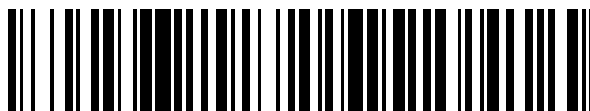


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 250**

51 Int. Cl.:

C07K 5/08 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08865440 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014** **EP 2235041**

54 Título: **Compuestos antimicrobianos**

30 Prioridad:

20.12.2007 GB 0724951

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.06.2014

73 Titular/es:

**LYTIX BIOPHARMA AS (100.0%)
Tromsø Science Park P.O. Box 6447
9294 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**STENSEN, WENCHE;
HAUG, BENGT ERIK;
REKDAL, ØYSTEIN y
SVENDSEN, JOHN SIGURD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 468 250 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

Compuestos antimicrobianos

5 La presente invención se refiere a moléculas bioactivas, en particular a péptidos que exhiben actividad antimicrobiana.

10 Los péptidos y sus derivados se han reconocido durante mucho tiempo como moléculas terapéuticamente interesantes. Una amplia diversidad de organismos usan péptidos como parte del mecanismo de defensa del hospedador. Se han aislado péptidos antimicrobianos de especies tan diversas como bacterias y mamíferos. En general, estos péptidos tienen una carga neta positiva y una propensión a formar estructuras anfífilas de hélices α o láminas β tras la interacción con la bicapa fosfolipídica externa en las membranas de las células bacterianas. En la mayoría de los casos, se desconocen los mecanismos moleculares detallados de la acción de los antibióticos, aunque se cree que ciertos péptidos clasificados como péptidos de clase L (líticos) interactúan con las membranas de las células bacterianas, probablemente formando canales de iones o poros.

15 La mayoría de los péptidos antibacterianos conocidos comprenden 10 o más, en general 20 o más aminoácidos, y este número de aminoácidos es necesario para proporcionar una longitud suficiente para que el péptido, en general en forma de hélice α , abarque la membrana celular bacteriana y forme un poro. Tal mecanismo es la manera generalmente aceptada en la que la mayoría de tales péptidos ejercen su actividad citotóxica.

20 La síntesis de los péptidos antibacterianos de la técnica anterior puede ser difícil, y en general requiere que los péptidos sean sintetizados por bacterias u otros organismos que se pueden cultivar y recolectar para proporcionar el péptido de interés, y normalmente son necesarias etapas de procesamiento adicionales tras el aislamiento del producto directo de la traducción. Si se pudieran identificar péptidos activos que fueran más cortos, esto posibilitaría la fabricación económica mediante la síntesis a partir de los bloques de construcción de aminoácidos o di- o tri-péptidos disponibles. Además, los péptidos cortos ofrecerían ventajas para la bioadministración. Existe una demanda creciente de antibióticos que se puedan administrar sin la necesidad de una inyección, tal como mediante inhalación y absorción a través de los capilares sanguíneos de las fosas nasales.

25 La búsqueda de antibióticos nuevos se ha llevado a cabo con una urgencia particular, debido al número creciente de cepas bacterianas que están exhibiendo resistencia a los fármacos conocidos y usados de forma generalizada. Las personas que trabajan en los campos de la medicina, así como en agricultura, protección medioambiental y seguridad alimentaria, necesitan constantemente agentes antibacterianos nuevos, y pueden tener que tratar a una población o lugar determinado con varios agentes antibacterianos diferentes para combatir de manera eficaz las bacterias indeseables.

30 Como se describió en el documento WO 01/66147, recientemente se ha demostrado que, de hecho, es posible generar moléculas antibióticas pequeñas, en particular péptidos, que se cree que actúan por medio de la desestabilización de la membrana.

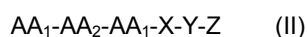
Haug (Antibacterial peptides containing non-coded aromatic amino acids, 01-05-2002, Universidad de Tromsø) describe, entre otros, la preparación de di- y tripéptidos antibacterianos catiónicos.

35 Svenson et al. (J. Med. Chem., 2007, 50, 3334-3339) se ocupa de la unión a albúmina de micropéptidos antimicrobianos catiónicos cortos y su influencia sobre el efecto bactericida in vitro.

40 Haug et al. (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 17, (2007), 2361-2364) se ocupa de la aplicación del acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura para incrementar la potencia antimicrobiana en la generación de agentes antibacterianos.

45 Los presentes inventores han identificado un pequeño grupo de péptidos modificados que exhiben una serie impresionante de características, en particular una combinación útil de actividad antimicrobiana, toxicidad baja y estabilidad, es decir, resistencia a la degradación enzimática.

50 Así, en un aspecto se proporciona un compuesto, que es un péptido, de fórmula (II)



60 en la que:

AA₁ es un aminoácido catiónico, preferiblemente lisina o arginina, pero puede ser histidina o cualquier aminoácido no codificado genéticamente o modificado que porta una carga positiva a pH 7,0.

65 AA₂ es un aminoácido con un grupo R lipófilo grande seleccionado de tributil triptófano (Tbt) o un derivado de bifenilalanina seleccionado de Phe (4-(2-Naftilo)), Phe (4-(1-Naftilo)), Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) y Bip (4-T-Bu);

X es un átomo de N, que puede estar sustituido, pero preferiblemente no está sustituido, con un grupo arilo o alquilo C₁-C₁₀ ramificado o sin ramificar, p.ej. metilo, etilo o fenilo, y este grupo puede incorporar hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O y S;

5

Y representa -R_a-R_b- en la que

R_a es C y

10 R_b es C; cada uno de R_a y R_b puede estar sustituido con grupos alquilo C₁-C₄ o sin sustituir, preferiblemente Y es -R_a-R_b- en el que R_a es C y -R_a-R_b- no está sustituido; y

15

Z es un grupo que comprende 1 grupo cíclico de 5 ó 6 átomos distintos de hidrógeno (preferiblemente átomos de C), el anillo puede estar sustituido y estas sustituciones pueden incluir, pero en general no incluirán, grupos polares, y los grupos sustituyentes adecuados incluyen halógenos, preferiblemente bromo o flúor, y grupos alquilo C₁-C₄; el resto Z incorpora un máximo de 15 átomos distintos de hidrógeno, preferiblemente 5-12, lo más preferiblemente es fenilo;

20

el enlace entre Y y Z es un enlace covalente entre R_a o R_b de Y y un átomo distinto de hidrógeno del grupo cíclico de Z.

25

Los aminoácidos no codificados genéticamente y los aminoácidos modificados adecuados que pueden proporcionar un aminoácido catiónico incluyen los análogos de lisina, arginina e histidina, tales como homolisina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico y homoarginina, así como trimetilisina y trimetilornitina, ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico, ácido 4-amino-1-carbamimidolpiperidin-4-carboxílico y 4-guanidinofenilalanina.

30

Entre los compuestos anteriores, se prefieren ciertos compuestos. En particular, los compuestos en los que el aminoácido con un grupo R lipófilo grande, mencionado de manera conveniente en la presente memoria como AA₂, se selecciona de Phe (4-(2-Naftilo)) y Tbt, son los más preferidos.

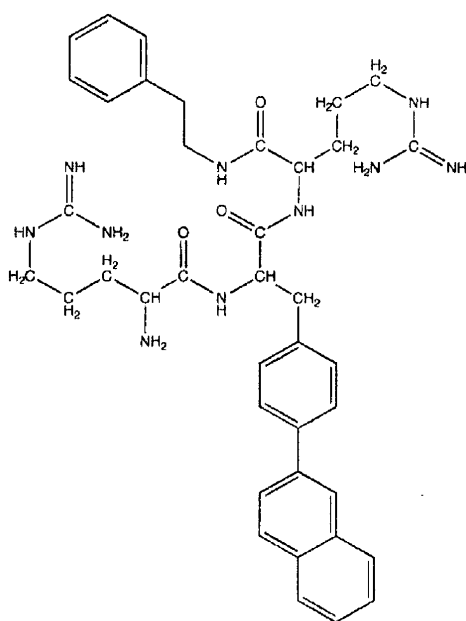
35

Otro grupo preferido de compuestos son aquellos en los que R_a y R_b están sin sustituir.

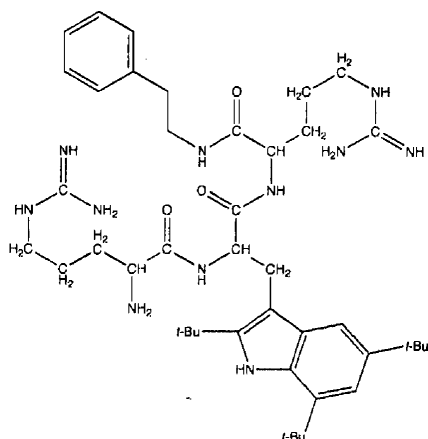
Un grupo preferido adicional de compuestos son aquellos en los que -X-Y-Z juntos son el grupo -NHCH₂CH₂Ph.

40

Los compuestos más preferidos son los siguientes:



Compuesto 1



Compuesto 2

En un aspecto adicional, se proporcionan compuestos de fórmula (II), para el uso en la terapia, en particular para el uso como un agente antimicrobiano (p.ej. antibacteriano), pero también como un agente anti-tumoral. Las moléculas de la invención también son eficaces como agentes antifúngicos, y su uso como tales en el tratamiento (que incluye la prevención) de las infecciones fúngicas constituye aspectos adicionales de la presente invención. La onicomosis es especialmente adecuada para el tratamiento con las moléculas de la invención. Las moléculas preferidas de la invención son activas como agentes tanto antifúngicos como antibacterianos.

