Arg	L-arginina
45	Lys	L-lisina
	Orn	L-ornitina
	Dpr	ácido L-2,3-diaminopropiónico
50	A ₂ Bu	ácido L-2,4-diaminobutírico
	Dbu	ácido (S)-2,3-diaminobutírico
	Phe (pNH ₂)	L-para-aminofenilalanina
55	Phe (mNH ₂)	L-meta-aminofenilalanina
	Phe (oNH ₂)	L-orto-aminofenilalanina
	hArg	L-homo-arginina
60	Phe (mC (NH ₂) =NH)	L-meta-amidinofenilalanina
	Phe (pC (NH ₂) =NH)	L-para-amidinofenilalanina
	Phe (mNHC (NH ₂) =NH)	L-meta-guanidinofenilalanina
65	Phe (pNHC (NH ₂) =NH)	L-para-guanidinofenilalanina
	Cit	L-citrulina

ES 2 305 355 T3

Los residuos particularmente preferentes para el grupo F son:

5	Asn	L-asparagina
	Cys	L-cisteína
	Gln	L-glutamina
	Ser	L-serina
10	Thr	L-treonina
	Cit	L-citrulina
	Pen	L-penicilamina
15	AcLys	L-Ne-acetillisina
	hCys	L-homo-cisteína
	hSer	L-homo-serine
20		

Los residuos particularmente preferentes para el grupo I son:

25	(EA)G	N-(2-aminoetil)glicina
	(PrA)G	N-(3-amino-n-propil)glicina
	(BA)G	N-(4-amino-n-butil)glicina
	(PeA)G	N-(5-amino-n-pentil)glicina
30	(EGU)G	N-(2-guanidinoetil)glicina
	(PrGU)G	N-(3-guanidino-n-propil)glicina
	(BGU)G	N-(4-guanidino-n-butil)glicina
35	(PeGU)G	N-(5-guanidino-n-pentil)glicina
	(PEG ₃ -NH ₂)G	N-[(CH ₂) ₃ O-(CH ₂ -CH ₂ O) ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂]glicina
40		

Los residuos particularmente preferentes para el grupo K son:

45	(Et-CONH ₂)G	N-(2-carbamoiletel)glicina
	(CH ₂ -CONH ₂)G	N-(carbamoilmetil)glicina
	(n-Pr-NHCONH ₂)G	N-(3-ureil-n-propil)glicina
50	(Et-SH)G	N-(2-mercaptoetil)glicina
	(Et-OH)G	N-(2-hidroxietyl)glicina

55 Generalmente, la cadena peptídica Z dentro de los miméticos de horquilla β según la invención comprende 12 residuos aminoácido. Las posiciones P1 a P2 de cada residuo aminoácido en la cadena Z se definen inequívocamente como sigue: P1 representa el primer aminoácido en la cadena Z que está acoplado por su terminal N al terminal C de la matriz, y P12 representa el último aminoácido de la cadena Z que está acoplado por su terminal C al terminal N de la matriz. Cada una de las posiciones P1 a P12 contiene preferentemente un residuo aminoácido perteneciente a uno de los tipos anteriores C, D, E, F o I, tal como sigue:

- 60
- P1: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F,
 - P2: de tipo D o de tipo E;
- 65
- P3: de tipo C;
 - P4: de tipo E o de tipo I o de tipo F;

ES 2 305 355 T3

- P5: de tipo E o de tipo I o de tipo F;
- P6: de tipo E o de tipo I o de tipo D;
- 5 - P7: de tipo E o de tipo I o de tipo C;
- P8: de tipo D;
- P9: de tipo E;
- 10 - P10: de tipo D o de tipo C,
- P11: de tipo E o de tipo D; o de tipo C y
- 15 - P12: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F;
- siendo también posibles en P6 y P7 los isómeros D;

con la condición de que, como mínimo, uno de los residuos aminoácido sea del tipo I.

20 Más preferentemente, los residuos aminoácido de las posiciones 1-12 son:

- P1: Leu; Thr; o Arg;
- 25 - P2: Arg; o Trp;
- P3: Leu;
- P4: Lys; hArg; (BA)G; o Gln;
- 30 - P5: Lys; Gln; hArg; o (PeA)G;
- P6: Arg, Trp, hArg; (EGU)G;
- (EA)G; (PrA)G; (PeA)G o (BA)G;
- 35 - P7: Arg; (PeA)G; o Val
- P8: Trp; o Bip;
- 40 - P9: Lys; Arg; o hArg;
- P10: Tyr;
- P11: Arg; o Tyr; y
- 45 - P12: Val; o Arg

con la condición de que

- 50 - el residuo aminoácido en P4 sea (BA)G; y/o
- el residuo aminoácido en P5 sea (PeA)G; y/o
- el residuo aminoácido en P6 sea (EGU)G o
- 55 (EA)G o (PrA)G o (PeA)G o (BA)G; y/o
- el residuo aminoácido en P7 sea (PeA)G.

60 Los β -peptidomiméticos particularmente preferentes según la invención incluyen los descritos en los ejemplos 1 a 12.

65 El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo ventajosamente como síntesis en hileras paralelas a efectos de obtener librerías de peptidomiméticos de horquilla β fijados sobre matrices que presentan la fórmula general I anterior. Esta síntesis en paralelo permite obtener hileras de diversos compuestos (habitualmente 24 a 192, típicamente 96) de fórmula general I con grandes rendimientos y purezas definidas, minimizando la formación de subproductos diméricos y poliméricos. La selección adecuada del soporte sólido funcionalizado (es decir, un soporte sólido más la molécula de enlace), las matrices y el lugar de ciclación juega un papel clave.

ES 2 305 355 T3

El soporte sólido funcionalizado se deriva convenientemente de poliestireno entrecruzado preferentemente con 1-5% de divinilbenceno; poliestireno recubierto con espaciadores de polietilenglicol (Tentagel^R); y resinas de poliácridamida (véase también Obrecht, D.; Villalgordo, J.-M, "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries" ("Síntesis combinatoria y paralela sobre soporte sólido de librerías de compuestos de bajo peso molecular"), Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

El soporte sólido se funcionaliza mediante un enlace, es decir, una molécula espaciadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para la fijación al soporte sólido y en el otro extremo un grupo funcional selectivamente dissociable utilizado para las subsiguientes transformaciones químicas y procedimientos de disociación. Para los propósitos de la presente invención, el enlace se debe seleccionar de tal modo que finalmente libere el grupo carboxilo bajo condiciones levemente ácidas que no afecten a los grupos protectores presentes en todos los grupos funcionales de las cadenas laterales de los diversos aminoácidos. Los enlaces adecuados para los propósitos de la presente invención forman ésteres lábiles en medio ácido con el grupo carboxilo de los aminoácidos, habitualmente ésteres lábiles en medio ácido de bencilo, benzhidrido y tritilo; ejemplos de estructuras de enlace de este tipo incluyen 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (enlace Sasrin^R), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlace Rink), ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlace HMPB), tritilo y 2-clorotritilo.

Preferentemente, el soporte se deriva de poliestireno entrecruzado, del modo más preferente con 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado mediante el enlace 2-clorotritilo.

Cuando se lleva a cabo como síntesis de hileras paralelas, el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo ventajosamente tal como se describe a continuación, pero para los expertos en la materia será inmediatamente evidente que este procedimiento deberá ser modificado en el caso de que se desee sintetizar un único compuesto que presente la fórmula anterior I.

En cierto número de recipientes de reacción (habitualmente de 24 a 192, típicamente 96) igual al número total de compuestos que se desee sintetizar mediante el método paralelo, se cargan de 25 a 1.000 mg, preferentemente 100 mg, del soporte sólido apropiadamente funcionalizado, preferentemente poliestireno entrecruzado de 1 a 3% o resina de tentagel.

El disolvente utilizado debe ser capaz de hinchar la resina e incluye, aunque sin limitarse a los mismos, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), dioxano, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), alcohol isopropílico y similares. Las mezclas de disolventes que contienen, por lo menos como un componente, un disolvente polar (por ejemplo, 20% TFE/DCM, 35% THF/NMP) son beneficiosas para asegurar la alta reactividad y la solvatación de las cadenas peptídicas enlazadas a la resina (Fields, G. B., Fields, C. G., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4202-4207).

Con el desarrollo de diversos enlaces que liberan el grupo carboxílico C-terminal bajo condiciones levemente ácidas, sin afectar a los grupos lábiles en medio ácido que protegen los grupos funcionales en la cadena o cadenas laterales, se han obtenido considerables progresos en la síntesis de fragmentos peptídicos protegidos. El enlace derivado de 2-metoxi-4-hidroxibencilalcohol (enlace Sasrin^R, Mergler y otros, Tetrahedron Lett. 1988, 29 4005-4008) es dissociable con ácido trifluoroacético diluido (0,5-1% TFA en DCM), y es estable a las condiciones de desprotección del Fmoc durante la síntesis de los péptidos, siendo compatibles con este esquema de protección los grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu. Otros enlaces adecuados para el procedimiento según la invención incluyen el superácido lábil 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlace Rink, Rink, H. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787-3790), requiriendo la eliminación del péptido un 10% de ácido acético en DCM o un 0,2% de ácido trifluoroacético en DCM; el enlace derivado de ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlace HMPB, Flörsheimer & Riniker, Peptides 1991, 1990 131), que también se disocia con un 1% de TFA/DCM a efectos de obtener un fragmento peptídico que contiene todos los grupos protectores de cadena lateral lábiles en medio ácido; y, además, el enlace cloruro de 2-clorotritilo (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946), que permite la separación del péptido utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 min.

