

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 846**

51 Int. Cl.:  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 7/64** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**A61K 38/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07700115 .4**  
96 Fecha de presentación: **15.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1979374**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2008**

54 Título: **Peptidomiméticos fijados a una matriz**

30 Prioridad:  
**16.01.2006 WO PCT/CH2006/000036**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2012**

73 Titular/es:  
**POLYPHOR LTD.  
GEWERBESTRASSE 14  
4123 ALLSCHWIL, CH y  
UNIVERSITÄT ZÜRICH**

72 Inventor/es:  
**GOMBERT, Frank;  
OBRECHT, Daniel;  
VRIJBLOED, Wim;  
DIAS, Ricardo;  
DEMARCO, Steve, J.;  
ROBINSON, John, Anthony y  
SRINIVAS, Nityakalyani**

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

ES 2 381 846 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Peptidomiméticos fijados a una matriz

5 La presente invención da a conocer peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  fijados a una matriz que incorporan una cadena de 12 residuos de  $\alpha$ -amino ácidos fijadas a una matriz, que dependiendo de sus posiciones en la cadena, son los que se definen en esta descripción. Estos miméticos de horquilla  $\beta$  fijados a una matriz tienen actividad antimicrobiana selectiva. Además, la presente invención da a conocer eficaces procesos sintéticos por los que estos  
10 compuestos pueden ser preparados, en caso deseado, en formato de biblioteca paralela. Estos peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  muestran una eficacia mejorada, biodisponibilidad, media vida y de manera más importante una proporción sensiblemente mejorada entre actividad antibacteriana por una parte, y hemólisis de glóbulos rojos por otra.

15 El creciente problema de resistencia microbiana a antibióticos conocidos ha estimulado gran interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con nuevas modalidades de acción (H. Breithaupt, Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1165-1169). Una clase emergente de antibiótico se basa en péptidos catiónicos de tipo natural (T. Ganz, R. I. Lehrer, Mol. Medicine Today 1999, 5, 292-297; R. M. Eppard, H. J. Vogel, Biochim Biophys. Acta 1999, 1462, 11-28). Éstos incluyen péptidos de horquilla  $\beta$  con puente de bisulfuro y péptidos laminares  $\beta$  (tal como las *protegrinas* [V. N. M; O. V. Shamova, H. A. Korneva, R. I. Lehrer, FEBS Lett. 1993, 327, 231-236], *taquiplesinas* [T. Nakamura, H.  
20 Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. J. Biol. Chem. 1988, 263, 16709-16713], y las *defensinas* [R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, Annu. Rev. Immunol. 1993, 11, 105-128], péptidos en hélice  $\alpha$  anfifáticos (por ejemplo, *cecropinas*, *dermaseptinas*, *magaininas*, y *melitinas* [A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Bipolymers 2000, 55, 4-30]), así como otros péptidos de estructura lineal y en bucle. Si bien, los mecanismos de acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos no son todavía bien conocidos, su sitio principal de interacción es la membrana celular microbiana (H. W. Huang, Biochemistry 2000, 39, 8347-8352). Después de exposición a estos agentes, la membrana celular presenta permeabilización, que es seguida por una rápida muerte celular. No obstante, no se pueden excluir en la actualidad mecanismos más complejos de acción comportando, por ejemplo, señalización mediada por receptor (M. Wu, E. Maier, R. Benz, R. E. Hancock, Biochemistry 1999, 38, 7235-7242).  
30

Las actividades antimicrobianas de muchos de estos péptidos catiónicos se correlacionan solamente con sus estructuras secundarias preferentes observadas en solución acuosa o en entorno de tipo membrana (N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 29-54). Estudios estructurales por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) han mostrado que los péptidos catiónicos, tales como protegrina 1 (A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, A. Eur. J. Biochem. 1996, 237, 575-583; R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. L. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, J. Feigon, J. Chem. Biol. 1996, 3, 543-550) y taquiplesina I (K. Kawano, T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada, S. J. Iwanaga, S. J. Biol. Chem. 1990, 265, 15365-15367) adoptan conformaciones bien definidas de horquilla  $\beta$  debido al efecto limitador de dos puentes de bisulfuro. En análogos de protegrina a los que les falta uno o ambos de estos enlaces bisulfuro, disminuye la estabilidad de la conformación de horquilla  $\beta$ , y la actividad antimicrobiana se reduce (J. Chen, T. J. Falla, H. J. Liu, M. A. Hurst, C. A. Fujii, D. A. Mosca, J. R. Embree D. J. Loury, P. A. Radcliff, C. C. Chang, L. Gu, J. C. Fiddes, Biopolymers 2000, 55, 88-98; S. L. Harwig, A. Waring, H. J. Yang, Y. Cho, L. Tan, R. I. Lehrer, R. J. Eur. J. Biochem. 1996, 240, 352-357; M. E. Mangoni, A. Aumelas, P. Chamet, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, FEBS Lett. 1996, 383, 93-98; H. Tamamura, T. Murakami, S. Noriuchi, K. Sugihara, A. Otaka, W. Takada, T. Ibuka, M. Waki, N. Tamamoto, N. Fujii, Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 853-858).  
45 Se han hecho observaciones similares en análogos de taquiplesina I (H. Tamamura, R. Ikoma, M. Niwa, S. Funakoshi, T. Murakami, N. Fujii, Chem. Pharm. Bull. 1993, 41, 978-980) y en miméticos de horquilla-bucle de defensina NP-2 de conejo. (S. Thennarasu, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1999, 254, 281-283). Estos resultados muestran que la estructura de horquilla  $\beta$  juega una importante papel en la actividad antimicrobiana y en la estabilidad de estos péptidos tipo protegrina. En el caso de péptidos catiónicos que prefieren estructuras helicoidales  $\alpha$ , la estructura anfifílica de la hélice parece jugar un papel clave en determinar la actividad antimicrobiana (A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, A. Biopolymers 2000, 55, 4-30). La gramicidina S es un péptido de esqueleto-cíclico con una bien definida estructura de horquilla  $\beta$  (S. E. Hull, R. Karlsson, P. Main, M. M. Woolfson, E. J. Dodson, Nature 1978, 275, 206-275) que muestra una potente actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, R. E. Hancock, R. S. Hodges, Int. J. Peptide Prot. Res. 1996, 47, 460-466). La elevada actividad hemolítica de la *gramicidina* S ha dificultado, no obstante, su utilización generalizada como antibiótico. Recientes estudios estructurales mediante NMR han indicado que la elevada actividad hemolítica se correlaciona aparentemente con la elevada naturaleza anfifática de esta molécula de tipo cíclico de horquilla  $\beta$ , pero es posible disociar las actividades antimicrobiana y hemolítica al modular la conformación y la anfifilicidad (L. H. Kondejewski, M. Jelokhani-Niaraki, S.W. Farmer, B. Lix, M. Kay, B. D. Sykes, R. E. Hancock, R. S. Hodges, J. Biol. Chem. 1999, 274, 13181-13192; C. McInnes, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, B. D. Sykes, J. Biol. Chem. 2000, 275, 14287-14294).  
60

65 Se ha informado recientemente a partir de leucocitos de primates sobre un nuevo péptido antimicrobiano cíclico RTD-1 (Y. -Q. Tang, J. Yuan, G. Ósabay, K. Ósabay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Oellette, M. E. Selsted, Science

1999, 286, 498-502). Este péptido contiene tres fuentes de bisulfuro, que actúan para limitar el esqueleto de péptido cíclico en una geometría de horquilla. El fraccionamiento de las tres fuentes de bisulfuro conduce a una pérdida significativa de actividad antimicrobiana. También se ha informado sobre análogos de protegrinas (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300) y taquiplesinas (J.-P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, Biochemistry 2000, 39, 7159-7169; N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 267, 783-790) conteniendo un esqueleto de péptido cíclico, así como múltiples puentes de bisulfuro para fomentar una estructura de horquilla amfifílica.

En estos casos, la eliminación de todas las limitaciones de cisteína no conduce siempre a una importante pérdida de actividad antimicrobiana, sino que modula la selectividad membranolítica (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300).

Un tema clave en el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos catiónicos son la biodisponibilidad, estabilidad y reducida actividad hemolítica. Las protegrinas y las taquiplesinas de tipo natural ejercen una actividad hemolítica significativa contra los glóbulos rojos humanos. Este es también el caso para análogos de protegrina, tales como IB367 (J. Chen, T. J. Falla, H. J. Liu, M. A. Hurst, C. A. Fujii, D. A. Mosca, J. R. Embree, D. J. Loury, P. A. Radel, C. C. Chang, L. Gu, J. C. Fiddes, Biopolymers 2000, 55, 88-98; C. Chang, L. Gu, J. Chen, US-Pat: 5.916.872, 1999). Esta elevada actividad hemolítica impide esencialmente su utilización in vivo, y representa una serie de desventajas en aplicaciones clínicas. Asimismo, la actividad antibiótica de análogos, disminuye frecuentemente de modo significativo con un aumento de la concentración de sal, de manera que en condiciones in vivo (ca. 100-150 mM NaCl) la actividad antimicrobiana se puede ver severamente reducida.

La *protegrina 1* muestra una actividad potente y similar contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, y también hongos en ensayos de alto y bajo contenido de sales. Esta amplia actividad antimicrobiana combinada con una modalidad de acción rápida, y su capacidad de exterminar bacterias resistentes a otras clases de antibióticos, las convierten en objetivos atractivos para el desarrollo de antibióticos utilizables clínicamente. La actividad contra bacterias gram-positivas es típicamente más elevada que contra las bacterias gram-negativas. No obstante, la protegrina 1, muestra también una elevada actividad hemolítica contra los glóbulos rojos humanos y, por lo tanto, baja selectividad hacia las células microbianas. Experimentos orientados a CD (W. T. Heller, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang, Biochemistry 1998, 37, 17331-17338) indican que la protegrina 1 puede existir en dos diferentes estados al interactuar con membranas y estos estados están fuertemente influidos por la composición de lípidos. Los estudios de análogos de protegrina cíclicos (J.-P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300) han mostrado, que un incremento en la rigidez conformacional, que resulta de la ciclización del esqueleto y múltiples puentes de bisulfuro, pueden conferir selectividad membranolítica que disocia la actividad antimicrobiana de la actividad hemolítica, por lo menos en la serie de compuestos estudiada.

La *protegrina 1* es un péptido de 18 residuos lineales, con un terminal carboxilo amidado y dos puentes de bisulfuro. La *taquiplesina 1* contiene 17 residuos, tiene también un terminal carboxilo amidado y contiene dos puentes de bisulfuro. Los análogos de protegrina y taquiplesina de esqueleto-cíclicos, recientemente descritos, contienen de manera típica 18 residuos y hasta tres puentes de bisulfuro (J. P. Tam, C. Wu, J.-L. Yang, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3289-3300; J. P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, Biochemistry 2000, 39, 7159-7169; N. Sitaram, R. Nagaraj, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 267, 783-790).

La *catelcidina*, un péptido catiónico de tipo helicoidal lineal de 37 residuos y sus análogos están actualmente bajo investigación como agentes terapéuticos de inhalación para *fibrosis quística (CF) enfermedad pulmonar* (L. Saiman, S. Tabibi, T. D. Starner, P. San Gabriel, P. L. Winokur, H. P. Jia, P. B. McGray, Jr., B. F. Tack, Antimicrob. Agents and Chemother. 2001, 45, 2838-2844; R. E. W. Hancock, R. Lehrer, Trends Biotechnol. 1998, 16, 82-88). Más de 80% de pacientes de CF resultan infectados de manera crónica con *pseudomonas aeruginosa* (C. A. Demko, P. J. Biard, P. B. Davies, J. Clin. Epidemiol. 1995, 48, 1041-1049; E. M. Kerem, R. Gold, H. Levinson, J. Pediatr. 1990, 116, 714-719). Otros péptidos antimicrobianos contra Pseudomonádas (Y.H. Yau, B. Ho, N.S. Tan, M.L. Ng, J.L. Ding, Antimicrob. Agents and Chemother. 2001, 45, 2820-2825 y referencias a los mismos que se citan), tales como FALL-39, SMAP-29, y cecropina de lepidópteros muestran algunos de los atributos deseados, tales como potente actividad antimicrobiana en una amplia gama de pH, rápida velocidad de exterminio, y baja actividad hemolítica.