Tales moléculas antimicrobianas también tienen usos no terapéuticos, por ejemplo en agricultura o en situaciones domésticas o industriales como agentes esterilizantes para materiales susceptibles a la contaminación microbiana. Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso ex vivo de las moléculas de la invención como agentes antimicrobianos, en particular como agentes antibacterianos.

Las moléculas exhiben actividad antimicrobiana, en particular ejercen un efecto citotóxico por medio de un mecanismo directo que afecta a la membrana, y se pueden denominar agentes antimicrobianos que actúan sobre la membrana. Estas moléculas son líticas, y desestabilizan o incluso perforan la membrana celular. Esto ofrece una ventaja terapéutica diferente respecto de los agentes que actúan sobre o que interaccionan con los componentes proteicos de las células seleccionadas como objetivo, p.ej. los receptores de la superficie celular. Aunque las mutaciones pueden dar como resultado formas nuevas de las proteínas seleccionadas como objetivo que conduzcan a la resistencia al antibiótico, es mucho menos probable que los cambios radicales en las membranas lipídicas pudieran llegar a impedir el efecto citotóxico. El efecto lítico provoca una muerte celular muy rápida, y así tiene la ventaja de destruir las bacterias antes de que tengan la oportunidad de multiplicarse. Además, las moléculas pueden tener otras propiedades útiles que destruyan o dañen a los microbios seleccionados como objetivo, p.ej. la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas, y así pueden tener actividad hacia múltiples objetivos.

Las moléculas de la invención se pueden usar para desestabilizar y/o permeabilizar las membranas celulares microbianas. 'Desestabilizar' significa una perturbación de la configuración tridimensional normal de la bicapa lipídica, que incluye, pero sin limitación, un estrechamiento de la membrana, una permeabilidad incrementada de la membrana (el general, sin implicar canales) al agua, iones o metabolitos, etc., que también altera los sistemas respiratorios de las bacterias.

Los aminoácidos β y γ , así como los aminoácidos α , se incluyen en el término 'aminoácidos', que se pueden considerar todos como unidades AA. Las moléculas de la invención incluyen los péptidos beta y depsi péptidos.

También se describen en la presente memoria los compuestos de fórmula (II) que son moléculas peptidomiméticas de los péptidos descritos y definidos en la presente memoria. Una molécula peptidomimética se caracteriza en general por retener la polaridad, el tamaño tridimensional y la funcionalidad (bioactividad) de su equivalente peptídico, pero en la que se han sustituido los enlaces peptídicos, a menudo por uniones más estables. 'Estable' significa más resistente a la degradación enzimática mediante enzimas hidrolíticas. En general, el enlace que sustituye al enlace amida (sustituto del enlace amida) conserva muchas de las propiedades del enlace amida, p.ej. la conformación, el efecto estérico, el carácter electrostático, la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno, etc. El capítulo 14 de "Drug Design and Development", Krogsgaard, Larsen, Liljefors and Madsen (Eds) 1996, Horwood Acad. Pub., proporciona una discusión general de las técnicas para el diseño y la síntesis de moléculas peptidomiméticas. En el presente caso, en el que la molécula va a reaccionar con una membrana en vez del sitio activo específico de una enzima, algunos de los problemas descritos sobre la imitación exacta de la afinidad y eficacia o la función del sustrato no son relevantes, y se puede preparar fácilmente una molécula peptidomimética basándose en una estructura peptídica dada o en un motivo de grupos funcionales necesarios. Los sustitutos de los enlaces amida adecuados incluyen los grupos siguientes: N-alkilación (Schmidt, R. et al., Int. J. Peptide Protein

Res., 1995, 46, 47), amida retro-inversa (Chorev, M y Goodman, M., Acc. Chem. Res, 1993, 26, 266), tioamida (Sherman D.B. y Spatola, A.F. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 433), tioéster, fosfonato, cetometileno (Hoffman, R.V. y Kim, H.O. J. Org. Chem., 1995, 60, 5107), hidroximetileno, fluorovinilo (Allmendinger, T. et al., Tetrahedron Lett., 1990, 31, 7297), vinilo, metilnamino (Sasaki, Y y Abe, J. Chem. Pharm. Bull. 1997 45, 13), metilendio (Spatola, A.F., Methods Neurosci, 1993, 13, 19), alcano (Lavielle, S. et. al., Int. J. Peptide Protein Res., 1993, 42, 270) y sulfonamido (Luisi, G. et al. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2391).

Los compuestos peptidomiméticos descritos en la presente memoria pueden tener 3 subunidades identificables que son aproximadamente equivalentes en tamaño y función a los aminoácidos (unidades AA). El término 'aminoácido' se puede usar así de manera conveniente en la presente memoria para hacer referencia a las subunidades equivalentes de un compuesto peptidomimético. Además, las moléculas peptidomiméticas pueden tener grupos equivalentes a los grupos R de los aminoácidos, y la discusión de la presente memoria de grupos R adecuados y de grupos modificadores N- y C-terminales se aplica, *mutatis mutandis*, a los compuestos peptidomiméticos.

Como se discute en el libro de texto mencionado anteriormente, al igual que la sustitución de enlaces amida, las moléculas peptidomiméticas pueden implicar la sustitución de restos estructurales mayores con estructuras de moléculas di- o tri-peptidomiméticas, y en este caso, se pueden usar restos miméticos que implican el enlace peptídico, tales como moléculas miméticas derivadas de azol, como sustituciones de dipéptidos. Sin embargo, se prefieren las moléculas peptidomiméticas, y así los esqueletos peptidomiméticos en los que los enlaces amida se han sustituido como se discutió anteriormente.

Las moléculas peptidomiméticas adecuadas incluyen péptidos reducidos en los que el enlace amida se ha reducido hasta una metilen-amina mediante tratamiento con un agente reductor, p.ej. borano o un hidruro reactivo tal como hidruro de litio y aluminio. Tal reducción tiene la ventaja añadida de incrementar la cationicidad global de la molécula.

Otras moléculas peptidomiméticas incluyen peptoides formados, por ejemplo, mediante la síntesis por etapas de poliglicinas funcionalizadas con amida. Ciertos esqueletos peptidomiméticos estarán fácilmente disponibles a partir de sus precursores peptídicos, tales como los péptidos que se han permitilado, y Ostresh, J.M. et al. describe métodos adecuados en Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1994) 91, 11138-11142. Las condiciones muy básicas favorecerán la metilación en N sobre la metilación en O, y darán como resultado la metilación de ciertos o todos los átomos de nitrógeno en los enlaces peptídicos y el nitrógeno N-terminal.

Los esqueletos peptidomiméticos preferidos incluyen los poliésteres, poliaminas y los derivados de los mismos, así como los alcanos y alquenos sustituidos. Las moléculas peptidomiméticas tendrán preferiblemente extremos N- y C-terminales que se pueden modificar tal como se discute en la presente memoria.

La invención proporciona las diversas moléculas de la invención para el uso en el tratamiento de infecciones microbianas. De forma similar, se describen las diversas moléculas de la invención para el uso en la desestabilización de las membranas celulares microbianas. La cantidad administrada debería ser eficaz para destruir todos o una proporción de los microbios seleccionados como objetivo, o para prevenir o reducir su velocidad de reproducción o de otra manera disminuir su efecto perjudicial en el cuerpo. El médico o el paciente deberían observar una mejora en uno o más de los parámetros o síntomas asociados a la infección. La administración también puede ser profiláctica.

Los péptidos de la invención se pueden sintetizar de cualquier manera adecuada. En general, los grupos reactivos presentes (por ejemplo amino, tiol y/o carboxilo) estarán protegidos durante toda la síntesis. La etapa final en la síntesis será así la desprotección de un derivado protegido de la invención.

En la construcción del péptido, se puede comenzar en principio en el extremo C-terminal o N-terminal, aunque se prefiere el procedimiento que comienza en el extremo C-terminal.

Los métodos de síntesis de péptidos son muy conocidos en la técnica, pero para la presente invención puede ser especialmente adecuado llevar a cabo la síntesis en un soporte de fase sólida, y tales soportes son muy conocidos en la técnica.

Se conoce una amplia selección de grupos protectores para aminoácidos, y los grupos protectores para amina adecuados pueden incluir carbobenzoilo (también denominado Z) t-butoxicarbonilo (también denominado Boc), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenceno sulfonilo (Mtr) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (también denominado Fmoc). Se apreciará que cuando el péptido se construye desde el extremo C-terminal, habrá presente un grupo protector de amina en el grupo α -amino de cada residuo nuevo añadido, y será necesario eliminarlo de manera selectiva antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

Los grupos protectores para carboxilo que se pueden emplear, por ejemplo, incluyen los grupos éster que se escinden fácilmente tales como los grupos bencilo (Bzl), p-nitrobencilo (ONb), pentaclorofenilo (OPClP), pentafluorofenilo (OPfp) o t-butilo (OtBu), así como los grupos de acoplamiento en soportes sólidos, por ejemplo grupos metilo unidos a poliestireno.

Los grupos protectores para tiol incluyen p-metoxibencilo (Mob), tritilo (Trt) y acetamidometilo (Acm).

