(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 356 016**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07752701 .8**
(96) Fecha de presentación : **09.03.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1996217**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

(54) Título: **Composiciones antibióticas novedosas.**

(30) Prioridad: **09.03.2006 US 780782 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.04.2011

(73) Titular/es: **CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED**
The Old Schools Trinity Lane Cambridge
Cambridgeshire CB2 1TN, GB

(72) Inventor/es: **Coleman, John;**
Han, Kang y
Cooper, Matthew Allister

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Composiciones antibióticas novedosas.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] Esta invención se refiere a composiciones antibióticas con actividad antibacteriana y a procedimientos y a productos intermedios para su producción. La invención se refiere adicionalmente al uso de tales composiciones antibióticas para el tratamiento de infecciones bacterianas en mamíferos, que incluyen seres humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Las enfermedades producidas por infecciones bacterianas tiene una significativa morbilidad y mortalidad en seres humanos y otros mamíferos. El proceso de infección está constituido por tres etapas: entrada bacteriana y colonización del hospedador; invasión bacteriana y crecimiento en tejidos hospedadores junto con la aparición de sustancias tóxicas; y la respuesta del hospedador.

[0003] Las infecciones bacterianas pueden clasificarse ampliamente en aquellas producidas por bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococci* y *Streptococci,* y aquellas producidas por bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli.* Las bacterias Gram-positivas tienen una membrana citoplásmica de bicapa de lípidos típica rodeada por una pared celular rígida. La pared celular está compuesta principalmente por peptidoglicano, un polímero de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico reticulado por un pentapéptido que comprende aminoácidos D y L alternos. Además, la pared celular externa de las bacterias Gram-positivas comprende un complejo de polisacáridos, proteínas, ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos. En comparación, las bacterias Gram-negativas tienen una capa de peptidoglicano mucho más pequeña, una membrana externa que contiene lipopolisacárido que carece de la compleja capa de carbohidrato y ácidos teicoicos.

[0004] Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos. Además, el uso común extiende el término antibiótico para incluir agentes antibacterianos que no son productos de microbios, tales como agentes antibacterianos sintéticos (por ejemplo, sulfonamidas) y diversos péptidos encontrados en sistemas de defensa de hospedadores que se producen localmente en respuesta a colonización por o invasión de microorganismos (por ejemplo, magainina). Se han identificado cientos de antibióticos, y muchos se han desarrollado hasta tal punto que son valiosos en la terapia de enfermedades infecciosas.

[0005] Se han propuesto varios esquemas para clasificar y agrupar agentes antimicrobianos. La clasificación más común se ha basado en la estructura química y el mecanismo de acción propuesto del siguiente modo: (1) agentes que actúan directamente sobre la membrana celular del microorganismo, afectando la permeabilidad y conduciendo a la fuga de los compuestos intracelulares tales como detergentes, péptidos catiónicos, gramicidina A y polimixina; (2) agentes que inhiben la síntesis de paredes celulares bacterianas que incluyen las beta-lactamas y glucopéptidos; (3) agentes que afectan la síntesis bacteriana de proteínas que incluyen tetraciclina y cloranfenicol; (4) agentes que actúan de antimetabolitos e interfieren con la síntesis bacteriana de ácido fólico tales como las sulfonamidas; y (5) agentes que inhiben la síntesis o la actividad de ácido nucleico tales como quinolonas.

[0006] Los agentes antibacterianos que actúan directamente sobre la membrana bacteriana producen una permeabilización o modificación general de la membrana citoplásmica bacteriana. Esto resulta de la unión de péptidos a componentes de la superficie de la membrana externa, produciendo la reorganización de la estructura de la membrana y la creación de poros por los que pueden escaparse los contenidos intracelulares. Generalmente, estas características están asociadas a un péptido que es de naturaleza anfifílica que frecuentemente incluye una estructura secundaria helicoidal y una carga positiva neta. Los antibióticos de péptidos que tienen en líneas generales este modo de acción incluyen las magaininas, las defensinas y los lantibióticos. La actividad de esta clase de antibióticos está dirigida hacia bacterias en vez de hacia células de mamífero debido a que los restos cargados positivos del antibiótico interactúan con lípidos negativamente cargados que se encuentran predominantemente en membranas celulares bacterianas en vez de las de mamíferos.

[0007] Otro grupo de antibióticos que ha recibido una extensa atención debido a su eficacia clínica, es el grupo de antibióticos de los glucopéptidos. Estos agentes están constituidos por un esqueleto de heptapéptidos ciclado rígido que puede estar sustituido con una variedad de aminoazúcares y no aminoazúcares. Los restos de aminoazúcar de algunos miembros de esta clase contienen sustituciones de *N*-acilo, *N*-alquilo o *N*-arilo. Dos antibióticos en esta clase son la vancomicina y la teicoplanina.

[0008] La resistencia a antibióticos está muy documentada y las cepas resistentes son una posible seria amenaza para el bienestar del género humano (por ejemplo, D'Costa y col., 2006 *Science* 311:374). Las bacterias se vuelven frecuentemente resistentes a un agente antimicrobiano debido a que el fármaco fracasa en alcanzar su diana; por ejemplo, el fármaco puede inactivarse, y/o la diana puede alterarse estructuralmente y/o alterarse en su

disponibilidad o accesibilidad al fármaco. Por ejemplo, algunas bacterias producen enzimas que residen en o dentro de la superficie celular e inactivan el fármaco, mientras que otras poseen membranas celulares impermeables que evitan la entrada del fármaco.

[0009] La aparición y la diseminación de resistencia de alto nivel a miembros del grupo de antibióticos de los glucopéptidos en *enterococci* en la pasada década ha producido cepas aisladas clínicas resistentes a todos los antibióticos de eficacia probada. La incidencia de la resistencia a glucopéptidos entre cepas aisladas clínicas está aumentando y los *enterococci* tienen importancia como patógenos nosocomiales y como un reservorio de genes de resistencia. Las infecciones nosocomiales con cepas resistentes a múltiples fármacos son posiblemente catastróficas y existe la necesidad de identificar novedosos agentes antibacterianos o procedimientos de control de infecciones bacterianas. El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es ahora un patógeno nosocomial grave, y la vancomicina se usa frecuentemente en el tratamiento de infecciones por MRSA a dosis relativamente altas. El problema de MRSA ha provocado el desarrollo de varios antibióticos novedosos que incluyen análogos de vancomicina.

[0010] Las soluciones que se han usado para combatir la aparición de cepas resistentes a antibióticos incluyen la modificación de antibióticos existentes para mejorar su potencia contra organismos resistentes, y el descubrimiento de nuevos antibióticos de péptidos que destruyen sus dianas permeabilizando la membrana plasmática bacteriana. Ejemplos de la primera solución se han basado recientemente en crear derivados de glucopéptidos tales como vancomicina. La funcionalización del extremo carboxilo de la vancomicina usando el agente de acoplamiento hexafluorofosfato de 2-(1-hidroxibenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) ha sido satisfactoria en la unión de secuencias de péptidos cortas, tanto en disolución como en fases sólidas. También se han derivatizado el aminoazúcar y los restos de amina del extremo de la vancomicina y antibióticos relacionados. En una solución de alquilación reductora se creó una serie de compuestos alquilados en el azúcar de vancosamina, algunos de los cuales mostraron actividad enormemente mejorada cuando se compararon con vancomicina contra cepas bacterianas resistentes a vancomicina.

[0011] La patente de EE.UU. Nº 6.713.606 describe derivados de polipéptidos en los que una proteína soluble terapéutica o péptido se modifica con una entidad de la siguiente estructura general:

$$-\{L-[W]\}_n-X \qquad (1)$$

en la que cada **L** es independientemente un grupo enlazante flexible, cada **W** es independientemente un elemento de unión a la membrana peptídica, **n** es un número entero superior a o igual a uno y **X** es un elemento de unión a la membrana o insertivo peptídico o no peptídico.

[0012] Las estructuras de tipo **(1)** representan una matriz combinatoria de elementos interactivos con membrana cuya unión a polipéptidos solubles se encontró que participaba en la unión de aquellos polipéptidos a la membrana celular externa de células de mamífero. Esta solución produce beneficios terapéuticos, particularmente en el caso de reguladores de la activación del complemento que actúan como citoprotectores y agentes antiinflamatorios. Posteriormente se planteó como hipótesis que las estructuras de tipo **(1)** mostrarían una mayor unión a membranas bacterianas, que tienen una mayor proporción de fosfolípidos ácidos que los organismos eucariotas, y que tienen una mayor proporción de proteínas asociadas a la membrana. Según esta hipótesis, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 2004/0106544 se mostró que agentes que comprenden péptidos antibacterianos, referentes a la estructura general **(1)** y adicionalmente derivatizados con el antibiótico del glucopéptido vancomicina, no tenían actividades antibacterianas superiores a las mostradas por ningún componente solo.

[0013] Sin embargo, según tales agentes, que se describen en la publicación de EE.UU. Nº 2004/0106544, algunos de estos péptidos antibacterianos confirieron una potenciada actividad antibacteriana insertándose físicamente en la membrana bacteriana y rompiéndola, requiriéndose así que el péptido antibacteriano tuviera tanto (i) un dominio de unión a membrana funcionalmente activo como (ii) un dominio de inserción en membrana funcionalmente activo. Por consiguiente, estos agentes antibacterianos implican necesariamente un péptido antibacteriano relativamente grande y conformacionalmente correcto, presentándose por sí mismos desafíos planteados en los contextos de tiempo, coste y eficacia de síntesis de tales agentes, que incluye asegurar el apropiado plegamiento. Claramente se desearía evitar tales problemas si las composiciones antibióticas pudieran diseñarse usando restos directores antibacterianos más pequeños y, por tanto, más eficaces. Como se describe en el presente documento, la presente invención satisface esta necesidad y ofrece otras ventajas relacionadas.

[0014] La producción y la expresión de quimeras de nisina-subtilina se describe en Chakicheria y col. J. Biol. Chem (1995) 270 23533-23539 y en los documentos US6153606 y US6153405.

[0015] Walsh y col. (1996) Int. Dairy J. 6 425-431 describen el uso de nisina para inhibir bacterias de ácido láctico no iniciadoras en queso Cheddar.

REFERENCIAS RELACIONADAS

[0016] Las siguientes referencias proporcionan antecedentes adicionales a la invención:

Solicitud de patente publicada de EE.UU. Nº 20040106544 (Cooper y col.);

Patente de EE.UU. Nº 6.713.606 (Smith y col.);

Patente de EE.UU. Nº 6.794.181 (Coughlin y col.);

McCormick, M.H. y col., "Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties", Antibiot. Annu.1955; 3:606-11;

Sheldrick, G.M. y col., "Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine", Nature 1978; 271(5642):223-5;

Dutka-Malen, S. y col., "The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes", Mol. Gen. Genet. 1990; 224(3):364-72;

Murray, B.E., "The life and times of the Enterococcus" Clin. Microbiol. Rev. 1990; 3(1):46-65;

Bugg, T.D. y col., "Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine: D-alanine ligase of altered substrate specificity" Biochemistry 1991; 30(8):2017-21;

Thuault, D. y col., "Inhibition of Clostridium tyrobutyricum by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria." J. Dairy Sci. 1991; 74(4):1145-50;

Handwerger, S. y col., "Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci" Clin. Infect. Dis. 1992; 14(3):655-61;

Arthur, M. y col., "Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147", J. Bacteriol. 1993; 175(1):117-27;

Handwerger, S. y col., "Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin", Clin. Infect. Dis. 1993; 16(6):750-5;

Billot-Klein, D. y col., "Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine" Biochem. J. 1994;.304 (Pt 3):1021-2;

Reynolds, P.E. y col., "Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum BM4174", Biochem. J. 1994; 301 (Pt 1):5-8;

Sundram, U.N. y col., "General and Efficient Method for the Solution- and Solid-Phase Synthesis of Vancomycin Carboxamide Derivatives", J. Org. Chem. 1995; 60(5):1102-1103;

Woodford, N. y col., "Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of Enterococcus faecalis" J. Antimicrob. Chemother. 1995; 35(1):179-84;

Arthur, M. y col., "Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci", Mol. Microbiol. 1996; 21(1):33-44;

Chan, W.C. y col., " Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin", FEBS Lett. 1996; 390(2):129-32;

Cooper, R.D. y col., "Reductive alkylation of glycopeptide antibiotics: synthesis and antibacterial activity", J. Antibiot. (Tokyo) 1996; 49(6):575-81;

Evers, S. y col., "Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in Enterococcus faecalis V583", J. Bacteriol. 1996; 178(5):1302-9;

Rodriguez, M.J. y col., "Snyder NJ, Zweifel MJ, y col. Novel glycopeptide antibiotics: N-alkylated derivatives active against vancomycin-resistant enterococci", J. Antibiot. (Tokyo) 1998; 51(6):560-9;

van Kraaij, C. y col., "Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane", Biochemistry 1998; 37(46):16033-40;

Linton, S.M. y col., "Therapeutic efficacy of a novel membrane-targeted complement regulator in antigen-induced arthritis in the rat", Arthritis Rheum. 2000; 43(11):2590-7;

Smith, R.A., “Targeting anticomplement agents” Biochem. Soc. Trans. 2002; 30(Pt 6):1037-41;

Bonev, B.B. y col., “Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin”, FASEB. J. 2004; 18(15):1862-9.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0017] Esta invención se refiere a composiciones antibióticas que comprenden un resto antibiótico unido covalentemente a un resto director. Estas composiciones antibióticas usan un modo distinto de interacción con membranas bacterianas y tienen actividades antibacterianas inesperadamente superiores a las mostradas por cada componente solo.

[0018] Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a composiciones antibióticas como se indican en la reivindicación 1. Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

T es un resto director que comprende un fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tiene una estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina:

L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana.

[0019] Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

en la que:

T es un resto director que comprende un homólogo de polipéptido de un fragmento del polipéptido nisina [1-12], teniendo dicho homólogo de polipéptido una estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina y seleccionándose de un fragmento del polipéptido subtilina [1-12], un fragmento del polipéptido epidermina, un fragmento del polipéptido epidermina (I1V 16L), un fragmento del polipéptido mutacina B-Ny266 y un fragmento del polipéptido mutacina 1140;

L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

[0020] Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

(a) T es un resto director que comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$(SEQS ID NO. 1-4)

en la que

X_1 se selecciona de F, I, V y W,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 se selecciona de E, I, K y W,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 se selecciona de I, F y L,

X_6 se selecciona de A, K, V, AX_7, KX_7 y VX_7, en las que X_7 se selecciona de A, G, I, L, M, P y V;

y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

(b) L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

(c) P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

[0021] Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

(a) T es un resto director que comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:5)

en la que

X_1 se selecciona de I, L, F, V, A y G,

X_2 se selecciona de G, A, V, L, I, F, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 se selecciona de I, L, F, V, A y G,

X_4 se selecciona de A, G, V, L, I, F y deshidroalanina,

X_5 se selecciona de L, I, F, V, A, G,

X_6 se selecciona de K, G, A, V, N, Q, R, H;

y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

(b) L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

(c) P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0022] Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

(a) T es un resto director que comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:6)

en la que

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico, y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 y X_6 se seleccionan cada uno independientemente de cualquier aminoácido natural o no natural,

y en la que T es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana, el lípido II, en el que dicho lípido II comprende undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc;

L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo

(b) entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

(c) P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

[0023] Una composición antibiótica puede comprender la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

(a) T es un resto director que comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:7)

en la que

X_1 es I,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 es I,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 es L,

X_6 es K;

y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo

(b) entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

(c) P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

[0024] Una composición antibiótica puede comprender un compuesto de fórmula:

T-L-P

en la que:

T es un resto director que comprende un fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tiene estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina;

L es un resto de enlazante que comprende una molécula de enlazante, en el que la molécula de enlazante forma un primer enlace amida al extremo C de T y un segundo enlace amida a un extremo C de P; y

P comprende vancomicina;

o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

[0025] En otra realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una composición antibiótica como se define en las reivindicaciones, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0026] T es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana el lípido II en el que dicho lípido II comprende undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc. En ciertas otras realizaciones relacionadas, L comprende un enlace covalente directo entre el resto director y el resto antibiótico. En algunas otras realizaciones relacionadas, L comprende un enlace covalente directo seleccionado de un enlace amida, éster, éter, tioéter, fosforodiéster, tiofosforodiéster, carbonato, carbamato, hidrazona, oxima y amino. En ciertas otras realizaciones relacionadas, L comprende una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P. En ciertas otras realizaciones relacionadas, P comprende vancomicina o un derivado de vancomicina.

[0027] P comprende un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana. En algunas otras realizaciones relacionadas, la entidad antibiótica que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana se selecciona de antibióticos de beta-lactama tales como penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamas; antibióticos de glucopéptido, lipoglucopéptido y lioglucodepsipéptido tales como vancomicina, derivados de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina y dalbavancina; polipéptidos tales como polimixina y bacitracina; y los antibióticos enumerados en la FIGURA 8. En algunas otras realizaciones relacionadas, la entidad antibiótica que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana se selecciona de vancomicina, un derivado de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina; oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina y un resto antibiótico de la FIGURA 8.

[0028] Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN de FIGURAS

[0029]

La FIGURA 1 ilustra un procedimiento de preparación del Segmento I (SEQ ID NO. 12-15) del fragmento del polipéptido nisina [1-12].

La FIGURA 2 ilustra un procedimiento de preparación del anillo A del Segmento I (SEQ ID NO. 12, 16 y 17) del fragmento del polipéptido nisina [1-12].

La FIGURA 2A ilustra la preparación de algunos aminoácidos usados en la preparación del anillo A del segmento I.

La FIGURA 3 ilustra un procedimiento de preparación del Segmento II (SEQ ID NO. 18-20) del fragmento del polipéptido nisina [1-12].

La FIGURA 3A ilustra un procedimiento de preparación de un aminoácido usado en la preparación del Segmento I.

La FIGURA 4 ilustra un procedimiento de acoplar el Segmento I (SEQ ID NO:15) y el Segmento II (SEQ ID NO:20) del fragmento del polipéptido nisina [1-12] para producir el fragmento del polipéptido nisina [1-12] (SEQ ID NO:10).

La FIGURA 5 ilustra un procedimiento de preparación del Segmento I' (SEQ ID NO. 21 y 22) del fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado.

La FIGURA 6 ilustra un procedimiento de preparación del anillo A' del Segmento I' (SEQ ID NO. 21, 23 y 24) del fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado.

La FIGURA 7 ilustra un procedimiento de acoplar el Segmento I' (SEQ ID NO:22) del fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado y el Segmento II (SEQ ID NO:20) del fragmento del polipéptido nisina [1-12] para producir el fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado (SEQ ID NO:11).

La FIGURA 8 muestra ejemplos de restos antibióticos que pueden alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0030] Algunas realizaciones de la invención descritas en el presente documento se derivan del sorprendente descubrimiento de que un fragmento de polipéptido del extremo N de lantibiótico, tal como un fragmento del polipéptido nisina [1-12], puede emplearse útilmente en la construcción de las composiciones antibióticas actualmente desveladas como resto director que es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana conocido como el Lípido II (undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc, en el que el pentapéptido tiene normalmente la secuencia L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (SEQ ID NO:8)). Inesperadamente, y como se describe en mayor detalle más adelante, un fragmento de polipéptido del extremo N de lantibiótico, tal como el

fragmento de nisina [1-12] derivado de un polipéptido nisina de longitud completa, conserva la actividad biológica como resto director para la administración del resto antibiótico. Por tanto, y según una teoría no limitante, los conjugados T-L-P desvelados en el presente documento proporcionan actividad biológica antibiótica sorprendentemente ventajosa en forma de administración elegida como diana de un resto antibiótico funcional distinto a una membrana bacteriana o pared celular mediante un resto director de fragmento del polipéptido lantibiótico que reconoce una diana molecular que no se muta fácilmente en cepas bacterianas resistentes a antibiótico. Por consiguiente y como se describe en el presente documento, se proporcionan composiciones antibióticas que tienen una actividad antibacteriana que es superior a la actividad antibacteriana tanto del resto director como del resto antibiótico solo.

[0031] La presente divulgación, según algunas realizaciones y como se describe en el presente documento, se refiere a composiciones antibióticas que tienen la estructura generalizada:

T-L-P

en la que T es un resto director, L es un resto de enlazante y P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana, a procedimientos de preparación de tales composiciones antibióticas y a procedimientos de uso de estas composiciones. La invención se define como se expone en las reivindicaciones.

[0032] En algunas realizaciones relacionadas, la composición antibiótica puede comprender combinaciones de dos o más de tales conjugados de T-L-P que pueden diferenciarse entre sí por tener distintos restos para uno o más de T, L y P como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, T_1-L_1-P_1, T_2-L_2-P_2, T_3-L_3-P_3, etc., o según otro ejemplo, T_1-L_1-P_1, T_1-L_2-P_2, T_1-L_2-P_3, etc. En una de esas realizaciones preferidas, una combinación de conjugados de T-L-P puede comprender restos T y L comunes, pero pueden diferenciarse entre sí por tener dos o más restos antibióticos distintos (P), por ejemplo, T-L-P_1, T-L-P_2, T-L-P_3, etc., en los que P_1, P_2, P_3, etc. representan restos antibióticos distintos como se proporcionan en el presente documento.

[0033] Por tanto, según algunas realizaciones se proporciona una composición antibiótica que comprende una pluralidad de composiciones no idénticas que tienen la estructura T-L-P en la que T comprende al menos un resto director que es el mismo o diferente en dichas composiciones no idénticas y que se selecciona de un resto director según se describe en el presente documento, L comprende al menos un resto de enlazante según se describe en el presente documento y que es el mismo o diferente en dichas composiciones no idénticas y P comprende al menos un resto antibiótico que es diferente en dichas composiciones no idénticas, comprendiendo cada uno de dichos restos antibióticos un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana como se describe en el presente documento; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En realizaciones preferidas relacionadas, el resto antibiótico se selecciona de vancomicina, un derivado de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina y un resto antibiótico de la FIGURA 8.