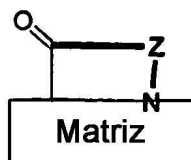
En los compuestos que se describen a continuación se ha introducido una nueva estrategia para estabilizar conformaciones de horquilla  $\beta$  en peptidomiméticos catiónicos de esqueleto cíclico que muestran actividad antimicrobiana selectiva. Esto comporta el trasplante de la secuencia catiónica y de horquilla hidrofóbica en una matriz cuya función es la de restringir el esqueleto del bucle del péptido en una geometría de horquilla.

También se han descrito en la literatura, los peptidomiméticos de horquilla (hairpin) unidos a matriz (D. Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, Adv. Med Chem. 1999, 4, 1-68; J. A. Robinson, Syn. Lett. 2000, 4, 429-441) y la capacidad de generar péptidomiméticos de horquilla  $\beta$  utilizando métodos de síntesis combinatoria y paralela se ha establecido actualmente (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, Helv. Chim. Acta. 2000, 83, 3097-3112). Los peptidomiméticos antibacterianos fijados a matriz y los métodos para su síntesis han sido descritos en las solicitudes de Patentes Internacionales WO-A-02/070547 y WO-A-2004/018503, pero estas moléculas no muestran elevada selectividad de plasma y, particularmente elevada potencia. Otros peptidomiméticos antibacterianos fijados

a matriz han sido descritos en el documento WO-A-2004/033489.

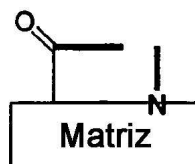
Los métodos descritos permiten las síntesis y rastreo de grandes bibliotecas de miméticos de horquilla, lo que a su vez, facilita considerablemente estudios de estructura-actividad y, por lo tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas con potente actividad antimicrobiana selectiva y actividad hemolítica muy baja con respecto a los glóbulos rojos humanos. La presente estrategia permite sintetizar peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  con nuevas selectividades hacia diferentes cepas de *pseudomonas*-resistentes a multi-medicamentos.

Los peptidomiméticos de horquilla- $\beta$  de la presente invención son compuestos de la fórmula general



(I)

en la que



es  $^D\text{Pro-}^L\text{Pro}$  ó  $^L\text{Pro-}^D\text{Pro}$ , y Z es una cadena de 12 residuos de  $\alpha$  aminoácidos, contándose las posiciones de dichos residuos de aminoácidos en la mencionada cadena empezando del terminal de aminoácido N, de manera que estos residuos de aminoácidos se encuentran en las posiciones P1 a P12 de la cadena,

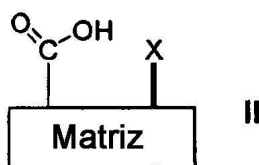
- P1: Ala, Cit, Thr, Asp, Glu;
- P2: Trp, Tyr;
- P3: Ile, Val, Nle, Chg, Cha;
- P4: Dab, Lys, Gln;
- P5: Lys, Dab, Orn;
- P6: Dab,  $^D\text{Dab}$ , Lys;
- P7: His, Lys, Gln, Dab;
- P8: Tyr, Trp Ser;
- P9: Dab, Lys;
- P10: Dab, Lys;
- P11: Ala, Abu, Thr, Gly, Pro, Hse, Ile, Nva,  $^D\text{Ala}$ ,  $^D\text{Val}$ , Aib, Nle, Chg, Cha, Gln, Asp, Glu, Cpa, t-BuG, Leu, Val, Asn; y
- P12: Dab, Lys, Gln, Ser;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

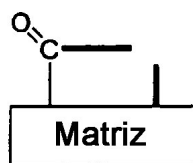
De acuerdo con la presente invención, estos peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  se pueden preparar por un procedimiento que comprende

(a) acoplamiento de un soporte sólido, apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-protégido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 5, 6 ó 7, quedando cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-

- protegido igualmente protegido de manera apropiada;  
 (b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;  
 (c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en una posición más próxima al residuo de aminoácido del N-terminal, encontrándose igualmente protegido cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;  
 (d) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;  
 (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que el residuo de aminoácido de N-terminal ha sido introducido;  
 (f) acoplar el producto obtenido con un compuesto de fórmula general;



en el que



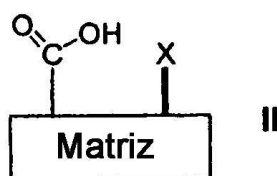
es el definido anteriormente y X es un grupo N-protector o, alternativamente

- (fa) acoplar el producto obtenido en la etapa (e) con un derivado apropiadamente N-protegido de <sup>L</sup>Pro ó <sup>D</sup>Pro;  
 (fb) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de esta manera; y  
 (fc) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido de <sup>L</sup>Pro ó <sup>D</sup>Pro;

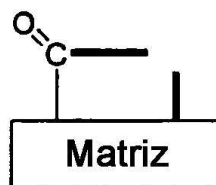
- (g) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) ó (fc);  
 (h) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición -12-, encontrándose igualmente protegido cualquier grupo funcional que se pueda encontrar presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;  
 (i) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;  
 (j) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado N-protegido apropiado de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más allá de la posición -12-, encontrándose igualmente protegido de manera apropiada cualquier grupo funcional que se pueda encontrar presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;  
 (k) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;  
 (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos aminoácidos han sido introducidos;  
 (m) en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente los grupos reactivos liberados de este modo;  
 (n) separar el producto obtenido de este modo del soporte sólido;  
 (o) ciclizar el producto fraccionado del soporte sólido;  
 (p) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en caso deseado, cualesquiera grupo protectores que puedan encontrarse además presentes en la molécula; y  
 (q) en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o no aceptable, obtenida de este modo en el compuesto correspondiente libre de la fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, se pueden preparar los peptidomiméticos de la presente invención por

- (a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general



en el que



es la definida anteriormente y X es un grupo N-protector o, alternativamente

- (a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido de <sup>L</sup>Pro ó <sup>D</sup>Pro;
- (a'b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo; y
- (a'c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de <sup>L</sup>Pro ó <sup>D</sup>Pro;
- (b') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (a') ó (a'c);
- (c') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido en la cadena final deseado en posición -12-, encontrándose igualmente protegido de manera apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- (d') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final se encuentra una posición más alejada de la posición -12-, siendo igualmente apropiadamente protegido cualquier grupo funcional que pueda encontrarse en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- (f) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que se han introducido todos los grupos aminoácido;
- (h') en caso deseado, desproteger de manera selectiva uno o varios grupos funcionales presentes en la molécula y sustituir de manera apropiada el grupo o grupos reactivos liberados de este modo;
- (i') separar el producto obtenido de este modo de los soportes sólidos;
- (j') ciclizar el producto fraccionado del soporte sólido;
- (k') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en los grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en caso deseado, cualesquiera grupos protectores que puedan encontrarse adicionalmente presentes en la molécula; y
- (l') en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.

Los peptidomiméticos de la presente invención pueden ser también enantiómeros de los compuestos de fórmula I. Estos enantiómeros pueden ser preparados por una modificación de los procesos anteriores en los que, se utilizan enantiómeros de todos los materiales quirales iniciales.

Las matrices **(a)** hasta **(p)** constituyen un bloque que tiene un terminal-N y un terminal-C orientados en el espacio de manera tal que la distancia entre estos dos grupos puede encontrarse entre 4,0-5,5Å. Una cadena de péptido **Z** está enlazada al terminal-C y al terminal-N de la matriz con intermedio de los términos correspondientes N- y C-, de manera que la matriz y la cadena forman una estructura cíclica, tal como se ha mostrado en la fórmula I. En un caso como el presente, en el que la distancia entre los términos N- y C- de la matriz se encuentra entre 4,0-5,5Å, la matriz inducirá la red de enlaces-H necesaria para la formación de una conformación de horquilla-β de la cadena de péptidos **Z**. De este modo, la matriz y la cadena de péptidos forman un *mimético de horquilla-β*. La conformación de horquilla-β es muy relevante para la actividad antibacteriana de los miméticos de horquilla-β de la presente invención. Las propiedades conformacionales estabilizantes de la horquilla-β de la matriz juegan un papel clave, no solamente para la actividad antimicrobiana selectiva, sino también para el proceso sintético que se ha definido anteriormente, dado que la incorporación de las matrices al inicio o cerca de la parte media de los precursores de péptidos lineales protegidos, aumenta significativamente los rendimientos de ciclización.

Los residuos de aminoácidos preferentes en la cadena Z son derivados de α-aminoácidos naturales. A continuación, se incluye una lista de aminoácidos que son apropiados, o lo son sus residuos, para los objetivos de la presente

invención, correspondiendo las abreviaturas adoptadas a la práctica general adoptada:

Código de tres letras		Código de una letra
Ala	L-Alanina	A
Asn	L-Asparagina	N
Asp	L-Ácido aspártico	D
Glu	L-Ácido glutámico	E
Gln	L-Glutamina	Q
Gly	Glicina	G
His	L-Histidina	H
Ile	L-Isoleucina	I
Lys	L-Lisina	K
Pro	L-Prolina	P
Thr	L-Threonina	T
Trp	L-Triptofan	W
Tyr	L-Tirosina	Y
Val	L-Valina	V

Otros  $\alpha$ -aminoácidos que son apropiados, o lo son sus residuos, para los objetivos de la presente invención incluyen:

5

Cit	L-Citrullina
Ore	L-Ornitina
Sar	Sarcosina
t-Bug	L-tert. Butilglicina
Cha	L-Ciclohexilalanina
Nle	L-Norleucina
Abu	$\gamma$ -Ácido aminoturérico (GABA)
Aib	$\alpha$ -Ácido aminoisobutírico
Dab	L-2, 4-Diamino-ácido butírico
Cpa	L-Ciclo-Propilamina

10

La cadena de péptidos **Z** dentro de los miméticos de horquilla- $\beta$  de la invención, comprende 12 residuos de aminoácidos. Las posiciones -P1- a -P12- de cada residuo de aminoácido en la cadena **Z** están definidos de manera inequívoca de la forma siguiente: -P1- representa el primer aminoácido de la cadena **Z** que está acoplado con su terminal-N al terminal-C de la matriz y -P12- representa el último aminoácido de la cadena **Z** acoplado con su terminal-C al terminal-N de la matriz.

15

Se incluyen entre los peptidomiméticos de horquilla- $\beta$  preferentes de la invención los descritos en los ejemplos 1, 2, 6, 16, 19, 22, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 40, 41, 49, 50.

20

Los procesos de la invención pueden ser llevar a cabo ventajosamente como síntesis de conjunto en paralelo para facilitar bibliotecas de peptidomiméticos de horquilla- $\beta$  fijados a la matriz, según la fórmula general anterior I. Estas síntesis paralelas permiten conseguir conjuntos de numerosos compuestos (normalmente de 24 a 192, de manera típica 96) de la fórmula general I con altos rendimientos y purzas definidas, minimizando la formación de subproductos dímeros y polímeros. La elección apropiada de soporte-sólido funcionalizado, (es decir, soporte sólido más molécula de enlace), matrices y lugar de ciclización juegan papeles clave.