5 Existe una amplia diversidad de procedimientos para eliminar los grupos protectores de amina y carboxilo. Estos, sin embargo, deben ser coherentes con la estrategia sintética empleada. Los grupos protectores de las cadenas laterales deben ser estables en las condiciones usadas para eliminar el grupo protector de α -amino temporal antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

10 Los grupos protectores para amina, tales como Boc, y los grupos protectores para carboxilo, tales como tBu, se pueden eliminar de manera simultánea mediante tratamiento con un ácido, por ejemplo con ácido trifluoroacético. Los grupos protectores para tiol, tales como Trt, se pueden eliminar de manera selectiva mediante el uso de un agente de oxidación tal como yodo.

15 Las referencias y técnicas para sintetizar compuestos peptidomiméticos y las otras moléculas bioactivas se describen en la presente memoria, y así son muy conocidas en la técnica.

20 Las formulaciones que comprenden uno o más compuestos de la invención mezclados con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Tales formulaciones pueden ser, entre otros, para fines farmacéuticos (que incluyen los veterinarios) o agrícolas, o para el uso como agentes esterilizantes para materiales susceptibles a la contaminación microbiana, p.ej. en la industria alimentaria. El experto en la técnica conoce los diluyentes, excipientes y vehículos adecuados.

25 Los péptidos definidos en la presente memoria exhiben una amplia actividad antimicrobiana, y así son también adecuados como agentes antivirales y antifúngicos, que tendrán aplicaciones farmacéuticas y agrícolas, y como promotores de la cicatrización de heridas o espermicidas. Todos estos usos constituyen aspectos adicionales de la invención.

30 Los aspectos adicionales de la presente invención constituyen uno o más de los péptidos de la presente invención para el uso en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas, virales o fúngicas o en el tratamiento de tumores. El paciente puede ser un paciente humano o animal.

Las composiciones según la invención se pueden presentar, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral, nasal, parenteral, intravenosa, intratumoral o rectal.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "farmacéutico" incluye las aplicaciones veterinarias de la invención.

40 Los compuestos activos definidos en la presente memoria se pueden presentar en las formas farmacológicas convencionales de administración, tales como comprimidos, comprimidos revestidos, aerosoles nasales, disoluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida.

45 Los péptidos son especialmente adecuados para la administración tópica, p.ej. en el tratamiento de úlceras diabéticas o infecciones fúngicas tales como la onicomicosis. Las formulaciones para la administración tópica están preferiblemente en forma de un gel, crema, loción, pasta u otra preparación que es más viscosa que el agua. Las formulaciones adicionales para la aplicación tópica incluyen vendajes, gasas, etc., que se han impregnado con un compuesto de la invención; cuando se impregnan tales materiales, no es necesario que la preparación que contiene un compuesto de la invención sea más viscosa que el agua. Se pueden emplear excipientes farmacéuticos convencionales, así como los métodos habituales de producción, para la preparación de estas formas. Se pueden producir comprimidos, por ejemplo, mezclando el ingrediente o ingredientes activos con excipientes conocidos, tales como, por ejemplo, con diluyentes, tales como carbonato cálcico, fosfato cálcico o lactosa, disgregantes tales como almidón de maíz o ácido algínico, aglutinantes tales como almidón o gelatina, lubricantes tales como estearato magnésico o talco, y/o agentes para obtener una liberación sostenida, tales como carboxipolimetileno, carboximetil celulosa, acetato-ftalato de celulosa, o poli(acetato de vinilo).

55 Los comprimidos, si se desea, pueden consistir en varias capas. Se pueden producir comprimidos revestidos revistiendo núcleos, obtenidos de una manera similar a los comprimidos, con agentes usados habitualmente para los revestimientos de comprimidos, por ejemplo, polivinil pirrolidona o goma laca, goma arábiga, talco, dióxido de titanio o azúcar. Para obtener una liberación sostenida o para evitar incompatibilidades, el núcleo también puede consistir en varias capas. El revestimiento del comprimido puede consistir también en varias capas para obtener una liberación sostenida, en cuyo caso se pueden usar los excipientes mencionados anteriormente para los comprimidos.

También se pueden usar sistemas de vehículos específicos de órganos.

65 Las disoluciones para inyección se pueden producir, por ejemplo, de manera convencional, tal como mediante la adición de agentes conservantes, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizantes, tales como EDTA. Las

disoluciones se rellenan después en viales o ampollas para inyección.

5 Los aerosoles nasales que son un método preferido de administración se pueden formular de forma similar en disolución acuosa y envasarlos en recipientes para aerosoles con un propelente de aerosol o proporcionar un medio para la compresión manual. Se pueden producir cápsulas que contienen uno o varios ingredientes activos, por ejemplo, mezclando los ingredientes activos con vehículos inertes, tales como lactosa o sorbitol, y relleno la mezcla en cápsulas de gelatina.

10 Se pueden producir supositorios adecuados, por ejemplo, mezclando el ingrediente activo o combinaciones de ingredientes activos con los vehículos convencionales previstos para este fin, tales como grasas naturales o polietilenglicol o derivados de los mismos.

15 Las unidades de dosis que contienen las moléculas activas contienen preferiblemente 0,1-10 mg, por ejemplo 1-5 mg del agente antimicrobiano. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además ingredientes activos adicionales, que incluyen otros agentes citotóxicos tales como otros péptidos antimicrobianos. Otros ingredientes activos pueden incluir diferentes tipos de antibióticos, citocinas, p.ej., IFN- γ , TNF, CSF y factores de crecimiento, inmunomoduladores, agentes quimioterápicos, p.ej., cisplatino o anticuerpos.

20 Las moléculas bioactivas, cuando se usan en composiciones tópicas, están presentes en general en una cantidad de al menos un 0,1% en peso. En la mayoría de los casos, no es necesario emplear el péptido en una cantidad mayor del 1,0% en peso.

25 Al emplear tales composiciones de manera sistémica (intramuscular, intravenosa, intraperitoneal), la molécula activa está presente en una cantidad para alcanzar un nivel en suero de la molécula bioactiva de al menos alrededor de 5 $\mu\text{g/ml}$. En general, no es necesario que el nivel en suero supere 500 $\mu\text{g/ml}$. Un nivel en suero preferido es alrededor de 100 $\mu\text{g/ml}$. Tales niveles en suero se pueden alcanzar incorporando la molécula bioactiva en una composición que se va a administrar de manera sistémica a una dosis de 1 a alrededor de 10 mg/kg. En general, no es necesario administrar la(s) molécula(s) a una dosis que supere 100 mg/kg.

30 También se describen métodos para tratar lugares o productos medioambientales o agrícolas, así como productos alimenticios y lugares de producción de alimentos, o superficies o herramientas, p.ej. en un medio hospitalario con una o más de las moléculas de la invención para reducir el número de bacterias viables presentes o para limitar el crecimiento o la reproducción bacteriana.

35 La invención se describirá adicionalmente a continuación con referencia a los Ejemplos no limitantes siguientes y las Figuras, en las que

40 La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento tópico de un día mediante el uso del compuesto 2 contra *Staphylococcus aureus* FDA486 en un modelo murino de infección cutánea. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se muestra en el eje Y, y el tipo de tratamiento tópico aplicado a los ratones se muestra en el eje X.

45 La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento tópico de un día mediante el uso del compuesto 2 contra *Streptococcus pyogenes* en un modelo murino de infección cutánea. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se muestra en el eje Y, y el tipo de tratamiento tópico aplicado a los ratones se muestra en el eje X.

La Figura 3 es un gráfico que muestra una comparación de la recuperación de ATP tras el apagamiento inducido por las formulaciones, y su comparación con patrones de concentración conocida (Ejemplo 5).

50 La Figura 4 es un gráfico que muestra una comparación de la liberación de ATP tras la aplicación de diferentes formulaciones (Ejemplo 5).

Ejemplos

55 Ejemplo 1

Actividades *in vitro* de las moléculas de la invención

60 2.0 Materiales y Métodos

2.1 Antimicrobianos

Los viales de Compuesto 1 y Compuesto 2 pre-pesados fueron suministrados por Lytix Biopharma AS.

65

Fórmula general del compuesto: AA ₁ -AA ₂ -AA ₁ -XYZ			
	AA ₁	AA ₂	XYZ
Compuesto 1	Arg	Phe(4-(2-Naftilo))	NHCH ₂ CH ₂ Ph
Compuesto 2	Arg	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butilriptófano	NHCH ₂ CH ₂ Ph

2.2 Aislamientos bacterianos

5 Los aislamientos bacterianos usados en este estudio fueron de diversas fuentes de todo el mundo almacenadas en GR Micro Ltd. y mantenidas, con subcultivos mínimos, congeladas a -70 °C en forma de una suspensión densa en una matriz de contenido elevado de proteínas de suero de caballo sin diluir. La especie usada y sus características se enumeran en la Tabla 1. Estos incluyen 54 bacterias grampositivas, 33 bacterias gramnegativas y 10 hongos.

2.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

10 Las CIMs se determinaron mediante el uso de los siguientes métodos de microdilución en caldo para ensayar la susceptibilidad antimicrobiana publicada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anteriormente NCCLS):

15 M7-A6 Vol. 23 N° 2, Enero de 2003, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Estándar Aprobado-Sexta Edición.

20 M100-S15 Vol. 25 N° 1, Enero de 2005, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Decimoquinto Suplemento Informativo.

M11-A6 Vol. 24 N° 2, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Estándar Aprobado-Sexta Edición.