[0034] Brevemente y a modo de antecedente, desde hace tiempo se cree que el antibiótico de glucopéptido vancomicina y el lantibiótico nisina, un polipéptido de 34 aminoácidos que se modifica postraduccionalmente para contener cinco anillos de lantionina y tres aminoácidos deshidratados, reconocen la misma molécula diana sobre la superficie de la célula bacteriana, concretamente undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc (SEQ ID NO:8), también conocido como el lípido II, un precursor de la pared celular bacteriana (por ejemplo, Breukink y col., 1999 Science 286:2361). Se cree además que la vancomicina y los lantibióticos tales como nisina ejercen sus efectos antibióticos interactuando con tales productos intermedios de lípidos para inhibir la síntesis de peptidoglicano, y uniéndose a e/o insertándose en membranas bacterianas, promoviéndose así la formación de poros en membranas citoplásmicas bacterianas (por ejemplo, Sahl, 1991 en Nisin and Novel Lantibiotics (Jung, G., y Sahl, H.G., Eds.), pág. 347-58, Escom, Leiden; Brotz y col., 2000 J. Antimicrob. Chemotherap. 46:1; Breukink y col., 1999 Science 286:2361; Brumfit y col., 2002 J. Antimicrobiol. Chemotherap. 50:731).

[0035] Recientemente, el delicado análisis estructural de interacciones antibióticas con el Lípido II ha permitido el discernimiento de los mecanismos de unión de vancomicina y nisina, reconociendo la vancomicina D-Ala-D-Ala en el resto de pentapéptido del Lípido II. En comparación, el polipéptido de nisina de longitud completa, mediante su región del extremo N, reconoce el grupo pirofosfato del Lípido II (por ejemplo, Bonev y col., 2004 FASEB J. 18:1862; Hsu y col., 2004 Nature Struct. Molec. Biol. 11:963). Sin embargo, es coherente con la caracterización anterior del dodecapéptido del extremo N de nisina aislado (nisina [1-12]) como biológicamente inactivo, distinguiéndose así funcionalmente la nisina [1-12] del polipéptido de nisina de 34 aminoácidos intacto (por ejemplo, Chan y col., 1996 FEBS Lett. 390:129). Hsu y col. (2004) concluyeron similarmente que la actividad biológica del lantibiótico nisina se basa en su participación en la formación de poros de la membrana bacteriana mediante la inserción en la membrana de la región del extremo C de nisina, y que la actividad biológica del lantibiótico nisina también depende de un cambio conformacional mediado por la región bisagra de nisina (restos de aminoácidos 20-22). Por tanto, antes de la presente solicitud, la materia ha fracasado de alguna manera en sugerir que un fragmento del extremo N de nisina tal como nisina [1-12], a diferencia del lantibiótico nisina de longitud completa (34-aminoácido), puede tener actividad biológica útil, mucho menos como un resto director para la administración de un resto antibiótico distinto de un modo que permita la inserción en la membrana del resto antibiótico (por ejemplo, vancomicina). Por tanto, la presente divulgación proporciona ventajosamente

composiciones y procedimientos para vencer la resistencia a antibiótico en bacterias mediante la selección de un resto director que es insensible a mecanismos bacterianos comunes de adquisición de resistencia mediante mutación de las estructuras diana del fármaco, en las que adicionalmente un resto director tal puede mediar en la administración de un resto antibiótico discreto que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana.

Definiciones

[0036] Según se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado más abajo.

[0037] Ciertos grupos químicos nombrados en el presente documento van precedidos de una anotación abreviada que indica el número total de átomos de carbono que van a encontrarse en el grupo químico indicado. Por ejemplo; alquilo C_7-C_{12} describe un grupo alquilo, como se define más adelante, que tiene un total de 7 a 12 átomos de carbono, y cicloalquil C_4-C_{12}-alquilo describe un grupo cicloalquilalquilo, como se define más adelante, que tiene un total de 4 a 12 átomos de carbono. El número total de carbonos en la anotación abreviada no incluye carbonos que puedan existir en sustituyentes del grupo descrito.

[0038] "Alquilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que está constituido únicamente por átomos de carbono y de hidrógeno, que no contienen insaturación, que tiene de uno a doce átomos de carbono, preferentemente uno a ocho átomos de carbono o uno a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, 1-metiletilo (*iso*-propilo), *n*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*t*-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo y similares. A menos que se establezca de otro modo específicamente en la memoria descriptiva, un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: halógeno, ciano, nitro, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2) en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo o alquilo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a no ser que se indique de otro modo a menos que se defina específicamente de otra manera.

[0039] "Alquenilo" se refiere a un grupo radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está constituido únicamente por átomos de carbono y de hidrógeno, que contiene al menos un doble enlace, que tiene de dos a doce átomos de carbono, preferentemente dos a ocho átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y similares. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, un grupo alquenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: ciano, nitro, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2) en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a no ser que se indique de otro modo a menos que se defina específicamente de otra manera.

[0040] "Alquinilo" se refiere a un grupo radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está constituido únicamente por átomos de carbono y de hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace, que opcionalmente contiene al menos un doble enlace, que tiene de dos a doce átomos de carbono, preferentemente dos a ocho átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, un grupo alquinilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: ciano, nitro, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2) en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se defina específicamente de otro modo.

[0041] "Alquileno" o "cadena de alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que liga el resto de la molécula a un grupo radical que está constituido únicamente por carbono e hidrógeno que no contiene insaturación y que tiene de uno a doce átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, propileno, *n*-butileno y similares. La cadena de alquileno está unida al resto de la molécula mediante dos enlaces sencillos. Los puntos de unión de la cadena de alquileno al resto de la molécula pueden ser mediante dos carbonos cualesquiera dentro de la cadena. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, una cadena de alquileno puede estar opcionalmente sustituida con uno o más de los siguientes sustituyentes: halógeno, ciano, nitro, arilo,

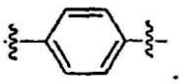
cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2) en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique de otro modo.

[0042] "Alquenileno" o "cadena de alquenileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que liga el resto de la molécula a un grupo radical que está constituido únicamente por carbono e hidrógeno que contiene al menos un doble enlace y que tiene de dos a doce átomos de carbono, por ejemplo, etenileno, propenileno, *n*-butenileno y similares. La cadena de alquenileno está unida al resto de la molécula mediante dos dobles enlaces, mediante dos enlaces sencillos o mediante un enlace sencillo y un doble enlace. Los puntos de unión de la cadena de alquenileno al resto de la molécula pueden ser mediante dos carbonos cualesquiera dentro de la cadena. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, una cadena de alquenileno puede estar opcionalmente sustituida con uno o más de los siguientes sustituyentes: halógeno, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2) en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique de otro modo.

[0043] "Alquinileno" o "cadena de alquinileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que liga el resto de la molécula a un grupo radical que está constituido únicamente por carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace y que tiene de dos a doce átomos de carbono, por ejemplo, propinileno, *n*-butinileno y similares. La cadena de alquinileno está unida al resto de la molécula mediante dos dobles enlaces, mediante dos enlaces sencillos o mediante un enlace sencillo y un doble enlace. Los puntos de unión de la cadena de alquinileno al resto de la molécula pueden ser mediante dos carbonos cualesquiera dentro de la cadena. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, una cadena de alquinileno puede estar opcionalmente sustituida con uno o más de los siguientes sustituyentes: alquilo, alquenilo, halógeno, haloalquenilo, ciano, nitro, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo, oxo, trimetilsilanilo, $-OR^{15}$, $-OC(O)-R^{15}$, $-N(R^{15})_2$, $-C(O)R^{15}$, $-C(O)OR^{15}$, $-C(O)N(R^{15})_2$, $-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con uno o más grupos halo), aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y en las que cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique de otro modo.

[0044] "Arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o multicíclico que sólo está constituido por hidrógeno y carbono y que contiene de 6 a 19 átomos de carbono, en el que el sistema de anillo puede estar parcialmente o completamente saturado. Los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como fluorenilo, fenilo y naftilo. El grupo arilo está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo o mediante un doble enlace. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquil") se indica para incluir radicales arilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que está constituido por alquilo, alquenilo, alquinilo, halógeno, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, nitro, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, $-R^{16}-OR^{15}$, $-R^{16}-OC(O)-R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})_2$, $-R^{16}-C(O)R^{15}$, $-R^{16}-C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-R^{16}-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2), en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y cada R^{16} es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada.

[0045] "Arileno" se refiere a un grupo arilo divalente como se define anteriormente que está unido al resto de la molécula mediante dos carbonos diferentes en el grupo arilo. Un ejemplo de un grupo arileno es fenileno, como se muestra a continuación:



[0046] El grupo arileno puede estar opcionalmente sustituido como se define anteriormente con un grupo arilo. "Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_b$ en la que R_a es un radical alquileno como se define anteriormente y R_b es uno o más radicales arilo como se definen anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo y similares. El (Los) radical(es) arilo puede(n) estar opcionalmente sustituido(s) como se ha descrito anteriormente. La parte de alquileno del

radical aralquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquileno.

[0047] "Aralquenilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_cR_b$ en la que R_c es un radical alquenileno como se define anteriormente y R_b es uno o más radicales arilo como se definen anteriormente. La parte arilo del radical aralquenilo puede estar opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo. La parte de alquenileno del radical aralquenilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquenileno.

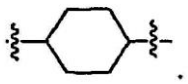
[0048] "Aralquinilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_dR_b$ en la que R_d es un radical alquinileno como se define anteriormente y R_b es uno o más radicales arilo como se definen anteriormente. La parte de arilo del radical aralquinilo puede estar opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo. La parte de alquinileno del radical aralquinilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquinilo.

[0049] "Ariloxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_b$ en la que R_b es un grupo arilo como se define anteriormente. La parte de arilo del radical ariloxi puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente.

[0050] "Aralquiloxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_b$ en la que R_b es un grupo aralquilo como se define anteriormente. La parte de aralquilo del radical aralquiloxi puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente.

[0051] "Cicloalquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monocíclico o policíclico no aromático estable no aromático que está constituido únicamente por átomos de carbono y de hidrógeno que puede incluir sistemas de anillo fusionados o unidos por puentes, que tiene de tres a quince átomos de carbono, preferentemente que tiene de tres a diez átomos de carbono, y que está saturado o insaturado y se une al resto de la molécula por un enlace sencillo. Los radicales monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los radicales policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantina, norbornano, decalinilo, 7,7-dimetil-biciclo[2.2.1]heptanilo y similares. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "cicloalquilo" se indica para incluir radicales cicloalquilo que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que está constituido por alquilo, alquenilo, halógeno, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, nitro, oxo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, $-R^{16}-OR^{15}$, $-R^{16}-OC(O)-R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})_2$, $-R^{16}-C(O)R^{15}$, $-R^{16}-C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-R^{16}-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2), en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y cada R^{16} es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada.

[0052] "Cicloalquileno" se refiere a un grupo cicloalquilo divalente como se define anteriormente que está unido al resto de la molécula mediante dos carbonos diferentes en el grupo cicloalquileno. Un ejemplo de un grupo cicloalquileno se muestra a continuación:



El grupo cicloalquileno puede estar opcionalmente sustituido como se define anteriormente para un grupo cicloalquilo.

[0053] "Cicloalquilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_e$ en la que R_a es un grupo alquileno como se define anteriormente y R_e es un grupo cicloalquilo como se define anteriormente. El grupo alquileno y el grupo cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos como se define anteriormente.

[0054] "Cicloalquilalquenilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_cR_e$ en la que R_c es un grupo alquenileno como se define anteriormente y R_e es un grupo cicloalquilo como se define anteriormente. El grupo alquenileno y el grupo cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos como se define anteriormente.

[0055] "Halo" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo.

[0056] "Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo como se define anteriormente que está sustituido con uno o más radicales halo como se definen anteriormente, por ejemplo, trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1-bromometil-2-bromoetilo y similares. La parte de alquilo del radical haloalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquilo.

[0057] "Haloalquenilo" se refiere a un radical alquenilo como se define anteriormente que está sustituido con uno

o más radicales halo como se definen anteriormente. La parte de alquenilo del radical haloalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquenilo.

[0058] "Haloalquinilo" se refiere a un radical alquinilo como se define anteriormente que está sustituido con uno o más radicales halo como se definen anteriormente. La parte de alquinilo del radical haloalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquinilo.

[0059] "Heterociclilo" se refiere a un radical de anillo no aromático de 3 a 18 miembros estables que está constituido por dos a doce átomos de carbono y de uno a seis heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por nitrógeno, oxígeno y azufre. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el radical heterociclilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico que puede incluir sistemas de anillo fusionados o unidos por puentes; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcialmente o completamente saturado. Ejemplos de tales radicales heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, 2,5-diazabiciclo[2.2.1]heptan-2-ilo, hexahidro-1*H*-1,4-diazepinilo, dioxolanilo, tienil[1,3]ditianilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxiranilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofurilo, tritianilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiamorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "heterociclilo" se indica para incluir radicales heterociclilo como se definen anteriormente que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que está constituido por alquilo, alquenilo, halógeno, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, oxo, tioxo, nitro, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, $-R^{16}-OR^{15}$, $-R^{16}-OC(O)-R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})_2$, $-R^{16}-C(O)R^{15}$, $-R^{16}-C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-R^{16}-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2), en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y cada R^{16} es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada.

[0060] "Heterociclilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_f$ en la que R_a es un grupo alquileno como se define anteriormente y R_f es un grupo heterociclilo como se define anteriormente, y si el heterociclilo es un heterociclilo que contiene nitrógeno, el heterociclilo puede unirse al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. La parte de alquileno del radical heterociclilalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquileno. La parte de heterociclilo del radical heterociclilalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo heterociclilo.

[0061] "Heteroarilo" se refiere a un radical de anillo completa o parcialmente aromático de 3 a 18 miembros que está constituido por tres a trece átomos de carbono y de uno a seis heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por nitrógeno, oxígeno y azufre. Para los fines de la presente invención, el radical heteroarilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico que puede incluir sistemas de anillo fusionados o unidos por puentes; y los átomos de nitrógeno, carbono o de azufre en el radical heteroarilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, acridinilo, bencimidazolilo, bencindolilo, benzodioxolilo, benzofuranilo, benzooxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[*b*][1,4]dioxepinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonaftofuranilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinolinilo, dibenzofuranilo, dibenzotiofenilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, indolizinilo, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinuclidinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo y tiofenilo (es decir, tienilo). A menos que se establezca específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "heteroarilo" se indica para incluir radicales heteroarilo como se definen anteriormente que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que está constituido por alquilo, alquenilo, alcoxi, halógeno, haloalquilo, haloalquenilo, ciano, oxo, tioxo, nitro, oxo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, $-R^{16}-OR^{15}$, $-R^{16}-OC(O)-R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})_2$, $-R^{16}-C(O)R^{15}$, $-R^{16}-C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)OR^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)R^{15}$, $-R^{16}-N(R^{15})C(O)N(R^{15})_2$, $-R^{16}-N(R^{15})S(O)_tR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_tOR^{15}$ (en la que t es 1 ó 2), $-R^{16}-S(O)_pR^{15}$ (en la que p es 0, 1 ó 2) y $-R^{16}-S(O)_tN(R^{15})_2$ (en la que t es 1 ó 2), en las que cada R^{15} es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, y cada R^{16} es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada.

[0062] "Heteroarilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_g$ en la que R_a es un grupo alquileno como se define anteriormente y R_g es un grupo heteroarilo como se define anteriormente. La parte de heteroarilo del radical de heteroarilalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo heteroarilo. La parte

de alquileno del radical heteroarilalquilo puede estar opcionalmente sustituida como se define anteriormente para un grupo alquilo.

[0063] "Compuesto estable" y "estructura estable" indican un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y la formulación en un agente terapéutico eficaz.

[0064] "Mamífero" incluye seres humanos y animales domésticos tales como gatos, perros, cerdos, ganado, ovejas, cabras, caballos; conejos y similares. Preferentemente, para los fines de la presente invención, el mamífero es un ser humano.

[0065] "Aminoácido natural o no natural" incluye cualquiera de los aminoácidos comunes que se producen naturalmente que sirven de elementos estructurales para la biosíntesis de péptidos, polipéptidos y proteínas (por ejemplo, alanina (Ala, A), cisteína (Cys, C), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), fenilalanina (Phe, F), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), lisina (Lys, K), leucina (Leu, L), metionina (Met, M), asparagina (Asn, N), prolina (Pro, P), glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), valina (Val, V), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y)) y también incluye aminoácidos modificados, derivatizados, enantioméricos, raros e/o inusuales, tanto si se producen naturalmente como si son sintéticos, por ejemplo, hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, ε-N-metillisina, ε-N-trimetillisina, metilhistidina, deshidrobutirina, deshidroalanina, ácido α-aminobutírico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, homocisteína, homoserina, citrulina, ornitina y otros aminoácidos que pueden aislarse de una fuente natural y/o que pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, como puede encontrarse en Proteins, Peptides and Amino Acids Sourcebook (White, J.S. y White, D.C., 2002 Humana Press, Totowa, NJ) o en Amino Acid and Peptide Synthesis (Jones, J., 2002 Oxford Univ. Press USA, Nueva York) o en Unnatural Amino Acids, ChemFiles vol. 1, nº 5 (2001 Fluka Chemie GmbH; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o en Unnatural Amino Acids II, ChemFiles vol. 2, nº 4 (2002 Fluka Chemie GmbH; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Descripciones adicionales de aminoácidos naturales y/o no naturales pueden encontrarse, por ejemplo, en Kotha, 2003 Acc. Chem. Res. 36:342; Maruoka y col., 2004 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101:5824; Lundquist y col., 2001 Org. Lett. 3:781; Tang y col., 2002 J. Org. Chem. 67:7819; Rothman y col., 2003 J. Org. Chem. 68:6795; Krebs y col., 2004 Chemistry 10:544; Goodman y col., 2001 Biopolymers 60:229; Sabat y col., 2000 Org. Lett. 2:1089; Fu y col., 2001 J. Org. Chem. 66:7118; y Hruby y col., 1994 Meths. Mol. Biol. 35:249. Una solución de manipulación de proteínas para modificar restos de aminoácidos postraduccionalmente deshidratados en el lantibiótico nisina de *Lactococcus lactis* se describe por Kuipers y col. (1992 J. Biol. Chem. 267:24340).

[0066] Las abreviaturas estándar de tres letras y los símbolos de 1 letra se usan en el presente documento para designar aminoácidos naturales y no naturales. Además, "DAla" se usa en el presente documento para designar D-alanina; "Dhb" se usa en el presente documento para designar deshidrobutirina; "Dha" se usa en el presente documento para designar deshidroalanina; "Abu" se usa en el presente documento para designar ácido α-aminobutírico; y "DAbu" se usa en el presente documento para designar ácido D-α-aminobutírico.

[0067] "Opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento posteriormente descrito de circunstancias puede o no producirse, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no. Por ejemplo, "arilo opcionalmente sustituido" significa que el radical arilo puede o puede no estar sustituido y que la descripción incluye tanto radicales arilo sustituidos como radicales arilo que no tienen sustitución.

[0068] "Excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye sin limitación cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, fluidificante, edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del aroma, tensioactivo, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, disolvente o emulsionante que ha sido aprobado por la Organismo Federal Estadounidense de Fármacos y Alimentos como aceptable para uso en seres humanos o animales domésticos.

[0069] "Sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales tanto de adición de ácido como de base.

[0070] "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la efectividad biológica y propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otro modo no deseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como, pero sin limitarse a, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfórico, ácido canfor-10- sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido múcico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido

oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiociánico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico y similares.

[0071] "Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la efectividad biológica y propiedades de los ácidos libres que no son biológicamente o de otro modo no deseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica para el ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen naturalmente, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico tales como amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromo, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

[0072] Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de un compuesto de la invención y a un medio generalmente aceptado en la materia para la administración del compuesto biológicamente activo a mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Un medio tal incluye todos los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para la misma.

[0073] "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una composición antibiótica de la invención que, cuando se administra a un mamífero, preferentemente a un ser humano, es suficiente para efectuar el tratamiento, como se define más adelante, de una enfermedad o afección de interés en el mamífero, preferentemente un ser humano. La cantidad de una composición antibiótica de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo de la composición antibiótica, la enfermedad o afección y su gravedad, y la edad del mamífero que va a tratarse, pero puede determinarse rutinariamente por un experto en la materia que tiene consideración por su propio conocimiento y por esta divulgación.

[0074] "Tratar" o "tratamiento" según se usa en el presente documento cubre el tratamiento de la enfermedad o afección de interés en un mamífero, preferentemente un ser humano, que tiene la enfermedad o afección de interés, e incluye:

(i) prevenir que se produzca la enfermedad o afección en un mamífero, en particular cuando tal mamífero tiene predisposición por la afección, pero todavía no se le ha diagnosticado que la tiene;

(ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;

(iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, producir la regresión de la enfermedad o afección; o

(iv) estabilizar la enfermedad o afección.

[0075] Según se usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "afección" pueden usarse indistintamente o puede ser diferentes porque la enfermedad o la afección particular pueden no tener un agente causante conocido (de manera que la etiología todavía no se ha resuelto) y, por tanto, todavía no se ha reconocido como una enfermedad, sino sólo como una afección o síndrome no deseable en el que los médicos han identificado un conjunto más o menos específico de síntomas.

[0076] Según se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" y "la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente" o a "una composición" incluye una pluralidad de agentes o composiciones tales, y la referencia a "la célula" incluye referencia a una o más células y equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la materia, etc. El término "que comprende" (y términos relacionados tales como "comprender" o "comprende" o "que tiene" o "que incluye") no pretenden excluir realizaciones en las que, por ejemplo, cualquier composición de materia, composición, método o procedimiento o similares descritos en el presente documento puedan "estar constituidas por" o "estar esencialmente constituidos por" las características descritas.