Son, por ejemplo, grupos protectores adecuados para los aminoácidos y, respectivamente, para sus residuos:

- para el grupo amino (tal como está presente, por ejemplo, también en la cadena lateral de lisina)

Cbz benciloxicarbonilo

Boc ter-butiloxicarbonilo

Fmoc 9-fluorenilmetoxicarbonilo

Alloc aliloxicarbonilo

Teoc trimetilsililetoxicarbonilo

Tcc tricloroetoxicarbonilo

ES 2 305 355 T3

Nps o-nitrofenilsulfonilo

Trt trifenilmetilo o tritilo;

- 5 - para el grupo carboxilo (tal como está presente, por ejemplo, también en la cadena lateral de ácido aspártico y glutámico) por conversión en ésteres con los componentes alcohol

tBu ter-butilo

10 Bn bencilo

Me metilo

Ph fenilo

15 Pac fenacilo

alilo

20 Tse trimetilsililetilo

Tce tricloroetilo;

- para el grupo guanidino (tal como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de arginina)

25 Pmc 2,2,5,7,8-pentametilmroman-6-sulfonilo

Ts tosilo (es decir, p-toluensulfonilo)

30 Cbz benciloxicarbonilo

Pbf pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

- para el grupo hidroxilo (tal como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de treonina y serina)

35 TBu ter-butilo

Bn bencilo

40 Trt tritilo

- y para el grupo mercapto (tal como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de cisteína)

Acm acetamidometilo

45 tBu ter-butilo

Bn bencilo

50 Trt tritilo

Mtr 4-metoxitritilo.

55 Los derivados aminoácido protegidos por 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) se utilizan preferentemente como los bloques constructivos para la construcción de los miméticos de bucle de horquilla β fijados sobre matriz de fórmula I. Para la desprotección, es decir, la separación por disociación del grupo Fmoc, se puede utilizar 20% piperidina en DMF o 2% DBU/2% piperidina en DMF.

60 Los derivados de glicina N-sustituídos (tipos I y K) utilizados como bloques constructivos para la construcción de los miméticos de bucle de horquilla β fijados sobre matriz de fórmula I se derivan de los derivados aminoácido protegidos por 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o preferentemente se construyen en dos etapas a partir de precursores de glicina que contienen un grupo saliente, tal como ácido bromoacético, cloroacético o yodoacético, y de bloques constructivos de amina primaria adecuados $\text{NH}_2\text{-R}^{86}$ o $\text{NH}_2\text{-R}^{87}$, según la definición de R^{86} o R^{87} . La primera etapa de síntesis consiste en la fijación del agente de acetilación que contiene el grupo saliente, tal como ácido bromoacético, al intermediario enlazado a la resina, a través de la formación de un enlace amida. La segunda etapa de reacción (el desplazamiento nucleofílico) se lleva a cabo utilizando los bloques constructivos de amina primaria, estando dichos residuos, si es necesario, adecuadamente protegidos con grupos tales como los descritos anteriormente para las cadenas laterales de los aminoácidos.

ES 2 305 355 T3

Para la incorporación de los derivados de glicina N-sustituídos como bloques constructivos en los miméticos de bucle de horquilla β fijados sobre matriz, se utiliza el procedimiento general de síntesis para montar los miméticos de horquilla, tal como se describe en el presente documento.

5 La cantidad del reactivo, es decir, el derivado aminoácido precursor de glicina que contiene un grupo saliente, es habitualmente de 1 a 20 equivalentes en base a la carga de miliequivalentes por gramo (meq/g) del soporte sólido funcionalizado (típicamente de 0,1 a 2,85 meq/g para resinas de poliestireno) pesada originalmente en el tubo de reacción. Si se requiere, se pueden utilizar equivalentes adicionales de reactivos a efectos de llevar la reacción a compleción en un tiempo razonable. Los tubos de reacción, junto con el bloque portante y el colector, se reinsertan en el bloque contenedor y el aparato. Se inicia el flujo de gas a través del colector a efectos de proporcionar un entorno controlado, por ejemplo, nitrógeno, argón, aire y similares. El flujo de gas también se puede calentar o enfriar antes de hacerlo pasar a través del colector. El calentamiento o enfriamiento de los pocillos de reacción se alcanza calentando el bloque de reacción o enfriando externamente con isopropanol/hielo seco y similares a efectos de desencadenar las reacciones sintéticas deseadas. La agitación se alcanza por vibración o agitación magnética (dentro del tubo de reacción). Las estaciones de trabajo preferentes (aunque sin limitarse a las mismas) son la estación Labsource's Combi-chem, ABI 433A y el sintetizador MultiSyn Tech's-Syro.

La formación del enlace amida requiere la activación del grupo α -carboxilo para la etapa de acilación. Cuando la desactivación se lleva a cabo mediante las carbodiimidas de uso habitual, tal como dicitohexilcarbodiimida (DCC, Sheehan & Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067-1068) o diisopropilcarbodiimida (DIC, Sarantakis y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 73, 336-342), la dicitohexilurea resultante es insoluble y, respectivamente, la diisopropilurea es soluble en los disolventes utilizados habitualmente. En una variación del método carbodiimida, se incluye como aditivo a la mezcla de acoplamiento 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, König & Geiger, Chem. Ber 1970, 103, 788-798). La HOBt impide la deshidratación, inhibe la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las lentas reacciones de acoplamiento. Algunos reactivos de fosfonio han sido utilizados como reactivos de acoplamiento directo, tal como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP) (Castro y otros, Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis, 1976, 751-752), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-BOP, Coste y otros, Tetrahedron Lett. 1990, 31, 205-208), o tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), o hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU, Knorr y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930); estos reactivos de fosfonio también son adecuados para la formación *in situ* de ésteres de HOBt con los derivados aminoácido protegidos. Más recientemente, también se han utilizado como reactivos de acoplamiento difenoxifosforilo azida (DPPA) o tetrafluoroborato de o-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TATU) o hexafluorofosfato de o-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU)/7-aza-1-hidroxi benzotriazol (HOAt, Carpino y otros, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281).

Debido al hecho de que son esenciales reacciones de acoplamiento cuasi cuantitativas, es deseable tener una evidencia experimental de la compleción de las reacciones. El ensayo de ninhidrina (Kaiser y otros, Anal. Biochemistry 1970, 34, 595), en el que una respuesta colorimétrica positiva a una alícuota de péptido enlazado a resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, se puede llevar a cabo fácil y rápidamente después de cada etapa de acoplamiento. La química del Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo de Fmoc cuando se libera con la base (Meienhofer y otros, Int. J. Peptide Protein Res. 1979, 13, 35-42).

La reacción de desplazamiento nucleofílico que substituye el grupo saliente del precursor de glicina se lleva a cabo preferentemente en DMF. La cantidad típica de bloque constructivo de amina primaria utilizada para la reacción de desplazamiento nucleofílico está comprendida entre 1 y 12 eq, en base a la carga de miliequivalentes por gramo (meq/g) del soporte sólido funcionalizado. La prueba experimental de la compleción de la acetilación y de la siguiente reacción de desplazamiento nucleofílico del procedimiento en dos etapas para sintetizar derivados de glicina N-sustituídos utilizados como bloques constructivos habitualmente no se controla (R.N. Zuckermann, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10646-10647 y referencias citadas).

El intermediario enlazado a resina dentro de cada tubo de reacción se lava del exceso de reactivos retenidos, de disolventes y de subproductos mediante exposición repetitiva a un disolvente o disolventes puros mediante uno de los dos métodos siguientes:

- 1) los pocillos de reacción se llenan con disolvente (preferentemente 5 ml), los tubos de reacción, junto con el bloque portante y el colector, se sumergen y se agitan durante 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y se drenan por gravedad seguido de la aplicación de gas a presión a través de la entrada del colector (manteniendo cerrada la salida) a efectos de expeler el disolvente;
- 2) el colector se extrae del bloque portante, se suministran alícuotas de disolvente (preferentemente 5 ml) a través de la parte superior de los tubos de reacción y se drenan por gravedad a través de un filtro hasta un recipiente receptor, tal como un tubo de ensayo o un vial.

Los dos procedimientos de lavado anteriores se repiten hasta aproximadamente 50 veces (preferentemente, aproximadamente 10 veces), controlando la eficiencia de la eliminación de reactivo, disolvente y subproducto mediante métodos tales como TLC, GC o inspección de las aguas de lavado.

ES 2 305 355 T3

El procedimiento descrito anteriormente de hacer reaccionar el compuesto enlazado a resina con reactivos dentro de los pocillos de reacción seguido de la eliminación de los reactivos en exceso, los subproductos y los disolventes, se repite con cada transformación sucesiva hasta obtener el péptido lineal final enlazado a resina completamente protegido.

Antes de separar este péptido lineal completamente protegido del soporte sólido, es posible, si se desea, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir de este modo apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados. A este efecto, el grupo o grupos funcionales en cuestión se deben proteger inicialmente mediante un grupo protector que se puede eliminar selectivamente sin afectar al resto de grupos protectores presentes. El Alloc (aliloxicarbonilo) es un ejemplo de un grupo protector de este tipo para amino, el cual puede ser eliminado selectivamente, por ejemplo, mediante Pd⁰ y fenilsilano en CH₂Cl₂, sin afectar al resto de grupos protectores, tal como el Fmoc, presentes en la molécula. A continuación, el grupo reactivo liberado de este modo puede ser tratado con un agente adecuado para introducir el sustituyente deseado. Así, por ejemplo, un grupo amino se puede acilar mediante un agente acilante correspondiente al sustituyente acilo que se desea introducir.