25 M27-A2 Vol. 22 N° 15, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Estándar Aprobado-Segunda Edición.

M38-A Vol. 22 N° 16, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Estándar Aprobado.

30 Se llevaron a cabo las estimaciones de CIM mediante el uso de placas húmedas, que contenían los agentes antibacterianos o antifúngicos, preparadas en GR Micro Ltd.

35 Se usó caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes (Oxoid Ltd., Basingstoke, R.U. y Trek Diagnostic Systems Ltd., East Grinstead, R.U.) (complementado con un 5% de sangre de caballo hemolizada para *Streptococcus* spp., *Corynebacterium jeikeium* y *Listeria monocytogenes*) para las bacterias aerobias, con un inóculo inicial de aproximadamente 10⁵ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

40 Se usó medio de ensayo de Haemophilus (caldo Mueller-Hinton que contenía un 0,5% de extracto de levadura y complemento de medio de ensayo de Haemophilus que contenía 15 mg/L de hematina y NAD₂, todo obtenido de Oxoid Ltd., Basingstoke, R.U.) para *Haemophilus influenza*, y se inoculó con aproximadamente 10⁵ UFC/mL.

45 Se usó caldo de Brucella complementado (SBB) para las cepas anaerobias con un inóculo de aproximadamente 10⁶ UFC/mL. SBB es un caldo que consiste en 1% de peptona, 0,5% de 'Lab-lemco', 1% de glucosa y 0,5% de cloruro sódico complementado con 5 µg/L de hemina y 1 µg/L de vitamina K (ambas obtenidas de Sigma Aldrich Ltd.)

50 Se llevaron a cabo CIM de levaduras y hongos filamentosos en medio RPMI 1640 tamponado con MOPS (el tampón MOPS se obtuvo de Sigma Aldrich Ltd., RPMI 1640 se obtuvo de Invitrogen Ltd, Paisley, Escocia). Los inóculos de levadura estuvieron en el intervalo 7,5 x 10² - 4 x 10³ UFC/mL, y los hongos filamentosos aproximadamente 8 x 10³ - 1 x 10⁵ UFC/mL

55 Siguiendo las prácticas normales, todas las placas que contenían caldo Mueller-Hinton se prepararon por adelantado, se congelaron a -70 °C el día de la preparación y se descongelaron el día del uso. Todas las determinaciones de CIM fúngicas, de *Haemophilus* y anaerobias se llevaron a cabo en placas preparadas el mismo día.

Para determinar si la congelación afectó a la actividad de los péptidos, ciertas determinaciones de CIM se repitieron mediante el uso de placas que contenían caldo Mueller-Hinton recién preparado.

2.4 Cepas de control

60 Las siguientes cepas de control (referencia) se incluyeron en el panel de cepas ensayadas

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258

Las cepas de control siguientes fueron adicionales al panel de cepas de ensayo, y se incluyeron donde fue adecuado para comprobar que los comparadores estuvieron dentro del intervalo.

<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Eggerthella lenta</i>	ATCC 43055

5

3.0 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 1 en forma de una lista de una sola línea. Los resultados de las cepas de control repetidas se muestran en la Tabla 2. Se puede observar que los resultados de las cepas de control fueron muy reproducibles, lo que incluye los datos de las placas que contuvieron caldo Mueller Hinton almacenado congelado o usado fresco. La congelación de las placas tampoco tuvo efecto sobre la CIM para otras cepas bacterianas.

10

Los datos de CIM obtenidos son muy alentadores, e indican que los péptidos tienen un espectro de actividad bastante amplio.

15

Tabla 1: Lista de una sola línea de la actividad *in vitro* de dos péptidos antimicrobianos nuevos y un comparador contra un panel de bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y hongos.

Especie y propiedades	Compuesto 1	Compuesto 2
<i>Candida albicans</i> ATCC90028 - cepa de referencia	2	8
<i>Candida albicans</i> ATCC24433 - cepa de referencia	2	8
<i>Candida tropicalis</i> ATCC750 - cepa de referencia	2	4
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC90018 - cepa de referencia	4	16
<i>Candida (Issatchenkia) krusei</i> ATCC6258 - cepa de referencia	4	4
<i>Aspergillus niger</i> - colección de G.R. Micro	4	8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> - colección de G.R. Micro	16	8
<i>Trichophyton interdigitale</i> - colección de G.R. Micro	8	8
<i>Microsporium canis</i> - colección de G.R. Micro	8	8
<i>Cryptococcus neoformans</i> - colección de G.R. Micro	4	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922 - cepa de tipo sensible a antibióticos	32	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC32518 - cepa de tipo positivo a β -lactamasa	32	8
<i>Escherichia coli</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	32	8
<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC11228 - cepa de tipo sensible a antibióticos	32	16
<i>Klebsiella aerogenes</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	64	16
<i>Enterobacter</i> sp - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	4
<i>Enterobacter</i> sp - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	64	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 - tipo sensible a antibióticos	16	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	32	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	8
<i>Salmonella</i> sp - aislamiento clínico sensible a antibióticos	16	8
<i>Salmonella</i> sp - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	16	8
<i>Shigella</i> sp - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	8
<i>Morganella morganii</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	≥ 128	16
<i>Haemophilus influenzae</i> - aislamiento clínico negativo a β -lactamasa	≥ 128	8
<i>Haemophilus influenzae</i> - aislamiento clínico positivo a β -lactamasa	≥ 128	8
<i>Haemophilus influenzae</i> - negativo a β -lactamasa resistente a ampicilina	≥ 128	8
<i>Moraxella catarrhalis</i> - aislamiento clínico positivo a β -lactamasa	4	4
<i>Moraxella catarrhalis</i> - susceptibilidad clínica reducida a fluoroquinolona	8	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 - control sensible a antibióticos	4	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - control sensible a antibióticos	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 - cepa de control resistente a metilicina	4	2

Espece y propiedades	Compuesto 1	Compuesto 2
<i>Staphylococcus aureus</i> - aislamiento clínico resistente a meticilina	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	8	4
<i>Staphylococcus aureus</i> - aislamiento clínico intermedio a teicoplanina	4	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	16	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - aislamiento clínico resistente a meticilina	2	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	4	4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 - control sensible a antibióticos	4	4
<i>Enterococcus faecalis</i> - aislamiento clínico sensible a vancomicina	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i> - aislamiento clínico resistente a vancomicina (VanA)	16	8
<i>Enterococcus faecalis</i> - aislamiento clínico resistente a vancomicina (VanB)	16	16
<i>Enterococcus faecalis</i> - aislamiento clínico resistente a gentamicina a nivel elevado	16	8
<i>Enterococcus faecium</i> - aislamiento clínico sensible a vancomicina	8	8
<i>Enterococcus faecium</i> - aislamiento clínico resistente a vancomicina (VanA)	16	8
<i>Enterococcus faecium</i> - aislamiento clínico resistente a vancomicina (VanB)	8	4
<i>Enterococcus gallinarum</i> - aislamiento clínico resistente a vancomicina (VanC)	4	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 - control sensible a antibióticos	32	16
<i>Streptococcus pneumoniae</i> - aislamiento clínico sensible a penicilina	64	32
<i>Streptococcus pneumoniae</i> - aislamiento clínico intermedio a penicilina	32	32
<i>Streptococcus pneumoniae</i> - aislamiento clínico resistente a penicilina	32	16
<i>Streptococcus pneumoniae</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	64	32
<i>Streptococcus pyogenes</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos (MLS)	32	16
<i>Streptococcus pyogenes</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos (tipo M)	32	16
<i>Corynebacterium jeikeium</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	16
<i>Corynebacterium jeikeium</i> - aislamiento clínico multirresistente a fármacos	32	8
<i>Listeria monocytogenes</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	16
MU50 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - cepa de tipo VISA	4	4
EMRSA3 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - SSCmec tipo 1	4	4
EMRSA16 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - SSCmec tipo 2	4	4
EMRSA1 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - SSCmec tipo 3	8	8
EMRSA15 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - SSCmec tipo 4	4	4
HT2001254 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) - positivo a PVL	4	4
<i>Streptococcus agalactiae</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	16	8
<i>Streptococcus agalactiae</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	32	16
<i>Streptococcus</i> del Grupo C - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	16
<i>Streptococcus</i> del Grupo C - aislamiento clínico resistente a macrólidos	64	32
<i>Streptococcus</i> del Grupo G - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	8
<i>Streptococcus</i> del Grupo G - aislamiento clínico resistente a macrólidos	32	16
<i>Streptococcus mitis</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	16
<i>Streptococcus mitis</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	≥128	32
<i>Streptococcus constellatus</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	32
<i>Streptococcus constellatus</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	64	32
<i>Streptococcus oralis</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	32
<i>Streptococcus oralis</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	32	32
<i>Streptococcus bovis</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	32
<i>Streptococcus bovis</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	8	8
<i>Streptococcus sanguis</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	64	32
<i>Streptococcus sanguis</i> - aislamiento clínico resistente a macrólidos	32	32
<i>Clostridium perfringens</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	≥128	32
<i>Clostridium difficile</i> - aislamiento clínico sensible a antibióticos	32	16

Tabla 2: Actividad *in vitro* de dos péptidos antimicrobianos nuevos y comparadores contra cepas de control de la ATCC

5 (Incluye las cepas de control de la ATCC además del panel de las cepas de ensayo)