25

El soporte sólido funcionalizado es convenientemente derivado de poliestireno reticulado con, preferentemente 1-5% de divinilbenceno; poliestireno con recubrimiento de separadores de polietilenglicol (Tentagel<sup>R</sup>); y resinas de poliacrilamida (ver también, Obrecht, D.; Villalgorido, J.-M, "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight-Compound Libraries", Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

30

El soporte sólido es funcionalizado mediante un enlazador, es decir, una molécula separadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para acoplamiento al soporte sólido, y en el otro extremo un grupo funcional fraccionable selectivamente utilizado para las subsiguientes transformaciones químicas y procesos de fraccionamiento. Para los objetivos de la presente invención se utilizan dos tipos de enlazadores:

35

Los enlazadores de tipo 1 están diseñados para liberar el grupo amida en condiciones ácidas (Rink H, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3783-3790). Los enlazadores de este tipo forman amidas de grupo carboxilo de los aminoácidos; se incluyen entre los ejemplos de resinas funcionalizadas por dichas estructuras enlazadoras resina PS 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil], resina PS 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] -4-metilbenci-drilamina (Rink amida MBHA), y resina PS 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] bencidrilamina (Rink amida resina PS BHA).

Preferentemente, el soporte es derivado de poliestireno reticulado con, de manera más preferente, 1-5%, divinilbenceno y medios funcionarizados del enlazador 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido).

5 Los enlazadores de tipo 2 están diseñados para liberar eventualmente el grupo carboxilo en condiciones ácidas. Los enlazadores de este tipo forman ésteres inestables con ácido con el grupo carboxilo de los aminoácidos, usualmente bencilo inestable con ácido, ésteres de bencidrilo y tritilo; se incluyen entre los ejemplos de dichas estructuras enlazadoras 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (enlazador Sasrin<sup>®</sup>), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink), 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB), tritilo y 2-clorotritilo. Preferentemente, el soporte es derivado de poliestireno reticulado con, de manera más preferente 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado por medio del enlazador de 2-clorotritilo.

15 Cuando se lleva a cabo como síntesis en paralelo, los procesos de la invención pueden ser llevados a cabo ventajosamente, tal como se describe a continuación, pero quedará evidente a los técnicos en la materia que estos procedimientos tendrán que ser modificados en el caso de que se desee sintetizar un compuesto único de la anterior fórmula I.

20 Una serie de recipientes de reacción (normalmente 24 a 192, de manera típica 96), igual al número total de compuestos a sintetizar por el método paralelo, se cargan con 25 a 1000 mg, preferentemente 100 mg, del soporte sólido apropiado funcionalizado, preferentemente 1 a 3% de poliestireno reticulado o resina Tentagel.

25 El disolvente a utilizar debe ser capaz de hinchar la resina e incluye, sin que ello sea limitativo, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), dioxanos, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), isopropilalcohol y similares. Mezclas de disolventes que contienen como un componente un disolvente polar (por ejemplo, 20% TFE/DCM, 35% THF/NMP) son beneficiosos para asegurar una elevada reactividad y solvatación de las cadenas de péptido unidas a resina (Fields, G. B., Fields, C. G., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4202-4207).

30 Con el desarrollo de varios enlazadores que liberan el grupo de ácido carboxílico del terminal-C en condiciones ácidas suaves, que no afectan a los grupos inestables frente a ácido que protegen grupos funcionales en las cadenas laterales, se han realizado considerables avances en las síntesis de fragmentos de péptidos protegidos. El enlazador derivado de 2-metoxi-4-hidroxibencilalcohol (enlazador Sasrin<sup>®</sup>, Mergler y otros, Tetrahedron Lett. 1988, 29 4005-4008) es fraccionable con ácido trifluoroacético diluido (0,5-1% TFA en DCM) y es estable a condiciones de desprotección a Fmoc durante la síntesis del péptido, siendo compatibles con este esquema de protección, grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu. Otros enlazadores, que son adecuados para el proceso de la invención, incluyen el enlazador super inestable a ácidos 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink, Rink, H. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787-3790), en el que la eliminación del péptido requiere ácido acético al 10% en DCM ó 0,2% de ácido trifluoroacético en DCM; el enlazador derivado del ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB, Flörsheimer & Riniker, Peptides 1991, 1990 131) que es fraccionado también con 1%TFA/DCM para proporcionar un fragmento de péptido que contiene todos los grupos protectores de cadena lateral inestables frente a ácido y, en particular, el enlazador 2-clorotritilcloruro (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946), que permite la separación del péptido utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 minutos.

45 Son grupos protectores adecuados para aminoácidos y, respectivamente, para sus residuos, por ejemplo, - para grupo amino (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de lisina)

Cbz	benciloxicarbonilo
Boc	tert.-butiloxicarbonilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Alloc	alililoxicarbonilo
Teoc	trimetilsililetoxicarbonilo
Tcc	tricloroetoxicarbonilo
Nps	o-nitrofenilsulfonilo;
Trt	trifenimetil o tritilo

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

tBu	tert.-butilo
Bn	benzilo
Me	metilo
Ph	fenilo
Pac	Fenacilo
	Alilo
Tse	Trimetilsililetilo
Tce	tricloroetilo



- y para el grupo hidroxilo (que se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de treonina y serina)

5	tBu	tert-butilo
	Bn	benzilo
	Trt	trilito

10 Los derivados de aminoácidos 9-fluorenilmetoxicarbonil-(Fmoc)-protegidos son utilizados preferentemente como miembros constituyentes para la construcción de miméticos de bucle de horquilla  $\beta$  fijados a matriz según la fórmula I. Para la desprotección, es decir, para la separación del grupo Fmoc, se puede utilizar 20% de piperidina en DMF o 2% DBU/2% piperidina en DMF.

15 La cantidad del reactivo, es decir, del derivado de aminoácido, es habitualmente de 1 a 20 equivalentes basado en los miliequivalentes por gramo (meq/g) de carga del soporte sólido funcionalizado (típicamente 0,1 a 2,85 meq/g para resinas de poliestireno) pesadas originalmente en el tubo de reacción. Se pueden utilizar equivalentes adicionales de reactivos, en caso necesario, para llevar la reacción a su terminación en un tiempo razonable. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector, son reinsertados en el bloque de reserva y el aparato es fijado. Se inicia el paso de gas a través del colector para proporcionar un entorno controlado, por ejemplo, nitrógeno, argón, aire y similares. El flujo de gas puede ser también calentado o enfriado antes de pasar por el colector. El calentamiento o refrigeración de los pocillos de reacción se consigue por calentamiento del bloque de reacción o enfriamiento exterior con isopropanol/hielo seco y similares para conseguir las reacciones sintéticas deseadas. La agitación se consigue por agitación o por agitación magnética (dentro del tubo de reacción). Las estaciones de trabajo preferentes (no obstante, sin que ello sea limitativo) son la estación Labsourcer's Combi-chem y el sintetizador MultiSyn Tech's-Syro.

25 La formación de enlaces de amida requiere la activación del grupo  $\alpha$ -carboxilo para la etapa de acilación. Cuando esta activación es llevada a cabo por medio de las carbodiimidias habitualmente utilizadas tal como dicitohexilcarbodiimida (DCC, Sheehan & Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067-1068) o diisopropilcarbodiimida (DIC, Sarantakis y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 73, 336-342), la dicitohexilurea y diisopropilurea resultantes son respectivamente insoluble y soluble en los disolventes utilizados en general. En una variación del método de carbodiimida se incluye 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, König & Geiger, Chem. Ber 1970, 103, 788-798) como aditivo a la mezcla de acoplamiento. El HOBt impide la deshidratación, suprime la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las lentas reacciones de acoplamiento. Ciertos reactivos de fosfonio han sido utilizados como reactivos de acoplamiento directo, tales como benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio hexafluorofosfato (BOP, Castro y otros, Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis 1976, 751-752), o benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato (Py-BOP, Coste y otros, Tetra-hedron Lett. 1990, 31, 205-208), o 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), o hexafluorofosfato (HBTU, Knorr y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930), o 1-benzotriazol-1-[bis(dimetil-amino)metilén]-5-cloro-hexafluorofosfato-1,3-óxido (HCTU); estos reactivos de fosfonio son también adecuados para formación in situ de ésteres de HOBt con los derivados de aminoácido protegidos. Más recientemente se han utilizado también como reactivos de acoplamiento difenoxifosforil azida (DPPA) u O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TATU) u O-(7-azabenzotriazol-1-il)N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU)/7-aza-1-hidroxilo benzotriazol (HOAt, Carpino y otros, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281).

45 Debido al hecho de que son esenciales las reacciones de acoplamiento casi cuantitativas, es deseable tener evidencia experimental de que se han completado las reacciones. El test de ninidrina (Kaiser y otros, Anal. Biochemistry 1970, 34, 595), en el que una respuesta colorimétrica positiva a una cantidad alícuota de péptido unido a resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, puede ser llevado a cabo de manera fácil y rápida después de cada etapa de acoplamiento. La química Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo Fmoc cuando es liberado con la base (Meienhofer y otros, Int. J. Peptide Protein Res. 1979, 13, 35-42).

50 El intermediario unido a la resina dentro de cada tubo de reacción es lavado para liberarlo del exceso de reactivos retenidos, disolventes o subproductos mediante exposición repetida a disolventes puros por uno de los dos métodos siguientes:

55 1) Los pozos de reacción son llenados con disolvente (preferentemente 5 ml), los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y colector, son sumergidos y agitados durante 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y escurridos por gravedad seguido de gas a presión aplicada a través de la entrada del colector (mientras se cierra la salida) para expulsar el disolvente;

60 2) Se retira el colector del bloque de soporte, se suministran partes alícuotas de disolvente (preferentemente 5 ml) por la parte superior de los tubos de reacción y se escurren por gravedad a través de un filtro a un recipiente receptor tal como un tubo de pruebas o vial.

65 Ambos procesos de lavado mencionados se repiten hasta unas 50 veces (preferentemente unas 10 veces),

monitorizando la eficacia del reactivo, eliminación del disolvente y subproductos por métodos tales como TLC, GC, o por inspección de los lavados.

5 El procedimiento antes descrito de reacción del compuesto unido a la resina con reactivos dentro de los pocillos de reacción seguido de la eliminación de exceso de reactivos, subproductos y disolventes se repite con cada transformación sucesiva hasta que se ha obtenido el péptido lineal completamente protegido unido a la resina.

10 Antes de que este péptido lineal completamente protegido haya sido separado del soporte sólido es posible, en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente los grupos reactivos liberados de esta manera. A este efecto, los grupos funcionales en cuestión deben estar protegidos inicialmente por un grupo protector que se pueda eliminar selectivamente sin afectar al resto de grupos protectores presentes. El Alloc (aliloxicarbonilo) es un ejemplo de dicho grupo aminoprotector que se puede eliminar selectivamente, por ejemplo, mediante Pd<sup>0</sup> y fenilsilano en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sin afectar al resto de grupos protectores tales como Fmoc, presentes en la molécula. El grupo reactivo liberado de esta manera puede ser tratado con un agente adecuado para introducir el sustituyente deseado. Así pues, por ejemplo, un grupo amino puede ser acilado por medio de un grupo acilante que corresponde al sustituyente acilo a introducir.

20 La separación del péptido lineal completamente protegido del soporte sólido se consigue por inmersión de los tubos de reacción en combinación con el bloque de soporte y colector en pocillos de reacción que contienen una solución del reactivo de fraccionamiento (preferentemente 3 a 5 ml). Se implementa la monitorización del flujo de gas, control de temperatura, agitación y reacción tal como se ha descrito anteriormente y tal como es deseable para llevar a cabo la reacción de separación. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector, son desacoplados del bloque recipiente y levantados por encima del nivel de la solución pero por debajo del borde superior de los pocillos de reacción, y se aplica presión de gas a través de la entrada del colector (cerrando la salida) para expulsar de manera eficaz la solución producto final hacia dentro de los pocillos receptáculo. La resina que permanece en los tubos de reacción es lavada a continuación de 2 a 5 veces tal como se ha indicado anteriormente con 3 a 5 ml de un disolvente apropiado para extraer (lavar) la mayor cantidad posible de producto separado. Las soluciones de producto obtenidas de esta manera son combinadas teniendo en cuenta evitar mezclas cruzadas. Las soluciones/extractos individuales son manipuladas a continuación según sea necesario para aislar los compuestos finales. Las manipulaciones típicas incluyen, sin que ello sea limitativo, evaporación, concentración, extracción de líquido/líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones adicionales en solución.