La separación del péptido lineal completamente protegido del soporte sólido se alcanza por inmersión de los tubos de reacción, junto con el bloque portante y el colector, en pocillos de reacción que contienen una solución de reactivos de disociación (preferentemente entre 3 y 5 ml). Se llevan a cabo el flujo de gas, el control de temperatura, la agitación y el control de la reacción tal como se ha descrito anteriormente, y tal como se desea a efectos de llevar a cabo la reacción de separación. Los tubos de reacción, junto con el bloque portante y el colector, se desmontan del bloque receptor y se elevan por encima del nivel de la solución, aunque por debajo de la boca superior de los pocillos de reacción, y se aplica gas a presión a través de la entrada del colector (manteniendo cerrada la salida) a efectos de expeler eficazmente la solución de producto final hacia los pocillos receptores. A continuación, se lava la resina restante en los tubos de reacción de 2 a 5 veces, tal como anteriormente, con 3 a 5 ml de un disolvente apropiado a efectos de extraer (extracción por lavado) tanta cantidad del producto separado como sea posible. Las soluciones de producto obtenidas de este modo se combinan, procurando evitar la mezcla cruzada. A continuación, las soluciones/extractos individuales se manipulan del modo necesario a efectos de aislar los compuestos finales. Las manipulaciones típicas incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, evaporación, concentración, extracción líquido/líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones adicionales en solución.

Las soluciones que contienen péptidos lineales completamente protegidos que han sido disociados del soporte sólido y neutralizados con una base, se evaporan. A continuación, se lleva a cabo la ciclación en solución utilizando disolventes tales como DCM, DMF, dioxano, THF y similares. Para la ciclación se pueden utilizar diversos reactivos de acoplamiento, mencionadas anteriormente. La duración de la ciclación es aproximadamente de 6-48 horas, preferentemente de aproximadamente 24 horas. Se realizó un seguimiento del progreso de la reacción, por ejemplo, por RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa). A continuación, el disolvente se elimina por evaporación, el derivado peptídico cíclico completamente protegido se disuelve en un disolvente no miscible con agua, tal como DCM, y la solución se extrae con agua o una mezcla de disolventes miscibles en agua, a efectos de eliminar cualquier exceso del reactivo de acoplamiento.

Antes de eliminar los grupos protectores del péptido cíclico completamente protegido, es posible, si se desea, formar un enlace entre hebras entre cadenas laterales de los residuos aminoácidos apropiados, en posiciones opuestas de la región de la hebra β .

Los enlaces entre hebras y su formación se han descrito anteriormente en relación con las explicaciones referentes a los grupos de tipo H, y pueden ser, por ejemplo, puentes disulfuro formados por cisteínas y homocisteínas en posiciones opuestas de la hebra β , o residuos de ácido glutámico y aspártico enlazándose con ornitinas y, respectivamente, lisinas, localizadas en posiciones opuestas de la hebra β , mediante formación de un enlace amida. La formación de dichos enlaces entre hebras se puede llevar a cabo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

El derivado peptídico completamente protegido de tipo I se trata con 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS u otra combinación de limpiadores para llevar a cabo la disociación de los grupos protectores. El tiempo de reacción de la disociación es habitualmente de 30 minutos a 12 horas, preferentemente de aproximadamente 2 horas.

Tras la desprotección es posible, si se desea, convertir cualquier grupo o grupos amino presentes en la molécula en grupos guanidina utilizando los reactivos de guanidación adecuados (K. Feichinger y otros, J. Org. Chem. 1998, 63, 3804-2805). Los reactivos de guanidación adecuados incluyen, sin limitarse a los mismos, N,N-di-Boc-trifluorometansulfonilguanidina. Esta guanidación convierte, por ejemplo, todos los residuos (EA)G en residuos (EGU)G y, simultáneamente todos los residuos Lys en residuos hArg.

Finalmente, la mayor parte del disolvente (tal como TFA) que habitualmente todavía está presente se evapora y el producto se precipita con éter/hexano (1:1) u otros disolventes adecuados para ello. Tras la eliminación cuidadosa del disolvente, el derivado peptídico cíclico obtenido como producto final se puede aislar. En función de su pureza, este derivado peptídico puede ser utilizado directamente en ensayos biológicos, o se debe purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante HPLC preparativa.

Tal como se ha mencionado anteriormente, a continuación es posible, si se desea, convertir un compuesto de fórmula I obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable, o convertir una sal farmacéuticamente

ES 2 305 355 T3

aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre de fórmula I, o en una sal diferente farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de estas operaciones se pueden llevar a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

5 Los materiales de partida de fórmulas H_2NR^{86} y H_2NR^{87} son conocidos o pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden utilizar en un amplio abanico de aplicaciones a efectos de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos.

10

Por ejemplo, se pueden utilizar como desinfectantes o como conservantes para materiales tales como alimentos, cosméticos, medicamentos y otros materiales que contienen nutrientes. Los peptidomiméticos de horquilla β según la invención también se pueden utilizar para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con infecciones microbianas en plantas y animales.

15

Para su uso como desinfectantes o conservantes, los peptidomiméticos de horquilla β se pueden añadir al material deseado individualmente, como mezclas de diversos peptidomiméticos de horquilla β , o en combinación con otros agentes antimicrobianos. Los peptidomiméticos de horquilla β pueden ser administrados como tales o se pueden aplicar en forma de formulación apropiada junto con portadores, diluyentes o excipientes bien conocidos en la técnica.

20

Cuando se utilizan para tratar o prevenir infecciones o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, particularmente infecciones relacionadas con enfermedades respiratorias tales como la fibrosis quística, los peptidomiméticos de horquilla β pueden ser administrados individualmente, como mezclas de diversos peptidomiméticos de horquilla β , en combinación con otros agentes antimicrobianos o antibióticos, o en combinación con agentes antivirales (por ejemplo, anti-HIV) o anticancerígenos, o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. Los peptidomiméticos de horquilla β se pueden administrar como tales o como composiciones farmacéuticas.

25

Se pueden preparar composiciones farmacéuticas que comprenden los peptidomiméticos de horquilla β según la invención mediante procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, preparación de comprimidos recubiertos, levigado, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular del modo convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes fisiológicamente aceptables o sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los peptidomiméticos de horquilla β activos hasta obtener preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente. La formulación adecuada depende del método de administración escogido.

30

Para su administración tópica, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden formular como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc., tal como se conocen en la técnica.

35

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para su administración transdérmica, transmucósica, oral o pulmonar.

40

Para las inyecciones, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden formular en soluciones adecuadas, preferentemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hink, la solución de Ringer o amortiguador de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden presentar en forma de polvos para su combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su utilización.

45

Para la administración transmucósica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para que la barrera pueda ser permeada, tal como se conoce en la técnica.

50

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los peptidomiméticos de horquilla β activos según la invención con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Estos portadores permiten que los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones, etc., para la ingestión oral de los mismos por parte del paciente que debe ser tratado. Para las formulaciones orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen sustancias de relleno tales como azúcares, tal como lactosa, sucrosa, manitol y sorbitol; preparaciones celulósicas, tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidonas entrecruzadas, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas se pueden recubrir con azúcar o con recubrimiento entérico mediante técnicas estándar.

55

60

65

Para las preparaciones orales líquidas tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, colorantes y similares.

ES 2 305 355 T3

Para la administración bucal, la composición puede adoptar forma de comprimidos, pastillas, etc. formulados del modo habitual.

5 Para la administración por inhalación, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se suministran convenientemente en forma de pulverizador de aerosol en recipientes a presión o un nebulizador, utilizando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar disponiendo una válvula a efectos de suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su utilización en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvos de los peptidomiméticos de horquilla β según la invención
10 y una base de polvos adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos también se pueden formular como composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios, junto con las bases de supositorio adecuadas, tales como mantequilla de coco u otros glicéridos.

15 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención también se pueden formular como preparaciones depot. Estas formulaciones de acción prolongada pueden ser administradas por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente), o por inyección intramuscular. Para la obtención de estas preparaciones de depósito, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, en forma de emulsión en un aceite
20 aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como sales moderadamente solubles.

Además, se pueden utilizar otros sistemas farmacéuticos de administración, tales como liposomas y emulsiones, bien conocidos en la técnica. También se pueden utilizar algunos disolventes orgánicos, tal como dimetilsulfóxido. Adicionalmente, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se pueden suministrar utilizando un sistema
25 de liberación controlada, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación controlada y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación controlada, en función de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante un período comprendido entre algunas semanas y más de 100 días. En función de la naturaleza química y la estabilidad biológica del agente terapéutico, se pueden utilizar estrategias adicionales para la estabilización proteínica.

30 Dado que los peptidomiméticos de horquilla β según la invención pueden contener residuos cargados, se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como bases libres o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos de las bases libres correspondientes.

35 Los peptidomiméticos de horquilla β según la invención, con las composiciones de los mismos, se utilizan generalmente en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito que se pretende. Se debe entender que la cantidad utilizada dependerá de la aplicación particular.

40 Por ejemplo, para su utilización como desinfectante o conservante, una cantidad eficaz desde el punto de vista antimicrobiano de un peptidomimético de horquilla β según la invención, o de una composición del mismo, se aplica o se añade al material que se debe desinfectar o conservar. La expresión cantidad eficaz desde el punto de vista antimicrobiano se refiere a una cantidad de un peptidomimético de horquilla β según la invención o de una composición del mismo que inhibe el crecimiento de una población microbiana diana o resulta letal para la misma. Mientras que
45 la cantidad eficaz desde el punto de vista antimicrobiano dependerá de la aplicación particular, para su utilización como desinfectantes o conservantes, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención, o las composiciones de los mismos, habitualmente se añaden o se aplican al material que se debe desinfectar o conservar en cantidades relativamente pequeñas. Típicamente, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención comprenden menos de aproximadamente 5% en peso de una solución desinfectante o material que se debe desinfectar, preferentemente menos
50 de 1% en peso, y más preferentemente menos de 0,1% en peso. El experto en la materia será capaz de determinar las cantidades eficaces desde el punto de vista antimicrobiano de peptidomiméticos de horquilla β particulares según la invención para las aplicaciones particulares sin una experimentación excesiva, por ejemplo, mediante los ensayos *in vitro* descritos en los ejemplos.