Cepa N°	Espece y propiedades	Compuesto		Tipo de placa
		1	2	
GP01	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 cepa de control sensible a antibióticos	8	4	MHB congelado

GP01	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 cepa de control sensible a antibióticos	4	4	MHB congelado
GP01	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 cepa de control sensible a antibióticos	4	2	MHB fresco
GN01	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 cepa de tipo sensible a antibióticos	32	8	MHB congelado
GN01	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 cepa de tipo sensible a antibióticos	32	8	MHB congelado
GN01	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 cepa de tipo sensible a antibióticos	16	8	MHB fresco
GN10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 cepa de tipo sensible a antibióticos	16	8	MHB congelado
GN10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 cepa de tipo sensible a antibióticos	32	8	MHB congelado
GN10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 cepa de tipo sensible a antibióticos	8	8	MHB fresco
GP11	<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212 cepa de control sensible a antibióticos	8	8	MHB congelado
GP11	<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212 cepa de control sensible a antibióticos	8	8	MHB congelado
GP11	<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212 cepa de control sensible a antibióticos	4	4	MHB fresco
	<i>Haemophilus influenzae</i> - ATCC 47247	32	4	HTM
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	4	8	RPMI 1640
F05	<i>Candida (Issatchenkia) krusei</i> ATCC 6258 cepa de referencia	8	8	RPMI 1640
F05	<i>Candida (Issatchenkia) krusei</i> ATCC 6258 cepa de referencia	8	8	RPMI 1640
	<i>Bacteroides fragilis</i> - ATCC 25285	64	64	SBB
	<i>Eggerthella lenta</i> - ATCC 43055	16	32	SBB

MHB, caldo Mueller Hinton; HTM, medio de ensayo de haemophilus; SBB, caldo Brucella complementado.

Ejemplo 2

5

Síntesis de Péptidos

Productos químicos

- 10 Los aminoácidos protegidos Boc-Trp-OH, Boc-Arg-OH, Boc-4-fenil-Phe y Ac-Arg-OH se adquirieron de Bachem AG, mientras Boc-4-yodofenilalanina, Boc-3,3-difenilalanina y Boc-(9-antril)alanina se adquirieron de Aldrich. Bencilamina, 2-feniletilamina, 3-fenilpropilamina, (R)-2-fenilpropilamina, (S)-2-fenilpropilamina, N,N-metilbencilamina, N,N-etilbencilamina y N,N-dibencilamina que constituyeron el extremo C-terminal del péptido se adquirieron de Fluka, excepto N-etilbencilamina, que se adquirió de Acros. Diisopropiletilamina (DIPEA), 1-hidroxibenzotriazol (1-HOBT), hexafluorofosfato de clorotripirrolidino fosfonio (PyCloP) y hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) se adquirieron de Fluka. Ácido 4-n-butilfenilborónico, ácido 4-t-butilfenilborónico, ácido 4-bifenilborónico, ácido 2-naftilborónico, tri orto-tolilfosfina, bromuro de bencilo y acetato de paladio se adquirieron de Aldrich. Los disolventes se adquirieron de Merck, Riedel-de Haën o Aldrich.

20 Preparación de aminoácidos

- 25 *Preparación de Boc-2,5,7-tri-terc-butiltriptófano-OH*: Se agita una mezcla de H₂N-Trp-OH (1,8 g, 8,8 mmol), t-BuOH (4,7 g, 63,4 mmol) en ácido trifluoroacético (19 mL) a 70 °C durante 3 horas. El volumen de la disolución translúcida de color marrón medio resultante se reduce en un rotavapor a temperatura ambiente durante 30 min, y después se tritura añadiendo 60 mL de NaHCO₃ del 7% (en peso) gota a gota. El sólido granular gris/blanco obtenido se recupera después mediante filtración a vacío y se seca a vacío a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto se aísla mediante cristalización a partir de una mezcla casi en ebullición de un 40 % de etanol en agua. Los volúmenes son en general de aproximadamente 20 mL por gramo de producto bruto.

- 30 Una primera cristalización a partir del producto bruto produce el producto aislado con un 80 - 83 % de pureza (HPLC) con respecto a las demás sustancias de la muestra, y aproximadamente un 94-95 % de pureza con respecto a los análogos conocidos de TBT. Los rendimientos en esta etapa están en el intervalo del 60 - 65 %.

- 35 *Bencilación de Boc-4-yodofenilalanina*. Se disolvió Boc-4-yodofenilalanina (1 equivalente) en metanol al 90% en agua y se neutralizó mediante la adición de carbonato de cesio hasta un pH alcalino débil (determinado mediante

papel de tornasol). El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, y el agua restante de la sal de cesio de Boc-4-yodofenilalanina se redujo adicionalmente mediante destilación azeotrópica repetida con tolueno. La sal seca resultante se disolvió en dimetilformamida (DMF), se añadió bromuro de bencilo (1,2 equivalentes) y la mezcla resultante se agitó durante 6 - 8 h. Al final de la reacción se eliminó la DMF a presión reducida, y se formó un aceite que contenía el compuesto del título. Este aceite se disolvió en acetato de etilo, y la disolución resultante se lavó con volúmenes iguales de una disolución de ácido cítrico (tres veces), una disolución de bicarbonato sódico y salmuera. El compuesto del título se aisló en forma de un aceite amarillo pálido con un rendimiento del 85% mediante cromatografía rápida con el uso de diclorometano:acetato de etilo (95:5) como eluyente. Se pudo obtener Boc-4-yodofenilalanina de bencilo cristalina mediante recristalización a partir de n-heptano.

Procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki: Se añadió Boc-4-yodofenilalanina de bencilo (1 equivalente), ácido arilborónico (1,5 equivalentes), carbonato sódico (2 equivalentes), acetato de paladio (0,05 equivalentes) y tri orto-tolilfosfina (0,1 equivalentes) a una mezcla desgasificada de dimetoxietano (6 ml/mmol de Boc-4-yodofenilalanina de bencilo) y agua (1 ml/mmol de Boc-4-yodofenilalanina de bencilo). La mezcla de reacción se mantuvo bajo argón y se calentó a 80 °C durante 4-6 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtra a través de una almohadilla corta de silicagel y carbonato sódico. La torta de filtración se lavó adicionalmente con acetato de etilo. Los filtrados se combinaron, y los disolventes se eliminaron a presión reducida. Los productos se aislaron mediante cromatografía rápida con el uso de mezclas de acetato de etilo y n-hexano como eluyente.

Preparación de Boc-Bip(n-Bu)-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 53% a partir de ácido 4-n-butilfenilborónico mediante el uso del procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki. Boc-Bip(n-Bu)-OBn se aisló mediante el uso de un eluyente de acetato de etilo:n-hexano 80:20.

Preparación de Boc-Bip(t-Bu)-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 79% a partir de ácido 4-t-butilfenilborónico mediante el uso del procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki. Boc-Bip(t-Bu)-OBn se aisló mediante el uso de un eluyente de acetato de etilo:n-hexano 80:20.

Preparación de Boc-Bip(4-Ph)-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61% a partir de ácido 4-bifenilborónico mediante el uso del procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki. Boc-Bip(4-Ph)-OBn se aisló mediante recristalización del producto bruto a partir de n-heptano.

Preparación de Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 68% a partir de ácido 2-naftilborónico mediante el uso del procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki. Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OBn se aisló mediante recristalización del producto bruto a partir de n-heptano.

Preparación de Boc-Bip(4-(1-Naftilo))-OBn: El compuesto del título se preparó a partir de ácido 2-naftilborónico mediante el uso del procedimiento general para los acoplamientos de Suzuki. Boc-Bip(4-(1-Naftilo))-OBn se aisló mediante recristalización del producto bruto a partir de n-heptano.

Procedimiento general para la desesterificación de los ésteres de bencilo: El éster de Bencilo se disuelve en DMF y se hidrogena durante 2 días a presión atmosférica mediante el uso de un 10% de Pd sobre carbono como catalizador. Al final de la reacción, el catalizador se elimina mediante filtración y el disolvente se elimina a presión reducida. Los ácidos libres se aíslan mediante recristalización a partir de éter dietílico.

Preparación de Boc-Bip(4-n-Bu)-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61% a partir de Boc-Bip(n-Bu)-OBn mediante el uso del procedimiento general para la desesterificación.

Preparación de Boc-Bip(4-t-Bu)-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 65% a partir de Boc-Bip(t-Bu)-OBn mediante el uso del procedimiento general para la desesterificación.

Preparación de Boc-Bip(4-Ph)-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61% a partir de Boc-Bip(4-ph)-OBn mediante el uso del procedimiento general para la desesterificación.

Preparación de Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 68% a partir de Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OBn mediante el uso del procedimiento general para la desesterificación.

Preparación de Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 68% a partir de Boc-Bip(4-(2-Naftilo))-OBn mediante el uso del procedimiento general para la desesterificación.

Procedimiento general para la síntesis de péptidos en fase de disolución mediante el uso de HBTU. Los péptidos se prepararon en disolución mediante acoplamiento de aminoácidos por etapas con el uso de la estrategia de protección con Boc según el siguiente procedimiento general. La parte del péptido C-terminal con un grupo amino libre (1 eq) y el aminoácido protegido con Boc (1,05 eq) y 1-hidroxibenzotriazol (1-HOBt) (1,8 eq) se disolvieron en DMF (2-4 ml/mmol de componente amino) antes de la adición de diisopropiletilamina (DIPEA) (4,8 eq). La mezcla se enfrió en hielo y se añadió hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) (1,2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1-2 h. La mezcla de reacción se diluyó mediante

acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico, bicarbonato sódico y salmuera. El disolvente se eliminó a vacío y el grupo protector Boc del péptido resultante se desprotegió en la oscuridad mediante el uso de TFA al 95% o cloruro de acetilo en metanol anhidro.