Composiciones antibióticas de la invención

[0077] Como se expone anteriormente en el Resumen de la invención, las composiciones antibióticas de la invención comprenden un resto director unido covalentemente a un resto antibiótico mediante un resto de enlazante como se define en las reivindicaciones. El resto director es un fragmento del lantibiótico nisina, que usa un modo distinto de interacción con membranas bacterianas. Las composiciones antibióticas de la invención proporcionan inesperadamente actividad antibacteriana mayor que la actividad antibacteriana individual del resto director o del resto

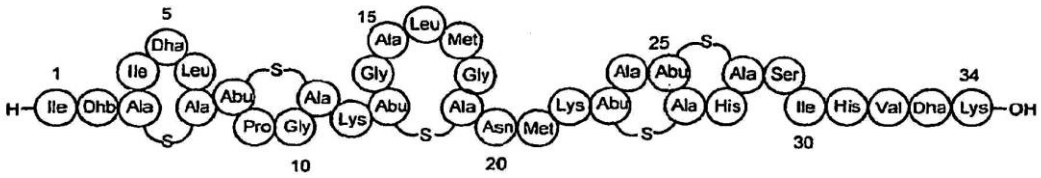
antibiótico.

A. Restos directores de las composiciones antibióticas de la invención

[0078] Los restos directores de las composiciones antibióticas de la invención comprenden un fragmento de polipéptido que puede unirse a la región pirofosfato de lípidos de la membrana bacteriana (particularmente el Lípido II). El fragmento de polipéptido del resto director se deriva de nisina y, en ciertas realizaciones, contempla un resto director que puede ser un producto sintético y/o un resto director que puede ser un producto biomanipulado, por ejemplo, un producto de metodologías de biología molecular recombinante actualmente disponibles tales como aquellas descritas por Rink y col. (2005 Biochem. 44(24):8873-82), Kluskens y col., (2005 Biochem. 44(38):12827-34), Wirawan y col., (2006 Appl. Env. Microbiol. 72(2):1148-56), Aso y col., (2004 J. Biosci. Bioeng. 98(6):429-36), Patton y col., (2005 Curr. Opin. Microbiol. 8(5):543-51) y Cotter y col., (2005 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102(51):18584), o procedimientos puestos en práctica por Novacta Biosystems Ltd. (Hertfordshire, RU) para la producción recombinante de lantibióticos.

[0079] La nisina es un destacado miembro del grupo de péptidos que contienen lantionina y/o β-metillantionina denominado lantibióticos. Otros miembros de este grupo incluyen, pero no se limitan a, subtilina, epidermina, pep5, lacticina 481, ancovenina y duramicina. Los lantibióticos son péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño (< 4 kDa) que son activos contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas.

[0080] La nisina tiene la siguiente secuencia de aminoácidos y estructura (SEQ ID NO:9):



Como se expone anteriormente, la nisina está constituida por una cadena de polipéptidos modificada en la que los aminoácidos se han ciclado para dar cuatro estructuras de anillo (una estructura de anillo de lantionina y tres estructuras de anillo de β-metillantionina) y una estructura correspondientemente rígida definida adicionalmente por la presencia de un resto de deshidroalanina. La estructura de anillo formada por los aminoácidos 3-7 se designa en el presente documento el anillo A, la estructura de anillo formada por los aminoácidos 8-11 se designa en el presente documento el anillo B, la estructura de anillo formada por los aminoácidos 13-19 se designa en el presente documento el anillo C, la estructura de anillo acumulada formada por los aminoácidos 23-28 se designa en el presente documento la estructura de anillo acumulada D-E.

[0081] La nisina es un producto que se produce naturalmente a partir de la fermentación de *lactococcus* y va a encontrarse en leche y productos lácteos. Generalmente se considera segura, usándose como aditivo alimentario, pero antes de la presente divulgación la nisina no se había usado ampliamente en una forma pura como un antibacteriano clínico o como un componente de una composición antibiótica. Se cree que la nisina actúa en un procedimiento en dos etapas, siendo la primera etapa el reconocimiento del pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana Lípido II [undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc, en el que el pentapéptido puede comprender normalmente L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (SEQ ID NO:8)], que está mediado por la región del extremo N del polipéptido modificado, y la segunda, la creación de un poro en el pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana Lípido II [undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc, en el que el pentapéptido puede comprender normalmente L-Ala-D-γ-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (SEQ ID NO:8)], que está mediado por la región del extremo N del polipéptido modificado, y la segunda, la creación de un poro en la membrana mediante cambio conformacional y la mediación autoasociada por la región del extremo C.

[0082] Una composición antibiótica comprende en la parte pertinente un resto director que es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana Lípido II. La unión de un resto director como se desvela en el presente documento al Lípido II puede determinarse según cualquiera de una variedad de metodologías aceptadas en la materia para detectar tal unión, que es normalmente el resultado de una o más interacciones intermoleculares no covalentes muy conocidas, tales como interacciones electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno, interacciones estéricas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y similares.

[0083] Ejemplos no limitantes de ensayos que pueden emplearse para la determinación de si una molécula de interés, tal como un resto director o composición antibiótica descritos en el presente documento, es capaz de interacciones de unión con el Lípido II se describe, por ejemplo, por Brotz y col. (1998 Antimicrob. Agent. Chemother. 42:154) y por Wiedemann y col., (2001 J. Biol. Chem. 276:1772). Brotz y col. describen el uso de una preparación de membrana de la pared celular bacteriana o una fracción de membrana de protoplasto que contiene el Lípido II como

sustrato de unión para un ligando de interés (ligando que, en el contexto de la presente solicitud, puede ser un resto director, un resto antibiótico o una composición antibiótica). Estos autores también describen un ensayo electroforético en gel de poliacrilamida para la determinación de un ligando de unión al Lípido II en el que se evita que un ligando del Lípido II marcado detectablemente (por ejemplo, un agente que puede unirse al Lípido II) migre en un gel de electroforesis cuando las micelas que contienen el Lípido II están disponibles para las interacciones de unión antes de la electroforesis. La cuantificación de tales interacciones de unión puede lograrse, por ejemplo, por radiometría de un ligado del Lípido II marcado detectablemente (por ejemplo, mediante radiometría de un resto director marcado con radioisótopo) o del propio Lípido II biosintéticamente radiomarcado. Weidemann y col. (2001 J. Biol. Chem. 276: 1772) describen ensayos de la unión de nisina radiomarcada a liposomas artificiales que contienen el Lípido II.

[0084] Pueden emplearse modificaciones de y variaciones de ensayos tales como estos por aquellos familiarizados con la materia basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento para los fines de determinación de las interacciones de unión de un resto director candidato con el Lípido II. Tales modificaciones pueden incluir adicionalmente la preparación para uso en estos ensayos del Lípido II.

[0085] Un resto director como se proporciona en el presente documento, o una composición antibiótica como se proporciona en el presente documento, es capaz de interacciones de unión con su diana (por ejemplo, el Lípido II o, preferentemente, el pirofosfato del Lípido II) si reacciona a un nivel detectable con la diana, preferentemente con una constante de afinidad, K_a, superior a o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1}, o superior a o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1}, superior a o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1}, superior a o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1}, o superior a o igual a 10^8 M^{-1}, y no se une no específicamente a otras moléculas estructuralmente distintas. Las afinidades de componentes de unión pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales tales como las descritas en el presente documento o, por ejemplo, aquellas descritas por Scatchard y col. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)), o por resonancia de plasmones superficiales (SPR; BIAcore™, Biosensor, Piscataway, NJ) u otros procedimientos puestos rutinariamente en práctica en la materia.

[0086] De particular interés para la invención son restos directores que comprenden fragmentos del polipéptido nisina, especialmente el fragmento de polipéptido que comprende los doce primeros aminoácidos del extremo N de nisina, como se muestra a continuación (SEQ ID NO:10):

Este fragmento, que se define en el presente documento como el fragmento del polipéptido nisina [1-12], contiene un enlace lantionina entre el aminoácido 3 y el aminoácido 7 (formando una estructura de anillo de lantionina) y un enlace β-metillantionina entre el aminoácido 13 y el aminoácido 19 (formando una estructura de anillo de β-metillantionina).

[0087] El fragmento del polipéptido nisina [1-12] puede sintetizarse a partir de un polipéptido que contiene la estructura de anillo de lantionina definida en el presente documento como el Segmento I del polipéptido de nisina [1-12] y un polipéptido que contiene la estructura de anillo de β-metillantionina definida en el presente documento como el Segmento II del fragmento del polipéptido nisina [1-12] como se ilustra en las FIGURAS 1-4. Esta síntesis se desvela en más detalle en Shiba, T. y col., "Chemistry of Lanthionine Peptides," Biopolymers (1986), vol. 25, pág. S11-S19.

[0088] Otro resto director de interés para la invención es el fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado. El fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado es un fragmento del polipéptido nisina [1-12] como se define anteriormente en el que el segundo aminoácido del extremo N, es decir, la deshidrobutirina, del fragmento del polipéptido nisina [1-12] está sustituido por ácido α-aminobutírico y el cuarto aminoácido del extremo N, es decir, la deshidroalanina, está sustituido por alanina, como se muestra a continuación (SEQ ID NO:11):

[0089] Este fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado puede sintetizarse como deshidroalanina, se sustituye con alanina, como se muestra a continuación (SEQ ID NO; 11):

[0090] Este fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado puede sintetizarse como se ilustra en las FIGURAS 5-7.

[0091] Además, la nisina puede digerirse por tripsina para proporcionar el fragmento del polipéptido nisina [1-12] como se desvela más abajo en más detalle en los ejemplos (por ejemplo, Ejemplo 4).

[0092] Los homólogos de péptidos del fragmento del polipéptido nisina [1-12] o del fragmento del polipéptido nisina [1-12] saturado también son restos directores. Estos homólogos, como se describen en Hsu y col., 2004 Nature Struct. Molec. Biol. 11:963, tienen una estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina y se seleccionan del grupo que está constituido por un fragmento del polipéptido subtilina [1-12], un fragmento del polipéptido epidermina, un fragmento del polipéptido epidermina (I1V 16L), un fragmento del polipéptido mutacina B-Ny266 y un fragmento del polipéptido mutacina 1140.

[0093] Otros restos directores incluyen aquellos restos directores que comprenden un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:1)

en la que

X_1 se selecciona de F, I, V y W,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 se selecciona de E, I, K y W,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 se selecciona de I, F y L,

X_6 se selecciona de A, K y V;

y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

[0094] Otros restos diana incluyen aquellos restos directores que comprenden un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:6)

en la que

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico, y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 y X_6 se seleccionan cada uno independientemente de cualquier aminoácido natural o no natural,

y en la que T es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana el lípido II [undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc].

[0095] Otros restos diana incluyen aquellos restos directores que comprenden un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4XA_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:7)

en la que

X_1 es I,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 es I,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 es L,

X_6 es K;

y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

[0096] Los restos directores son capaces de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana el lípido II [undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc].

[0097] Según se observa anteriormente también pueden emplearse metodologías recombinantes establecidas para el diseño y la síntesis de péptidos biomanipulados que tienen secuencias deseadas tales como un fragmento del polipéptido nisina [1-12] o una variante del mismo tal como un homólogo de polipéptido de un fragmento del polipéptido nisina [1-12] y son muy conocidas para aquellos que están familiarizados con la materia. Por tanto, pueden usarse técnicas de biología molecular recombinante que incluyen tecnologías que permiten la expresión de péptidos biomanipulados que pueden modificarse postraduccionalmente para tener enlaces lantionina (por ejemplo, Rink y col. 2005 Biochem. 44(24):8873-82, Kluskens y col., 2005 Biochem. 44(38):12827-34, Wirawan y col., 2006 Appl. Env. Microbiol. 72(2):1148-56, Aso y col., 2004 J. Biosci. Bioeng. Los fragmentos del polipéptido nisina [1-12] recombinantemente producidos y homólogos de polipéptido del fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tienen estructuras de anillo de lantionina y β-metillantionina y que tienen secuencias de aminoácidos como se desvelan en el presente documento, y algunas otras realizaciones de la divulgación, contemplan variantes de tales péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos similar a las secuencias de aminoácidos del fragmento del polipéptido nisina [1-12] y homólogo de fragmento del polipéptido nisina [1-12] desveladas en el presente documento. Tales variantes de polipéptidos pueden contener una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Las variantes incluyen, por ejemplo, polimorfismos que se producen naturalmente (por ejemplo, variantes alélicas) o variantes recombinantemente manipuladas o modificadas. La secuencia de aminoácidos de una variante tal es idéntica o similar al menos aproximadamente al 80%, 85%, 90%, 95% o el 98% a la secuencia nativa (por ejemplo, que se produce naturalmente). Por ejemplo, una variante puede tener una adición, deleción o sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido número doce de la secuencia del fragmento del polipéptido nisina [1-12], que es el extremo carboxilo del fragmento, pudiendo introducir deseablemente a modo de otro ejemplo no limitante una adición, deleción o sustitución tal una funcionalidad química en la cadena lateral del aminoácido que tiene propiedades útiles para la unión al resto de enlazante o al resto antibiótico. Por tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones el extremo C del resto director puede seleccionarse de A, K, V, AX, KX y VX, en las que X se selecciona de A, G, I, L, M, P y V.

[0098] Una variedad de criterios conocidos para los expertos en la materia indica si los aminoácidos en una posición particular en un péptido o polipéptido son conservativos o no o similares. Por ejemplo, un aminoácido similar o una sustitución de aminoácidos conservativa es una en la que un resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar tal como aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). La prolina, que se considera más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, leucina, valina, isoleucina y alanina). En ciertas circunstancias, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico puede considerarse una sustitución similar porque la glutamina y la asparagina son derivados de amida de ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente. El porcentaje de identidad o similitud entre secuencias de aminoácidos de dos péptidos, tales como entre un fragmento del polipéptido nisina [1-12] y un homólogo o variante del mismo, puede determinarse fácilmente mediante inspección visual o por procedimientos de alineación (por ejemplo, usando GENEWORKS, Align o el algoritmo BLAST) con los que está familiarizado un experto en la materia, y la selección de motivos de secuencias que son responsables de las modificaciones postraduccionales tales como aquellas que participan en la formación de anillos de lantionina está comprendida dentro del estado de la materia y puede realizarse fácilmente sin experimentación adicional (por ejemplo, Rink y col. 2005 Biochem. 44(24):8873-82, Kluskens y col., 2005 Biochem. 44(38):12827-34).

[0099] Por tanto, un fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tiene una estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina, o un homólogo del mismo o una variante del mismo, puede prepararse fácilmente por procedimientos y técnicas de manipulación genética y de biología molecular recombinante. Brevemente, el análisis de las secuencias de aminoácidos primaria y secundaria de tales péptidos y el análisis mediante modelado por ordenador para analizar la estructura terciaria usando la secuencia de aminoácidos y estructuras y motivos habituales del polipéptido pueden ayudar en la identificación de restos de aminoácidos específicos que pueden estar sustituidos, incluyendo la predicción asistida por ordenador de estructuras de variantes de secuencias (Bradley y col., Science 309:1868 (2005); Schueler-Furman y col., Science 310:638 (2005)). Además, la conservación evolutiva de o la tolerancia por la variabilidad de aminoácidos en polipéptidos relacionados puede dar la oportunidad de ver restos de aminoácidos que pueden alterarse para reducir, mantener o potenciar la actividad.

[0100] La modificación de ADN que codifica un fragmento del polipéptido nisina [1-12] o un homólogo o variante

del mismo puede realizarse mediante una variedad de procedimientos que incluyen mutagénesis sitioespecífica o sitiodirigida del ADN, procedimientos que incluyen amplificación de ADN usando cebadores para introducir y amplificar alteraciones en el molde de ADN tales como corte y empalme por PCR mediante extensión por solapamiento (SOE). Las mutaciones pueden introducirse en una localización particular sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligadura a fragmentos de la secuencia nativa. Tras la ligadura, la secuencia reconstruida resultante codifica una variante (o derivado) que tiene la inserción, sustitución o deleción de aminoácidos deseada.

[0101] La mutagénesis sitiodirigida se efectúa normalmente usando un vector de fago que tiene formas monocatenarias y bicatenarias tales como un vector de fago M13 que es muy conocido y está comercialmente disponible (véase, por ejemplo, Veira y col., Meth. Enzymol. 15:3 (1987); Kunkel y col., Meth. Enzymol. 154:367 (1987)) y en las patentes de EE.UU. nº 4.518.584 y 4.737.462). Se pueden emplear procedimientos de mutagénesis sitioespecífica dirigida a oligonucleótido (o específica de segmento) para proporcionar un polinucleótido alterado que tiene codones particulares alterados según la sustitución, deleción o inserción deseada. Los derivados de deleción o truncación de proteínas también pueden construirse usando sitios de endonucleasa de restricción convenientes adyacentes a la deleción deseada. Procedimientos a modo de ejemplo de la preparación de las alteraciones expuestas anteriormente se desvelan por Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2001). Alternativamente, las técnicas de mutagénesis al azar tales como mutagénesis por cribado de alanina, mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa propensa a error y mutagénesis dirigida a oligonucleótido pueden usarse para preparar variantes (*véase, por ejemplo,* Sambrook y col., *más arriba*).

[0102] Además de la predicción computacional anteriormente descrita de la estructura tridimensional de la variante de polipéptidos (Bradley y col., *más arriba*; Schueler-Furman y col., *más arriba*), los ensayos de confirmación para evaluar si la variante incorpora o no una conformación comparable con el polipéptido no variante o fragmento pueden incluir, por ejemplo, prueba funcional usando el ensayo de unión al Lípido II descrito anteriormente.

[0103] Las mutaciones que se hacen en las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un fragmento del polipéptido nisina [1-12] o un homólogo o variante del mismo para fines de expresión recombinante del fragmento de péptido conservan preferentemente el marco de lectura de las secuencias codificantes. Además, las mutaciones no crearán preferentemente regiones complementarias que cuando se transcriban podrían hibridarse para producir estructuras de ARNm secundarias tales como bucles u horquillas, que afectarían adversamente a la traducción del ARNm. Aunque puede predeterminarse un sitio de mutación, la naturaleza de la mutación *por sí misma* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para seleccionar características óptimas de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis al azar puede realizarse en el codón diana y los mutantes expresados se criban para la ganancia o pérdida o retención de actividad biológica (*por ejemplo*, unión al Lípido II).

[0104] Las variantes de polinucleótidos que pueden ser variantes degeneradas o que pueden incluir una variante de polinucleótido que codifica un fragmento del polipéptido nisina [1-12] u homólogo o una variante del mismo también pueden identificarse por procedimientos de hibridación. Condiciones moderadamente rigurosas adecuadas incluyen, por ejemplo, prelavado en una disolución de 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50ºC-70ºC, 5X SSC durante 1-16 horas; seguido de lavado una vez o dos veces a 22-65ºC durante 20-40 minutos con uno o más de cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,05-0,1%. Para rigurosidad adicional, las condiciones pueden incluir un lavado en 0,1X SSC y SDS al 0,1% a 50-60ºC durante 15 minutos. Como es entendido por los expertos en la materia, las variaciones en la rigurosidad de las condiciones de hibridación pueden lograrse alterando el tiempo, la temperatura y/o la concentración de las disoluciones usadas para la prehibridación. Condiciones de rigurosidad adicionales pueden incluir un lavado en 0,1X SSC y SDS al 0,1% a 50-60ºC durante 15 minutos. Como es entendido por los expertos en la materia, las variaciones en la rigurosidad de las condiciones de hibridación pueden lograrse alterando el tiempo, la temperatura y/o la concentración de las disoluciones usadas para las etapas de prehibridación, hibridación y lavado. Las condiciones adecuadas también pueden depender en parte de las secuencias de nucleótidos particulares de la sonda usada (es decir, por ejemplo, el contenido de guanina más citosina (G/C) frente a adenina más timidina (A/T)). Por consiguiente, un experto en la materia apreciará que condiciones adecuadamente rigurosas pueden seleccionarse fácilmente sin experimentación adicional cuando se identifica una selectividad deseada de la sonda.

B. Restos antibióticos de las composiciones antibióticas de la invención

[0105] Los restos antibióticos son antibióticos que pueden alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana. “Alterar” se define en el presente documento como aumentar o disminuir una actividad tal en un modo estadísticamente significativo, es decir, con respecto a un control apropiado como puede ser seleccionado por aquellos expertos en la materia. “Actividad de una membrana bacteriana o pared celular bacteriana” se define en el presente documento en el sentido que incluye, pero no se limita a, cualquier parámetro detectable que se refiera directamente a una condición, procedimiento, ruta, estructura dinámica, estado u otra actividad que implique una membrana bacteriana y/o una pared celular bacteriana y para el que puede detectarse la función alterada (por ejemplo, aumento o disminución con significancia estadística). Por tanto, las composiciones y procedimientos de ciertas realizaciones de la presente invención se refieren en parte a tal correlación en la que la actividad alterada de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana puede ser, por ejemplo, una alteración en la permeabilidad de la

membrana bacteriana que incluye permeabilidad selectiva tal como transporte pasivo o activo alterado de metabolitos, catabolitos, precursores, cofactores, mediadores y similares, y/o actividad biosintética alterada para uno o más componentes de la membrana bacteriana y/o de la pared celular bacteriana, u otros criterios como se proporcionan en el presente documento.

[0106] Por tanto, "actividad alterada de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana" puede referirse a cualquier condición o estado en el que cualquier estructura o actividad de la membrana o de la pared celular bacteriana que está directa o indirectamente relacionada con una función bacteriana ha cambiado en un modo estadísticamente significativo con respecto a un control o patrón. La función alterada de la membrana bacteriana o la pared celular bacteriana puede tener su origen en estructuras o acontecimientos extracelulares, además de en estructuras o acontecimientos intramembranarios o intracelulares, en interacciones directas entre genes bacterianos y hospedador y/o sus productos génicos, o incluir actividad respiratoria, metabólica u otra bioquímica o biofísica alterada en algunas o todas las células. Como ejemplos no limitantes, un mantenimiento marcadamente afectado del potencial de la membrana bacteriana puede relacionarse con función alterada de la membrana o de la pared celular bacteriana, ya que puede ser competencia por la replicación bacteriana afectada o respiración defectuosa. Como otros ejemplos, la biosíntesis alterada de la membrana bacteriana y/o pared celular bacteriana, la inducción de poros no selectivos de la membrana bacteriana que conducen a la pérdida de la integridad de la célula bacteriana y la formación de especies reticuladas químicas y/o bioquímicas atípicas dentro de una célula bacteriana, tanto por mecanismos enzimáticos como no enzimáticos, pueden todos considerarse como indicativos de función alterada de la membrana bacteriana o pared celular bacteriana.