35 Las soluciones que contienen derivados de péptidos lineales completamente protegidos que han sido fraccionadas del soporte sólido y neutralizadas con una base, son evaporadas. Entonces se efectúa ciclización en solución utilizando disolventes tales como DCM, DMF, dioxano, THF y similares. Se pueden utilizar diferentes reactivos de acoplamiento anteriormente mencionados para la ciclización. La duración de la ciclización es aproximadamente de 6-48 horas, preferentemente unas 16 horas. El avance de la reacción es seguido, por ejemplo, mediante RP-HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento en Fase Inversa). Entonces el disolvente es eliminado por evaporación, el derivado péptido cíclico completamente protegido es disuelto en un disolvente no miscible con agua, tal como DCM, y la solución es extraída con agua o una mezcla de disolventes miscibles en agua, para eliminar cualquier exceso del reactivo de acoplamiento.

45 Finalmente, el derivado péptido completamente protegido es tratado con 95% TFA, 2,5% H<sub>2</sub>O, 2,5% TIS u otra combinación de agentes de barrido para llevar a cabo el fraccionamiento de grupos protectores. El tiempo de la reacción de fraccionamiento es habitualmente de 30 minutos a 12 horas, preferentemente unas 2,5 horas. Los volátiles son evaporados hasta estado seco y el péptido crudo es disuelto en 20% AcOH en agua y extraído con isopropil éter u otros disolventes que son adecuados para ello. La capa acuosa es recogida y evaporada hasta estado seco, y el derivado péptido cíclico completamente desprotegido de la fórmula I es obtenido como producto final. Dependiendo de su pureza, este derivado péptido puede ser utilizado directamente para ensayos biológicos o tiene que ser purificado adicionalmente, por ejemplo, mediante HPLC preparativa.

De manera alternativa, la separación, ciclización y desprotección completa del péptido completamente protegido con respecto al soporte sólido se pueden conseguir manualmente en recipientes de vidrio.

55 Tal como se ha mencionado anteriormente, es posible posteriormente, en caso deseado, convertir un producto completamente desprotegido de fórmula I obtenido de esta manera en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable o no aceptable obtenida de esta manera en el correspondiente compuesto libre de fórmula I o una sal diferente, farmacéuticamente aceptable. Cualesquiera de estas operaciones puede ser llevada a cabo por métodos bien conocidos en la técnica.

60 Los peptidomiméticos de horquilla β de la invención pueden ser utilizados en un amplio rango de aplicaciones para inhibir el crecimiento de microorganismos o para exterminarlos. En particular, se pueden utilizar para inhibir de manera selectiva el crecimiento de microorganismos tales como Pseudomonas aeruginosa o para eliminarlos.

65 Pueden ser utilizados, por ejemplo, como desinfectantes o conservantes para materiales tales como artículos alimenticios, cosméticos, medicamentos u otros materiales que contienen nutrientes. Los peptidomiméticos de

horquilla  $\beta$  de la invención pueden ser utilizados también para tratar o prevenir enfermedades relativas a infecciones microbianas en plantas y animales.

5 Para uso como desinfectantes o conservantes, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  pueden ser añadidos al material deseado individualmente en forma de mezclas de varios peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  o en combinación con otros agentes antimicrobianos. Los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  pueden ser administrados por sí mismos o pueden ser aplicados como formulación apropiada junto con portadores, diluyentes o excipientes bien conocidos en esta técnica.

10 Cuando se utilizan para tratar o prevenir infecciones o enfermedades relacionadas con dichas infecciones, particularmente infecciones relacionadas con enfermedades respiratorias tales como fibrosis quística, enfisema y asma; infecciones relacionadas con la piel o tejidos blandos, enfermedades tales como heridas quirúrgicas, heridas traumáticas y heridas por quemadura; infecciones relativas a enfermedades gastrointestinales tales como diarrea epidémica, enterocolitis necrotizante y tiflitis; infecciones relativas a enfermedades de los ojos tales como queratitis y endoftalmitis; infecciones relativas a enfermedades del oído tales como otitis, infecciones relativas a enfermedades CNS tales como abscesos cerebrales y meningitis, infecciones relativas a enfermedades de los huesos tales como osteocondritis y osteomielitis; infecciones relativas a enfermedades cardiovasculares tales como endocarditis y pericarditis; o infecciones relativas a enfermedades gastrourinarias tales como epididimitis, prostatitis y uretritis; los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  pueden ser administrados solos, como mezclas de varios peptidomiméticos de horquilla  $\beta$ , en combinación con otros agentes antimicrobianos o antibióticos o agentes anticáncer, o agentes antivíricos (por ejemplo, anti-HIV), o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. Los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  pueden ser administrados por sí mismos o como composiciones farmacéuticas.

25 Las composiciones farmacéuticas que comprenden peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención, pueden ser fabricados por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de tabletas con recubrimiento, levigación, emulsión, encapsulado, retención (atrapamiento) o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de manera convencional utilizando uno o varios portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables, que facilitan el proceso de los peptidomiméticos activos de horquilla  $\beta$  en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende del método de administración escogido.

30 Para administración tópica, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención pueden ser formulados como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc., tal como es bien conocido en esta técnica.

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

40 Para inyecciones, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención pueden ser formulados en soluciones adecuadas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hink, solución de Ringer o solución fisiológica salina. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De forma alternativa, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención pueden adoptar forma de polvo para combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su utilización.

45 Para administración transmucosal, se utilizan penetrantes apropiados de la barrera a permear en la formulación, tal como es conocido en esta técnica.

50 Para administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente por combinación de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  activos de la invención con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en esta técnica. Estos portadores posibilitan la formulación de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención como tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, emulsiones, suspensiones, etc., para ingestión oral del paciente a tratar. Para formulaciones orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparados de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes de unión. En caso deseado, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato sódico. En caso deseado, las formas de dosificación sólida pueden ser recubiertas con azúcar o un recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar.

60 Para preparados líquidos orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, se pueden añadir portadores adecuados, excipientes o diluyentes incluyendo agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes de sabor, conservantes, agentes de color y similares.

65 Para administración bucal, la composición puede adoptar la forma de tableta, pastillas, etc. formuladas de la manera

habitual.

Para administración por inhalación, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  de la invención son suministrados convenientemente en forma de un aerosol desde envases a presión o un nebulizador, con ayuda de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar la cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina a utilizar en un inhalador o insuflador conteniendo una mezcla de material en polvo de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención y un material en polvo base adecuado tal como lactosa o almidón.

Los compuestos pueden ser formulados también en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios, junto con bases de supositorio apropiadas tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención pueden ser formulados también como preparaciones depósito. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular) o por inyección. Para la fabricación de estas preparaciones depósito, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  de la invención pueden ser formulados con materiales polímeros o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o una resina de intercambio iónico, o sales escasamente solubles.

Además, se pueden utilizar otros sistemas de suministro farmacéutico tales como liposomas y emulsiones bien conocidos en la técnica. Otros disolventes orgánicos determinados, tales como dimetilsulfóxido pueden ser utilizados también. Adicionalmente, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención pueden ser suministrados utilizando un sistema de liberación continuada tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos conteniendo el agente terapéutico. Se han dado a conocer diferentes materiales de liberación continuada y son bien conocidos por los técnicos en la materia. Las cápsulas de liberación continuada pueden liberar, dependiendo de su naturaleza química, los compuestos durante un tiempo de unas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente terapéutico se pueden utilizar estrategias adicionales para estabilización de proteínas.

Dado que los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  de la invención pueden contener residuos cargados, pueden ser incluidos en cualquiera de las formulaciones antes descritas como tales o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención, o composiciones de los mismos, serán utilizados generalmente en una cantidad efectiva para lograr el objetivo deseado. Se debe comprender que la cantidad utilizada dependerá de una aplicación específica.

Por ejemplo, para utilizar como desinfectante o conservante, una cantidad antimicrobianamente efectiva de un péptido mimético de horquilla  $\beta$  según la invención o una composición del mismo, se aplica o se añade al material a desinfectar o conservar. Por cantidad antimicrobianamente efectiva se comprende una cantidad de peptidomimético de horquilla  $\beta$  según la invención, o una composición del mismo, que inhibe el crecimiento, o que es letal, con respecto a una población microbiana. Si bien la cantidad antimicrobianamente efectiva dependerá de una aplicación específica, para utilización como desinfectantes o conservantes, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención o composiciones de los mismos se añaden usualmente o se aplican al material a desinfectar o conservar en cantidades relativamente bajas. De manera típica, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención comprenden menos de un 5% aproximadamente en peso de una solución desinfectante o material a conservar, preferentemente menos de 1% en peso y más preferentemente menos de 0,1% en peso. Un técnico ordinario en la materia podrá determinar cantidades antimicrobianamente efectivas de peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  específicos según la invención para aplicaciones particulares sin excesiva experimentación utilizando, por ejemplo, los ensayos in vitro indicados en los ejemplos.

Para su utilización para tratar o prevenir infecciones microbianas o enfermedades relativas a dichas infecciones, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención o compuestos de los mismos son administrados o aplicados en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por cantidad terapéuticamente efectiva se comprende una cantidad efectiva para mejorar los síntomas o mejorar, tratar o prevenir infecciones microbianas o enfermedades relacionadas con las mismas. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva se encuentra dentro de la capacidad de los técnicos en la materia, especialmente teniendo en cuenta la descripción detallada que se facilita.

Igual que en el caso de los desinfectantes y conservantes, para administración tópica para tratar o prevenir infecciones bacterianas, se puede determinar una dosis terapéuticamente efectiva utilizando, por ejemplo, los ensayos in vitro facilitados en los ejemplos. El tratamiento puede ser aplicado mientras la infección es visible o incluso cuando no es visible. Un experto ordinario en la materia será capaz de determinar cantidades terapéuticamente efectivas para tratar infecciones tópicas sin experimentación excesiva.

5 Para administración sistémica, se puede estimar una dosis terapéuticamente efectiva inicialmente a partir de ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración circulante de peptidomimético de horquilla  $\beta$  en una gama que comprende el  $IC_{50}$  determinado en el cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de prueba que es letal para el 50% de un cultivo celular), el MIC, determinado en un cultivo celular (es decir, la concentración de un compuesto de prueba que es letal para 100% de un cultivo celular). Esta información puede ser utilizada para determinar de manera más precisa dosis útiles en humanos.

10 También se pueden determinar las dosificaciones iniciales a partir de datos in vivo, por ejemplo, modelos animales, utilizando técnicas bien conocidas en el sector. Un técnico ordinario en la materia podría optimizar fácilmente la administración a humanos basándose en datos de animales.

15 La cantidad de dosificación para aplicaciones como agentes antimicrobianos se puede ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Los niveles terapéuticamente efectivos en suero se pueden conseguir administrando múltiples dosis cada día.

20 En casos de administración local o toma selectiva, la concentración local efectiva de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un técnico en la materia podrá optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente efectivas sin experimentación excesiva.

25 La cantidad de peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  administrados dependerá, desde luego, del sujeto objeto de tratamiento, del peso del mismo, de la gravedad de la afectación, del modo de administración y de la evaluación del médico que efectúa la prescripción.

30 La terapia antimicrobiana puede ser repetida de manera intermitente, mientras las infecciones son detectables o incluso cuando no lo son. Se puede facilitar la terapia sola o en combinación con otros medicamentos tales como, por ejemplo, antibióticos u otros agentes antimicrobianos.

Normalmente, una dosis terapéuticamente efectiva de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  que se describen proporcionará beneficios terapéuticos sin provocar toxicidad sustancial.