55 Para su utilización para tratar o prevenir infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención, o las composiciones de los mismos, se administran o se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz en la mejora de los síntomas de infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con las mismas, o en su mejora, tratamiento o prevención. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra dentro de
60 las capacidades de los expertos en la materia, particularmente a la vista de la descripción detallada que se expone en el presente documento.

Tal como en el caso de los desinfectantes y conservantes, para la administración tópica para tratar o prevenir infecciones bacterianas se puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz utilizando, por ejemplo, los ensayos *in vitro* expuestos en los ejemplos. El tratamiento se puede aplicar mientras la infección es visible, o incluso cuando no lo es. El experto en la materia será capaz de determinar cantidades terapéuticamente eficaces para tratar infecciones
65 tópicas sin excesiva experimentación.

ES 2 305 355 T3

Para la administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de los ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales a efectos de alcanzar un intervalo de concentración de peptidomiméticos de horquilla β circulante que incluía el IC_{50} determinado en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo letal para el 50% de un cultivo celular), el MIC determinado en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de ensayo letal para el 100% de un cultivo celular). Dicha información puede ser utilizada para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

Las dosificaciones iniciales también se pueden determinar a partir de los datos *in vivo*, por ejemplo, de modelos animales, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. El experto en la materia puede optimizar fácilmente la administración a humanos en base a los datos en animales.

Las dosificaciones para aplicaciones como agentes antimicrobianos se pueden ajustar individualmente a efectos de proporcionar niveles en plasma de los peptidomiméticos de horquilla β según la invención suficientes para mantener el efecto terapéutico. Los niveles en suero terapéuticamente eficaces se pueden alcanzar administrando múltiples dosis diariamente.

En los casos de administración local o de toma selectiva, la concentración local eficaz de los peptidomiméticos de horquilla β según la invención puede no estar relacionada con la concentración en plasma. El experto en la materia será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin excesiva experimentación.

Evidentemente, la cantidad de peptidomiméticos de horquilla β administrada dependerá del sujeto que se somete a tratamiento, de su peso, de la gravedad de la infección, del modo de administración y de la consideración del médico responsable.

La terapia antimicrobiana se puede repetir intermitentemente mientras se pueden detectar las infecciones, o incluso cuando las mismas no se pueden detectar. La terapia se puede administrar individualmente o en combinación con otros fármacos, tales como, por ejemplo, antibióticos u otros agentes antimicrobianos.

Habitualmente, una dosificación terapéuticamente eficaz de los peptidomiméticos de horquilla β descritos en el presente documento proporcionará beneficios terapéuticos sin provocar ninguna toxicidad sustancial.

La hemólisis de glóbulos rojos se utiliza frecuentemente para la evaluación de la toxicidad de compuestos relacionados, tales como *protegrina* o *taquiplesinas*. Los valores se indican como el % en lisis de glóbulos rojos observado a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Los valores típicos determinados para péptidos catiónicos, tales como *protegrina* y *taquiplesinas*, son de 30-40%, con valores promedio de MIC de 1-5 $\mu\text{g/ml}$ para un amplio espectro de patógenos. Normalmente, los peptidomiméticos de horquilla β según la invención mostrarán hemólisis en un intervalo de 0,5-10%, frecuentemente en un intervalo de 1-5%, para niveles de actividad comparables a los mencionados anteriormente para *protegrina* y *taquiplesinas*. De este modo, los compuestos preferentes exhiben valores bajos de MIC y % bajos de hemólisis de glóbulos rojos observados a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

La toxicidad de los peptidomiméticos de horquilla β según la invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la LD_{50} (dosis letal para el 50% de la población) o la LD_{100} (dosis letal para el 100% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los compuestos que exhiben elevados índices terapéuticos son preferentes. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su utilización en humanos. La dosificación de los peptidomiméticos de horquilla β según la invención está comprendida preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de dicho intervalo en función de la forma de dosificación y de la ruta de administración utilizadas. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosis pueden ser seleccionadas por el médico en particular a la lista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl y otros, 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap.1, pág. 1).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención con mayor detalle, pero no pretenden limitar su alcance en ningún sentido. En dichos ejemplos se utilizan las siguientes abreviaciones:

HBTU: hexafluorofosfato de 1-benzotriazol-1-il-tetrametiluronio (Knorr y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930)

HOBt: 1-hidroxibenzotriazola

DIEA: diisopropiletilamina

HOAT: 7-aza-1-hidroxibenzotriazola

HATU: hexafluorofosfato de o-(7-aza-benzotriazola-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (Carpino y otros, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281)

ES 2 305 355 T3

Ejemplos

1. Síntesis de péptidos

5 Acoplamiento del primer residuo aminoácido

Se introdujeron en un matraz seco 1,0 gramos de resina de cloruro de 2-clorotritilo (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) (1,08 mmol/g, 1,08 mmol). La resina se suspendió en CH_2Cl_2 (10 ml) y se dejó hinchar a temperatura ambiente bajo agitación constante. Dicha resina se trató dos veces con 0,18 g (1,2 eq) de ácido bromoacético y 0,738 ml (4 eq) de diisopropiletilamina (DIEA) en CH_2Cl_2 (10 ml), y se agitó la mezcla a 25°C durante 2 h. La resina se lavó abundantemente ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIEA}$: 17/2/1; CH_2Cl_2 , DMF; CH_2Cl_2 ; Et_2O , 3 veces cada uno).

A continuación se llevó a cabo la sustitución nucleofílica del bromo con una amina protegida por Boc. Las aminas protegidas por Boc utilizadas fueron Boc-NH- CH_2 - CH_2 - NH_2 , Boc-NH- CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2 y Boc-NH- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2 . La amina protegida por Boc, disuelta (3 eq) en DMSO: CH_2Cl_2 1:1 v/v 5 ml, se añadió a la resina. Dicha resina se lavó con CH_2Cl_2 , DMF, CH_2Cl_2 5 ml, 3 veces.

La resina se dejó secar durante una noche.

Se prepararon las siguientes resinas precargadas: (EA)G-O-clorotritiloresina; (BA)G-O-clorotritiloresina; (PrA)G-O-clorotritiloresina.

25 Ciclo de síntesis

La síntesis se llevó a cabo utilizando un sintetizador Syro-peptide (Multisyntech) o un ABI 433A con 24 a 96 recipientes de reacción. En cada recipiente se introdujeron 60 mg de peso de la resina antes de cargar la resina anterior. Se programaron y se llevaron a cabo los siguientes ciclos de reacción:

30

	Etapas	Reactivo	Tiempo
35	1	CH_2Cl_2 , lavado e hinchado (manual)	3 x 1 min.
	2	DMF, lavado e hinchado	1 x 5 min.
	3	40 % piperidina/DMF	1 x 5 min.
	4	DMF, lavado	5 x 2 min.
40	5a	5 equiv. Fmoc aminoácido/DMF + 5 eq. HBTU + 5 eq. HOBt + 5 eq. DIEA	1 x 120 min.
45	6	DMF, lavado	4 x 2 min.
	7	CH_2Cl_2 , lavado (al final de la síntesis)	3 x 2 min.

50

Las etapas 3 a 6 se repiten para añadir cada aminoácido o bloque constructivo de glicina N-sustituida

55 Para introducir un bloque constructivo de glicina N-sustituida en posiciones específicas dentro de la cadena, se llevaron a cabo las siguientes etapas 5b.1-5b.3 en lugar de la etapa 5a:

- 5b.1: 11 equiv. $\text{BrCH}_2\text{COOH}/\text{DMF}$ + 13 equiv. DIC, 90 min;
- 60 - 5b.2: DMF, lavado 4 x 2 min;
- 5b.3: 20 equiv. bloque constructivo de amina con residuo protegido/DMF, 120 min.

65 Además, si se había introducido un bloque constructivo de glicina N-sustituida en el ciclo previo, la etapa 5a se modificó del modo siguiente: HBTU y HOBt fueron sustituidos por 3,5 eq de HATU, y se utilizaron 7 eq de DIEA.

ES 2 305 355 T3

Disociación del fragmento peptídico completamente protegido

Después de la finalización de la síntesis, la resina se suspendió en 1 ml (0,39 mmol) de 1% TFA en CH₂Cl₂ (v/v) durante 3 minutos, se filtró, y el filtrado se neutralizó con 1 ml (1,17 mmol, 3eq) de 20% DIEA en CH₂Cl₂ (v/v). Este procedimiento se repitió dos veces para asegurar la compleción de la disociación. El filtrado se evaporó a sequedad y una muestra del producto se desprotegió completamente para ser analizada por HPLC de fase inversa (columna C₁₈) a efectos de controlar la eficacia de la síntesis del péptido lineal.

Ciclación del péptido lineal

Se disolvieron 100 mg del péptido lineal completamente protegido en DMF (9 ml, conc. 10 mg/ml). A continuación se añadieron 41,8 mg (0,110 mmol, 3 eq) de HATU, 14,9 mg (0,110 mmol, 3 eq) de HOAt y 1 ml (0,584 mmol) de 10% DIEA en DMF (v/v) y la mezcla se agitó con vórtice a 20°C durante 16 horas y a continuación se concentró bajo alto vacío. El residuo se extrajo en CH₂Cl₂ y H₂O/CH₃CN (90/10; v/v). La fase CH₂Cl₂ se evaporó para obtener el péptido cíclico completamente protegido.

Desprotección del péptido cíclico

El péptido cíclico obtenido se disolvió en 1 ml de la mezcla de disociación que contenía 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de agua y 2,5% de triisopropilsilano (TIS). La mezcla se dejó reposar a 20°C durante 2,5 horas y a continuación se concentró bajo vacío. El residuo se disolvió en una solución de H₂O/ácido acético (75/25; v/v) y la mezcla se extrajo con diisopropiléter.