5 Formación de amida en fase de disolución mediante el uso de PyCloP. Síntesis de Boc-Arg-N(CH₂Ph)₂. Se disolvió Boc-Arg-OH (1 eq), NH(CH₂Ph)₂ (1,1 eq) y PyCloP (1 eq) en DCM seco (filtrado a través de alúmina) (2 ml) y DMF (1 ml). La disolución se enfrió en hielo, y se añadió DIPEA (2 eq) con agitación. Las disoluciones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó, y se redisolvió en acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico, bicarbonato sódico y salmuera. El disolvente se eliminó a vacío y el grupo protector Boc del péptido resultante se desprotegió en la oscuridad mediante el uso de TFA al 95%.

15 *Purificación y análisis de péptidos.* Los péptidos se purificaron mediante el uso de HPLC de fase inversa en una columna C₁₈ Delta-Pak (Waters) (100 Å, 15 µm, 25 x 100 mm) con una mezcla de agua y acetonitrilo (que contenían ambos un 0,1% de TFA) como eluyente. Los péptidos se analizaron mediante RP-HPLC con el uso de una columna analítica C₁₈ Delta-Pak (Waters) (100 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm) y espectrometría de masas con electronebulización de iones positivos en un espectrómetro de masas de cuadrupolo VG Quattro (VG Instruments Inc., Altringham, R.U.).

Ejemplo 3 Estabilidad hacia la degradación con tripsina

20 Los compuestos de fórmula AA₁-AA₂-AA₁-NHCH₂CH₂Ph se ensayaron en cuanto a su resistencia a tripsina y su actividad antimicrobiana.

Medidas y cálculo de la semivida de los péptidos

25 Cada péptido se disolvió en un tampón de NH₄HCO₃ 0,1 M (pH 6,5) para producir una concentración final de péptido de 1 mg/ml. Se preparó una disolución de tripsina disolviendo 1 mg de tripsina en 50 ml de tampón de NH₄HCO₃ 0,1 M (pH 8,2). Para la determinación de la estabilidad, se incubaron 250 µl de disolución recién hecha de tripsina y 250 µl de disolución de péptido en 2 ml de tampón de NH₄HCO₃ 0,1 M (pH 8,6) a 37 °C en un agitador orbital. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml a diferentes intervalos de tiempo, se diluyeron con 0,5 ml de agua:acetonitrilo (60:40 v/v) que contenía un 1% de TFA y se analizaron mediante RP-HPLC como se describió anteriormente. Las muestras sin adición de tripsina tomadas a las 0 h y después de 20 h a 37 °C se usaron como controles negativos. Se usó la integración del área de los picos a 254 nm para las muestras tomadas durante las primeras 5 horas del ensayo para generar el τ_{1/2}. Los péptidos que no exhibieron degradación durante las primeras 24 h se clasificaron como estables.

35 Ensayo antibacteriano

Las determinaciones de CIM en *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), cepa ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina (MRSE), cepa ATCC 27626, fueron llevadas a cabo por Toslab AS mediante el uso de los métodos habituales. Amsterdam, D. (1996) Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, en *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4ª ed. (Lorian, V., Ed.) págs. 75-78, Williams and Wilkins Co, Baltimore.

45 Tabla 3. Estabilidad de los péptidos AA₁-AA₂-AA₁-NHCH₂CH₂Ph hacia tripsina medida como la semivida (τ_{1/2}) y actividades antibacterianas expresadas como CIM.

Péptido	AA ₁	AA ₂	τ _{1/2} ^a (h)	CIM ^b (µM)		
				<i>S. aureus</i> ^c	MRSA ^d	MRSF ^e
Compuesto 6 ^f	Arg	Trp	7	145	97	81
Compuesto 5	Arg	Bip(4-Ph)	Estable	5	3	3
Compuesto 4	Lys	2,5,7-tri-terc-butiltriptófano	Estable		3	<2
Compuesto 3	Arg	Phe(4-(1-Naftilo))	20		3	3
Compuesto 2	Arg	2,5,7-tri-terc-butiltriptófano	Estable	<3	<3	<3
Compuesto 1	Arg	Phe(4-(2-Naftilo))	Estable	4	<3	<3

^a Se usó la Calculadora Médica de la Universidad de Cornell para calcular la semivida.

^b Concentración inhibitoria mínima

^c *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923

^d *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina ATCC 33591

^e *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina ATCC 27626

^f fuera del alcance de la invención

Ejemplo 4 Actividad *in vivo* del compuesto 2

50 Se infectó la piel de ratones con *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*, y posteriormente se administraron un total de tres tratamientos a intervalos de tres horas. Tres horas después del último tratamiento, se recogieron biopsias de piel y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) presentes en la

muestra de piel. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2, expresados como el número de unidades formadoras de colonias por ratón.

En el experimento 1 (Figura 1), se aplicó el compuesto 2 a la piel murina como parte de una crema o un gel que contenía un 2% (p/p) de compuesto 2. Se usó la misma crema o gel sin el compuesto 2 como control negativo (placebo). Se puede observar claramente que el número de UFCs se redujo cuando se aplicó una crema o gel que contenía el compuesto 2 a la piel murina, en comparación con el control negativo, lo que indica que el compuesto 2 ejerció un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*. La naturaleza del vehículo, crema o gel, no tuvo un efecto significativo.

En el experimento 2 (Figura 2), se aplicó el compuesto 2 en dos concentraciones diferentes, en forma de un gel del 1% o del 2%. Se usó un gel placebo y un agente antibacteriano conocido, "bactroban", como controles. Se puede observar que los geles que contienen el compuesto 2 fueron más eficaces para reducir el número de UFCs que el gel placebo o el bactroban. El gel que contuvo un 2% de compuesto 2 fue más eficaz que el gel que contuvo solamente un 1% de compuesto 2.

Ejemplo 5 Eficacia *ex vivo* del Compuesto 2 contra *Tricophyton rubrum* en un modelo de uña infectada

El objetivo de este estudio fue medir la eficacia antifúngica del Compuesto 2 (como se definió en el Ejemplo 1) para el tratamiento de la onicomiosis y compararlo con Loceryl®, comercialmente disponible, en el modelo de uña infectada TCCT™ *in vitro* de MedPharm mediante el uso de uñas humanas.

Materiales

El artículo de ensayo 1 es el Compuesto 2 en forma de una sal de HCl. El artículo de referencia 1 es la laca de uñas Loceryl®

Tabla 4: Lista de materiales usados en el estudio

Materiales	Proveedor
Anfotericina B	Sigma, R.U.
Patrones de ATP	Sigma, R.U.
BacTiter-Glo™	PROMEGA, R.U.
Etanol	Fisher, R.U.
Agar Sabouraud-Dextrosa	Oxoid, UK
Disolución de Ringer	Oxoid, UK
Hidrocloruro de terbinafina	Hetero Labs Limited, India
Tween 80	Merck, Alemania

Sistemas de ensayo

Sistema ChubTur®

- El sistema de ensayo ChubTur® ha sido diseñado por MedPharm.
- El sistema de ensayo ChubTur® se estableció mediante el uso de *T. rubrum* como hongo de ensayo, y los detalles de la fuente se describen más adelante.
- Los sistemas de ensayo ChubTur® se establecieron a temperatura ambiente. Sin embargo, la incubación de las celdas finales es a 25 ± 2 °C.

T. rubrum

Un tubo de agar Sabouraud-dextrosa (SDA) inclinado se inoculó con *T. rubrum* obtenido de la Universidad de Cardiff. El cultivo se aisló en un principio de un paciente de onicomiosis. Tras la recepción, el organismo se subcultivó en tubos de SDA inclinado a 25 °C durante 7 días, y las muestras de referencia se colocaron en una disolución de glicerol y se congelaron criogénicamente. El organismo se ha subcultivado trimestralmente para mantener la viabilidad. Los cultivos se almacenan a 25 °C durante siete días después del subcultivo, y después se almacenan a 2-8 °C hasta que son necesarios.

Métodos

Investigación preliminar

Preparación de Compuesto 2

Se preparó una disolución saturada del Compuesto 2 mediante el uso de 10 mg de Compuesto 2 en 1 ml de agua desionizada. Después de agitar durante la noche, la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante resultante se decantó y se almacenó a 2-8 °C durante un máximo de 14 días.

5 El placebo fue agua desionizada solamente.

Preparación de suspensiones de organismos

10 Preparación de agar Sabouraud-dextrosa

Brevemente, se añadieron 65 g de SDA en polvo a 1 L de agua desionizada. La mezcla se calentó hasta que el agar se disolvió visiblemente. Después se esterilizó a 121 °C durante 15 min en un autoclave, se dejó enfriar a 56 °C, antes de transferir 25 ml a placas Petri estériles de 90 mm. La placa Petri se dejó con la tapa ligeramente entreabierta (aprox. una apertura de 1 cm) durante 30 min bajo una cámara de flujo laminar antes del uso.

15

Preparación de la disolución de Ringer

20 La disolución de Ringer se preparó como se describió en el documento SOP 3080. La disolución se esterilizó después en un autoclave durante 15 min a 121 °C.