35 Frecuentemente se utiliza la hemólisis de los glóbulos rojos para la evaluación de la toxicidad de compuestos relacionados tales como *protegrina* y *taquiplesina*. Los valores se indican como % de lisis de los glóbulos rojos observada para una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores típicos determinados para péptidos catiónicos tales como *protegrina* y *taquiplesina* están comprendidos entre 30-40% con valores MIC promedio de 1-5  $\mu\text{g/ml}$  en una amplia gama de patógenos. Normalmente, los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención mostrarán hemólisis en un rango de 0,5-10%, frecuentemente en un rango de 1-5%, para niveles de actividad comparables a los mencionados anteriormente para *protegrina* y *taquiplesina*. De este modo, los compuestos preferentes muestran valores bajos de MIC y bajo % de hemólisis de los glóbulos rojos observada para una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

45 La toxicidad de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando el  $LD_{50}$  (dosis letal para el 50% de la población) o el  $LD_{100}$  (dosis letal para 100% de la población). La relación de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Son preferibles los compuestos que muestran índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación que no es tóxico para su utilización en humanos. La dosificación de los peptidomiméticos de horquilla  $\beta$  según la invención se encuentra preferentemente durante un rango de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de un rango que depende de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, ruta de administración y dosis pueden ser escogidas por el médico individual en vista del estado del paciente (ver, por ejemplo, Fingl y otros, 1975, In : The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p.1).

55 Los siguientes Ejemplos muestran la invención de manera más detallada pero no están destinados a limitar su alcance en modo alguno. Las siguientes abreviaturas se utilizan en estos Ejemplos:

60 HBTU: hexafluorofosfato de 1-benzotriazol-1-yl-tetrametiluronio (Knorr y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1939);

HCTU: 1-benzotriazol-1-[bis(dimetilamino)metileno]-5cloro-hexafluorofosfato-1,3-óxido

65 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol;

DIEA: diisopropiletilamina;

HOAT: 7-aza-1-hidroxibenzotriazol;

- 5 HATU: hexafluorofosfato O-(7-aza-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (Carpino y otros Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281).

## Ejemplos

### 10 1. Síntesis de péptidos

*Acoplamiento del primer residuo de aminoácido protegido a la resina*

- 15 0,5 g de resina de 2-clorotritilcloruro (Barlos y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) (0,83 mMol/g, 0,415 mmol) se colocó en un matraz seco. La resina fue suspendida en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml) y se dejó empapar a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 minutos. La resina fue tratada con 0,415 mMol (1eq) del primer residuo de aminoácido adecuadamente protegido (ver más adelante) y 284 µl (4eq) de diisopropiletilamina (DIEA) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml), la mezcla fue agitada a 25°C durante 4 horas. La resina fue agitada (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH/DIEA: 17/2/1), 30 ml durante 30 minutos; a continuación fue lavada en el siguiente orden con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1x), DMF (1x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1x), MeOH (1x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x) y secada en vacío durante 6 horas. La carga fue típicamente de 0,6-0,7 mMol/g.

Se preparó la siguiente resina precargada: Fmoc-Pro-2-clorotritilresina.

- 25 *Síntesis del fragmento de péptido completamente protegido*

La síntesis fue llevada a cabo utilizando un sintetizador de péptidos Syro (Multisyntech) utilizando 24 a 96 pocillos de reacción. En cada recipiente se colocaron 60 mg (peso de la resina antes de la carga) de la resina anterior. Se programaron y se llevaron a cabo los siguientes ciclos de reacción:

30

Etapa	Reactivo	Tiempo
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , lavado y empapado (manual)	3 x 1 min.
2	DMF, lavado y empapado	1 x 5 min.
3	40% piperidina/DMF	2 x 5 min.
4	DMF, lavado	5 x 2 min.
5	5 equivalentes Fmoc aminoácido/DMF + 5 eq. HCTU + 5 eq. DIEA	2 x 60 min.
6	DMF, lavado	4 x 2 min.
7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , lavado (al final de la síntesis)	3 x 2 min.

Las etapas **3 a 6** se repiten para añadir cada uno de los aminoácidos.

- 35 Después de terminar la síntesis de cada uno de los fragmentos de péptidos completamente protegidos, a continuación, se utilizó para la preparación de los péptidos, el fraccionamiento, ciclización y proceso de trabajo, tal como se describe más adelante.

*Métodos analíticos:*

- 40 *Método 1:* Tiempos de retención de HPLC analítico (RT, en minutos) se determinaron utilizando una columna Jupiter Proteo (90A, 150 x 2,0 mm, cod 00F4396-BO- Phenomenex) con los siguientes disolventes **A** (H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) y **B** (CH<sub>3</sub>CN + 0,1% TFA) y el gradiente: 0 min: 95%A, 5%B; 20 min: 40%A 60%B; 21-23 min: 0%A, 100%B; 23.1-30 min: 95% A, 5%B.

- 45 *Método 2:* Los tiempos de retención de HPLC analítico (RT, en minutos) fueron determinados utilizando una

Columna Aquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 100 x 2,1 mm, cod. 186002352 – Waters) con los siguientes disolventes **A** (H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) y **B** (CH<sub>3</sub>CN + 0,085% TFA) y el gradiente: 0 min: 95%A, 5%B; 0,2 min: 95%A 5%B; 4 min: 35%A, 65%B; 4,2 min: 5% A, 95%B; 4,25 min: 95%A, 5%B; 4,9 min: 95%A, 5%B.

50

Procedimiento: Fraccionamiento, ciclización y proceso de los péptidos de esqueleto ciclizados

*Fraccionamiento, ciclización del esqueleto y purificación del péptido*

- 55 Después de la reunión de los péptidos lineales, la resina fue suspendida en 1 ml (0,39 mMol) de 1% TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) durante 3 minutos y filtrada, y el filtrado fue neutralizado con 1ml (1,17 mMol, 3 equivalentes) de 20% DIEA en

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v). Este procedimiento fue repetido dos veces para asegurar que se completara el fraccionamiento. La resina fue lavada con 2ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fue evaporada hasta estado seco.

5 El péptido lineal completamente protegido fue solubilizado en 8 ml de DMF seco. A continuación, se añadieron al péptido 2 equivalentes de HATU en DMF seco (1ml) y 4 equivalentes de DIPEA en DMF seco (1 ml) seguido de agitación durante 16 horas. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco. El péptido cíclico en crudo fue disuelto en 7 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y extraído con 10% de acetonitrilo en agua (4,5 ml) tres veces. La capa de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fue evaporada hasta estado seco. Para desproteger por completo el péptido se añadieron 3 ml de cocktail de fraccionamiento TFA:TIS:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5), y la mezcla fue agitada durante 2,5 horas. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco, y el péptido en crudo fue disuelto en 20% AcOH en agua (7 ml) y extraído con diisopropil éter (4 ml) tres veces. La capa acuosa fue recogida y evaporada hasta estado seco y el residuo fue purificado por LC-MS de fase inversa preparativa.

15 Después de liofilización, los productos fueron obtenidos en forma de un polvo blanco y analizados por *métodos* analíticos HPLC-ESI-MS, tal como se ha descrito anteriormente. Los datos analíticos comprendiendo una pureza después de HPLC y ESI-MS se indican en la Tabla 1.

20 Los **Ejemplos 1-50**, se muestran en la *Tabla 1*. Los péptidos fueron sintetizados empezando con el aminoácido L-Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial fue resina Fmoc-Pro-2-clorotritilo, que fue preparada, tal como se ha descrito en lo anterior. Los péptidos lineales, fueron sintetizados sobre soporte sólido, según el procedimiento descrito anteriormente con la secuencia siguiente: Resina-Pro-<sup>D</sup>Pro-P12-P11-P10-P9-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Los **Ejemplos 1-50**, fueron separados por fraccionamiento de la resina ciclizados, desprotegidos y purificados, tal como se ha indicado por LC-MS de fase inversa preparativa.

25 Después de iofilización los productos fueron obtenidos en forma de polvo blanco y analizados mediante *métodos* HPLC-ESI-MS, tal como se ha descrito anteriormente.

30 Los tiempos de retención de HPLC (minutos) fueron determinados utilizando los *métodos* analíticos descritos anteriormente. Los **Ejemplos 1 a 39** fueron analizados con el *método 1*, para los **Ejemplos 40-50** se utilizó el *método 2*:

35 **Ej. 1** (8,87), **Ej. 2** (9,26), **Ej. 3** (9,34), **Ej. 4** (9,45), **Ej. 5** (9,48), **Ej. 6** (9,44), **Ej. 7** (10,11), **Ej. 8** (9,99), **Ej. 9** (10,22), **Ej. 10** (9,76), **Ej. 11** (10,56), **Ej. 12** (11,37), **Ej. 13** (9,13), **Ej. 14** (9,34), **Ej. 15** (8,80), **Ej. 16** (9,23); **Ej. 17** (9,65), **Ej. 18** (9,18), **Eh, 19** (8,37), **Ej. 20** (8,86), **Ej. 21** (8,78), **Ej. 22** (9,32), **Ej. 23** (9,58), **Ej. 24** (9,27), **Ej. 25** (9,31), **Ej. 26** (9,24), **Ej. 27** (9,23), **Ej. 28** (9,34), **Ej. 29** (9,66), **Ej. 30** (9,88), **Ej. 31** (9,62), **Ej. 32** (8,86), **Ej. 33** (9,73), **Ej. 34** (10,46), **Ej. 35** (9,21), **Ej. 36** (9,80), **Ej. 37** (9,73), **Ej. 38** (9,20), **Ej. 39** (9,53), **Ej. 40** (2,07), **Ej. 41** (1,77), **Ej. 42** (1,66), **Ej. 43** (1,67), **Ej. 44** (1,81), **Ej. 45** (1,87), **Ej. 46** (1,81), **Ej. 47** (1,83), **Ej. 48** (1,79), **Ej. 49** (1,88), **Ej. 50** (2,17).

Tabla 1: Ejemplos

Ejemplo	Seq.u.ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Matriz	Pureza % <sup>a)</sup>	[M+2H] <sup>2</sup>
1	SEQ.ID NO:1	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	790,9
2	SEQ.ID NO:2	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Gly	Dab	DProLPro	95	783,9
3	SEQ.ID NO:3	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	DAla	Dab	DProLPro	95	791,1
4	SEQ.ID NO:4	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	DVal	Dab	DProLPro	95	805,2
5	SEQ.ID NO:5	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Aib	Dab	DProLPro	86	798,0
6	SEQ.ID NO:6	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Abu	Dab	DProLPro	86	797,9
7	SEQ.ID NO:7	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Leu	Dab	DProLPro	95	812,5
8	SEQ.ID NO:8	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ile	Dab	DProLPro	89	812,6
9	SEQ.ID NO:9	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Nle	Dab	DProLPro	39	812,3
10	SEQ.ID NO:10	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Nva	Dab	DProLPro	87	805,1
11	SEQ.ID NO:11	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Chg	Dab	DProLPro	82	825,7
12	SEQ.ID NO:12	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Cha	Dab	DProLPro	95	831,9
13	SEQ.ID NO:13	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Gln	Dab	DProLPro	87	819,6
14	SEQ.ID NO:14	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Asp	Dab	DProLPro	80	813,5
15	SEQ.ID NO:15	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Glu	Dab	DProLPro	83	820,1
16	SEQ.ID NO:16	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Thr	Dab	DProLPro	95	806,1
17	SEQ.ID NO:17	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Pro	Dab	DProLPro	85	804,0
18	SEQ.ID NO:18	Cit	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	819,6
19	SEQ.ID NO:19	Thr	Tyr	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	779,9
20	SEQ.ID NO:20	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Tyr	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	779,5
21	SEQ.ID NO:21	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	His	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	810,0
22	SEQ.ID NO:22	Ala	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	776,2
23	SEQ.ID NO:23	Ala	Trp	Ile	Dab	Dab	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Val	Dab	DProLPro	95	776,4
24	SEQ.ID NO:24	Thr	Trp	Ile	Lys	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	87	805,1
25	SEQ.ID NO:25	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Lys	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	805,0
26	SEQ.ID NO:26	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Lys	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	87	805,2
27	SEQ.ID NO:27	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Lys	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	805,1
28	SEQ.ID NO:28	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Lys	DProLPro	95	805,0
29	SEQ.ID NO:29	Thr	Trp	Ile	Gln	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	86	805,2
30	SEQ.ID NO:30	Thr	Trp	Ile	Gln	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Val	Dab	DProLPro	88	819,1
31	SEQ.ID NO:31	Thr	Trp	Nle	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	791,1
32	SEQ.ID NO:32	Thr	Trp	Val	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	784,0
33	SEQ.ID NO:33	Thr	Trp	Chg	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	804,4