[0107] Las células bacterianas en las que al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana está alterada también pueden presentar propiedades de permeabilidad alteradas de la membrana celular ya que pueden detectarse fácilmente mediante el uso de colorantes vitales (por ejemplo, azul de tripano, colorantes indicadores de ácidos nucleicos fluorescentes tales como yoduro de propidio o SYTO®9 proporcionados en, por ejemplo, el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ disponible de Molecular Probes, Medford, OR, o detección luminiscente de ATP celular usando luciferasa tal como el kit del ensayo de viabilidad de células microbianas BacTiter-Glo™ disponible de ProMega, Madison, WI) o mediante la detección de una fuga de marcador citosólico (por ejemplo, una enzima o metabolito fácilmente detectable) en el medio extracelular. Estos y otros medios para detectar células que tienen actividad alterada de la membrana o la pared celular bacteriana, por criterios morfológicos, por criterios bioquímicos, por permeabilidad alterada de la membrana plasmática y/o por cambios relacionados, serán evidentes para aquellos familiarizados con la materia.

[0108] Por tanto, los restos antibióticos para uso según la invención desvelada en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, antibióticos de beta-lactama tales como penicilinas, cefalosporinas, carbapenenos y monobactamas; antibióticos de glucopéptido, lipoglucopéptido y lioglucodepsipéptidos tales como vancomicina, derivados de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina y dalbavancina; polipéptidos tales como polimixina y bacitracina; y los antibióticos enumerados en la FIGURA 8. De particular interés son aquellos restos antibióticos seleccionados del grupo que está constituido por vancomicina, un derivado de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina y un resto antibiótico de la FIGURA 8.

[0109] De particular interés para la invención es el antibiótico de glucopéptido conocido como vancomicina. La vancomicina se produce por *Streptococcus orientalis,* un actinomiceto aislado de muestras de tierra en Indonesia e India. La vancomicina es un glucopéptido complejo tricíclico con una masa molecular de aproximadamente 1500 Da.

[0110] La vancomicina es principalmente activa contra bacterias Gram-positivas. Las cepas de bacterias se consideran susceptibles a una concentración inhibitoria mínima inferior a o igual a 4 µg/ml. *Strep. pyogenes, Strep. pneumoniae, Corynebacterium* spp. son altamente susceptibles, como lo son la mayoría de las cepas de *Enterococcus* spp. La mayoría de las especies de *Actinomyces* y *Clostridium* spp. también son sensibles a la vancomicina, pero a mayores concentraciones de antibiótico. La vancomicina sólo se emplea para tratar infecciones graves y es particularmente útil en el control de infecciones debidas a *Staphylococci* resistentes a meticilina que incluyen neumonía, empiema, endocarditis, osteomielitis y abscesos de tejidos blandos. El agente también es extremadamente útil en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* en pacientes que son alérgicos a penicilinas y cefalosporinas.

[0111] La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles bloqueando la reticulación de cadenas de peptidoglicanos adyacentes durante la síntesis de la pared celular bacteriana. Sin reticulación suficiente, la pared celular se vuelve mecánicamente frágil y las bacterias se lisan cuando se someten a cambios en la presión osmótica. La vancomicina se une con alta afinidad al extremo de D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de la porción del pentapéptido del precursor de peptidoglicano antes de la reticulación. El dipéptido de D-Ala-D-Ala forma enlaces de hidrógeno complementarios con el esqueleto peptídico de vancomicina. Se cree que el complejo de vancomicina-peptidoglicano bloquea físicamente la acción de la enzima transpeptidasa y así inhibe la formación de puentes cruzados de péptidos que refuerzan el peptidoglicano: Esta actividad también conduce a la acumulación de precursores de peptidoglicano en el citoplasma bacteriano.

[0112] Como se ha observado anteriormente en Antecedentes de la invención, la resistencia a antibióticos es

muy conocida. Se han descrito tres tipos de resistencia para vancomicina. El fenotipo VanA es inducible por vancomicina y confiere resistencia tanto a teicoplanina como a vancomicina. El fenotipo VanA está mediado por el elemento transposable Tn1546 o elementos muy relacionados. El transposón codifica una deshidrogenasa (VanH) que reduce el piruvato en D-lactato (D-lac), y una ligasa de especificidad de amplio sustrato (VanA) que cataliza la formación de un enlace éster entre D-Ala y D-Lac. El depsipéptido D-Ala-D-Lac resultante sustituye al dipéptido D-Ala-D-Ala en la ruta de síntesis de peptidoglicanos. La sustitución elimina un enlace hidrógeno que es fundamental para la unión a antibiótico. El fenotipo VanB también se induce tras la exposición a vancomicina; sin embargo, a diferencia del fenotipo VanA, estos microorganismos no son resistentes a teicoplanina debido a que la teicoplanina no induce la expresión de los genes requerida para la resistencia en bacterias VanB. La resistencia a vancomicina por bacterias del fenotipo VanB se produce mediante un mecanismo similar a la resistencia a VanA, concretamente la sustitución del precursor del peptidoglicano D-Ala-A-Ala terminal en el peptidoglicano inmaduro por el depsipéptido D-Ala-D-Lac. Se ha descrito otro fenotipo resistente a vancomicina (VanC) en *enterococci* que pertenecen a las especies *E. gallinarum, E. casseliflavus* y E. *flavescens.* Estas bacterias son intrínsecamente resistentes a bajos niveles de vancomicina y son susceptibles a teicoplanina. La resistencia es el resultado de la producción de precursores de peptidoglicanos que terminan en D-serina. La sustitución de D-Ala por D-Ser en el extremo carboxilo de los análogos de precursores de peptidoglicanos reduce la afinidad de los precursores por vancomicina con un cambio relativamente pequeño en la afinidad por teicoplanina.

[0113] Otros restos antibióticos que pueden usarse según ciertas realizaciones de la invención desvelada en el presente documento, restos antibióticos que pueden alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana, incluyen, pero no se limitan a, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina, ácido 6-aminopenicilánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, bacitracina, carbenicilina, cefaclor, cefamandol, cefazolina, cefmetazol, cefoperazona, cefotaxima, cefsulodina, ceftriaxona, cefalexina, cefalosporina C, cefalotina, cefapirina, cefradina, cloxacilina, d-(-)-penicilamina, d-cicloserina, dicloxacilina, econazol, etambutol, lisostafina (de *Staphylococcus staphylolyticus*), moxalactam, nafcilina, nikomicina, nikomicina Z (de *Streptomyces tendae*), *N*-óxido de 2-mercaptopiridina, 4-bromocalcimicina, alameticina, anfotericina B, calcimicina (A23187), diacetato de clorhexidina, clotrimazol, colistina, econazol, hidrocortisona-21-acetato (VETRANAL®), filipina, gliotoxina (de *Gliocladium fimbriatum*), gramicidinas A, B, C y D, y paracelsina (de *Trichoderma reesei*). Restos antibióticos adecuados también se describen, por ejemplo, por Fisher y col. (2005 Chem. Rev. 105:395-424), Kahne y col. (2005 Chem. Rev. 105:425-448), Walker y col. (2005 Chem. Rev. 105:449-476), Chatterjee y col. (2005 Chem. Rev. 105:633-684) y Bagley y col. (2005 Chem. Rev. 105:685-714). Ejemplos de restos antibióticos que pueden usarse según ciertas realizaciones de la invención desvelada en el presente documento, restos antibióticos que pueden alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana, incluyen, pero no se limitan a, aquellos mostrados en la FIGURA 8.

[0114] Por consiguiente, y sin desear ceñirse a la teoría, el resto antibiótico (P) preferido en las composiciones antibióticas desveladas en el presente documento que tienen la estructura general T-L-P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana como se describe en el presente documento. Sin embargo, algunas realizaciones de la invención de la composición antibiótica T-L-P pueden no limitarse a ésta y, por tanto, pueden incluir conjugados de T-L-P que ejercen sus efectos intracelularmente en una célula bacteriana, incluso cuando se sabe que el resto antibiótico (P) puede alterar una actividad de una membrana bacteriana o pared celular bacteriana.

C. Restos de enlazantes de las composiciones antibióticas de la invención

[0115] Los restos de enlazantes de las composiciones antibióticas de la invención unen los restos antibióticos con los restos directores. Los restos de enlazantes pueden ser un enlace covalente directo entre un grupo funcional sobre el resto antibiótico y un grupo funcional sobre el resto director (tal como un enlace covalente amida entre un grupo carboxilo sobre el resto antibiótico y un grupo amino sobre el resto director). Ejemplos de tales enlaces covalentes directos incluyen enlaces amida, éster, éter, tioéter, fosforodiéster, tiofosforodiéster, carbonato, carbamato, hidrazona, oxima o amino. Se entiende que puede que tengan que usarse grupos protectores en grupos funcionales en tanto el resto director como el resto antibiótico con el fin de preparar el enlace directo deseado entre los dos restos. El uso de grupos protectores se describe en detalle en Green, T.W. y P.G.M. Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis (1999), 3ª ed., Wiley. Alternativamente, un control acertado del pH de reacción puede proporcionar selectividad por el enlace directo deseado.

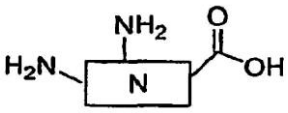
[0116] El resto antibiótico y el resto director también pueden unirse covalentemente entre sí mediante una molécula de enlazante para formar las composiciones antibióticas de la invención. La molécula de enlazante se deriva de una molécula parental correspondiente que contiene preferentemente al menos dos grupos funcionales tales como un grupo carboxilo, hidroxilo, aldehído o amino, cada uno de los cuales puede usarse para formar un enlace covalente con el grupo funcional apropiado en el resto antibiótico y con el grupo funcional apropiado en el resto director para formar la molécula de enlazante. Los grupos funcionales en la molécula parental pueden ser iguales o diferentes. Se entiende que puede que tengan que usarse grupos protectores en los grupos funcionales en la molécula parental, el resto antibiótico y el resto director con el fin de preparar el enlace deseado del resto antibiótico para la molécula director mediante una molécula de enlazante.

[0117] Preferentemente, la molécula de enlazante está covalentemente unida a T y P y comprende a) una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y b) dos o más grupos funcionales seleccionados del grupo que está constituido por -O-, -S-, -C(O)-, -N(R^4)-, -C(O)N(R^4)-, -C(O)O-, -C(O)S- y -OC(O)N(R^4)- en las que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

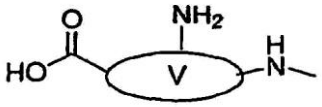
[0118] Más preferentemente, la molécula de enlazante se selecciona del grupo que está constituido por -N(R^4)-R^2-N(R^4)-, -C(O)N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)O-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)S-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)N(R^4)-R^2-N(R^4), -C(O)O-R^2-N(R^4), -C(O)S-R^2-N(R^4), -N(R^4)C(O)-R^2-C(O)N(R^4)- y -N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4)-; en las que cada R^2 es independientemente una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y en las que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

[0119] Incluso más preferentemente, la molécula de enlazante es -N(R^4)-R^2-N(R^4)- en la que cada R^4 es hidrógeno y R^2 es hexileno.

[0120] Los siguientes diagramas, que no son limitantes para el alcance de la invención, ilustran diversas soluciones que un experto en la materia puede perseguir en la preparación de las composiciones antibióticas de la invención en las que el resto antibiótico está unido covalentemente a la molécula director mediante tanto un enlace directo como mediante una molécula de enlazante. En los siguientes diagramas, el resto director se muestra como un esquema del fragmento del polipéptido nisina [1-12] de la invención:



en el que uno de los grupos amino (-NH_2) representa el extremo N del fragmento y el otro grupo amino representa el amino libre sobre el aminoácido lisina en el fragmento y el grupo carboxilo (-C(O)OH) representa el extremo C del fragmento. El resto antibiótico se muestra en los siguientes diagramas como un esquema de vancomicina:

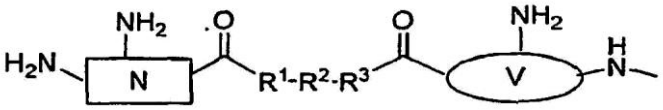


en la que el grupo carboxilo representa el extremo C de la vancomicina, el grupo amino representa la amina de azúcar de vancosamina y el grupo metilamino (-N(CH_3)-) representa el extremo N de la vancomicina. Se entiende que otros restos directores, como se exponen en el presente documento, y otros restos antibióticos, como se exponen en el presente documento, pueden usarse en un modo similar como se muestra más adelante para preparar las composiciones antibióticas de la invención. También se entiende que la preparación de composiciones antibióticas de la invención en las que un resto director se liga directamente a una entidad de antibiótico mediante un enlace covalente dependerá del tipo de grupo funcional presente en el resto director y en el resto antibiótico, el uso acertado de grupos protectores en los grupos funcionales y las condiciones de acoplamiento y los reactivos requeridos para perfeccionar el enlace, que puede ser fácilmente determinado por un experto en la materia mediante referencia a tratados químicos conocidos (véase, por ejemplo, March, J., Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure (1992), 4ª ed., Wiley, y John Wiley & Sons (1992), y Green, T.W. y P.G.M. Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis (1999), 3ª ed., Wiley).

[0121] En una solución, el extremo C del resto director puede unirse al extremo C del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante de fórmula:

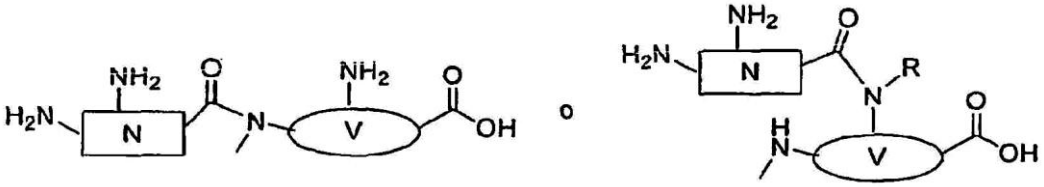
$$H\text{-}R^1\text{-}R^2\text{-}R^3\text{-}H$$

en la que R^1 y R^3 son cada uno independientemente -N(R^4)-, -O- o -S-; cada R^4, si está presente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; y R^2 es cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno para formar la siguiente composición antibiótica de la invención en la que R^1, R^2 y R^3 son como se definen anteriormente:



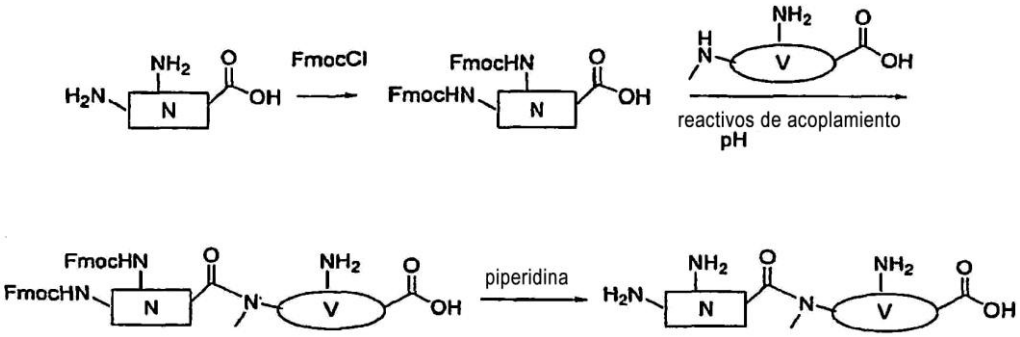
Preferentemente, la molécula de enlazante es un diaminoalcano de 2 a 10 carbonos de longitud tal como 1,6-diaminohexano. Esta solución se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos más adelante.

[0122] En otra solución, el extremo C del resto director puede unirse directamente al extremo N del resto antibiótico mediante un enlace amida para preparar las composiciones antibióticas de la invención como se muestra en el siguiente diagrama en el que R es hidrógeno o alquilo:

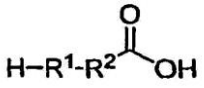


La selectividad de formación del enlace amida puede lograrse ajustando del pH de reacción y el uso acertado de grupos protectores en los grupos funcionales.

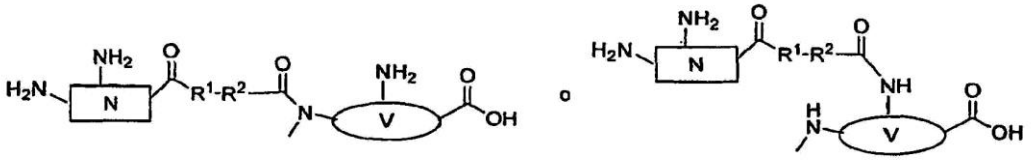
[0123] La formación de este enlace amida directo se ejemplifica en el siguiente diagrama en el que Fmoc es 9-fluorenilmetoxicarbonilo:



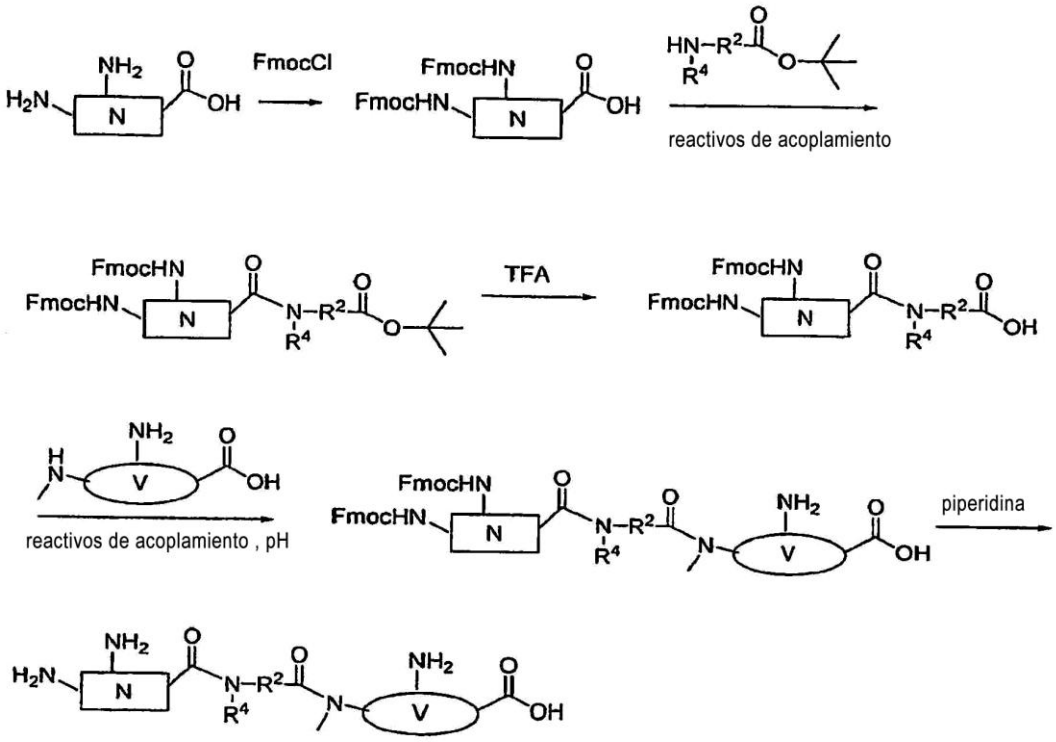
[0124] En otra solución, el extremo C del resto director puede unirse directamente al extremo N del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante de fórmula:



en la que R^1 es -N(R^4)-, -O- o -S-; R^4, si está presente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; y R^2 es cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno, o arileno para formar las siguientes composiciones antibióticas de la invención en las que cada R^1 y R^2 son como se definen anteriormente:



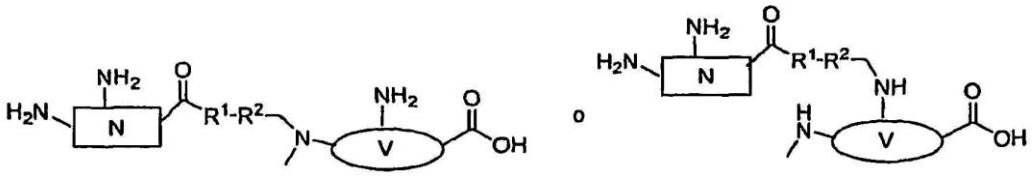
[0125] Las anteriores composiciones antibióticas en las que R^1 es -N(R^4)- pueden prepararse mediante amidación directa como se ejemplifica en el siguiente diagrama en el que R^1 y R^4 son como se definen anteriormente, TFA es ácido trifluoroacético y Fmoc es 9-fluorenilmetoxicarbonilo:



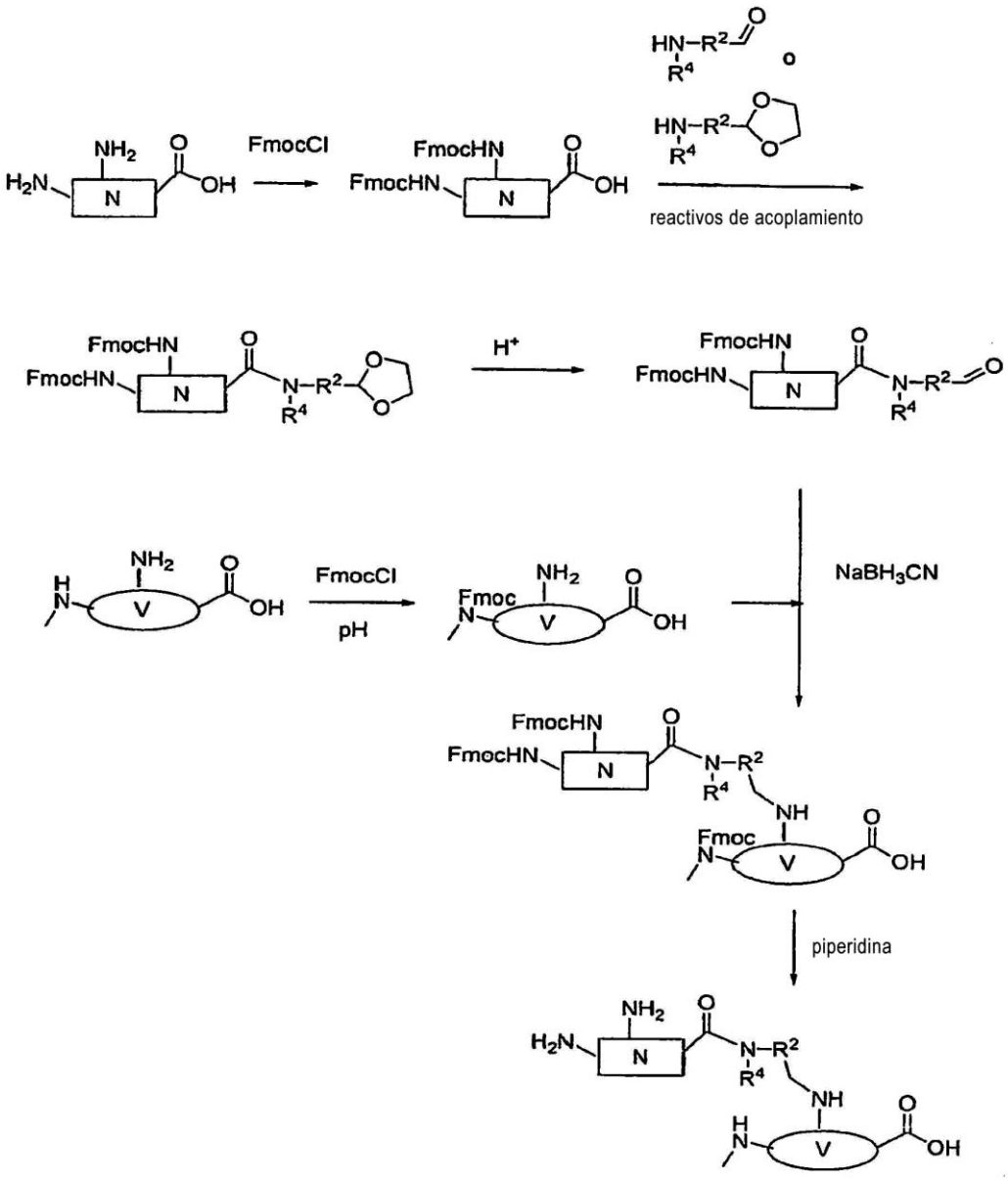
Se entiende que composiciones antibióticas correspondientes en las que -N(R^4)- se reemplaza por -O- o -S- pueden prepararse en un modo similar mediante procedimientos conocidos para un experto en la materia.