La fase acuosa se secó bajo vacío y a continuación el producto se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa.

Guanidinación de las funciones amina de cadena lateral con trifil-guanidinas desprotegidas

Se disolvieron 8 mg del péptido cíclico desprotegido y N,N-di-Boc-trifluorometansulfonilguanidina (270 mg, 15 eq) en agua y dioxano (3 ml, 1:5; v/v). Se añadió trietilamina (190 µl, 15 eq) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. La solución se concentró bajo vacío a efectos de eliminar el dioxano. Se añadieron agua (1 ml) y CH₂Cl₂ (1 ml). La fase de CH₂Cl₂ extraída se reconcentró. El residuo se redisolvió en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1,2 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se trituró la solución con dietiléter, se extrajo la capa orgánica y se secó el residuo *in vacuo*.

Purificación del péptido cíclico

Tras la liofilización, los productos se obtuvieron como polvos blancos y se analizaron por ESI-MS. Los datos analíticos, que comprenden los tiempos de retención de HPLC y ESI-MS, se muestran en la tabla 1.

Se determinaron los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna VYDAC 218TP104 (longitud 25 cm) con gradiente A (50% CH₃CN + 0,1% TFA y 50% H₂O + 0,1% TFA a 100% CH₃CN + 0,1% TFA y 0% H₂O + 0,1% TFA en 25 minutos) o gradiente B utilizando los disolventes A (H₂O + 0,02% TFA) y B (CH₃CN) 0 min: 92% A, 8% B; 8 min: 62% A, 38% B; 9-12 min: 0% A, 100% B.

La purificación se llevó a cabo utilizando HPLC preparativa de fase inversa con gradiente C:

10% CH₃CN + 0,1% TFA y 90% H₂O + 0,1% TFA a 60% CH₃CN + 0,1% TFA y 40% H₂O + 0,1% TFA en 20 minutos.

En la tabla 1 se muestran los ejemplos 1 y 3-6. Los péptidos se sintetizaron empezando por el aminoácido de la posición P6, fijado a la resina. Las resinas iniciales fueron (EA)G-O-clorotritiloresina; (BA)G-O-clorotritiloresina; y (PrA)G-O-clorotritiloresina, que se prepararon tal como se ha descrito anteriormente. Los péptidos lineales se sintetizaron sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento anterior y en la siguiente secuencia: P7-P8-P9-P10-P11-P12-^DPro-Pro-P1-P2-P3-P4-P5-P6-resina, se disoció, se cicló, se desprotegió y se purificó tal como se ha indicado.

Los tiempos de retención de HPLC (minutos) se determinaron utilizando el gradiente A.

En la tabla 1 también se muestra el ejemplo 2. El péptido se sintetizó empezando con un precursor del aminoácido de la posición P6, fijado a la resina. La resina inicial fue (EA)G-O clorotritiloresina, que se preparó tal como se ha descrito anteriormente. El péptido lineal se sintetizó sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento anterior y con la siguiente secuencia: P7-P8-P9-P10-P11-P12-^DPro-Pro-P1-P2-P3-P4-P5-precursor de P6-resina, introduciéndose Lys en las posiciones P9, P4 y P5. A continuación el péptido protegido se disoció, se cicló, se desprotegió, se

ES 2 305 355 T3

guanidinó y se purificó tal como se ha indicado, transformando dicha guanidinación (EA)G en (EGU)G y Lys en hArg.

Los tiempos de retención de HPLC (minutos) se determinaron utilizando el gradiente A.

En la tabla 1 también se muestran los ejemplos 7-12.

Se introdujeron en un matraz seco 0,5 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) (0,83 mmol/g, 0,415 mmol). La resina se suspendió en CH₂Cl₂ (2,5 ml) y se dejó hinchar a temperatura ambiente bajo agitación constante durante 30 min. La resina se trató con 0,415 mmol (1 eq) del primer residuo aminoácido adecuadamente protegido (véase a continuación) y 284 μl (4 eq) diisopropiletamina (DIEA) en CH₂Cl₂ (2,5 ml), y la mezcla se agitó a 25°C durante 4 horas. El color de la resina cambió a púrpura y la solución permaneció amarillenta. La resina se agitó (CH₂Cl₂/MeOH/DIEA : 17/2/1), 30 ml durante 30 min; a continuación se lavó en el orden siguiente con CH₂Cl₂ (1x), DMF (1x), CH₂Cl₂ (1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂(1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (2x), Et₂O (2x) y se secó bajo vacío durante 6 horas. La carga fue típicamente de 0,6-0,7 mmol/g.

Se preparó la siguiente resina precargada: Fmoc-ProO-clorotritiloresina.

Los péptidos se sintetizaron empezando por el aminoácido Pro, fijado a la resina. La resina inicial fue Fmoc-ProO-clorotritiloresina, que se preparó tal como se ha descrito anteriormente. Los péptidos lineales se sintetizaron sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento anterior y en la secuencia siguiente: Resina-Pro-^DPro-P12-P11-P10-P9-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1, se disociaron, se ciclaron, se desprotegeron y se purificaron tal como se ha indicado. Los tiempos de retención de HPLC (minutos) se determinaron utilizando el gradiente B tal como se ha descrito anteriormente. La incorporación de (PeA)G en las posiciones relevantes de los ejemplos 7-12 se llevó a cabo utilizando ácido bromoacético y Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1: ejemplos

Ejemplo	Id. Sec.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Matriz	RT(')	% B	[MS]
1	SEQ ID NO:1	Leu	Arg	Leu	Lys	Lys	(EAG)G	Arg	Trp	Lys	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	10,4	68	1.823,9
2	SEQ ID NO:2	Leu	Arg	Leu	hArg	hArg	(EGU)G	Arg	Trp	hArg	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	10,8	40	498,6*
3	SEQ ID NO:3	Leu	Arg	Leu	Lys	Lys	(PEA)G	Arg	Trp	Lys	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	10,0	51	933,2***
4	SEQ ID NO:4	Leu	Arg	Leu	Lys	Lys	(BA)G	Arg	Bip	Lys	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	10,5	63	1.889,0
5	SEQ ID NO:5	Leu	Arg	Leu	(BA) G	Lys	(BA)G	Arg	Bip	Lys	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	11,8	54	1.890,0
6	SEQ ID NO:6	Leu	Arg	Leu	Lys	Lys	(PEA)G	Arg	Bip	Lys	Tyr	Arg	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	10,6	55	1.902,8
7	SEQ ID NO:7	Arg	Trp	Leu	Lys	Lys	Arg	(PEA)G	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	5,67	100	959,3**
8	SEQ ID NO:8	Arg	Trp	Leu	Gln	(PEA)G	Arg	Arg	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	P ¹ Pro ¹ Pro	5,28/6,05	100	1.015,2***
9	SEQ ID NO:9	Arg	Trp	Leu	Lys	(PEA)G	Arg	Arg	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Val	P ¹ Pro ¹ Pro	5,78	100	986,9**
10	SEQ ID NO:10	Thr	Trp	Leu	Lys	(PEA)G	Arg	Arg	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	P ¹ Pro ¹ Pro	5,2	80	986,9**
11	SEQ ID NO:11	Arg	Trp	Leu	Gln	Lys	Arg	(PEA)G	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	P ¹ Pro ¹ Pro	5,25	100	1.001,3***
12	SEQ ID NO:12	Thr	Trp	Leu	Lys	(PEA)G	Arg	Arg	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Arg	P ¹ Pro ¹ Pro	5,27/5,93	70	987,7**

a) % de pureza de los compuestos después de HPLC prep.

* M/z + 4H, z = 4

** M/z, z = 2

ES 2 305 355 T3

2. Métodos biológicos

2.1 Preparación de los péptidos

5 Los péptidos liofilizados se pesaron en una Microbalance (Mettler MT5) y se disolvieron en agua estéril que contenía 0,01% de ácido acético.

2.2 Actividad antimicrobiana de los péptidos

10 Las actividades antimicrobianas de los péptidos se determinaron mediante el método de microdilución de caldo estándar NCCLS (véase referencia 1, a continuación), examinándose en placas estériles de 96 pocillos (placas de microtitulación de poliestireno de Nunclon) en un volumen total de 100 μ l. Se prepararon inóculos de los microorganismos con 0,5 Mcfarland estándar y a continuación se diluyeron en caldo de Mueller-Hinton (MH) para obtener aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias(CFU)/ml para las bacterias. Se añadieron alícuotas (50 μ l) de los inóculos a 50 μ l de caldo MH que contenía el péptido en diluciones dobles en serie. Los microorganismos utilizados fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC 27853), *Pseudomonas putida* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 y ATCC 25923). Las actividades antimicrobianas de los péptidos se expresaron como la concentración inhibidora mínima (MIC) en μ g/ml para la que no se observaba crecimiento visible después de 18-20 horas de incubación de las placas de microtitulación a 37°C.

2.3 Hemólisis

20 Se analizó en los péptidos la actividad hemolítica contra glóbulos rojos humanos (hRBC). Se lavaron hRBC frescos tres veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2.000 x g. Se incubaron péptidos a una concentración de 100 μ g/ml con 20% v/v hRBC durante 1 hora a 37°C. La concentración final de eritrocitos fue de aproximadamente $0,9 \times 10^9$ /ml. Se determinó un valor de 0% resp. 100% de lisis celular por incubación de los hRBC en presencia de sólo PBS y resp. 0,1% Triton X-100 en H₂O. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se diluyó 20 veces en amortiguador de PBS, y se midió la densidad óptica (OD) de la muestra a 540 nM. El valor de 100% de lisis (OD_{540H_2O}) dio una OD de aproximadamente 1,6-2,0. Se calculó el porcentaje de hemólisis del modo siguiente: $(OD_{540péptido}/OD_{540H_2O}) \times 100\%$.