(continuación)

Ejemplo	Sequ.ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Matriz	Pureza% <sup>a)</sup>	[M+2H] <sup>2</sup>
34	SEQ ID NO:34	Thr	Trp	Cha	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	811,5
35	SEQ ID NO:35	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Hse	Dab	DProLPro	95	806,4
36	SEQ ID NO:36	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	t-BuG	Dab	DProLPro	95	812,5
37	SEQ ID NO:37	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Cpa	Dab	DProLPro	89	811,3
38	SEQ ID NO:38	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Asn	Dab	DProLPro	95	813,1
39	SEQ ID NO:39	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Gln	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	95	805,2
40	SEQ ID NO:40	Thr	Trp	Ile	Gln	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Gln	DProLPro	95	819,6
41	SEQ ID NO:41	Thr	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	91	791,2
42	SEQ ID NO:42	Asp	Tyr	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	85	786,6
43	SEQ ID NO:43	Asp	Tyr	Ile	Dab	Orn	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	85	779,6
44	SEQ ID NO:44	Glu	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	78	805,1
45	SEQ ID NO:45	Glu	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Gln	DProLPro	82	819,2
46	SEQ ID NO:46	Glu	Trp	Ile	Dab	Lys	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dap	DProLPro	83	798,0
47	SEQ ID NO:47	Glu	Trp	Ile	Dab	Orn	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	85	798,3
48	SEQ ID NO:48	Thr	Trp	Ile	Dab	Orn	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Dab	DProLPro	86	784,1
49	SEQ ID NO:49	Thr	Trp	Ile	Dab	Orn	Dab	Dab	Trp	Dab	Dab	Ala	Ser	DProLPro	91	777,7
50	SEQ ID NO:50	Glu	Trp	Ile	Gln	Lys	Dab	Dab	Ser	Dab	Dab	Ala	Ser	DProLPro	95	805,8

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

## 2. Métodos biológicos

### 2.1. Preparación de las muestras de péptidos.

- 5 Se pesaron péptidos liofilizados en una Microbalanza (Mettler MT5) y se disolvieron en agua estéril hasta una concentración final de 1 mg/ml, si no se indica lo contrario. Las soluciones de materiales fueron mantenidas a +4°C, con protección contra la luz.

### 2.2. Actividad antimicrobiana de los péptidos.

- 10 Las actividades antimicrobianas selectivas de los péptidos fueron determinadas en placas de 96 pocillos (poliestireno Nunclon) por el método estándar de microdilución de caldo NCCLS (ver referencia 1, más adelante) con ligeras modificaciones. Los inóculos de los microorganismos se diluyeron en caldo Mueller-Hinton (MH) + 0,02% BSA y se compararon con estándar 0,5 Mcfarland para proporcionar aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml. Se añadieron partes alícuotas (50  $\mu$ l) de inoculado a 50  $\mu$ l de caldo MH + 0,02% BSA conteniendo el péptido en diluciones de dos veces en serie. Se utilizaron los siguientes microorganismos para determinar selectividad antibiótica de los péptidos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa* ATCC 27853, P8191900, P1021913, IMP 1 Livermore 3140). Las actividades antimicrobianas de los péptidos fueron expresadas como la concentración inhibitoria mínima (MIC) en  $\mu$ g/ml, para la que no se observó crecimiento visible después de 18-20 horas de incubación a 37°C.

### 2.3. Ensayo de citotoxicidad

- 25 La citotoxicidad de los péptidos con respecto a células HELA (Acc57) y células COS-7 (CRL-1651) fue determinada utilizando el ensayo de reducción MTT [ver referencias 2 y 3, a continuación]. De modo breve, el método era el siguiente: Las células HELA y COS-7 fueron sembradas a  $7,0 \times 10^3$  y, respectivamente,  $4,5 \times 10^3$  células por pocillo y cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. En este punto, se determina el tiempo cero (Tz) por reducción MTT (ver más adelante). El sobrenadante de los pocillos restantes fue descartado y se dispensaron en los pocillos medio fresco y los péptidos en diluciones serie de 12,5, 25 y 50  $\mu$ M. Cada concentración de péptido fue ensayada por triplicado. La incubación de las células fue continuada durante 48 horas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Los pocillos fueron lavados a continuación con solución salina con tampón fosfato (PBS) y a continuación con 100  $\mu$ l de reactivo MTT (0,5 mg/ml en medio RPMI1640 y, respectivamente, DMEM) fueron añadidos a los pocillos. Se efectuó incubación a 37°C durante 2 horas y, a continuación, el medio fue aspirado y se añadieron 100  $\mu$ l de isopropanol a cada pocillo. Se midió la absorbancia del producto solubilizado a 595 nm (OD<sub>595</sub>péptido). Para cada concentración se calcularon los promedios por triplicados. El porcentaje de crecimiento fue calculado de la manera siguiente:  $(OD_{595}péptido - OD_{595}Tz - OD_{595}Pocillo\ vacío) / (OD_{595}Tz - OD_{595}Pocillo\ vacío) \times 100\%$  y se representó para cada concentración de péptido.

- 40 Los valores LC 50 (Concentración Letal, definida como la concentración que extermina el 50% de las células) fue determinada para cada péptido utilizando la función de línea de tendencia de EXCEL (Microsoft Office 2000) para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0  $\mu$ M), los porcentajes de crecimiento correspondientes y el valor -50, (=TREND(C50:C0, %50: %0, -50)). Se calcularon las concentraciones GI 50 (Inhibición de crecimiento) para cada péptido utilizando una función de línea de tendencia para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0  $\mu$ g/ml), los correspondientes porcentajes y el valor 50, (=TREND(C<sub>50</sub>:C<sub>0</sub>, %<sub>50</sub>:%<sub>0</sub>, 50)).

### 2.4. Hemólisis

- 50 Se comprobaron los péptidos en cuanto a su actividad hemolítica contra glóbulos rojos humanos (hRBC). Se lavaron hRBC frescos tres veces con solución salina con tampón fosfato (PBS) por centrifugación durante 10 minutos a 2000 x g. Se incubaron péptidos con una concentración de 100  $\mu$ M con 20% v/v hRBC durante 1 hora a 37°C. La concentración final de eritrocitos era aproximadamente de  $0,9 \times 10^9$  células por ml. Se determina un valor de 0% y, respectivamente 100% de lisis de las células por incubación del hRBC en presencia de PBS solo y, respectivamente, 0,1% Triton X-100 EN H<sub>2</sub>O. Las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante fue diluido 20 veces en PBS tampón y se midió la densidad óptica (OD) de la muestra a 540 nm. El valor de lisis al 100% (OD<sub>540</sub>H<sub>2</sub>O) proporciona un OD<sub>540</sub> de aproximadamente 1,3-1,8. El porcentaje de hemólisis fue calculado del modo siguiente:  $(OD_{540}\text{ péptido} / OD_{540}H_2O) \times 100\%$ .

### 2.5. Estabilidad del plasma

- 60 Se colocaron 405  $\mu$ l de una solución de plasma/alúmina en un tubo de polipropileno (PP) y se salpicó con 45  $\mu$ l de compuesto de una solución B 100 mM, derivada de 135  $\mu$ l de PBS y 15  $\mu$ l de 1 mM de péptido en PBS, pH 7,4. Se transfirieron partes alícuotas de 150  $\mu$ l en pocillos individuales de una placa de filtro de 10 kDa (Millipore MAPPB 1010 membrana Biomax). Para "controles de 0 minutos": se colocaron 270  $\mu$ l de PBS en un tubo de PP y 30  $\mu$ l de solución base B fue añadida y mezclada. 150  $\mu$ l de solución de control fueron colocados en un pocillo de la placa de filtro y sirvió como "control filtrado".

Otros 150 µl de solución de control fueron colocados directamente en un pocillo receptor (reservado para filtrado) y sirvió como "control no filtrado". La totalidad de la placa incluyendo tapa de evaporación se incubó durante 60 minutos a 37°C. Se centrifugaron muestras de plasma (plasma de rata: Harlan Sera lab UK, plasma humano: Blutspendezentrum Zürich) como mínimo durante 2 h a 4300 rpm (3500 g) y 15°C para conseguir 100 µl de filtrado. Para muestras de "seroalbúmina" (albúmina humana recién preparada: Sigma A-4327, albúmina de rata: Sigma A-6272, todas a una concentración de 40 mg/ml en PBS) fue suficiente aproximadamente 1 hora de centrifugación. Los filtrados en la placa de PP receptora fueron analizados por LC/MS del modo siguiente: Columna: Jupiter C18 (Phenomenex), fases móviles: (A) 0,1% ácido fórmico en agua y (B) acetonitrilo, gradiente: 5%-100% (B), en 2 minutos, ionización por electropulverización, detección MRM (triple cuádruple). Las áreas pico fueron determinadas y se hizo el promedio de valores triplicados. La unión fue expresada en porcentaje del control 1 y 2 (filtrado y no filtrado punto de tiempo 0 minutos) por:  $100 - (100 \times T_{60}/T_0)$ . Se calculó entonces el promedio de estos valores.

## 2.6. Estudio farmacocinético (PK)

### Estudio farmacocinético después de administración única intravenosa, subcutánea e intraperitoneal en ratones

Se llevó a cabo el estudio farmacocinético después de una única administración intravenosa (i.v.) y subcutánea (s.c.) para el compuesto del Ejemplo 1 ("Ej. 1"). Se utilizaron ratones CD-1 (20-25 g) en el estudio. Se utilizó solución fisiológica salina y un vehículo. El volumen era de 2 ml/kg i.v., y 5 ml/kg s.c. y el péptido Ej. 1 fue inyectado para proporcionar una dosis intravenosa final de 1 mg/kg, y una dosis subcutánea de 5 mg/kg. Se retiraron aproximadamente 200-250 µl de sangre bajo anestesia ligera de isoflurano mediante punción cardíaca a intervalos de tiempo predeterminados (0, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 3, 4 y 5 horas para el estudio i.v. y 0, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8 y 10 horas para el estudio s.c.) y se añadió a tubos heparinizados. Se retiró el plasma de las células electrizadas después de centrifugación y congelación a -80°C antes de análisis HPLC-MS.

### Preparación de muestras de calibrado de plasma

Se utilizó plasma de ratón "en blanco" procedente de animales sin tratamiento. Se salpicaron partes alícuotas de plasma cada una de 0,2 ml con 50 ng de propranolol (Internal Standard, IS), (preparación de muestra por extracción de fase sólida en cartuchos OASIS® HLB (Waters)) y con cantidades conocidas del Ej. 1 para obtener 9 muestras de calibración de plasma en el rango 10-5000 nM. Los cartuchos OASIS® HLB fueron acondicionados con 1 ml de metanol y a continuación con 1 ml de 1% NH<sub>3</sub> en agua. Las muestras fueron diluidas a continuación con 700 µl de 1% NH<sub>3</sub> en agua y se cargaron. La placa fue lavada con 1 ml de metanol 1% NH<sub>3</sub> en agua 5/95. Se llevó a cabo la elución utilizando 1 ml de 0,1% TFA en metanol.