[0126] En otra solución, el extremo C del resto director puede unirse directamente al extremo N del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante de fórmula:

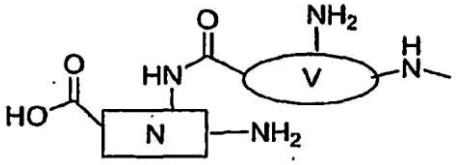
en la que R^1 es -N(R^4)-, -O- o -S-; R^4, si está presente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; y R^2 es cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno, o arileno, para formar las siguientes composiciones antibióticas de la invención en las que cada R^1 y R^2 son como se definen anteriormente:



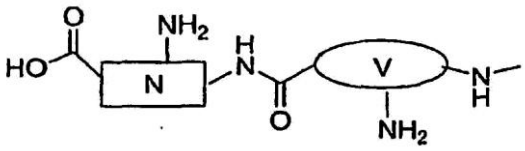
Las anteriores composiciones antibióticas de la invención en las que R^1 es -N(R^4)- pueden prepararse mediante aminación reductora como se ejemplifica en el siguiente diagrama en el que R^1 y R^4 son como se definen anteriormente, TFA es ácido trifluoroacético y Fmoc es 9-fluorenilmetoxicarbonilo (para fines de comodidad, en el siguiente diagrama sólo se muestra la preparación de sólo una de las anteriores composiciones antibióticas; se entiende que la otra composición antibiótica puede prepararse similarmente usando procedimientos conocidos para un experto en la materia):



[0127] En otra solución, el extremo N del resto director puede unirse directamente al extremo C del resto antibiótico mediante un enlace amida que produce una mezcla de composiciones antibióticas de la invención como se muestra a continuación en el siguiente diagrama:

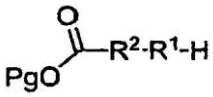


o

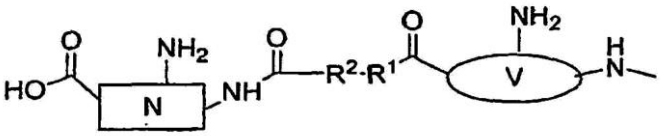


[0128] Esta solución se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos más adelante.

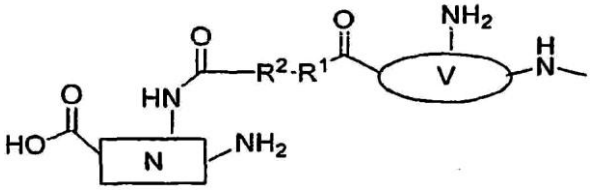
[0129] En otra solución, el extremo N del resto director puede unirse al extremo C del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante de fórmula:



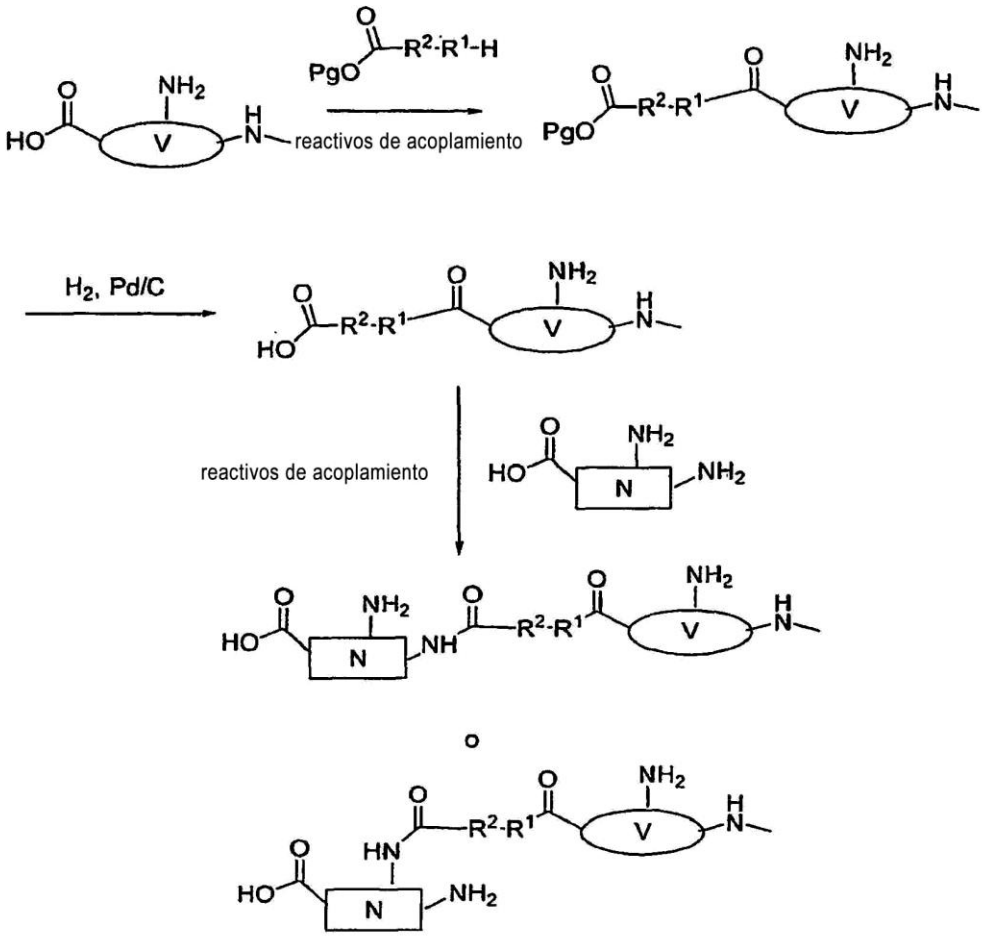
en la que Pg es un grupo protector de hidroxi, R^1 es -N(R^4)-, -O- o -S-; R^4, si está presente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; y R^2 es cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno, para formar las siguientes composiciones antibióticas de la invención en las que cada R^1, R^2 y R^4 son como se definen anteriormente:



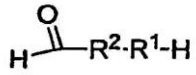
o



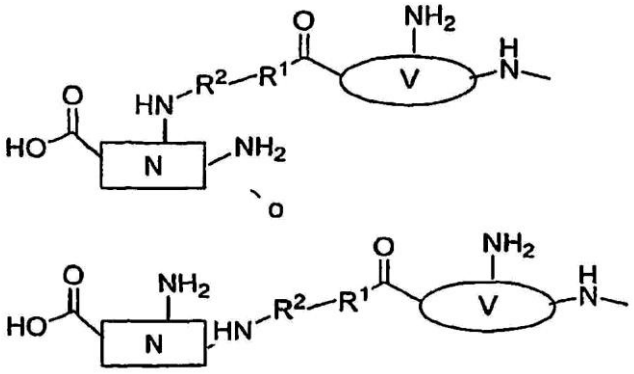
[0130] Las anteriores composiciones antibióticas pueden prepararse mediante amidación (o esterificación, dependiendo de lo que sea R^1) como se muestra a continuación en el siguiente diagrama en el que R^1 y R^2 son como se definen anteriormente y Pg es un grupo protector de oxígeno tal como bencilo:



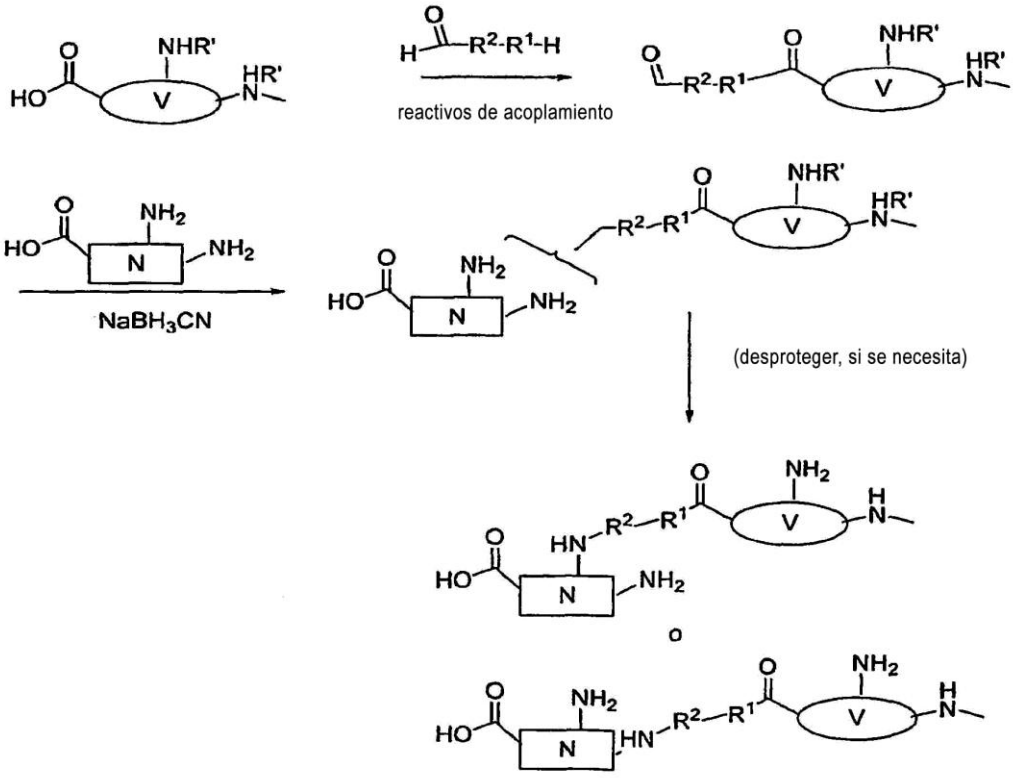
[0131] En otra solución, el extremo N del resto director puede unirse al extremo C del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante de fórmula:



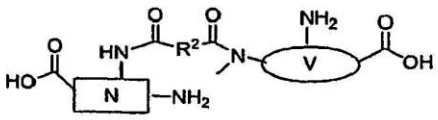
en la que R^1 es -N(R^4)-, -O- o -S-; R^4, si está presente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; y R^2 es cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno, o arileno, para formar las siguientes composiciones antibióticas de la invención en las que cada R^1 y R^2 son como se definen anteriormente:

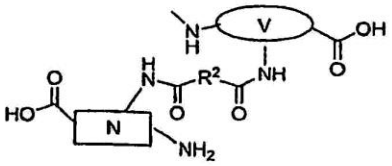


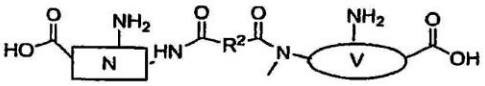
[0132] Las anteriores composiciones antibióticas pueden prepararse mediante amidación (o esterificación dependiendo de lo que sea R^1) seguida de aminación reductora como se ejemplifica en el siguiente diagrama en el que R^1 y R^2 son como se definen anteriormente y R' es hidrógeno o un grupo protector de nitrógeno tal como Fmoc:

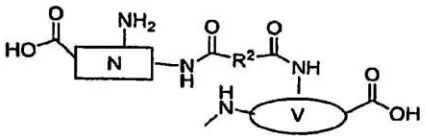


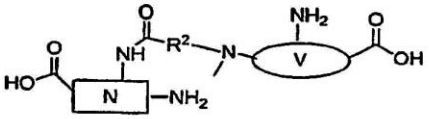
[0133] En otra solución, el extremo N del resto director puede unirse al extremo N del resto antibiótico mediante una molécula de enlazante como se ejemplifica a continuación en las siguientes composiciones antibióticas de la invención en las que cada R^2 es independientemente una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno:

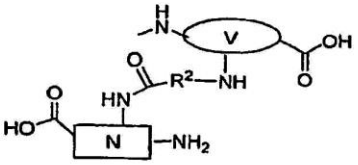


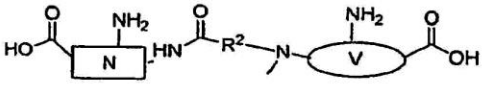


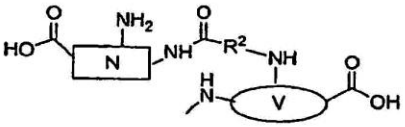


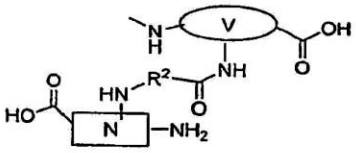


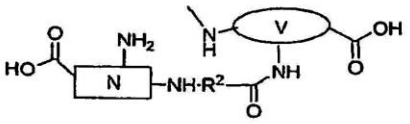


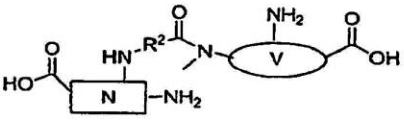


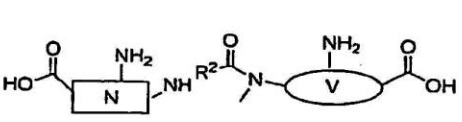


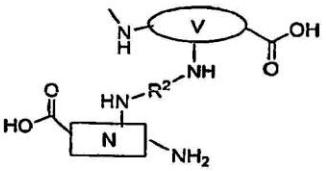


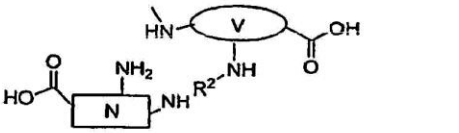


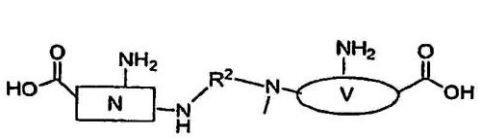


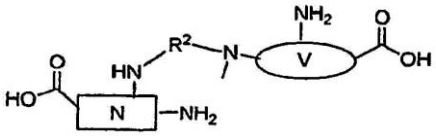








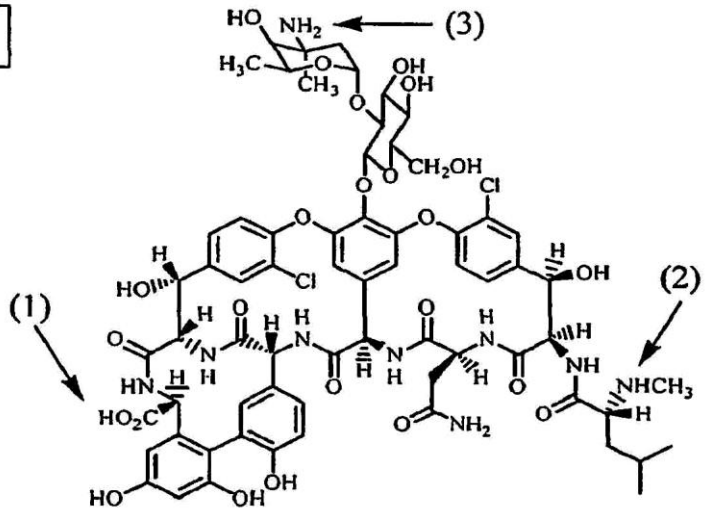




[0134] Se entiende que otras composiciones antibióticas de la invención no ejemplificadas anteriormente pueden prepararse mediante procedimientos similares conocidos para un experto en la materia.

[0135] En una realización preferida de la invención, el resto director es el polipéptido de nisina [1-12], que carece casi completamente de actividad antibacteriana, y el resto antibiótico es vancomicina. El enlace del fragmento del polipéptido nisina [1-12] a vancomicina puede llevarse a cabo mediante tres puntos de derivatización en cada componente (en el extremo N (2), el extremo C (1) y la amina de azúcar de vancosamina (3) en vancomicina [véase la Figura A a continuación] y en el extremo N, el extremo C y N-épsilon-amina de lisina en nisina). En una realización más preferida de la invención, este enlace se lleva a cabo mediante los extremos C de ambos componentes y el resto de enlazante es un grupo diaminoalquilo asimétrico.

Figura A

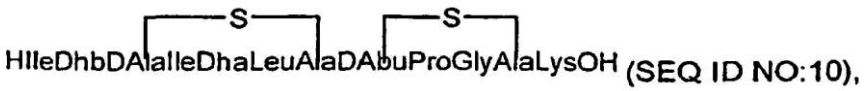


[0136] Por tanto, en una realización preferida de la invención, una composición antibiótica de la invención comprende la siguiente estructura:

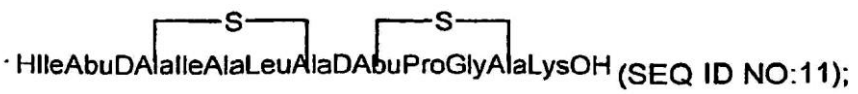
T-L-P

en la que:

T es un resto director seleccionado de uno de los siguientes fragmentos del polipéptido nisina [1-12]:



o



L es -N(R^4)-R^2-N(R^4)- en la que cada R^4 es hidrógeno y R^2 es hexileno;

y P es vancomicina o un derivado de vancomicina como se ha descrito anteriormente;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Composiciones farmacéuticas de la invención y administración

[0137] La administración de las composiciones antibióticas de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que sirven para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse combinando una composición antibiótica de la invención con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Las vías típicas de administración de tales composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan de manera que permitan que los principios activos contenidos en ellas estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual, y un recipiente de un compuesto de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Los procedimientos reales de preparación de tales formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes para aquellos expertos en esta materia; por ejemplo, véase The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que va a administrarse contendrá en todo caso una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés según las enseñanzas de la presente invención.

[0138] Una composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un sólido o líquido. En un aspecto, el (los) vehículo(s) es (son) particulado(s), de manera que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o de polvo. El (Los) vehículo(s) puede(n) ser líquido(s), siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral, líquido inyectable o un aerosol que es útil en, por ejemplo, administración inhalatoria.

[0139] Si se prevé para administración por vía oral, la composición farmacéutica está preferentemente en forma tanto sólida como líquida, estando las formas semisólidas, semilíquidas, de suspensión y de gel incluidas dentro de las formas consideradas en el presente documento tanto sólidas como líquidas.

[0140] Como composición sólida para administración por vía oral, la composición farmacéutica puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, chicle, oblea o forma similar. Una composición sólida tal contendrá normalmente uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, uno o más de los siguientes puede estar presente: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes de disgregación tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja; y un agente colorante.

[0141] Si la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o aceite.

[0142] La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración por vía oral o para administración mediante inyección, como dos ejemplos. Si se prevé para administración por vía oral, composiciones preferidas contienen, además de los presentes compuestos, uno o más de un edulcorante, conservante, tinte/colorante y potenciador del aroma. En una composición prevista para ser administrada por inyección puede incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

[0143] Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, tanto si son disoluciones, suspensiones como otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir de disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables

o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

[0144] Una composición farmacéutica líquida de la invención prevista para tanto administración parenteral como por vía oral deberá contener una cantidad de un compuesto de la invención de forma que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos el 0,01% de una composición antibiótica de la invención en la composición. Si se prevé para administración por vía oral, esta cantidad puede variarse para que esté entre el 0,1 y aproximadamente el 70% del peso de la composición. Las composiciones farmacéuticas orales preferidas contienen entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 50% de una composición antibiótica de la invención. Las composiciones farmacéuticas preferidas y las preparaciones según la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga entre el 0,01 y el 10% en peso de la composición antibiótica antes de la dilución de la invención.

[0145] La composición farmacéutica de la invención puede preverse para administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una base de disolución, emulsión, pomada o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. Los espesantes pueden estar presentes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si se prevé para administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración de la composición antibiótica de la invención de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% peso/volumen (peso por unidad de volumen).