2.4 Resultados

Los resultados de los experimentos descritos anteriormente se indican en la tabla 2, a continuación.

Referencias

- 35 1. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (Métodos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de dilución para bacterias de crecimiento aeróbico), 3ª ed. Estándar aprobado M7-A3. National Committee for Clinical laboratory standards, Villanova, Pa, EE.UU.
- 40 2. **Mossman T. J** *Immunol Met* 1983, 65, 55-63.
- 45 3. **Berridge M V, Tan AS.** *Archives of Biochemistry & Biophysics* 1993, 303, 474-482.

TABLA 2

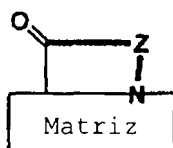
Concentraciones inhibidoras mínimas (MIC en μ g/ml) y porcentajes de hemólisis a una concentración de 100 μ g/ml de péptido

Ej	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>P. Aeruginosa</i> ATCC27853	Hemólisis hRBC
1	6,2	6,2	12,5	12,5	n.d.	1,7
2	12,5	6,2	12,5	12,5	n.d.	8,8
3	25	12,5	50	50	n.d.	1,6
4	12,5	12,5	12,5	12,5	n.d.	4,2
5	6,2	12,5	6,2	6,2	n.d.	2,1
6	12,5	6,2	6,2	6,2	n.d.	7,0
8	32	n.d.	128	128	8	1,1
9	32	n.d.	128	128	16	1,4
10	64	n.d.	128	128	8	1,0
11	32	n.d.	128	128	8	1,1
12	64	n.d.	128	128	8	2,2

n.d.: no determinado

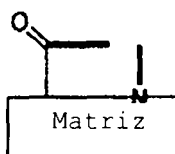
REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula general:



(I)

en los que



es un grupo que presenta una de las fórmulas ^DPro-^LPro y ^LPro-^DPro

R⁸ es H; Cl; F; CF₃; NO₂; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo; aril-alquilo inferior; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sOR⁵⁵; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSR⁵⁶; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sNR³³R³⁴; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSOCONR³³R⁷⁵; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR³³R⁸²; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCOOR⁵⁷; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCONR⁵⁸R⁵⁹; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sPO(OR⁶⁰)₂; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSO₂R⁶²; o -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSCOR⁶⁴;

R²⁰ es H; alquilo; alqueno; o aril-alquilo inferior;

R³³ es H; alquilo, alqueno; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOR⁵⁵; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR³⁴R⁶³; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOCONR⁷⁵R⁸²; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR⁷⁸R⁸²; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCOR⁶⁴; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_s-CONR⁵⁸R⁵⁹; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sPO(OR⁶⁰)₂; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSO₂R⁶²; o -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sC₆H₄R⁸;

R³⁴ es H; alquilo inferior; arilo, o aril-alquilo inferior;

R³³ y R³⁴ conjuntamente pueden formar: -(CH₂)₂₋₆-; -(CH₂)₂O(CH₂)₂-; -(CH₂)₂S(CH₂)₂-; o -(CH₂)₂NR⁵⁷(CH₂)₂-;

R³⁷ es H; F; Br; Cl; NO₂; CF₃; alquilo inferior; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sOR⁵⁵; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sNR³³R³⁴; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sOCONR³³R⁷⁵; -(CH₂)_p(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR³³R¹²; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCOOR¹⁷; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCONR⁵⁸R⁵⁹; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sPO(OR⁶⁰)₂; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sSO₂R⁶²; o -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sC₆H₄R⁸;

R⁵⁰ es H; alquilo inferior; o aril-alquilo inferior;

R⁵⁵ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; aril-alquilo inferior; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOR⁵⁷; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR³⁴R⁶³; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOCONR⁷⁵R⁸²; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR⁷⁸R⁸²; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_s-COR⁶⁴; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCOOR⁵⁷; o -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCONR⁵⁸R⁵⁹;

R⁵⁶ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; aril-alquilo inferior; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOR⁵⁷; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR³⁴R⁶³; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sOCONR⁷⁵R⁸²; -(CH₂)_m(CHR⁶¹)_sNR²⁰CONR⁷⁸R⁸²; -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_s-COR⁶⁴; o -(CH₂)_o(CHR⁶¹)_sCONR⁵⁸R⁵⁹;

R⁵⁷ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo alquilo inferior; o heteroarilo alquilo inferior;

R⁵⁸ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; o heteroaril-alquilo inferior;

R⁵⁹ es H; alquilo inferior; alqueno inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; o heteroaril-alquilo inferior; o

R⁵⁸ y R⁵⁹ conjuntamente pueden formar: -(CH₂)₂₋₆-; -(CH₂)₂O(CH₂)₂-; -(CH₂)₂S(CH₂)₂-; o -(CH₂)₂NR⁵⁷(CH₂)₂-;

ES 2 305 355 T3

R⁶⁰ es H; alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior;

R⁶¹ es alquilo; alqueniilo; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_m\text{OR}^{55}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{33}\text{R}^{34}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_o\text{COOR}^{37}$; $-(\text{CH}_2)_o\text{NR}^{58}\text{R}^{59}$; o $-(\text{CH}_2)_o\text{PO}(\text{COR}^{60})_2$;

R⁶² es alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo, heteroarilo; o aril-alquilo inferior;

R⁶³ es H; alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo, heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; $-\text{COR}^{64}$; $-\text{COOR}^{57}$; $-\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$; $-\text{SO}_2\text{R}^{62}$; o $-\text{PO}(\text{OR}^{61})_2$; o

R³⁴ y R⁶³ conjuntamente pueden formar: $-(\text{CH}_2)_{2-6}$; $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$; $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2$; o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{17}(\text{CH}_2)_2$;

R⁶⁴ es H; alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo; heteroarilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{65}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{SR}^{66}$; o $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{34}\text{R}^{63}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{OCONR}^{75}\text{R}^{82}$; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{NR}^{20}\text{CONR}^{78}\text{R}^{82}$;

R⁶⁵ es H; alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo, aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; $-\text{COR}^{57}$; $-\text{COOR}^{57}$; o $-\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$;

R⁶⁶ es H; alquilo inferior; alqueniilo inferior; arilo; aril-alquilo inferior; heteroaril-alquilo inferior; o $-\text{CONR}^{58}\text{R}^{59}$;

m es 2-4; o es 0-4; p es 1-4; q es 0-2; r es 1 o 2; s es 0 o 1;

Z es una cadena de 12 residuos α -aminácido, contándose las posiciones de dichos residuos aminoácido en dicha cadena empezando por el aminoácido N-terminal, siendo dichos residuos aminoácidos, dependiendo de su posición en las cadenas, Gly o Pro o uno de entre los tipos

C: $-\text{NR}^{20}\text{CH}(\text{R}^{72})\text{CO}-$;

D: $-\text{NR}^{20}\text{CH}(\text{R}^{73})\text{CO}-$;

E: $-\text{NR}^{20}\text{CH}(\text{R}^{74})\text{CO}-$;

F: $-\text{NR}^{20}\text{CH}(\text{R}^{84})\text{CO}-$; y

H: $-\text{NR}^{20}-\text{CH}(\text{CO}-)(\text{CH}_2)_{4-7}-\text{CH}(\text{CO}-)\text{NR}^{20}$; $-\text{NR}^{20}-\text{CH}(\text{CO}-)(\text{CH}_2)_p\text{SS}(\text{CH}_2)_p-\text{CH}(\text{CO}-)\text{NR}^{20}$; $-\text{NR}^{20}-\text{CH}(\text{CO}-)(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{20}\text{CO}(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{CO}-)\text{NR}^{20}$; y $-\text{NR}^{20}-\text{CH}(\text{CO}-)(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{20}\text{CONR}^{20}(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{CO}-)\text{NR}^{20}$;

I: $-\text{NR}^{86}\text{CH}_2\text{CO}-$;

K: $-\text{NR}^{87}\text{CH}_2\text{CO}-$;

R⁷² es H, alquilo inferior; alqueniilo inferior; $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{OR}^{85}$; o $-(\text{CH}_2)_p(\text{CHR}^{61})_s\text{SR}^{85}$;

R⁷³ es $-(\text{CH}_2)_o\text{R}^{77}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_o\text{R}^{77}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_o\text{R}^{77}$; o $-(\text{CH}_2)_r\text{NR}^{20}(\text{CH}_2)_o\text{R}^{77}$;

R⁷⁴ es $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{77}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{80}\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{N}=\text{C}(\text{NR}^{78}\text{R}^{80})\text{NR}^{79}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{77}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{80}\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{N}=\text{C}(\text{NR}^{78}\text{R}^{80})\text{NR}^{79}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{77}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{80}\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{77}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^{80}\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{79}\text{R}^{80}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NOR}^{50})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{=NNR}^{78}\text{R}^{79})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_r\text{S}(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{80}\text{C}(\text{=NR}^{80})\text{NR}^{78}\text{R}^{79}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{80}\text{COR}^{64}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{80}\text{COR}^{77}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{80}\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$; o $-(\text{CH}_2)_p\text{C}_6\text{H}_4\text{NR}^{80}\text{CONR}^{78}\text{R}^{79}$;