La placa conteniendo eluidos fue introducida en el sistema concentrador y llevada a estado seco. Los residuos fueron disueltos en 100 µl de ácido fórmico 0,1%/acetonitrilo, 95/5 (v/v) y analizado en una columna de fase inversa HPLC/MS (Jupiter C18, 50 x 2,0 mm, 5 µm, Phenomenex), utilizando elución de gradiente (fases móviles A: 0,1% ácido fórmico en agua, B: acetonitrilo; de 5%B a 100%B en 2 minutos).

### Preparación de muestras de plasma

Se reunieron muestras procedentes de tratamientos de animales a efectos de obtener un volumen apropiado para la extracción. Si el volumen total obtenido era menor de 0,2 ml la cantidad apropiada de plasma de ratón "en blanco" fue añadido para mantener la matriz idéntica a la curva de calibración. Las muestras fueron a continuación salpicadas con IS y procesadas tal como se ha descrito para la curva de calibración.

## Evaluación farmacocinética

Se llevaron a cabo análisis PK sobre datos recogidos (en general n=2 ó 3) utilizando el software Win Nonlin (Pharsight). El área situada debajo de la curva AUC fue calculada por la norma trapecial lineal. La media vida de eliminación fue calculada por regresión lineal en un mínimo de tres puntos de datos durante la fase de eliminación. Los intervalos de tiempo seleccionados para las determinaciones de vida media se evaluaron por el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), que debe ser, como mínimo, de 0,85 y de manera más óptima por encima de 0,96. En el caso de administración i.v., la concentración inicial  $t_{cero}$  fue determinada por extrapolación de la curva a través de los dos primeros puntos de tiempo. Finalmente, la biodisponibilidad después de administración i.p. fue calculada a partir de la porción AUCinf\_D\_obs después de s.c. con respecto a la administración i.v.

## 2.7. Ensayo de septicemia in vivo

Se utilizaron grupos de 6 ratones macho derivados CD-1 (CrI.) con pesos de 24±2 g. Cada uno de los ratones fue inoculado por vía intravenosa (IV) con un LD90-100 de Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) (9 x 10<sup>6</sup> CFU/0,5ml/ratón) en caldo de infusión de cerebro y corazón sin 5% de mucina. Se administraron por vía subcutánea

(SC) compuesto a las dosis de 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 y 0,1 mg/kg, vehículo (0,9% NaCl, 10 ml/kg) para probar los animales 1 hora después de la inoculación bacteriana. Asimismo, un grupo adicional fue tratado dos veces con compuesto a una dosis de 5 mg/kg a las horas 1 y 6 después de inoculación bacteriana. La mortalidad fue registrada una vez al día durante 7 días después de la inoculación bacteriana y un incremento de la supervivencia de los animales de 50 por cien o más (<sup>3</sup> 50 %) después de la inoculación bacteriana, con respecto al control del vehículo, indica un efecto antimicrobiano significativo. El MED (ED50) fue determinado por regresión no lineal utilizando Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, EE.UU.)

**2.8. Resultados**

Los resultados de los experimentos descritos en los puntos anteriores 2.2, 2.3 y 2.4, están indicados en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC en µg/ml) en caldo Mueller-Hinton, citotoxicidad y hemólisis porcentual a una concentración de 100 µl de péptido

Ej.	P. aeruginosa ATCC 27853	P. aeruginosa P8191900	P. aeruginosa P1021903	P. aeruginosa P1021913	P. aeruginosa IMP1 Livermore 3140	MIC promedio	Citotoxicidad células GI <sub>50</sub> HeLa	Hemólisis a 100 µg/ml
1	0,03	0,07	0,07	0,13	0,18	0,10	30	0,5
2	0,04	0,10	0,16	0,18	0,24	0,15	50	0,3
3	0,09	0,30	0,30	0,31	2,0	0,6	34	0,6
4	0,75	1,50	1,50	2,50	>2,0	>1	40	0,6
5	0,08	0,30	0,21	0,21	0,75	0,31	50	0,6
6	0,05	0,10	0,09	0,16	0,24	0,13	50	0,2
7	0,13	0,50	1,50	0,65	>2	>1	13	0,8
8	0,05	0,18	0,18	0,31	0,43	0,23	50	0
9	0,21	0,75	1,50	0,75	>2	>1	50	0,7
10	0,05	0,18	0,13	0,37	0,43	0,23	50	0
11	0,30	1,00	2,00	0,75	>2	>1	50	0,5
12	0,40	1,00	2,00	0,75	>2	>1	50	0,7
13	0,21	0,30	0,40	0,31	0,75	0,40	50	0,4
14	0,21	0,40	0,31	0,65	>2	>1	12	0,3
15	0,50	2,50	1,25	2,25	>2	>1	50	0,3
16	0,05	0,09	0,05	0,10	0,24	0,11	50	0,1
17	0,75	1,50	2,00	1,25	>2	>1	29	0,5
18	0,06	0,10	0,10	0,81	0,30	0,28	50	0,4
19	0,03	0,05	0,03	0,10	0,10	0,06	50	0,2
20	0,21	0,40	0,21	0,31	1,25	0,48	50	0,2
21	0,09	0,40	0,21	0,31	1,00	0,40	50	0,4
22	0,02	0,09	0,09	0,16	0,24	0,12	50	0,2
23	1,00	1,00	1,50	1,25	>2	>1	13	0,5

(continuación)

Ej.	P. aeruginosa ATCC 27853	P. aeruginosa P8191900	P. aeruginosa P1021903	P. aeruginosa P1021913	P. aeruginosa IMP1 Livermore 3140	MIC promedio	Citotoxicidad células <i>GI</i> <sub>50</sub> <i>Hela</i>	Hemólisis a 100 µg/ml
24	0,05	0,16	0,08	0,16	0,24	0,14	50	0,1
25	0,05	0,10	0,05	0,13	0,24	0,11	50	0,1
26	0,08	0,30	0,13	0,18	0,40	0,22	50	0,8
27	0,09	0,30	0,30	0,21	0,50	0,28	50	0,6
28	0,04	0,10	0,07	0,16	0,24	0,12	50	0,1
29	0,09	0,13	0,13	0,21	0,40	0,19	50	0,5
30	0,09	0,13	0,30	0,50	2,00	0,60	46	0,5
31	0,03	0,16	0,40	0,16	0,24	0,20	50	0,5
32	0,02	0,05	0,05	0,10	0,22	0,09	50	0
33	0,05	0,18	0,29	0,31	0,43	0,25	50	0,1
34	0,05	0,24	0,29	0,48	0,60	0,33	50	0
35	0,05	0,22	0,10	0,24	0,31	0,18	48	0,2
36	0,06	0,18	0,18	0,24	0,43	0,22	50	0,1
37	0,06	0,18	0,31	0,37	1,17	0,42	50	0,5
38	0,09	0,17	0,17	0,27	1,06	0,35	50	0,5
39	0,13	0,21	0,31	0,31	0,75	0,34	50	0,4
40	0,25	0,50	0,50	0,50	1,00	0,55	50	0,7
41	0,02	0,05	0,03	0,25	0,25	0,12	50	0,2
42	0,25	0,06	0,125	0,50	0,50	0,29	50	0,2
43	0,13	0,50	0,125	2,00	2,00	0,95	50	0,5
45	0,25	0,50	0,50	1,00	1,00	0,65	50	0,2
46	0,06	0,25	0,25	0,50	0,50	0,31	50	0,3
47	0,09	0,13	0,13	0,50	0,75	0,32	50	0,2
48	0,02	0,03	0,02	0,13	0,19	0,08	50	0,2
49	0,03	0,06	0,03	0,25	0,50	0,17	50	0,1
50	0,09	0,13	0,06	0,50	2,00	0,56	50	n.d.

n.d. = no determinado

Los resultados del experimento descrito en el punto anterior 2.5, se indican en la siguiente Tabla 3.

5

Tabla 3

Ej.	Estabilidad plasma humano $t_{1/2}$ (min)	Estabilidad plasma rata $t_{1/2}$ (min)
1	300	300
2	300	300
6	300	300
16	300	300
22	300	300
24	300	300
25	300	300
28	300	300
29	300	300

Ej.	Estabilidad plasma humano $t_{1/2}$ (min)	Estabilidad plasma rata $t_{1/2}$ (min)
32	300	300
35	300	300

Los resultados del experimento descrito en el punto anterior 2.6 (PK) se indican en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Parámetros	Dimensiones	Ruta de administración	
		I.V.	S.C.
HL_Lambda_z	hr	0,53	0,95
Tmax	hr	0,08	0,58
Cmax	ng/mL	1268,0	2333,3
Cmax_D	kg*ng/mL/mg	1268,0	466,7
C0	ng/mL	2174,0	-
AUCINF_obs	hr*ng/mL	679,5	4016,5
AUCINF_D_obs	hr*kg*ng/mL/mg	679,5	803,3
Vz_obs	mL/kg	1136,1	1705,6
Cl_obs	mL/hr/kg	1539,1	1249,8
Biodisponibilidad	%	100	118,2

5 Después de administración intravenosa de Ej. 1 a un nivel de dosis de 1 mg/kg de peso corporal, el Ej. 1 siguió características cinéticas intravenosas. Después del análisis PK, el Ej. 1 mostró un  $C_{inicial}$  extrapolado de 2174 ng/ml y un  $C_{max}$  observado de 1268 ng/ml a 5 minutos. Los niveles de plasma disminuyeron rápidamente a 575 y 177 ng/ml a los 15 minutos y 1 hora, respectivamente. De 0,5 a 2 horas los niveles en plasma disminuyeron con una eliminación de media vida de 0,53 h a 10,6 ng/ml a las 3 horas. El valor de AUCIF\_obs ascendió a 679,5 ng.h/ml.

10 Después de administración subcutánea de Ej. 1 a un nivel de dosis de 5 mg/kg de peso corporal, los niveles de plasma de Ej. 1 aumentaron en las primeras 0,5-1 hora y mostraron un  $C_{max}$  de 2333 ng/ml. De 0,5 a 8 horas los niveles en plasma disminuyeron con una eliminación de la vida media de 0,95 horas a 7,3 ng/ml a las 8 horas. El valor de AUCINF\_obs ascendió a 4016,5 ng.h/ml.

15 En comparación con el valor de AUC normalizado después de administración i.v. (100% absorbido, 679 ng.h/ml) de Ej. 1 absorbido después de administración s.c. ascendió a 118% (803 ng.h/ml). El valor por encima de 100% puede reflejar parcialmente una fiabilidad empeorada provocada por el número limitado de puntos o es provocada por falta de linealidad en la dosis.

20 Los resultados del experimento descrito en 2.7 (Ensayo de septicemia), anteriormente indicado, se muestran en las siguientes Tablas 5-7 a continuación.

25 Experimento de septicemia en ratones: LD90-100 de Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) (9 x 106 CFU/0,5 ml/ratón IV y después de 1 hora Ej. 1 s.c.

Tabla 5

Compuesto/dosis	Muertos	Supervivientes
Control negativo	5	1
Gentamicina, 1 mg/kg	0	6
Compuesto del Ejemplo 1 en las dosis siguientes (mg/kg)		
10 (2x5)	0	6
5	0	6
2,5	0	6
1	1	5
0,5	2	4
0,25	5	1
0,1	5	1

30 Experimento de septicemia en ratones: LD90-100 de Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) (9 x 106 CFU/05 ml/ratón IV), y después de 1 y 5 horas Ej. 40 s.c.

Tabla 6

Compuesto/dosis	Muertos	Supervivientes
Control negativo	6	0
Gentamicina, 2 x 1 mg/kg	1	5
Compuesto del Ejemplo 40 en las dosis siguientes (mg/kg)		
2x10	0	6
2x3	0	6
2x1	2	4
2 x 0,3	6	0
2 x 0,1	6	0

5 Experimento de septicemia en ratones: LD90-100 de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ( $9 \times 10^6$  CFU/05 ml/ratón IV), y después de 1 y 5 horas Ej. 50 s.c.