[0146] La composición farmacéutica de la invención puede preverse para administración rectal en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará la composición antibiótica. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

[0147] La composición farmacéutica de la invención puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una vaina de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la vaina de recubrimiento son normalmente inertes y pueden seleccionarse de, por ejemplo, azúcar, shellac y otros agentes de recubrimiento entéricos. Alternativamente, los principios activos pueden revestirse de una cápsula de gelatina.

[0148] La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al compuesto de la invención y así ayudar en la administración del compuesto. Agentes adecuados que pueden actuar en esta capacidad incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o un liposoma.

[0149] La composición farmacéutica de la invención puede estar constituida por unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se usa para denotar una variedad de sistemas que oscilan de aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que están constituidos por envases presurizados. La administración puede ser por un gas licuado o comprimido o por un sistema de bomba adecuado que dispensa los principios activos. Los aerosoles de composiciones antibióticas de la invención pueden administrarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de administrar el (los) principio(s) activo(s). La administración del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, subrecipientes y similares que juntos pueden formar un kit. Un experto en la materia puede determinar aerosoles preferidos sin experimentación adicional.

[0150] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse mediante metodología muy conocida en la ciencia farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica prevista para administrarse por inyección puede prepararse combinando una composición antibiótica de la invención con agua destilada estéril para formar una disolución. Un tensioactivo puede añadirse para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan no covalentemente con la composición antibiótica de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto en el sistema de administración acuosa.

[0151] Las composiciones antibióticas de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que variará dependiendo de una variedad de factores que incluyen la actividad de la composición antibiótica específica empleada; la estabilidad metabólica y la duración de la acción de la composición antibiótica; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que está recibiendo la terapia. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,001 mg/kg (es decir, 0,07 mg) a aproximadamente 100 mg/kg (es decir, 7,0 g); preferiblemente una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,01 mg/kg (es decir, 7 mg) a aproximadamente 50 mg/kg (es decir, 3,5 g); más preferentemente una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 1 mg/kg (es decir, 70 mg) a aproximadamente 25 mg/kg (es decir, 1,75 g).

[0152] Las composiciones antibióticas de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables también pueden administrarse simultáneamente a, antes de o después de la administración de uno o varios agentes terapéuticos. Tal terapia de combinación incluye administración de una única formulación de forma farmacéutica que contiene una composición antibiótica de la invención y uno o más agentes activos adicionales, además de administración de la composición antibiótica de la invención y cada agente activo en su propia formulación de forma farmacéutica separada. Por ejemplo, una composición antibiótica de la invención y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación oral tal como un comprimido o cápsula, o cada agente se administra en formulaciones de formas farmacéuticas orales separadas. Si se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones antibióticas de la invención y uno o más agentes activos adicionales pueden administrarse a esencialmente la misma vez, es decir, simultáneamente, o en tiempos escalonados por separado, es decir, secuencialmente; se entiende que la terapia de combinación incluye todas estas pautas.

Preparación de las composiciones antibióticas de la invención

[0153] Los siguientes ejemplos específicos se proporcionan como guía para ayudar en la práctica de la invención y no están previstos como una limitación del alcance de la invención.

[0154] En general, las composiciones antibióticas de la invención pueden prepararse mediante procedimientos que emplean etapas conocidas para aquellos expertos en la materia o análogos de esas etapas. Los procedimientos generales de síntesis pueden encontrarse en “Comprehensive Organic Transformations”, R.C. Larock, VCH Publishers, Nueva York, N.Y., 1989 y referencias citadas en su interior.

EJEMPLO 1

Síntesis de la composición antibiótica de nisina [1-12]-vancomicina mediante un enlace directo

[0155] La tripsina digiere nisina para permitir el aislamiento del fragmento de nisina que está constituido por los 12 primeros aminoácidos (fragmento del polipéptido nisina [1-12]). Este fragmento del polipéptido nisina [1-12] contiene lisina en el extremo C. El fragmento del polipéptido nisina [1-12] contiene dos grupos amino que están disponibles para reaccionar con vancomicina usando condiciones de formación de amida para dar hasta dos composiciones antibióticas diferentes de la invención. La elección acertada de grupos protectores de nitrógeno permitirá la preparación específica de cada una de las composiciones antibióticas.

[0156] En particular, se disolvieron el fragmento del polipéptido nisina [1-12] (8,1 mg, 0,007 mmol) y clorhidrato de vancomicina (10,4 mg, 0,007 mmol) en una mezcla de DMF/DMSO (1 ml/0,5 ml) a temperatura ambiente. Se añadieron HOBt (~1 mg) y EDC (6,7 mg, 0,035 mmol), seguido de DIEA (6,1 µl, 0,035 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y luego se trató con pequeñas cantidades de agua. La mezcla bruta se separó por HPLC preparativa (Procedimiento A) y los productos se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento: 1,0 mg (6%, espuma blanca); EM: 2564,3 $[M-16+H]^+$, 1282,7 $[M-16+2H]^{2+}$, 855,8 $[M-16+3H]^{3+}$.

EJEMPLO 2

Síntesis de la composición antibiótica de nisina [1-12]-vancomicina mediante una molécula de enlazante.

[0157] El resto director, el fragmento del polipéptido nisina [1-12], puede conjugarse con un resto antibiótico tal como vancomicina mediante una molécula de enlazante. Un procedimiento usa un compuesto de diamino tal como 1,6-diaminohexano al que se unen tanto el fragmento del polipéptido nisina [1-12] como la vancomicina mediante acoplamientos de amida. La síntesis de nisina[1-12]-1,6-diaminohexano-vancomicina es un ejemplo representativo de esta solución.

[0158] En general, los dos grupos amino del fragmento del polipéptido nisina [1-12] se protegen primero con grupos Fmoc. El fragmento del polipéptido nisina [1-12] protegido se trata luego con la molécula de enlazante mono-tritil-1-6-diaminohexano. Como resultado, la lisina del extremo C del fragmento del polipéptido nisina [1-12] se somete a una formación de amida haciendo reaccionar su grupo carboxilo con mono-tritil-1,6-diaminohexano. Entonces, el grupo tritilo se elimina de la molécula de enlazante y su amina libre se acopla luego al grupo carboxilo de la vancomicina. La eliminación de los grupos Fmoc en el conjugado resultante proporciona un conjugado de nisina [1-12]-vancomicina, una composición antibiótica de la invención.

A. Síntesis del fragmento del polipéptido nisina [1-12] protegido con Fmoc

[0159] A una disolución con agitación del fragmento del polipéptido nisina [1-12] (34,5 mg, 0,03 mmol) en DMF (2 ml) a temperatura ambiente se añadió FmocCl (21,7 mg, 0,084 mmol) seguido de DIEA (26 µl, 0,15 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y luego el producto bruto se purificó por HPLC preparativa (Procedimiento B). Rendimiento: 10,4 mg (22%, cristal amarillento). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ: señales de Fmoc: 7,8 (4H, d), 7,7 (4H, m), 7,3 (8H, m).

B. Acoplamiento del fragmento del polipéptido nisina [1-12] protegido con Fmoc con mono-tritil-1,6-diaminohexano (molécula de enlazante de C_6)

[0160] A una disolución con agitación del fragmento del polipéptido nisina [1-12] protegido con Fmoc (18,6 mg, 0,012 mmol) y mono-tritil-1,6-diaminohexano (10,5 mg, 0,029 mmol) en DMF (3 ml) a temperatura ambiente se añadieron HOBt (4 mg, 0,029 mmol) y EDC (22,4 mg, 0,12 mmol). La mezcla se agitó durante 66 horas y el producto bruto se purificó luego por HPLC preparativa (Procedimiento B). Rendimiento: 10 mg (44%). La RMN ^{1}H mostró tanto señales de Fmoc como de tritilo entre 7,8 y 7,2 ppm.

C. Escisión del grupo protector de tritilo de la molécula de enlazante de C_6

[0161] El producto del párrafo B anterior (10 mg + 3,4 mg de otro lote) se trató con una mezcla de TFA/agua/triisopropilsilano (TIPS) (9:0,5:0,5, 2 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron mediante evaporación rotatoria y el residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar nisina [1-12] protegida con Fmoc-diaminohexano. Rendimiento: 4,7 mg (40%). La RMN ^{1}H mostró la desaparición de las señales de tritilo.

D. Acoplamiento de nisina [1-12] protegida con Fmoc-diaminohexano con vancomicina

[0162] El producto del párrafo C anterior (4,7 mg, 0,028 mmol) se disolvió en DMF/DMSO (1 ml/0,5 ml) y a la disolución resultante se añadieron clorhidrato de vancomicina (7,2 mg, 0,0048 mmol), HOBt (1 mg), EDC (3,1 mg, 0,016 mmol) y DIEA (1,1 µl, 0,0063 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 día y se añadieron vancomicina (3,6 mg, 0,0024 mmol), EDC (3,1 mg, 0,016 mmol) adicionales. La reacción continuó durante otro día y luego se trató con pequeñas cantidades de agua. La mezcla bruta se purificó por HPLC preparativa para proporcionar nisina [1-12] protegida con Fmoc-diaminohexano-vancomicina: Rendimiento: 5,4 mg (62%). La RMN ^{1}H mostró tanto señales de Fmoc-nisina (1-12) como de vancomicina.

E. Escisión de grupos protectores de Fmoc

[0163] El producto del párrafo anterior (5,4 mg, 0,0017 mmol) se trató con piperidina al 20% en DMF (1 ml) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron cuidadosamente HOAc (~0,2 ml) y pequeñas cantidades de agua mientras se agitaba. La mezcla bruta se purificó por HPLC preparativa (Procedimiento D). Rendimiento: 1,1 mg (24%). La RMN ^{1}H mostró tanto señales de nisina (1-12) como de vancomicina. EM: 1340,4 $[M+2H]^{2+}$.

EJEMPLO 3

Purificación de nisina

[0164] La nisina comercial (Nutrition 21 Inc., NY, EE.UU., lote nº 84FC) contenía aproximadamente 80% de nisina en peso. Las sales de impureza se eliminaron por HPLC preparativa.

[0165] Se disolvió nisina comercial (518 mg) en 27% (v/v) de ACN/agua con 0,1% (v/v) de TFA (10 ml) y se purificó por HPLC preparativa (detección a 254 nm, SunFire Prep C18 OBD 5 µm 30 x 100 mm) preparando cinco inyecciones. El producto se recogió de 4,3 a 5,8 minutos, se concentró mediante evaporación rotatoria y se liofilizó. Rendimiento: 470 mg (sólido blanco esponjoso). La concentración inhibitoria mínima de nisina fue 0,3-0,6 µg/ml frente a MRSA y 5-10 µg/ml frente a VRE.

Procedimiento de HPLC

[0166]

Disolvente A = 0,1% (v/v) de TFA en agua

Disolvente B = 0,1% (v/v) de TFA en ACN/agua 9:1

Los cambios de gradiente son lineales con respecto a los tiempos indicados.

Velocidad de flujo: 40 ml/min

Perfil: 30% de B durante 3 min, 30 al 50% de B durante 1 min, 50% de B durante 3 min, 50 al 30% de B durante 1 min, 30% de B durante 4 min.

EJEMPLO 4

Preparación y purificación del fragmento del polipéptido nisina [1-12]

A. Preparación del tampón de digestión

[0167] Se disolvieron acetato sódico (1,41 g), base Trizma (402 mg) y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (407 mg) en agua (550 ml) y la disolución se ajustó a pH 7,0 con HCl acuoso y NaOH acuoso para dar tampón de digestión (acetato sódico 25 mM, Tris-acetato 6 mM, $CaCl_2$ 5 mM).

B. Preparación de la disolución de tripsina (LNB CH104-86)

[0168] Se disolvió tripsina (125 mg) en tampón de digestión (25 ml) para dar la disolución de tripsina (5 mg/ml).

C. Digestión tríptica de nisina para dar el fragmento del polipéptido nisina [1-12]

[0169] Se emplearon dos procedimientos para la digestión tríptica de nisina.

1. Procedimiento A

[0170] Se disolvió nisina (625 mg, ~80% en peso de nisina, ~150 µmol, 1 eq) en tampón de digestión (500 ml), luego se añadió NaOH acuoso 0,5 M (1,19 ml, 596 µmol, 4 eq) para dar pH 7. Se añadió disolución de tripsina (10 ml, 50 mg, 10% en peso) y la mezcla se incubó a 30ºC durante 6 días. Se añadió tripsina adicional (5 ml cada día, 25 mg, 5% en peso) a 1, 2 y 3 días.

[0171] La mezcla se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 60 ml de volumen. La adición de ácido trifluoroacético (TFA) (1 ml) dio pH 4 y ayudó a disolver algo del precipitado. El producto se purificó por HPLC preparativa (detección a 215 nm, Phenomenex Jupiter 10 µm C18 300Å, 250 x 21,20 mm). La mezcla de reacción (1,7 ml) se diluyó hasta 3,0 ml con agua, se filtró (nailon de 0,45 µm, filtro de jeringuilla de 25 mm), luego se inyectó. El producto se recogió de aproximadamente 16,25 a 17,5 minutos, se concentró y se liofilizó. La HPLC analítica (Procedimiento 1 de APT, detección a 210 nm, Waters XTerra RP18 3,5 µm 4,6 x 150 mm) indicó el 98% de pureza. Rendimiento: 158 mg (sólido blanco). EM: 1150,8 $[M+H]^+$, 575,9 $[M+2H]^{2+}$.

2. Procedimiento B

[0172] Se disolvió nisina (625 mg, ~80% en peso de nisina, ~150 µmol, 1 eq) en tampón de digestión en el que no se había ajustado el pH (100 ml). Se añadió disolución de tripsina (10 ml, 50 mg, 10% en peso) y la mezcla se ajustó a pH 7,0 con $HCl_{(ac)}$, luego se incubó a 30ºC durante 7 días. Se añadió tripsina adicional (5 ml cada día, 25 mg, 5% en peso) a 1, 2 y 3 días.

[0173] La adición de TFA (1 ml) dio pH 1 y ayudó a disolver algo del precipitado. El producto se purificó por HPLC preparativa (detección a 215 nm, Phenomenex Jupiter 10 µm C18 3001Å, 250 x 21,20 mm) cargando 4 ml de mezcla de reacción por inyección. El fragmento del polipéptido nisina [1-12] se recogió de aproximadamente 16,25 a 17,25 minutos, se concentró y se liofilizó. La HPLC analítica (detección a 215 nm, Waters XTerra MS C18 3,5 µm 4,6 x 150 mm) indicó el 99% de pureza. Rendimiento: 186 mg (sólido blanco). EM: 1150,8 $[M+H]^+$, 576,1 $[M+2H]^{2+}$. El fragmento del polipéptido nisina [1-12] no inhibió ni MRSA ni VRE a hasta 10 ó 40 µg/ml, respectivamente.

EJEMPLO 5

Ensayo de actividad antimicrobiana

[0174] Se probaron composiciones antibióticas de la invención para la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC nº33591 y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE) ATCC nº 51575. Los cultivos de patógenos se cultivaron en caldo de soja tríptica (TSB) con 5 g/l de NaCl (TSB+) durante la noche (~18 h) a 37ºC. Los cultivos se sacaron de la estufa de incubación y se refrigeraron al menos 3 horas para detener adicionalmente el crecimiento del cultivo. Se determinaron relaciones de alícuotas de cultivo con respecto a caldo para obtener aproximadamente $2{,}5x10^5$ UFC/ml para las que se midieron recuentos precisos mediante dilución seriada en placas de agar de soja tríptica con 5 g/l de NaCl (TSA+). Las series de diluciones dobles de 0,005-10 y 0,005-40 µg/ml se prepararon para MRSA y VRE, respectivamente. Todos los componentes, excepto el azul de tiazolilo-bromuro de tetrazolio (MTT), se añadieron a los pocillos antes de una incubación inicial durante la noche a 37ºC. El MTT se añadió a cada pocillo, 29 µl ó 37 µl para placas de MRSA o VRE, respectivamente, seguido de 1 hora de incubación a 37ºC. La vancomicina y/o Zyvoxam se incluyeron como compuestos de referencia con vancomicina preparada de la misma forma que los compuestos de prueba. Zyvoxam se suministró como una disolución de 2 mg/ml. Los criterios de valoración de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se leyeron como la concentración más baja que no mostró crecimiento visible.

[0175] La concentración inhibitoria mínima de Zyvoxam cuando se probó en este ensayo fue 0,3 µg/ml contra MRSA y 1,2 µg/ml contra VRE. La concentración inhibitoria mínima de vancomicina cuando se probó en este ensayo fue 1,2 µg/ml contra MRSA y 500 µg/ml contra VRE.

[0176] La concentración inhibitoria mínima de la composición antibiótica de nisina [1-12]-vancomicina preparada en el Ejemplo 1 cuando se probó en este ensayo fue 5,0 µg/ml contra MRSA y 40 µg/ml contra VRE.

[0177] La concentración inhibitoria mínima del conjugado de nisina (1-12)-1,6-diaminohexano-vancomicina preparado en el Ejemplo 2 cuando se probó en este ensayo fue 0,04 µg/ml contra MRSA y 20 µg/ml contra VRE.

[0178] Aunque la anterior invención se ha descrito con cierto detalle para facilitar el entendimiento, será evidente que ciertos cambios y modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, las realizaciones descritas deben considerarse como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no va a limitarse a los detalles facilitados en el presente documento, sino que puede modificarse dentro del alcance y los equivalentes de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0179]

<110> Inflazyme Pharmaceuticals Ltd.

Coleman, John

Han, Kang

<120> NOVEDOSAS COMPOSICIONES ANTIBIÓTICAS

<130> 480117.419PC

<140> PCT

<141> 09-03-2007

<160> 24

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa = F, I, V o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2

<223> Xaa = A, K, ácido alfa-aminobutírico o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> Xaa = E, I, K o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5

<223> Xaa = F, A o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 6

<223> Xaa = I, F o L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = ácido alfa-aminobutírico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = A, K o V

<400> 1

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Xaa
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa = F, I, V o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2

<223> Xaa = A, K, ácido alfa-aminobutírico o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> Xaa = E, I, K o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5

<223> Xaa = F, A o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 6

<223> Xaa = I, F o L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = ácido alfa-aminobutírico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = A, G, I, L, M, P o V

<400> 2

```
Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Ala Xaa
 1               5                  10
```

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa = F, I, V o W

<220>

<221> MOID_RES

<222> 2

<223> Xaa = A, K, ácido alfa-aminobutírico o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> Xaa = E, I, K o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5

<223> Xaa = F, A o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 6

<223> Xaa = I, F o L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = ácido alfa-aminobutírico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = A, G, I, L, M, P o V

<400> 3

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Lys Xaa
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa = F, I, V o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2

<223> Xaa = A, K, ácido alfa-aminobutírico o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> Xaa = E, I, K o W

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5

<223> Xaa = F, A o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> 6

<223> Xaa = I, F o L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = ácido alfa-aminobutírico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = A, G, I, L, M, P o V

<400> 4

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Val Xaa
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = I, L, F, V, A o G

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = G, A, V, L, I, F, ácido alfa-aminobutírico o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = I, L, F, V, A o G

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = A, G, V, L, I, F o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = L, I, F, V, A o G

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = K, G, A, V, N, Q, R, H

<400> 5

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Xaa
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido natural o no natural

<400> 6

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Pro Gly Ala Xaa
1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = A, K, Abu o deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = F, A o deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Abu

<400> 7

Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Ácido D-gamma-glutámico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)...(4)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> D-Alanina

<400> 8

Ala Glu Lys Ala Ala
1 5

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)...(13)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)...(23)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)...(25)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)...(33)

<223> Xaa = deshidroalanina

<400> 9

```
Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys Xaa Gly Ala Leu
 1               5                  10                  15
Met Gly Ala Asn Met Lys Xaa Ala Xaa Ala His Ala Ser Ile His Val
            20                  25                  30
Xaa Lys
```

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = deshidroalanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = D-Abu

<400> 10

Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = D-Abu

<400> 11

Ile Xaa Ala Ile Ala Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys
1 5 10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Dpr

<400> 12

Ala Ile Xaa Leu Ala
1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = deshidroalanina

<400> 13

Ala Ile Xaa Leu Ala
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = deshidroalanina

<400> 14

Ile Thr Ala Ile Xaa Leu Ala
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = deshidrobutirina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> D-Alanina

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = deshidroalanina

<400> 15

Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala
1 5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Dpr con modificación de carbobenciloxi en la cadena lateral

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)...(4)

<223> Modificación de acetamidometilo en la cadena lateral

<400> 16

Ile Xaa Leu Cys
1

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Cisteína con modificación de tritilo en la cadena lateral

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Dpr con modificación de carbobenciloxi en la cadena lateral

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = modificación de acetamidometilo en la cadena lateral

<400> 17

Cys Ile Xaa Leu Cys
1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Cisteína con modificación de tritilo en la cadena lateral

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)...(4)

<223> Modificación de acetamidometilo en la cadena lateral

<400> 18

Cys Pro Gly Cys
1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = D-Abu

<400> 19

Xaa Pro Gly Ala
1

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = D-Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> con modificación de carbobenciloxi en la cadena lateral

<400> 20

Xaa Pro Gly Ala Lys
1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Alanina

<400> 21

Ala Ile Ala Leu Ala
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Abu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)...(3)

<223> D-Alanina

<400> 22

Ile Xaa Ala Ile Ala Leu Ala
1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)...(0)

<223> Modificación de acetamidometilo en la cadena lateral

<400> 23

Ile Ala Leu Cys
1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> D-Cisteína con modificación de tritilo en la cadena lateral

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> Modificación de acetamidometilo en la cadena lateral

<400> 24

Cys Ile Ala Leu Cys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición antibiótica comprendida por la siguiente estructura:

T-L-P

en la que:

(a) T es un resto director que comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en el que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A,X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:6)

en la que

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico, y en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina;

X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 y X_6 se seleccionan cada uno independientemente de cualquier aminoácido natural o no natural,

y en la que T es capaz de interacciones de unión con un pirofosfato del precursor de la pared celular bacteriana el Lípido II en el que dicho Lípido II comprende undecaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc;

(b) L es un resto de enlazante seleccionado del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

(c) P es un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

2. Una composición antibiótica según la reivindicación 1, en la que T comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en la que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO. 1-4)

en la que

X_1 se selecciona de F, I, V y W,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 se selecciona de E, I, K y W,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 se selecciona de I, F y L,

X_6 se selecciona de A, K, V, AX_7, KX_7 y VX_7 en las que X_7 se selecciona de A, G, I, L, M, P y V; y,

en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina.