Preparación de una suspensión de *T. rubrum*

25 (i) Una placa de SDA de 90 mm se sembró con *T. rubrum* retirando suavemente el micelio y las esporas con el uso de una torunda estéril de un cultivo inclinado, y transfiriéndolas a la superficie del agar.

(ii) La placa de agar se incubó después a 25 °C durante 7 días.

30 (iii) Las esporas blancas se arrastraron después de la superficie de la placa con disolución de Ringer (20 ml).

(iv) La suspensión de esporas se filtró después a través de una gasa estéril (Smith+Nephew, Propax, gasa de 7,5 cm x 7,5 cm 8 Ply, BP Tipo 13) para eliminar el micelio y los restos de agar.

35 (v) Se llevó a cabo un recuento viable de la suspensión de esporas y el recuento de esporas se ajustó a aproximadamente 1×10^7 ufc/ml, diluyendo o concentrando las esporas adecuadamente en un volumen final de 20 ml.

Preparación de uñas

40 Antes de cortar las uñas humanas distales en segmentos de 3 mm x 3 mm, las uñas se extrajeron del congelador y se colocaron en una cámara de flujo laminar durante 30 min para equilibrarlas a temperatura ambiente. Tras esto, las uñas se lavaron brevemente por separado como sigue:

45 (i) Las uñas se sumergieron en una disolución en agua de etanol al 70% y se mezclaron en vórtex durante 1 min.

(ii) La disolución de etanol se decantó y se substituyó con una disolución reciente de etanol al 70 %, y se mezcló en vórtex durante un minuto más.

50 (iii) La disolución de etanol se decantó y se substituyó con disolución de Ringer, se mezcló en vórtex durante 1 min y se decantó y se substituyó con disolución de Ringer reciente. Este proceso de lavado con disolución de Ringer se llevó a cabo tres veces, substituyendo la disolución de lavado en cada fase.

(iv) Una vez que se completó el proceso de lavado, las uñas se colocaron en una placa Petri estéril sin tapa y se secaron al aire bajo una cámara de flujo laminar durante 30 min a temperatura ambiente.

55 Descripción del método: Celdas ChubTur®

Las celdas ChubTur® se usaron como sigue:

60 (i) Después de preparar las uñas, se midió el grosor de cada uña mediante el uso de un calibre antes de montarlas en las celdas ChubTur®.

65 (ii) Los segmentos de uñas se inocularon inicialmente en la parte inferior con *T. rubrum* (5 µL de $\sim 1 \times 10^7$ ufc/ml), se secaron en una cámara de flujo laminar y después se montaron en una celda ChubTur® con el lado dorsal hacia arriba. El contenido de la cámara receptora (volumen de $4,4 \pm 0,24$ cm³) se rellenó hasta la mitad con disolución de Ringer estéril.

- (iii) Las celdas se incubaron después a 25 ± 3 °C durante 14 días para permitir el crecimiento completo del organismo en la uña.
- 5 (iv) A los 14 días, las celdas ChubTur[®] se retiraron de la incubación y se aplicaron 10 µL del Compuesto 2 y de Loceryl[®] por separado a la superficie de la uña en posición opuesta al lado en el que se inoculó a las uñas la suspensión de organismos. Una vez que el Compuesto 2 y Loceryl[®] se aplicaron a la superficie de las uñas, las celdas se devolvieron a la incubación a 25 ± 3 °C.
- 10 (v) Se empleó un régimen de dosis múltiples en el que se aplicaron dosis a las celdas a intervalos de 24 h durante 5 días (Tabla 5). Antes de aplicar las dosis, se lavó la superficie de las uñas con disolución de Ringer estéril para eliminar cualquier exceso de Compuesto 2 y de Loceryl[®] de la dosis previa. Una vez que se hizo esto, se aplicó una dosis fresca de 10 µL de Compuesto 2 y de Loceryl[®] a las celdas adecuadas según el régimen de dosificación de la tabla 5.

15

Tabla 5: Tabla que muestra un resumen de las muestras a investigar:

Sistemas Experimentales	Artículo de ensayo	Régimen de dosificación
A (n=3)	Compuesto 2	Diario durante 5 días
B (n=3)	Loceryl [®]	
C (n=3)	Placebo	
D (n=2)	Control Infectado	-
E (n=2)	Control Sin Infectar	-

- 20 (vi) Después de la dosificación de 5 días, cuando fue posible se eliminó el exceso de Compuesto 2 y de Loceryl[®] de la superficie de las uñas, y las uñas se desmontaron de la junta de las celdas ChubTur[®]. Las uñas se analizaron después en busca de la presencia de ATP de los hongos viables.

Resultados y discusión

- 25 Investigación de interferencia: Efecto del apagamiento en presencia de la formulación.

Cualquier efecto de apagamiento de los Artículos de Ensayo se ensayó añadiendo 10 µL de Compuesto 2, Loceryl[®] y placebo a un patrón de calibración de ATP de concentración conocida (n=3) y comparándolo con el patrón solo (que no contiene Artículos de Ensayo). Se generó una curva de regresión lineal que muestra la concentración frente a las unidades de luminiscencia para los patrones de calibración de ATP en el intervalo de 10 mg/mL a 1000 ng/mL. La comparación entre el patrón de ATP en presencia de diversas matrices se presenta en la Figura 3. Se puede observar a partir del gráfico que el Compuesto 2 y Loceryl mostraron apagamiento cuando se añadieron a una concentración conocida de disolución patrón de ATP (750 ng/mL), ya que la unidad de absorbancia para las dos formulaciones mostró una disminución notable en comparación con el patrón solo. El placebo no mostró efecto de apagamiento, ya que no hubo una diferencia evidente entre el placebo y el patrón solo.

35

Recuperación de ATP tras la aplicación del fármaco

La Figura 4 muestra la variación en la liberación de ATP de muestras de uñas infectadas tras la aplicación de los Artículos de Ensayo (n=3) y su comparación con muestras de uñas de control infectadas y sin tratamiento, y sin infectar y sin tratamiento (los controles se ensayaron a n=2). Se debería indicar que cuanto menor fue la cantidad de ATP recuperada, mayor fue la eficacia del Artículo de Ensayo contra el organismo de ensayo. Se puede observar a partir del gráfico que el control infectado y sin tratar produjo una recuperación de ATP elevada esperada, mientras el control sin infectar y sin tratar produjo niveles muy bajos de ATP. También se observó que el Compuesto 2 y Loceryl[®] produjeron una recuperación baja de ATP en comparación con el control infectado y el placebo, lo que indica una eficacia elevada contra el organismo de ensayo. No hubo una diferencia evidente entre el placebo y el control infectado y sin tratar.

45

Ejemplo 6

50 Se preparó un compuesto adicional de la invención y se obtuvieron los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) contra una diversidad de bacterias.

H-Arg-Tbt-Arg-NH (CH₂)₂(2-Br-fenilo)

55

Saponificación de Boc-Arg-Tbt-Arg-OMe

Se añadió LiOH·H₂O (373 mg, 8,9 mmol) a una disolución incolora de BocArgTbtArg-OMe ·2 HCl (2,5 g, 2,9 mmol,

ES 2 468 250 T3

5 preparada como se describió en el documento WO 01/66147) en una mezcla de H₂O (5 ml) y THF (20 ml), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, durante lo cual se desarrolló rápidamente un color amarillo. Se añadió HCl diluido (52 ml) y salmuera saturada (35 ml), y la mezcla resultante se extrajo con DCM. El DCM se evaporó y el material orgánico se redisolvió en DCM, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. Masa obtenida de BocArgTbtArg-OH: 2,46 g, 93%.

Acoplamiento mediado por PyBOP

10 La sal de TFA de BocArgTbtArgCO₂H (365 mg, 0,35 mmol) se mezcló con 2-bromo fenil etil amina (53 µl) en DMF (0,9 ml), y se añadió DIPEA (120 µl). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min antes de añadir PyBOP (194 mg, 0,37 mmol), y después se dejó durante 3 horas. Antes del procesamiento, la mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml) y se lavó con 2x30 ml de disol. de ácido cítrico del 5%, 2x30 ml de disol. de NaHCO₃ del 5%, 30 ml de salmuera sat., seguido de secado sobre Na₂SO₄, filtración y concentración. El producto bruto se aisló
15 en forma de un aceite (432 mg) que contuvo un subproducto del reactivo de acoplamiento. El grupo Boc se eliminó disolviendo el producto bruto en 15 ml de HCl 4 M en 1,4-dioxano y agitándolo durante 30 min a temperatura ambiente antes de la concentración y purificación final mediante cromatografía de fase inversa.

20 Pureza: >95%, Espectrometría de masas con electronebulización (m/z, ión molecular protonado): 866,48/868,56 (calculado), 866,5/868,5 (observado).