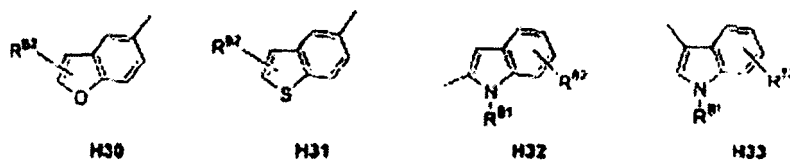
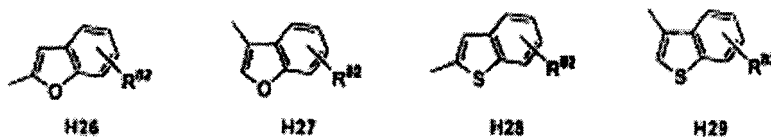
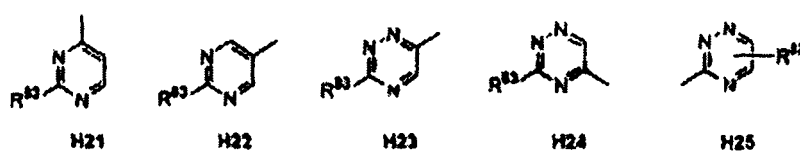
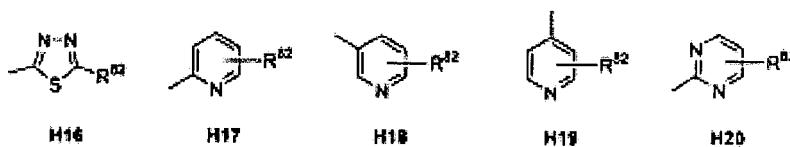
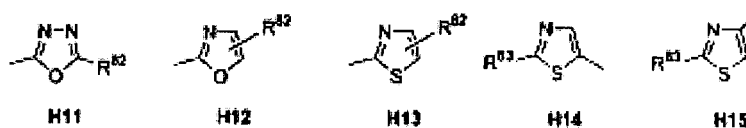
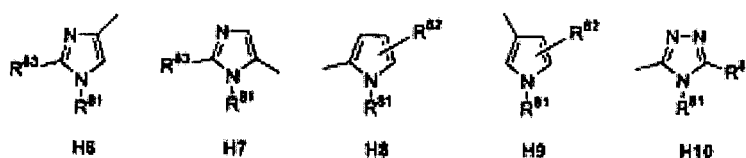
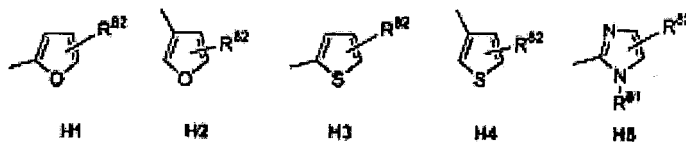
R⁷⁵ es alquilo inferior; alqueniilo inferior; o aril-alquilo inferior; o

ES 2 305 355 T3

R^{33} y R^{75} conjuntamente pueden formar: $-(CH_2)_{2-6}-$; $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; $-(CH_2)_2S(CH_2)_2-$; o $-(CH_2)_2NR^{57}(CH_2)_2-$; o

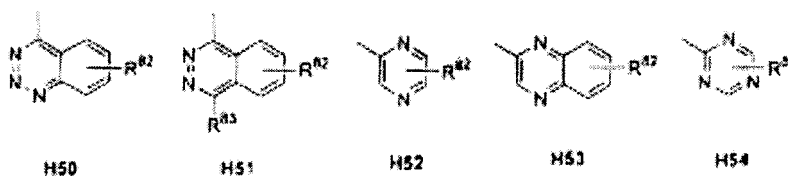
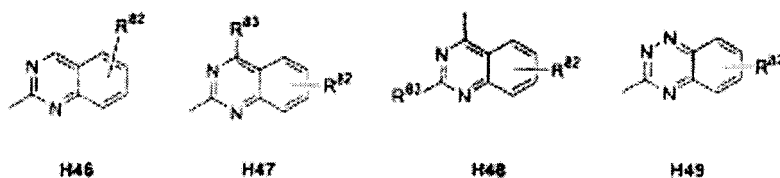
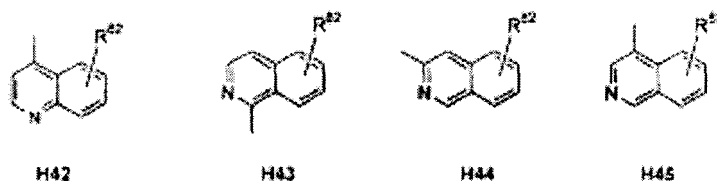
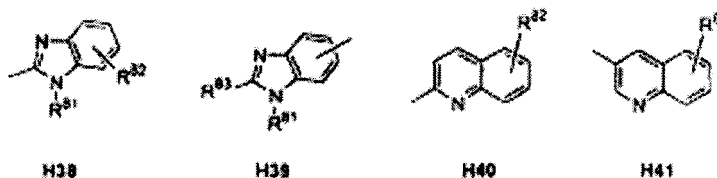
R^{75} y R^{82} conjuntamente pueden formar: $-(CH_2)_{2-6}-$; $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; $-(CH_2)_2S(CH_2)_2-$; o $-(CH_2)_2NR^{57}(CH_2)_2-$;

R^{77} es R^{88} ; o un grupo heteroarilo que presenta una de las fórmulas



45

ES 2 305 355 T3



45 R^{78} es H; alquilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior;

R^{78} y R^{82} conjuntamente pueden formar: $-(CH_2)_{2-6}-$; $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; $-(CH_2)_2S(CH_2)_2-$; o $-(CH_2)_2NR^{57}(CH_2)_2-$;

50 R^{79} es H; alquilo inferior; arilo; o aril-alquilo inferior; o

R^{78} y R^{79} , conjuntamente, pueden ser $-(CH_2)_{2-7}-$; $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; o $-(CH_2)_2NR^{57}(CH_2)_2-$;

55 R^{80} es H; o alquilo inferior;

R^{81} es H; alquilo inferior; o aril-alquilo inferior;

R^{82} es H; alquilo inferior; arilo; heteroarilo; o aril-alquilo inferior;;

60 R^{83} y R^{82} conjuntamente pueden formar: $-(CH_2)_{2-6}-$; $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$; $-(CH_2)_2S(CH_2)_2-$; o $-(CH_2)_2NR^{57}(CH_2)_2-$;

R^{83} es H; alquilo inferior; arilo; o $-NR^{78}R^{79}$;

65 R^{84} es $-(CH_2)_m(CHR^{61})_sOR^{78}$; $-(CH_2)_m(CHR^{61})_sSR^{78}$; $-(CH_2)_pCONR^{78}R^{79}$; $-(CH_2)_pNR^{80}CONR^{78}R^{79}$; $-(CH_2)_pC_6H_4CONR^{78}R^{79}$; o $-(CH_2)_pC_6H_4NR^{80}CONR^{78}R^{79}$;

R^{85} es alquilo inferior; o alquenilo inferior;

ES 2 305 355 T3

R^{86} es R^{74} ; $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_vNR^{78}R^{79}$; $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_v-C(=NR^{80})NR^{78}R^{79}$; X es -O-, $-NR^{20}$ -, -S-, -OCOO-, u es 1-3, t es 1-6, v es 1-3;

5 R^{87} es R^{84} ; $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_vOR^{78}$, $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_v-CONR^{78}R^{79}$, $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_v-NR^{80}CONR^{78}R^{79}$, $-[(CH_2)_u-X]_t-(CH_2)_vSR^{78}$; X es -O-, $-NR^{20}$ -, -S-, -OCOO-, u es 1-3, t es 1-6, v es 1-3;

R^{88} es fenilo, p-hidroxifenilo, 2-naftilo, 1-naftilo, 4-clorofenilo, 3-clorofenilo, 2-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 4-fluorofenilo, 3-fluorofenilo, 2-fluorofenilo, p-benziloxifenilo, p-bifenilo o p-benzoilfenilo,

10 con la condición de que, en dicha cadena Z de 12 residuos de α -aminoácido, los residuos aminoácido de las posiciones 1 a 12 sean:

- P1: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F, o el residuo es Pro;
- 15 - P2: de tipo E o de tipo D;
- P3: de tipo C, o el residuo es Pro;
- P4: de tipo E o de tipo F o de tipo I o de tipo K;
- 20 - P5: de tipo E o de tipo D o de tipo C o de tipo I o de tipo K o de tipo F, o el residuo es Gly o Pro;
- P6: de tipo E o de tipo F, o de tipo I o de tipo K o de tipo D, o el residuo es Gly;
- 25 - P7: de tipo E o de tipo F o de tipo I o de tipo C;
- P8: de tipo D o de tipo C, o el residuo es Pro;
- P9: de tipo E o de tipo D o de tipo F;
- 30 - P10: de tipo D o de tipo C o el residuo es Pro;
- P11: de tipo E o de tipo D o de tipo C; y
- 35 - P12: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F, o el residuo es Pro; o
- P4 y P9 y/o P2 y P11, conjuntamente, pueden formar un grupo de tipo H; y en P6 y P7 también son posibles los isómeros D;

40 con la condición adicional de que dicha cadena de 12 residuos de α -aminoácido contiene, como mínimo, un residuo de tipo I o de tipo K;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

45 2. Compuestos, según la reivindicación 1, en los que los residuos de α -aminoácido de las posiciones 1 a 12 de la cadena Z son:

- P1: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F,
- 50 - P2: de tipo D o de tipo E;
- P3: de tipo C;
- P4: de tipo E o de tipo I o de tipo F;
- 55 - P5: de tipo E o de tipo I o de tipo F;
- P6: de tipo E o de tipo I o de tipo D;
- 60 - P7: de tipo E o de tipo I o de tipo C;
- P8: de tipo D;
- P9: de tipo E;
- 65 - P10: de tipo D o de tipo C,
- P11: de tipo E o de tipo D; o de tipo C y

ES 2 305 355 T3

- P12: de tipo C o de tipo D o de tipo E o de tipo F;
- siendo también posibles en P6 y P7 los isómeros D;

5 con la condición de que, como mínimo, uno de los residuos aminoácido sea del tipo I.