3. Una composición antibiótica según la reivindicación 1, en la que T comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en la que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:5)

en la que

X_1 se selecciona de I, L, F, V, A y G,

X_2 se selecciona de G, A, V, L, I, F, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 se selecciona de I, L, F, V, A y G,

X_4 se selecciona de A, G, V, L, I, F y deshidroalanina,

X_5 se selecciona de L, I, F, V, A, G,

X_6 se selecciona de K, G, A, V, N, Q, R, H; y,

en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina.

4. Una composición antibiótica según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que T comprende un fragmento de péptido del extremo N de un lantibiótico en la que el fragmento de péptido comprende la siguiente fórmula:

$X_1X_2A_1X_3X_4X_5A_2A_3PGA_4X_6$ (SEQ ID NO:7)

en la que

X_1 es I,

X_2 se selecciona de A, K, ácido α-aminobutírico y deshidrobutirina,

A_1, A_2 y A_4 son alanina y A_3 es ácido α-aminobutírico,

X_3 es I,

X_4 se selecciona de F, alanina y deshidroalanina,

X_5 es L,

X_6 es K; y,

en la que A_1 y A_2 forman juntos un enlace lantionina y A_3 y A_4 forman juntos un enlace β-metillantionina.

5. Una composición antibiótica según la reivindicación 4, en la que T comprende un fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tiene una estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina.

6. Una composición antibiótica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que T comprende un homólogo de polipéptido del fragmento del polipéptido nisina [1-12], teniendo dicho homólogo de polipéptido estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina y seleccionándose del grupo que está constituido por un fragmento del polipéptido subtilina [1-12], un fragmento del polipéptido epidermina, un fragmento del polipéptido epidermina (I1V 16L), un fragmento del polipéptido mutacina B-Ny266 y un fragmento del polipéptido mutacina 1140.

7. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la reivindicación 6, en la que L comprende un enlace covalente directo seleccionado del grupo que está constituido por un enlace amida, éster, éter, tioéter, fosforodiéster, tiofosforodiéster, carbonato, carbamato, hidrazona, oxima y amino.

8. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la reivindicación 6, en la que la molécula de enlazante comprende:

a) una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y

b) dos o más grupos funcionales seleccionados del grupo que está constituido por -O-, -S-, -C(O)-, -N(R^4)-, -C(O)N(R^4)-, -C(O)O-, -C(O)S- y -OC(O) N(R^4)-

en las que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

9. La composición antibiótica de la reivindicación 8, en la que la molécula de enlazante se selecciona del grupo constituido por -N(R^4)-R^2-N(R^4), -C(O)N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)O-R^2-C(O)N(R^4), -C(O) S-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)N(R^4)-R^2-N(R^4), -C(O)O-R^2-N(R^4), -C(O)S-R^2-N(R^4), -N (R^4)C(O)-R^2-C(O)N(R^4)-, y -N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4)-;

en la que cada R^2 es independientemente una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y

en la que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

10. La composición antibiótica según la reivindicación 9, en la que la molécula de enlazante es -N(R^4)-R^2-N(R^4)- en la que cada R^4 es hidrógeno y R^2 es hexileno.

11. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que P comprende vancomicina o un derivado de vancomicina.

12. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que:

T es un resto director que comprende un fragmento del polipéptido nisina [1-12] que tiene estructura de anillo de lantionina y una estructura de anillo de β-metillantionina;

L es un resto de enlazante que comprende una molécula de enlazante, en el que la molécula de enlazante forma un primer enlace amida al extremo C de T y un segundo enlace amida a un extremo C de P; y

P comprende vancomicina.

13. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que P comprende un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana.

14. La composición antibiótica de la reivindicación 13, en la que el resto antibiótico se selecciona del grupo que está constituido por vancomicina, un derivado de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina, ácido 6-aminopenicilánico, N-óxido de 2-mercaptopiridina, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, 4-bromocalcimicina, A47934, alameticina de *Trichoderma viride*, amoxicilina, anfotericina B de *Streptomyces sp*., ampicilina, calcimicina A23187, azlocilina, clorhexidina, bacitracina, clotrimazol, carbenocilina, colistina, cefaclor, econazol, cefamandol, hidrocortisona-21-acetato VETRANAL®, cefamandol nafato, complejo de filipina de *Streptomyces filipinensis*, cefazolina, gliotoxina de *Gliocladium fimbriatum*, cefmetazol, gramicidina A, cefoperazona, gramicidina C, cefotaxima, gramicidina de *Bacillus aneurinilyticus* (*Bacillus brevis*), cefalosporina C, gramicidina de *Bacillus brevis*, cefalotina, sal de calcio de lonomicina de *Streptomyces conglobatus*, cefapirina, lasalocida A, cefradina, lonomicina A, cloxacilina, monensina, cloroeremoicina, clorhidrato de N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida, D-cicloserina, narasina de *Streptomyces aureofaciens*, dicloxacilina, nigericina, D-penicilamina, nisina, econazol, nonactina, diclorhidrato de etambutol, nistatina, lisostafina de *Staphylococcus staphylolyticus*, metosulfato de fenazina, moxalactama, imaricina, meticilina, polimixina B, nafcilina, DL-penicilamina, nikomicina, praziquantel, nikomicina Z de *Streptomyces tendae*, salinomicina, nitrofurantoína, surfactina, oxacilina, valinomicina, ácido penicílico, penicilina, feneticilina, ácido fenoximetilpenicilínico, fosfomicina, ácido pipemídico, piperacilina, ramoplanina y ristomicina.

15. Una composición farmacéutica que comprende una composición antibiótica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición antibiótica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para uso en un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un mamífero.

17. Una composición antibiótica que comprende una pluralidad de composiciones antibióticas no idénticas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que las composiciones antibióticas tienen la estructura:

T-L-P

en la que:

T comprende al menos un resto director que es el mismo o diferente en dichas composiciones no idénticas y que se selecciona del grupo que está constituido por un resto director según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6;

L comprende al menos un resto de enlazante que es el mismo o diferente en dichas composiciones no idénticas y que se selecciona del grupo que está constituido por (i) un enlace covalente directo entre T y P y (ii) una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P; y

P comprende al menos un resto antibiótico que es diferente en dichas composiciones no idénticas, comprendiendo cada uno de dichos restos antibióticos un resto antibiótico que puede alterar al menos una actividad de una membrana bacteriana o una pared celular bacteriana;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

18. La composición antibiótica de la reivindicación 17, en la que el resto antibiótico se selecciona del grupo que está constituido por vancomicina, un derivado de vancomicina, teicoplanina, ramoplanina, oritavancina, dalbavancina, polimixina, bacitracina, 6 ácido 6-aminopenicilánico, N-óxido de 2-mercaptopiridina, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, 4-bromocalcimicina, A47934, alameticina de *Trichoderma viride*, amoxicilina, anfotericina B de *Streptomyces sp*., ampicilina, calcimicina A23187, azlocilina, clorhexidina, bacitracina, clotrimazol, carbenocilina, colistina, cefaclor, econazol, cefamandol, hidrocortisona-21-acetato VETRANAL®, cefamandol nafato, complejo de filipina de *Streptomyces filipinensis*, cefazolina, gliotoxina de *Gliocladium fimbriatum*, cefmetazol,

gramicidina A, cefoperazona, gramicidina C, cefotaxima, gramicidina de *Bacillus aneurinilyticus* (*Bacillus brevis*), cefalosporina C, gramicidina de Bacillus brevis, cefalotina, sal de calcio de lonomicina de *Streptomyces conglobatus*, cefapirina, lasalocida A, cefradina, lonomicina A, cloxacilina, monensina, cloroeremoicina, clorhidrato de N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida, D-cicloserina, narasina de *Streptomyces aureofaciens*, dicloxacilina, nigericina, D-penicilamina, nisina, econazol, nonactina, diclorhidrato de etambutol, nistatina, lisostafina de *Staphylococcus staphylolyticus*, metosulfato de fenazina, moxalactama, imaricina, meticilina, polimixina B, nafcilina, DL-penicilamina, nikomicina, praziquantel, nikomicina Z de *Streptomyces tendae*, salinomicina, nitrofurantoína, surfactina, oxacilina, valinomicina, ácido penicílico, penicilina, feneticilina, ácido fenoximetilpenicilínico, fosfomicina, ácido pipemídico, piperacilina, ramoplanina y ristomicina.

19. La composición antibiótica de la reivindicación 17, en la que L es un enlace covalente directo entre T y P seleccionado del grupo que está constituido por un enlace amida, éster, éter, tioéter, fosforodiéster, tiofosforodiéster, carbonato, carbamato, hidrazona, oxima y amino.

20. La composición antibiótica de la reivindicación 17, en la que L es una molécula de enlazante unida covalentemente a T y P y en la que la molécula de enlazante comprende:

a) una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y

b) dos o más grupos funcionales seleccionados del grupo que está constituido por -O-, -S-, -C(O)-, -N(R^4)-, -C(O)N(R^4)-, -C(O)O-, -C(O)S- y -OC(O) N(R^4)-

en las que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

21. La composición antibiótica de la reivindicación 20, en la que la molécula de enlazante se selecciona del grupo que está constituido por -N(R^4)-R^2-N(R^4)-, -C(O)N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)O-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)S-R^2-C(O)N(R^4), -C(O)N(R^4)-R^2-N(R^4), -C(O)O-R^2-N(R^4), -C(O)S-R^2-N(R^4), -N(R^4)C(O)-R^2-(O)N(R^4)-, y -N(R^4)-R^2-C(O)N(R^4)-;

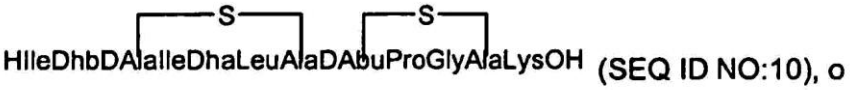
en la que cada R^2 es independientemente una cadena de alquileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cadena de alquenileno C_2-C_{10} lineal o ramificada, cicloalquileno o arileno; y

en la que cada R^4 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

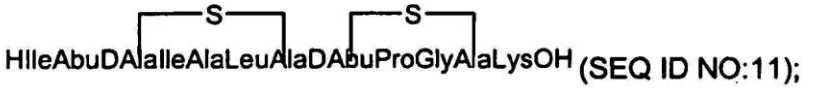
22. La composición antibiótica de la reivindicación 21, en la que la molécula de enlazante es -N(R^4)-R^2-N(R^4)- en la que cada R^4 es hidrógeno y R^2 es hexileno.

23. Una composición antibiótica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que:

T se selecciona de uno de los siguientes fragmentos del polipéptido nisina [1-12]:



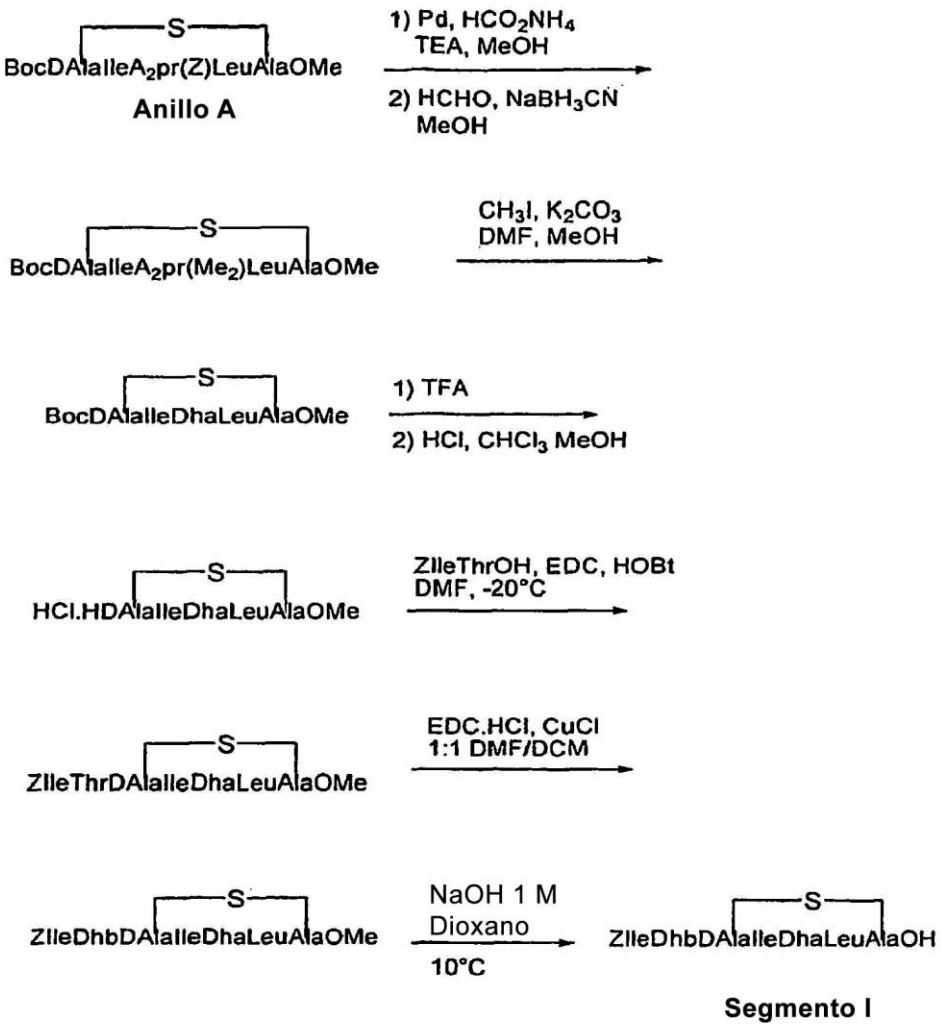
(SEQ ID NO:10), o



(SEQ ID NO:11);

L es -N(R^4)-R^2-N(R^4)- en la que cada R^4 es hidrógeno y R^2 es hexileno; y P es vancomicina o un derivado de vancomicina.

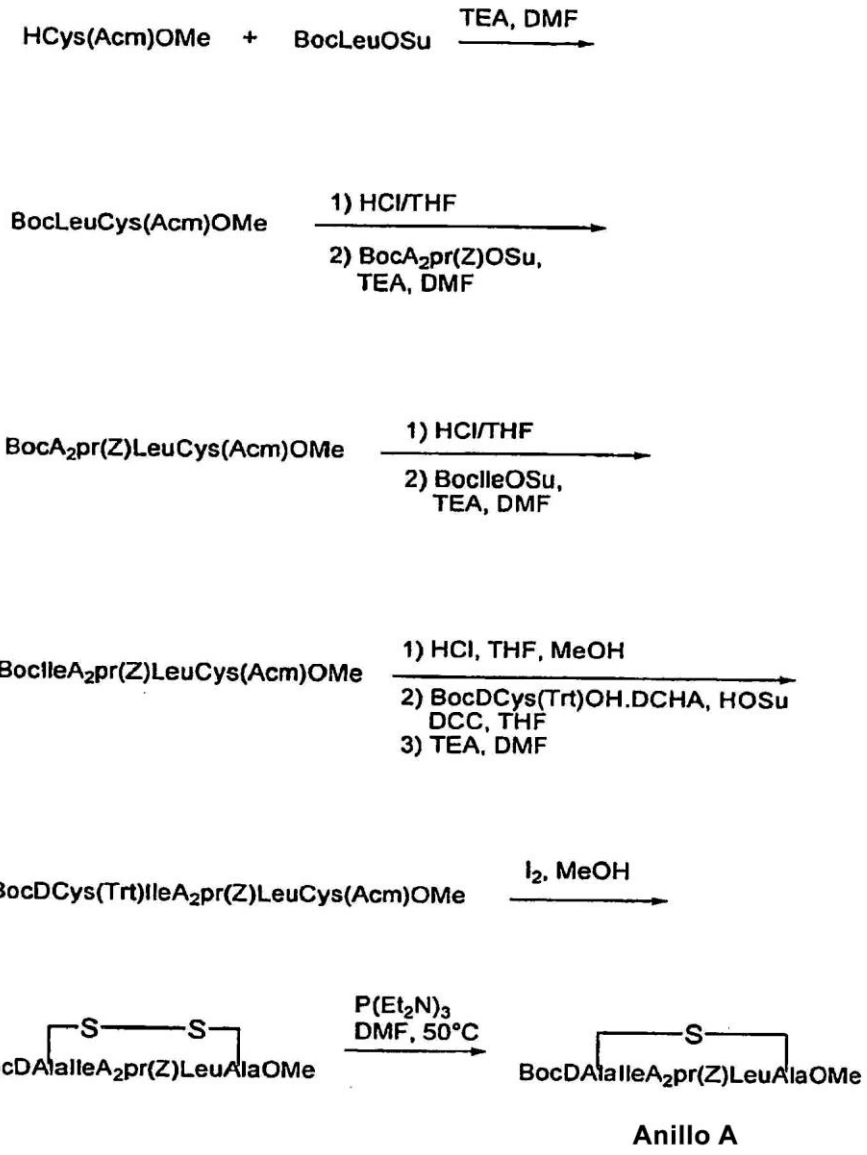
Síntesis del segmento I de nisina [1-12]



TEA = trietilamina
Z = carbobenciloxi
A_2pr = ácido 2,3-diaminopropionico
Boc = *t*-butoxicarbonilo

FIGURA 1

Síntesis del anillo A del segmento I de nisina [1-12]

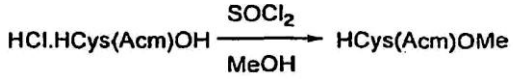


Acm = acetamidometilo
Boc = *t*-butoxicarbonilo
Su = succinamida

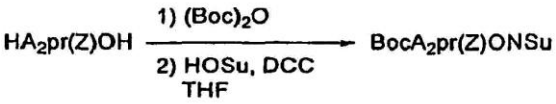
FIGURA 2

Síntesis de aminoácidos protegidos usados en la síntesis del anillo A del segmento I

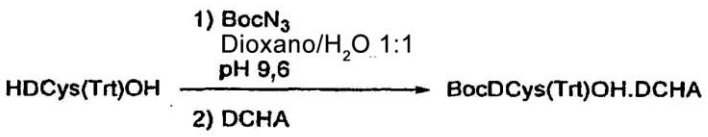
Preparación de HCys(Acm)OMe



Preparación de BocA$_2$pr(Z)ONSu



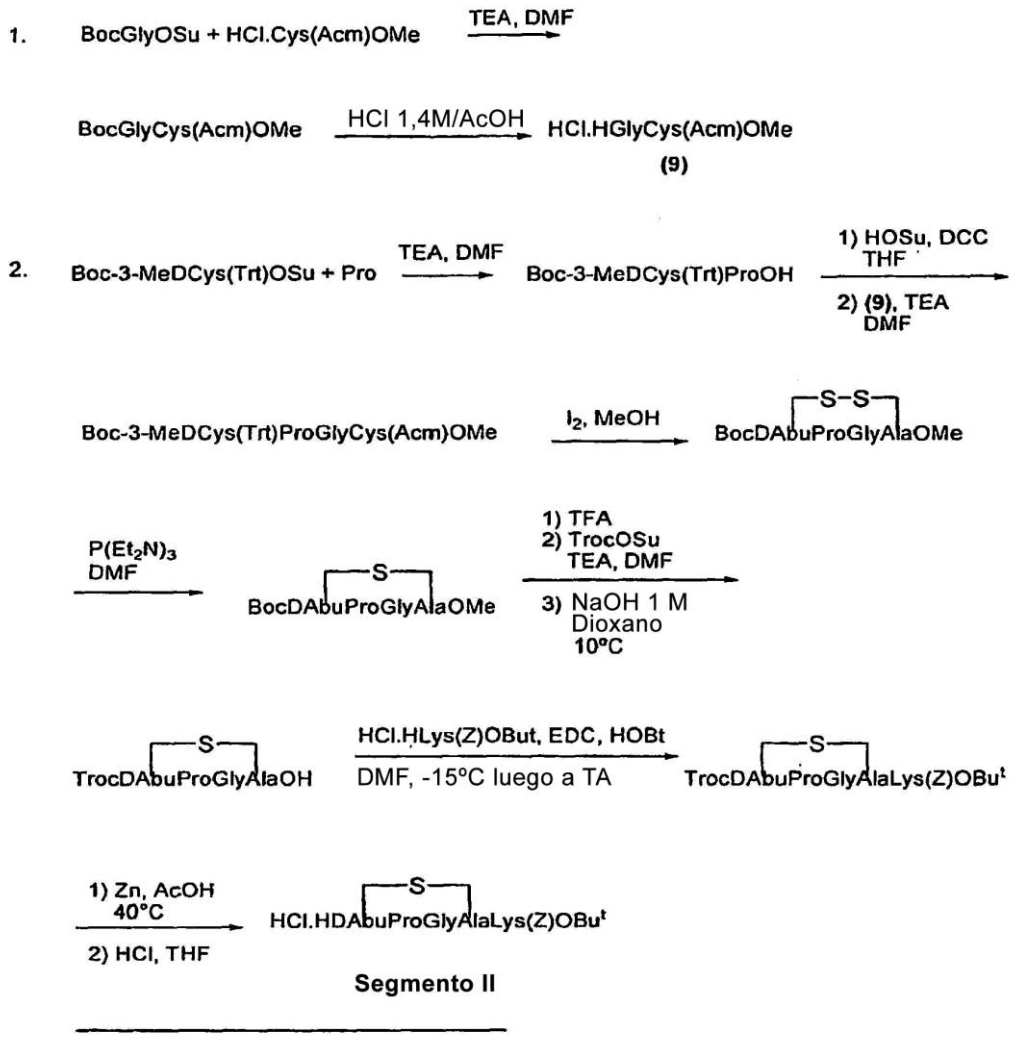
Preparación de BocDCys(Trt)OH.DCHA



Acm = acetamidometilo
Z = carbobenciloxi
A_2pr = ácido 2,3-diaminopropionico
Boc = *t*-butoxicarbonilo
DCHA = diciclohexilamonio