Tabla 7

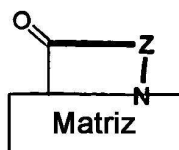
Compuesto/dosis	Muertos	Supervivientes
Control negativo	5	1
Gentamicina, 2 x 1 mg/kg	1	5
Compuesto del Ejemplo 50 en las dosis siguientes (mg/kg)		
2x10	0	6
2x3	3	3
2x1	5	1
2 x 0,3	6	0
2 x 0,1	6	0

Referencias

- 10
1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ed. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical laboratory standards, Villanova, Pa.
  2. Mossman T. J Immunol Meth 1983, 65, 55-63
  - 15 3. Berridge MV, Tan AS. Archives of Biochemistry & Biophysics 1993, 303, 474-482

REIVINDICACIONES

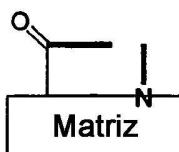
1. Compuestos de fórmula general



5

(I)

en la que



10

es <sup>D</sup>Pro<sup>L</sup>Pro ó <sup>L</sup>Pro-<sup>D</sup>Pro, y Z es una cadena de 12 residuos de α-aminoácidos, contándose las posiciones de dichos residuos de aminoácidos en dicha cadena empezando desde el terminal N de aminoácido, de manera que estos residuos de aminoácidos se encuentran en las posiciones P1 a P12 de la cadena,

- 15 - P1: Ala, Cit, Thr, Asp, Glu;
- P2: Trp, Tyr;
- P3: Ile, Val, Nle, Chg, Cha;
- P4: Dab, Lys, Gln;
- P5: Lys, Dab, Orn;
- 20 - P6: Dab, <sup>D</sup>Dab, Lys;
- P7: His, Lys, Gln, Dab;
- P8: Tyr, Trp, Ser;
- P9: Dab, Lys;
- P10: Dab, Lys;
- 25 - P11: Ala, Abu, Thr, Gly, Pro, Hse, Ile, Nva, <sup>D</sup>Ala, <sup>D</sup>Val, Aib, Nle, Chg, Cha, Gln, Asp, Glu, Cpa, t-BuG, Leu, Val, Asn;
- y
- P12: Dab, Lys, Gln, Ser;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30

2. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en la posición 1-12 son:

- 35 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- 40 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala, y
- P12: Dab

45

3. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 50 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;



5 -P8: Trp;  
-P9: Dab;  
-P10: Dab;  
-P11: Gly; y  
-P12: Dab

4. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

10 -P1: Thr;  
-P2: Trp;  
-P3: Ile;  
-P4: Dab;  
-P5: Lys;  
15 -P6: Dab;  
-P7: Dab;  
-P8: Trp;  
-P9: Dab;  
-P10: Dab;  
20 -P11: Abu; y  
-P12: Dab

5. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

25 -P1: Thr;  
-P2: Trp;  
-P3: Ile;  
-P4: Dab;  
-P5: Lys;  
30 -P6: Dab;  
-P7: Dab;  
-P8: Trp;  
-P9: Dab;  
-P10: Dab;  
35 -P11: Thr; y  
-P12: Dab

6. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

40 -P1: Thr;  
-P2: Tyr;  
-P3: Ile;  
-P4: Dab;  
-P5: Lys;  
45 -P6: Dab;  
-P7: Dab;  
-P8: Trp;  
-P9: Dab;  
-P10: Dab;  
50 -P11: Ala; y  
-P12: Dab

7. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

55 -P1: Ala;  
-P2: Trp;  
-P3: Ile;  
-P4: Dab;  
-P5: Lys;  
60 -P6: Dab;  
-P7: Dab;  
-P8: Trp;  
-P9: Dab;  
-P10: Dab;  
65 -P11: Ala; y  
-P12: Dab

8. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 5 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Lys;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- 10 -P7: Dab;
- P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- 15 -P12: Dab

9. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 20 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: Lys;
- P7: Dab;
- 25 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- 30 -P12: Dab

10. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 35 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- 40 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- 45 -P12: Lys

11. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 50 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Ile;
- P4: Gln;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- 55 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- 60 -P12: Dab

12. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- 65 -P1: Thr;
- P2: Trp;
- P3: Val;
- P4: Dab;

- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- P8: Trp;
- 5 -P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- P12: Dab

10 13. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- P1: Thr;
- P2: Trp;
- 15 -P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- 20 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Hse; y
- P12: Dab

25 14. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- P1: Thr;
- P2: Trp;
- 30 -P3: Ile;
- P4: Gln;
- P5: Lys;
- P6: Dab;
- P7: Dab;
- 35 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- P12: Gln

40 15. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- P1: Glu;
- P2: Trp;
- 45 -P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Lys;
- P6: <sup>D</sup>Dab;
- P7: Dab;
- 50 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;
- P11: Ala; y
- P12: Gln

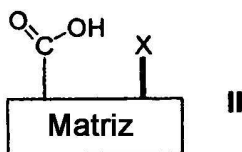
55 16. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:

- P1: Thr;
- P2: Trp;
- 60 -P3: Ile;
- P4: Dab;
- P5: Om;
- P6: <sup>D</sup>Dab;
- P7: Dab;
- 65 -P8: Trp;
- P9: Dab;
- P10: Dab;

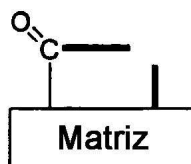
- P11: Ala; y
- P12: Ser

- 5 17. Compuesto de fórmula I, según la reivindicación 1, en el que los residuos de aminoácidos en posición 1-12 son:
- P1: Glu;
  - P2: Trp;
  - P3: Ile;
  - P4: Gln;
  - 10 -P5: Lys;
  - P6: Dab;
  - P7: Dab;
  - P8: Ser;
  - P9: Dab;
  - 15 -P10: Dab;
  - P11: Ala; y
  - P12: Ser
- 20 18. Enantioméros de los compuestos de fórmula I, según la reivindicación 1.
19. Compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, a utilizar como sustancias terapéuticamente activas.
- 25 20. Compuestos, según la reivindicación 18, que tienen actividad antimicrobiana selectiva, en particular contra *Pseudomonas aeruginosa*.
21. Composición farmacéutica que contiene un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y un portador farmacéuticamente inerte.
- 30 22. Composiciones, según la reivindicación 21, en forma apropiada para administración oral, tópica, transdérmica, inyección, bucal, transmucosal, pulmonar o inhalación.
- 35 23. Composición, según la reivindicación 21 ó 22, en forma de tabletas, grageas, cápsulas, soluciones, líquidos, geles, parches, cremas, ungüentos, jarabes, emulsiones, suspensiones, pulverizaciones, nebulizadores o supositorios.
24. Utilización de los compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento o prevención de infecciones o enfermedades relativas a dichas infecciones.
- 40 25. Utilización, según la reivindicación 24, en la que dichas infecciones están relacionadas con enfermedades respiratorias tales como fibrosis quística, enfisema y asma; relacionadas con enfermedades de la piel o de tejidos blandos, tales como heridas quirúrgicas, heridas traumáticas o heridas de quemaduras; relacionadas con enfermedades gastrointestinales, tales como diarrea epidémica, enterocolitis necrotizante o tiflitis; relacionadas con enfermedades de los ojos tales como queratitis y endoftalmitis; relacionadas con enfermedades de los oídos, tales como otitis; relacionadas con enfermedades CNS tales como absceso cerebral o meningitis; relacionadas con enfermedades de los huesos, tales como osteocondritis o osteomielitis; relacionadas con enfermedades cardiovasculares tales como endocarditis o pericarditis; relacionadas con enfermedades gastrourinales tales como epidemitis, prostatitis o uretritis; relacionadas con cáncer o relacionadas con HIV.
- 45 26. Utilización de los compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, como desinfectantes o conservantes para productos alimenticios, cosméticos, medicamentos y otros materiales que contienen nutrientes.
- 50 27. Procedimiento para la fabricación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, cuyo procedimiento comprende:
- 55 (a) acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido, que en producto final deseado se encuentra en posición 5, 6 ó 7, cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido encontrándose igualmente protegido de forma apropiada;
- 60 (b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (c) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido, que en el producto final deseado se encuentra un posición más próxima al residuo de aminoácido de terminal N, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- 65 (d) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que se ha introducido el residuo de aminoácido del terminal N;

(f) acoplar el producto obtenido con el compuesto de fórmula general



5 en la que



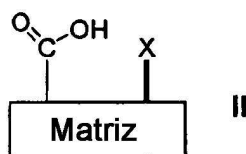
es el definido en la reivindicación 1 y X es un grupo N-protector, o de manera alternativa

- 10
- (fa) acoplado el producto obtenido en la etapa (e) con un derivado apropiadamente N-prottegido de <sup>L</sup>Pro o <sup>D</sup>Pro;
  - (fb) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido de este modo; y
  - (fc) acoplado el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-prottegido de <sup>L</sup>Pro o <sup>D</sup>Pro;
- 15
- (g) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) o (fc);
  - (h) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 12, encontrándose igualmente protegido de manera apropiada cualquier funcional que pueda estar presente en dicho residuo de aminoácido N-prottegido;
- 20
- (i) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
  - (j) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más lejos de la posición 12, estando igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- 25
- (k) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
  - (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos de aminoácidos hayan sido introducidos;
  - (m) en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir apropiadamente los grupos reactivos liberado de esta forma;
- 30
- (n) separar el producto obtenido del soporte sólido;
  - (o) ciclizar el producto fraccionado del soporte sólido;
  - (p) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes o grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácido y, en caso deseado, cualesquiera grupos protectores que pueden encontrarse adicionalmente presentes en la molécula; y
- 35
- (q) en caso deseado, convertir el producto obtenido en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir la sal farmacéuticamente aceptable o no aceptable obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre de fórmula I o en una sal farmacéuticamente aceptable distinta.

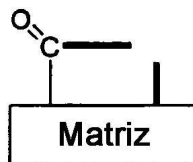
28. Procedimiento para la fabricación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende

40

(a') acoplar un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general



45 en la que



es el definido en la reivindicación 1 y X es un grupo N-protector o alternativamente

- 5 (a'a) acoplar dicho soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N-  
 protegido de <sup>L</sup>Pro o <sup>D</sup>Pro;  
 (a'b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido; y  
 (a'c) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-protegido de <sup>L</sup>Pro o <sup>D</sup>Pro;
- 10 (b') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (a') o (a'c);  
 (c') acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el  
 producto final deseado se encuentra en posición 12, cualquier grupo funcional que pueda encontrarse  
 presente en dicho derivado aminoácido N-protegido estando igualmente protegido de forma apropiada;  
 (d') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- 15 (e') acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el  
 producto final deseado se encuentra una posición más alejada de la posición 12, estando igualmente  
 protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado  
 aminoácido N-protegido;
- (f) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- 20 (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que se han introducido todos los residuos de aminoácidos;  
 (h') en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales presentes en la molécula y  
 sustituyendo de manera apropiada los grupos reactivos liberados de este modo;
- (i') separar el producto obtenido del soporte sólido;
- (j') ciclizar el producto fraccionado del soporte sólido;
- 25 (k') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la  
 cadena de residuos de aminoácido y, en caso deseado, cualesquiera grupos protectores que puedan  
 encontrarse adicionalmente presentes en la molécula; y
- (l') en caso deseado, convertir el producto obtenido en una sal farmacéuticamente aceptable o inaceptable  
 obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre de fórmula I o en una sal farmacéuticamente  
 aceptable distinta.
- 30

29. Modificación del proceso de la reivindicación 27 ó 28 para la fabricación de compuestos, según la reivindicación 18, en el que se utilizan enantiómeros de todos los materiales virales iniciales.