3. Compuestos, según la reivindicación 2, en los que los residuos de α -aminoácido de la posición 1 a 12 de la cadena Z son:

- 10 - P1: Leu; Thr; o Arg;
- P2: Arg; o Trp;
- P3: Leu;
- 15 - P4: Lys; hArg; (BA)G; o Gln;
- P5: Lys; Gln; hArg; o (PeA)G;
- 20 - P6: Arg, Trp, hArg; (EGU)G;
- (EA)G; (PrA)G; (PeA)G o (BA)G;
- P7: Arg; (PeA)G; o Val
- 25 - P8: Trp; o Bip;
- P9: Lys; Arg; o hArg;
- 30 - P10: Tyr;
- P11: Arg; o Tyr; y
- P12: Val; o Arg

35 con la condición de que

- el residuo aminoácido en P4 sea (BA)G; y/o
- 40 - el residuo aminoácido en P5 sea (PeA)G; y/o
- el residuo aminoácido en P6 sea (EGU)G o (EA)G o (PrA)G o (PeA)G o (BA)G; y/o
- 45 - el residuo aminoácido en P7 sea (PeA)G.

4. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- 50 - P1: Leu;
- P2: Arg;
- 55 - P3: Leu;
- P4: Lys;
- P5: Lys;
- 60 - P6: (EA)G;
- P7: Arg;
- 65 - P8: Trp;
- P9: Lys;

ES 2 305 355 T3

- P10: Tyr;
- P11: Arg; y
- P12: Val

5

5. Compuesto de fórmula Ia, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Leu;
- P2: Arg;
- P3: Leu;
- P4: hArg;
- P5: hArg;
- P6: (EGU)G;
- P7: Arg;
- P8: Trp;
- P9: hArg;
- P10: Tyr;
- P11: Arg; y
- P12: Val

10

15

20

25

30

6. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Leu;
- P2: Arg;
- P3: Leu;
- P4: Lys;
- P5: Lys;
- P6: (PrA)G;
- P7: Arg;
- P8: Trp;
- P9: Lys;
- P10: Tyr;
- P11: Arg; y
- P12: Val

35

40

45

50

55

60

7. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Leu;
- P2: Arg;
- P3: Leu;

65

ES 2 305 355 T3

- P4: Lys;
- P5: Lys;
- 5 - P6: (BA)G;
- P7: Arg;
- 10 - P8: Bip;
- P9: Lys;
- P10: Tyr;
- 15 - P11: Arg; y
- P12: Val

20 8. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Leu;
- P2: Arg;
- 25 - P3: Leu;
- P4: (BA)G;
- 30 - P5: Lys;
- P6: (BA)G;
- P7: Arg;
- 35 - P8: Bip;
- P9: Lys;
- 40 - P10: Tyr;
- P11: Arg; y
- P12: Val
- 45

9. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Leu;
- 50 - P2: Arg;
- P3: Leu;
- 55 - P4: Lys;
- P5: Lys;
- P6: (PrA)G;
- 60 - P7: Arg;
- P8: Bip;
- 65 - P9: Lys;
- P10: Tyr;

ES 2 305 355 T3

- P11: Arg; y

- P12: Val

5 10. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- P1: Arg;

10 - P2: Trp;

- P3: Leu;

15 - P4: Lys;

- P5: Lys;

- P6: Arg;

20 - P7: (PeA)G;

- P8: Trp;

- P9: Lys;

25 - P10: Tyr;

- P11: Tyr; y

30 - P12: Val

11. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

35 - P1: Arg;

- P2: Trp;

- P3: Leu;

40 - P4: Gln;

- P5: (PeA)G;

45 - P6: Arg;

- P7: Arg;

- P8: Trp;

50 - P9: Lys;

- P10: Tyr;

55 - P11: Tyr; y

- P12: Arg

12. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

60 - P1: Arg;

- P2: Trp;

65 - P3: Leu;

- P4: Lys;

ES 2 305 355 T3

- P5: (PeA)G;
- P6: Arg;
- 5 - P7: Arg;
- P8: Trp;
- P9: Lys;
- 10 - P10: Tyr;
- P11: Tyr; y
- 15 - P12: Val

13. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- 20 - P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Leu;
- 25 - P4: Lys;
- P5: (PeA)G;
- P6: Arg;
- 30 - P7: Arg;
- P8: Trp;
- 35 - P9: Lys;
- P10: Tyr;
- 40 - P11: Tyr; y
- P12: Arg

14. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- 45 - P1: Arg;
- P2: Trp;
- 50 - P3: Leu;
- P4: Gln;
- P5: Lys;
- 55 - P6: Arg;
- P7: (PeA)G;
- P8: Trp;
- P9: Lys;
- P10: Tyr;
- 65 - P11: Tyr; y
- P12: Arg

ES 2 305 355 T3

15. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que la matriz es ^DPro-^LPro y los residuos aminoácido en la posición 1-12 son:

- 5
- P1: Thr;
 - P2: Trp;
 - P3: Leu;

10

 - P4: Lys;
 - P5: (PeA)G;
 - P6: Arg;

15

 - P7: Arg;
 - P8: Trp;

20

 - P9: Lys;
 - P10: Tyr;
 - P11: Tyr; y

25

 - P12: Arg

16. Enantiómeros de los compuestos de fórmula I, tal como se definen en la reivindicación 1.

30 17. Compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su utilización como sustancias terapéuticamente activas.

18. Compuestos, según la reivindicación 17, que presentan actividad antibacteriana.

35 19. Composición farmacéutica que contiene un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y un portador farmacéuticamente inerte.

40 20. Composiciones, según la reivindicación 19, en una forma adecuada para su administración oral, tópica, transdérmica, como inyección, bucal, transmucósica, pulmonar o inhalatoria.

21. Composiciones, según la reivindicación 18 ó 19, en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, soluciones, líquidos, geles, parches, cremas, pomadas, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones, pulverizadores, nebulizadores o supositorios.

45 22. Utilización de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir infecciones o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, siendo dicha enfermedad particularmente la fibrosis quística.

50 23. Utilización de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, como desinfectantes o conservantes para alimentos, cosméticos, medicamentos y otros materiales que contienen nutrientes.

24. Procedimiento para la preparación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, comprendiendo dicho procedimiento:

- 55 (a) acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra en la posición 5, 6 ó 7, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-prottegido de aminoácido;
- 60 (b) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más cerca del residuo aminoácido N-terminal, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-prottegido de aminoácido;
- 65 (d) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;

ES 2 305 355 T3

- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que el residuo aminoácido N-terminal se ha introducido;
- (f) acoplar el producto obtenido de este modo con
- 5 (fa) un derivado apropiadamente N-protegido de ^LPro o ^DPro
- (fb) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo; y
- 10 (fc) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de ^DPro y, respectivamente, ^LPro;
- (g) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido en la etapa (fc);
- 15 (h) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra en posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- (i) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- 20 (j) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más allá de la posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;
- 25 (k) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
- (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos aminoácido se han introducido;
- 30 (m) si se desea, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;
- (o) separar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;
- 35 (p) ciclar el producto disociado del soporte sólido;
- (q) si se desea, formar uno o dos enlaces entre hebras entre las cadenas laterales de residuos aminoácido apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;
- 40 (r) eliminar todos los grupos protectores presentes en los grupos funcionales de todos los miembros de la cadena de residuos aminoácido y, si se desea, cualquier grupo o grupos que puedan estar adicionalmente presentes en la molécula;
- (s) si se desea, guanidinizar todos los grupos amino de cadena lateral presentes en la cadena de residuos aminoácido; y
- 45 (t) si se desea, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable, o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo, en el correspondiente compuesto libre de fórmula I, o en otra sal diferente farmacéuticamente aceptable.
- 50 25. Procedimiento para la preparación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado
- 55 (a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-protegido de ^LPro o ^DPro
- (a'b) eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo; y
- 60 (a'c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de ^DPro y, respectivamente, ^LPro;
- (b') eliminar el grupo protector de N el producto obtenido en la etapa (a'c);
- 65 (c') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más cerca del residuo aminoácido N-terminal, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-protegido de aminoácido;

ES 2 305 355 T3

(d') eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;

(e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido del aminoácido que, en el producto final deseado, se encuentra una posición más allá de la posición 12, estando igualmente apropiadamente protegidos todos los grupos funcionales que pueden estar presentes en dicho derivado N-prottegido de aminoácido;

(f') eliminar el grupo protector de N del producto obtenido de este modo;

(g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que todos los residuos aminoácido se han introducido;

(h') si se desea, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;

(i') separar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;

(j') ciclar el producto disociado del soporte sólido;

(k') si se desea, formar uno o dos enlaces entre hebras entre las cadenas laterales de residuos aminoácido apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;

(l') eliminar todos los grupos protectores presentes en los grupos funcionales de todos los miembros de la cadena de residuos aminoácido y, si se desea, cualquier grupo o grupos que puedan estar adicionalmente presentes en la molécula;

(m') si se desea, guanidinizar todos los grupos amino de cadena lateral presentes en la cadena de residuos aminoácido; y

(n') si se desea, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable, o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo, en el correspondiente compuesto libre de fórmula I, o en otra sal diferente farmacéuticamente aceptable.

26. Procedimiento, según la reivindicación 24 ó 25, pero en el que se introduce un residuo aminoácido de tipo I o K por acoplamiento con un agente de acetilación que contiene un grupo saliente, seguida del desplazamiento nucleofílico con una amina de fórmula H_2NR^{86} y, respectivamente, H_2NR^{87} que, si es necesario, está apropiadamente protegida.

27. Procedimiento, según la reivindicación 26, en el que dicho agente de acetilación que contiene un grupo saliente es ácido bromoacético, cloroacético o yodoacético.

28. Modificación de los procedimientos según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, para la preparación de compuestos según la reivindicación 16, en la que se utilizan enantiómeros de todos los materiales de partida quirales.