FIGURA 2A

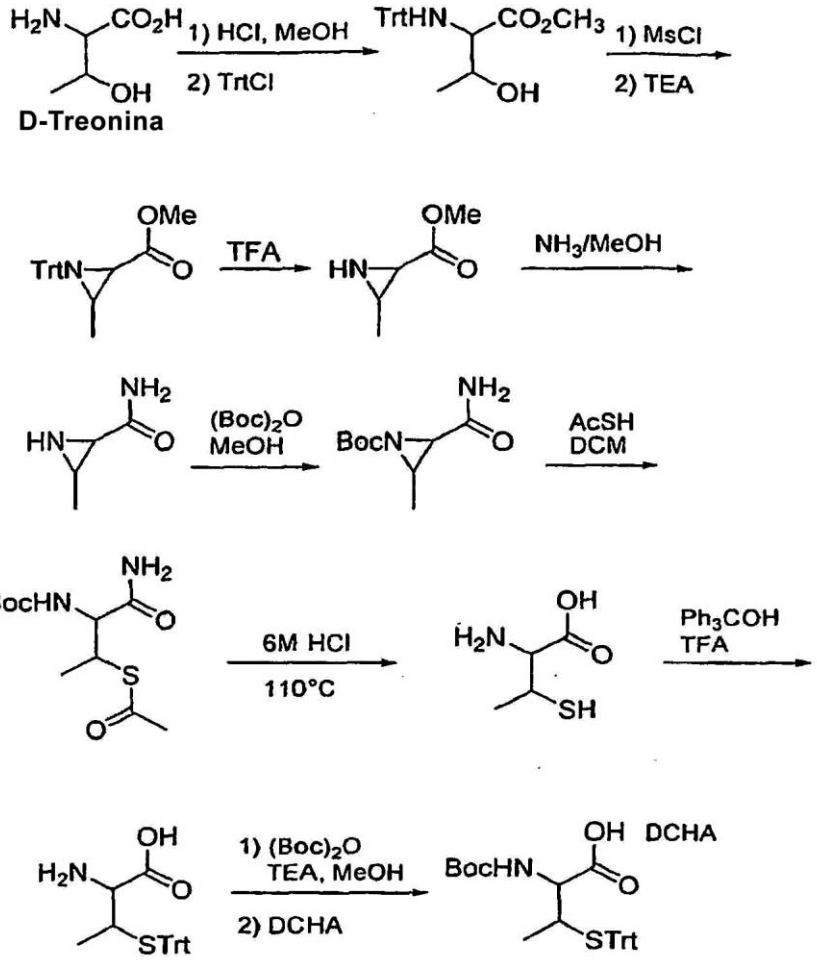
Síntesis del segmento II de nisina [1-12]



Acm = acetamidometilo
Boc = *t*-butoxicarbonilo
Bzyl = bencilo
DCHA = diciclohexilamonio
Su = succinimida
Troc = 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
Trt = tritilo
Z = carbobenciloxi

FIGURA 3

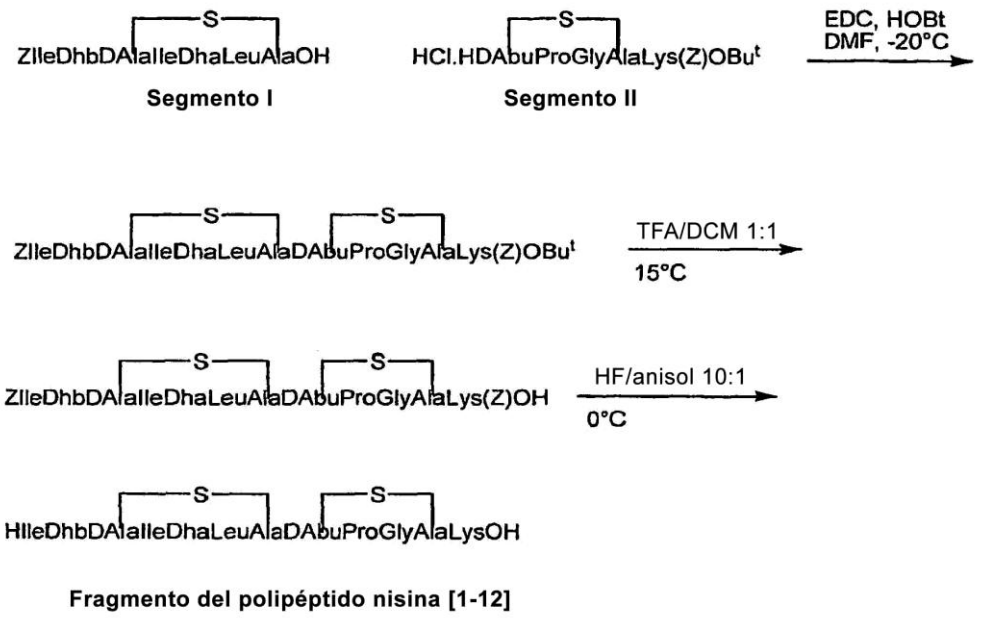
Preparación de Boc-3-MeDCys(Trt)OSu



DCHA = diciclohexilamonio

FIGURA 3A

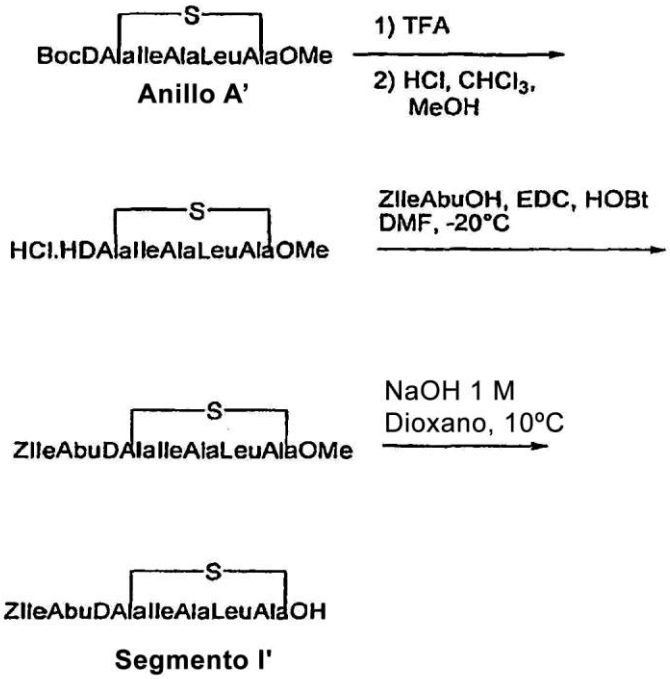
Acoplamiento del segmento I de nisina [1-12] y el segmento II de nisina [1-12]



Fragmento del polipéptido nisina [1-12]

FIGURA 4

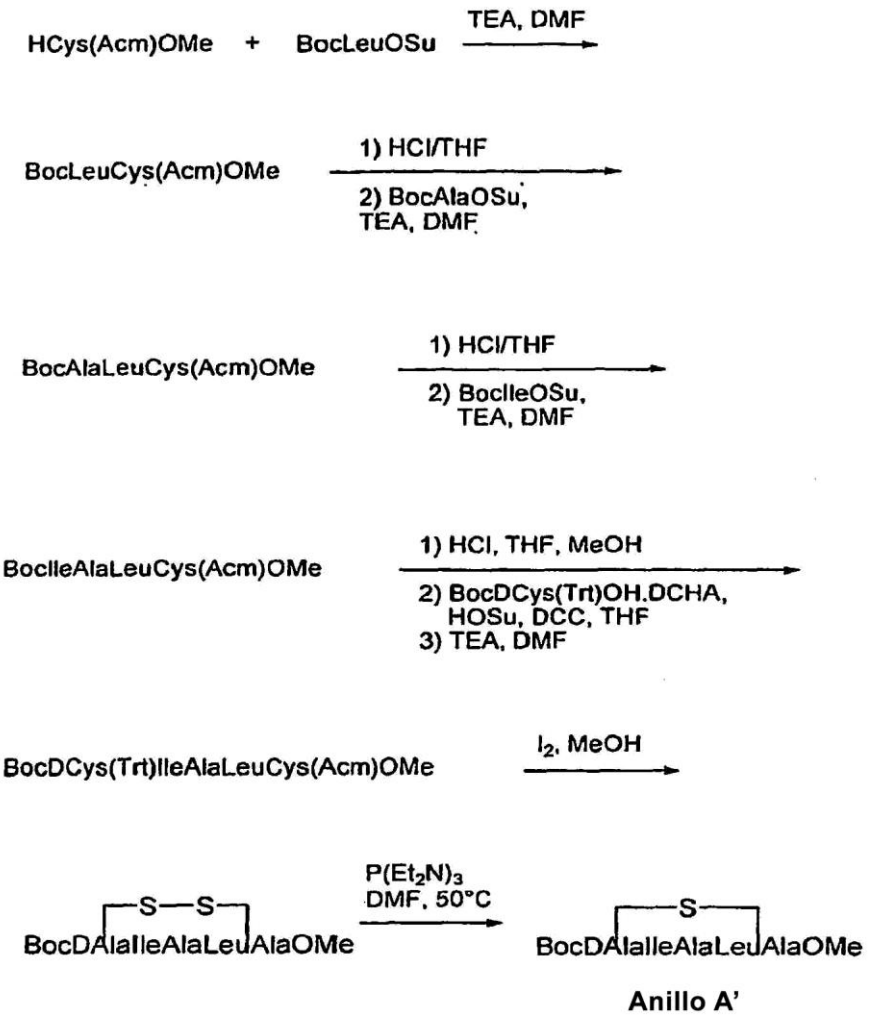
Síntesis del segmento I' de nisina [1-12]



Z = carbobenciloxi

FIGURA 5

Síntesis del anillo A' del segmento I' de nisina [1-12]



Acm = acetamidometilo
Boc = *t*-butoxicarbonilo
DCHA = diciclohexilamonio
Su = succinimida
Trt = tritilo

FIGURA 6

Acoplamiento del segmento I' de nisina [1-12] y el segmento II de nisina [1-12]

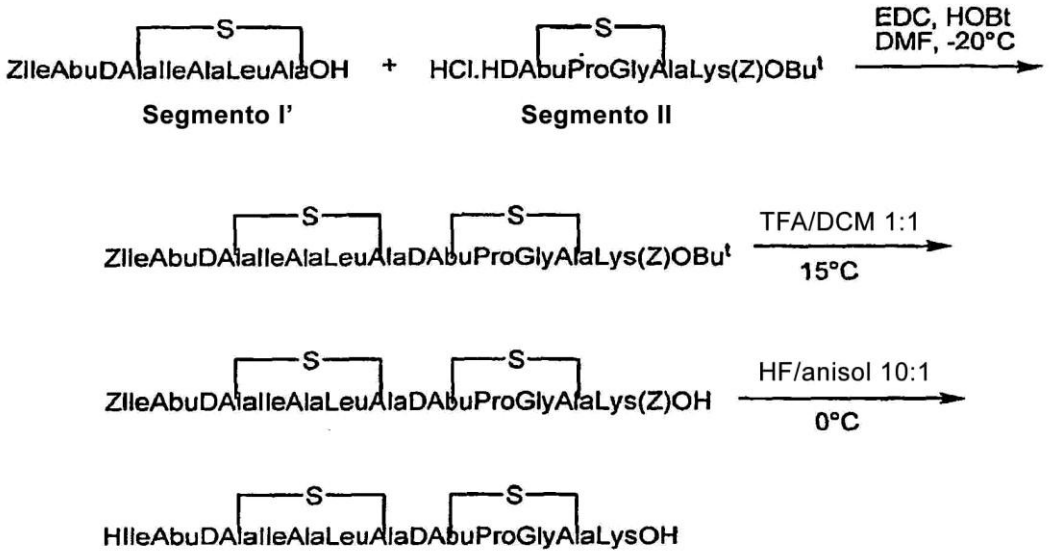


FIGURA 7

Antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana

Ácido 6-aminopenicilánico
Ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico
A47934
Amoxicilina
Ampicilina
Azlocilina
Bacitracina
Carbenicilina
Cefaclor
Cefamandol
Cefamandol nafato
Cefazolina
Cefmetazol
Cefoperazona
Cefotaxima
Cefalosporina C
Cefalotina
Cefapirina
Cefradina
Cloxacilina
Cloroeremoicina
D-Cicloserina
Dicloxacilina
D-Penicilamina
Econazol
Diclorhidrato de etambutol
Lisostafina de *Staphylococcus staphylolyticus*
Moxalactam
Meticilina
Nafcilina
Nikomicina
Nikomicina Z de *Streptomyces tendae*
Nitrofurantoína,
Oxacilina
Ácido penicílico
Penicilina
Feneticilina
Ácido fenoximetilpenicilínico
Fosfomicina
Ácido pipemídico
Piperacilina
Ramoplanina
Ristomicina
Vancomicina

Antibióticos que interfieren con la permeabilidad de la membrana celular (ionóforos)

N-óxido de 2-mercaptopiridina
4-Bromocalcimicina
Alameticina de *Trichoderma viride*
Anfotericina B de Streptomyces sp.,
Calcimicina A23187
Clorhexidina
Clotrimazol
Colistina
Econazol
Hidrocortisona-21-acetato VETRANAL®
Complejo de filipina de *Streptomyces filipinensis*,
Gliotoxina de *Gliocladium fimbriatum*
Gramicidina A
Gramicidina C
Gramicidina de *Bacillus aneurinilyticus (Bacillus brevis)*
Gramicidina de *Bacillus brevis*
Sal de calcio de lonomicina de *Streptomyces conglobatus*
Lasalocida A
Lonomicina A
Monensina
Clorhidrato de N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida
Narasina de *Streptomyces aureofaciens*
Nigericina
Nisina
Nonactina
Nistatina
Metosulfato de fenazina
Pimaricina
Polimixina B
DL-Penicilamina
Praziquantel
Salinomicina
Surfactina
Valinomicina

FIGURA 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6713606 B [0011] [0016]
- US 20040106544 A [0012] [0013] [0016]
- US 6153606 A [0014]
- US 6153405 A [0014]
- US 6794181 B, Coughlin [0016]
- US 4518584 A [0101]
- US 4737462 A [0101]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Chakicheria et al. J. Biol. Chem, 1995, vol. 270, 23533-23539 [0014]
- Walsh et al. Int. Dairy J., 1996, vol. 6, 425-431 [0015]
- McCormick, M.H. et al. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. Antibiot. An-nu., 1955, vol. 3, 606-11 [0016]
- Sheldrick, G.M. et al. Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. Nature, 1978, vol. 271 (5642), 223-5 [0016]
- Dutka-Malen, S. et al. The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymesM ol. Gen. Genet., 1990, vol. 224 (3), 364-72 [0016]
- Murray, B.E. The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev., 1990, vol. 3 (1), 46-65 [0016]
- Bugg, T.D. et al. Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine: D-alanine ligase of altered substrate specificity. Biochemistry, 1991, vol. 30 (8), 2017-21 [0016]
- Thuault, D. et al. Inhibition of Clostridium tyrobutyricum by bacteriocin-like substances produced by lactic acid acteria. J. Dairy Sci., 1991, vol. 74 (4), 1145-50 [0016]
- Handwerger, S. et al. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. Clin. Infect. Dis., 1992, vol. 14 (3), 655-61 [0016]
- Arthur, M. et al.Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. J. Bacteriol., 1993, vol. 175 (1), 117-27 [0016]
- Handwerger, S. et al. Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. Clin. Infect. Dis., 1993, vol. 16 (6), 750-5 [0016]
- Billot-Klein, D. et al. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. Biochem. J., 1994, vol. 304,1021-2 [0016]
- Reynolds, P.E. et al. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum BM4174. Biochem. J., 1994, vol. 301, 5-8 [0016]
- Sundram,U.N. et al. General and Efficient Method for the Solution- and Solid-Phase Synthesis of Van-comycin Carboxamide Derivatives. J. Org. Chem., 1995, vol. 60 (5), 1102-1103 [0016]
- Woodford, N. et al.Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of Enterococcus faecalis. J. Antimicrob. Chemother., 1995, vol. 35 (1), 179-84 [0016]
- Arthur, M. et al. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precur Mol.Microbiol., 1996, vol. 21 (1), 33-44 [0016]
- Chan, W.C. et al. Structure-activity relationships
- Breukink et al. Science, 1999, vol. 286, 2361 [0034]
- Sahl. Nisin and Novel Lantibiotics. 1991, 347-58[0034]
- Brotz et al. J. Antimicrob. Chemotherap, 2000, vol. 46, 1 [0034]
- Brumfit et al. J. Antimicrobiol. Chemotherap., 2002, vol. 50, 731 [0034]
- Bonev et al. FASEB J., 2004, vol. 18, 1862 [0035]
- Hsu et al. Nature Struct. Molec. Biol., 2004, vol. 11, 963 [0035] [0092]

in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. FEBS Lett., 1996, vol. 390 (2), 129-32 [0016]

• Cooper, R.D. et al. Reductive alkylation of glycopeptide antibiotics: synthesis and antibacterial activity. J. Antibiot. (Tokyo), 1996, vol. 49 (6), 575-81 [0016]

• Evers, S. et al. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in Enterococcus faecalis V583. J. Bacteriol., 1996, vol. 178 (5), 1302-9 [0016]

• Rodriguez, M.J. et al. Snyder NJ, Zweifel MJ, et al. Novel glycopeptide antibiotics: N-alkylated derivatives active against vancomycin-resistant enterococci. J. Antibiot. (Tokyo), 1998, vol. 51 (6), 560-9 [0016]

• van Kraaij, C. et al. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. Biochemistry, 1998, vol. 37 (46), 16033-40 [0016]

• Linton, S.M. et al. Therapeutic efficacy of a novel membrane-targeted complement regulator in antigen-induced arthritis in the raA. rthritis Rheum., 2000, vol. 43 (11), 2590-7 [0016]

• Smith, R.A. Targeting anticomplement agents. Biochem. Soc. Trans., 2002, vol. 30, 1037-41 [0016]

• Bonev, B.B. et al. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. FASEB. J., 2004, vol. 18 (15), 1862-9 [0016]

• Patton et al. Curr. Opin. Microbiol., 2005, vol. 8 (5), 543-51 [0078]

• Cotter et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2005, vol. 102 (51), 18584 [0078]

• Brotz et al. Antimicrob. Agent. Chemother, 1998, vol. 42, 154 [0083]

• Wiedemann et al. J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, 1772 [0083]

• Weidemann et al. J. Biol. Chem., 2001, vol.

• Chan et al. FEBS Lett., 1996, vol. 390, 129 [0035]

• Proteins, Peptides and Amino Acids Sourcebook. Humana Press, 2002 [0065]

• Jones, J. Amino Acid and Peptide Synthesis. Oxford Univ. Press, 2002 [0065]

• Unnatural Amino Acids, ChemFiles. Fluka Chemie GmbH, 2001, vol. 1 [0065]

• Unnatural Amino Acids II, ChemFiles. Fluka Chemie GmbH, 2002, vol. 2 [0065] •

• Kotha. Acc. Chem. Res., 2003, vol. 36, 342 [0065]

• Maruoka et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2004, vol. 101, 5824 [0065] •

• Lundquist et al. Org. Lett., 2001, vol. 3, 781 [0065]

• Tang et al. J. Org. Chem., 2002, vol. 67, 7819 [0065]•

• Rothman et al. J. Org. Chem., 2003, vol. 68, 6795 [0065]

• Krebs et al. Chemistry, 2004, vol. 10, 544 [0065]

• Biopolymers, 2001, vol. 60, 229

[0065]

• Sabat et al. Org. Lett., 2000, vol. 2, 1089 [0065]

• Fu et al. J. Org. Chem., 2001, vol. 66, 7118 [0065]

• Hruby et al.Meths. Mol. Biol., 1994, vol. 35, 249 [0065]

• Kuipers et al. J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, 24340 [0065]

• Rink et al. Biochem., 2005, vol. 44 (24), 8873-82 [0078] [0097] [0098]

• Kluskens et al.Biochem.,

12827-34 [0078] [0097] [0098]

• Wirawan et al. Appl. Env. Microbiol., 2006, vol. 72 (2), 1148-56 [0078] [0097]

• Aso et al. J. Biosci. Bioeng., 2004, vol. 98 (6), 429-36 [0078]

276, 1772 [0083]

• Scatchard et al. Ann. N. Y. Acad. Sci. USA, 1949, vol. 51, 660 [0085]

• Shiba, T. et al. Chemistry of Lanthionine Peptides. Biopolymers, 1986, vol. 25, S11-S19 [0087]
• Aso et al. J. Biosci. Bioeng., 2004 [0097]
• Bradley et al. Science, 2005, vol. 309, 1868 [0099]
• Schueler-Furman et al. Science, 2005, vol. 310, 638 [0099]

• Veira et al. Meth. Enzymol., 1987, vol. 15, 3 [0101]
• Kunkel et al. Meth. Enzymol., 1987, vol. 154, 367 [0101]

• Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0101]

• Fisher et al. Chem. Rev., 2005, vol. 105, 395-424 [0113]

• Kahne et al. Chem. Rev., 2005, vol. 105, 425-448 [0113]

• Walker et al. Chem. Rev., 2005, vol. 105, 449-476 [0113]

• Chatterjee et al.Chem. Rev., 2005, vol. 105, 633-684 [0113]

• Bagley et al. Chem. Rev., 2005, vol. 105, 685-714 [0113]

• Green, T.W. ; P.G.M. Wutz. Protective Groups in Organic Synthesis. Wiley, 1999 [0115] [0120]
• March, J. Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure. Wiley, and John Wiley & Sons, 1992 [0120]

• Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000 [0137] R.C.

• Larock. Comprehensive Organic Transformations. VCH Publishers, 1989 [0154]