Datos microbiológicos

Concentración inhibitoria mínima (mg/l), H-Arg-Tbt-Arg-NH-Y-Z

25

Y-Z	E. coli	S. aureus	MRSA	Str. pyogenes
-(CH ₂) ₂ -(2-BrPh)	6	3	3	3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (II)

5 AA₁-AA₂-AA₁-X-Y-Z (II)

en la que:

AA₂ es un aminoácido catiónico;

10 AA₂ es un aminoácido seleccionado de tributil triptófano (Tbt) o un derivado de bifenilalanina seleccionado de Phe (4-(2-Naftilo)), Phe (4-(1-Naftilo)), Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) y Bip (4-T-Bu);

15 X es un átomo de N, que puede estar sustituido con un grupo arilo o alquilo C₁-C₁₀ ramificado o sin ramificar, cuyo grupo puede incorporar hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O y S;

Y representa -R_a-R_b- en la que

R_a es C y

20 R_b es C; cada uno de R_a y R_b puede estar sustituido con grupos alquilo C₁-C₄ o sin sustituir; y

Z es un grupo que comprende 1 grupo cíclico de 5 ó 6 átomos distintos de hidrógeno, y el grupo cíclico puede estar sustituido; el resto Z incorpora un máximo de 15 átomos distintos de hidrógeno; y en la que

25 el enlace entre Y y Z es un enlace covalente entre R_a o R_b de Y y un átomo distinto de hidrógeno del grupo cíclico de Z,

en el que dicho compuesto es un péptido.

30 2. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 1, en el que dichos aminoácidos catiónicos son lisina y/o arginina.

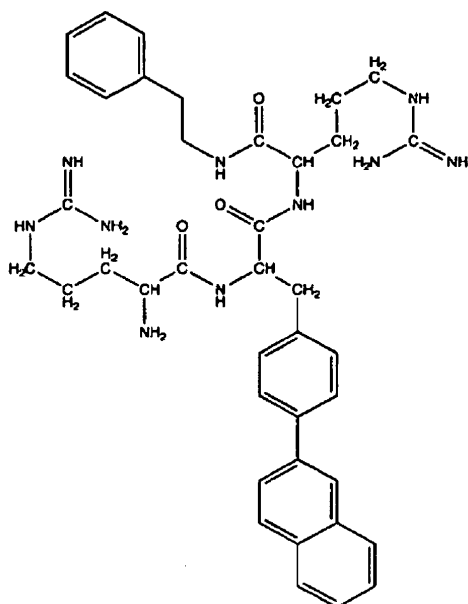
35 3. Un compuesto de fórmula (II) según cualquier reivindicación precedente, en el que X está sin sustituir.

4. Un compuesto de fórmula (II) según cualquier reivindicación precedente, en el que Y es -R_a-R_b- y está sin sustituir, preferiblemente Y es -CH₂-CH₂-.

40 5. Un compuesto de fórmula (II) según cualquier reivindicación precedente, en el que Z es fenilo.

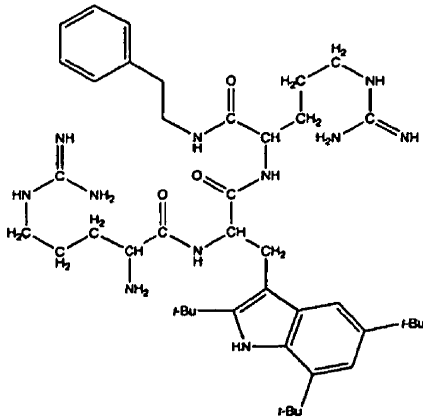
6. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente, en el que -X-Y-Z juntos son -NHCH₂CH₂Ph.

7. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente y que tiene la fórmula estructural



45

0



- 5 8. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente para el uso en la terapia.
- 9. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente para el uso como agente antimicrobiano, antifúngico o antitumoral.
- 10 10. El uso *ex vivo* de un compuesto según cualquier reivindicación precedente como agente antimicrobiano.
- 11. Una formulación que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 mezclado con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado.
- 15 12. Una formulación según la reivindicación 11, que es una formulación farmacéutica que es preferiblemente adecuada para la administración tópica.

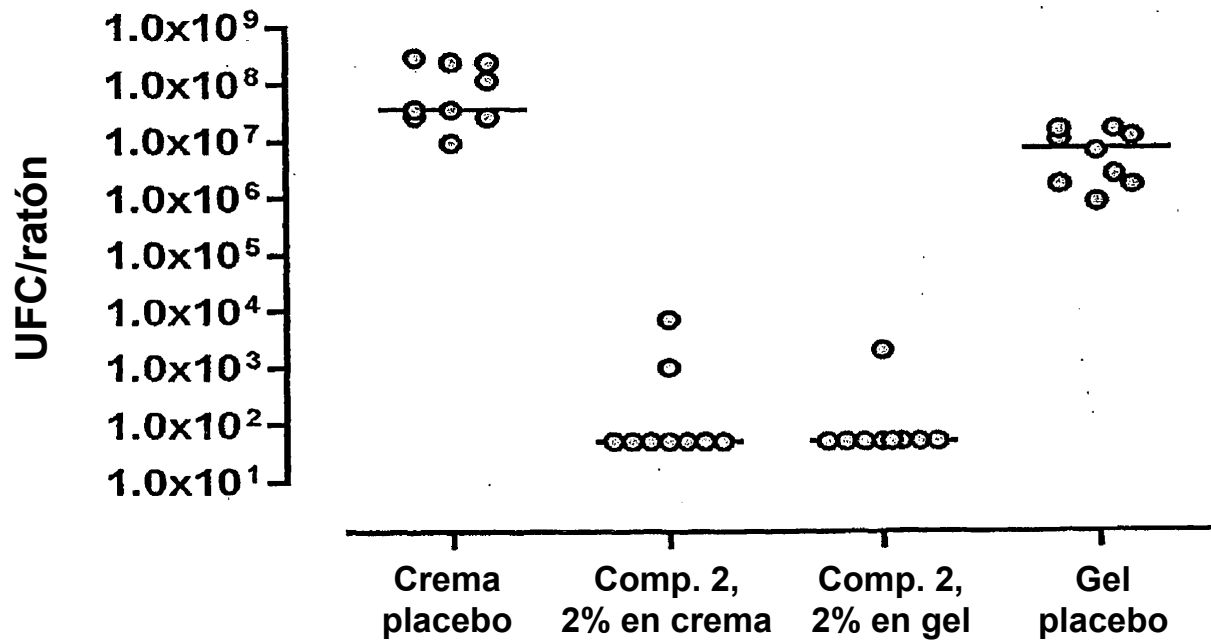


Figura 1

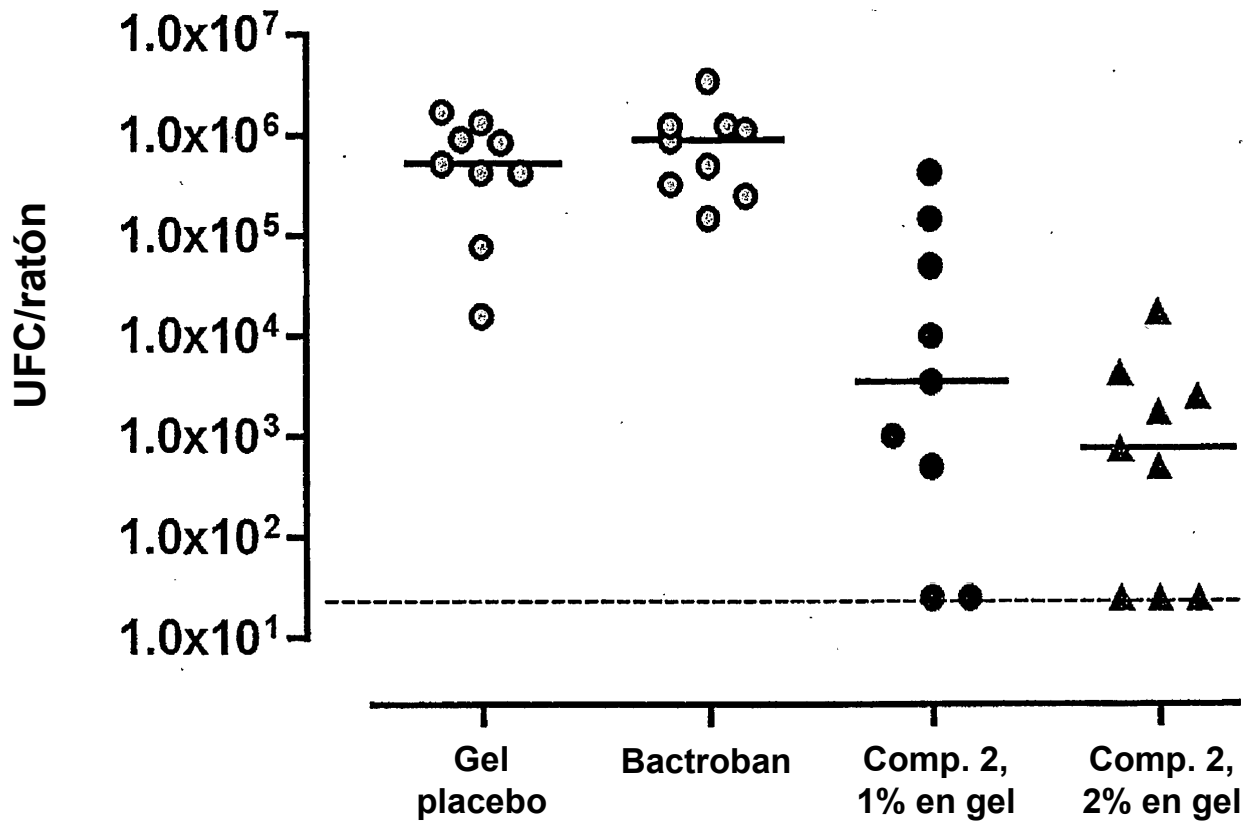


Figura 2

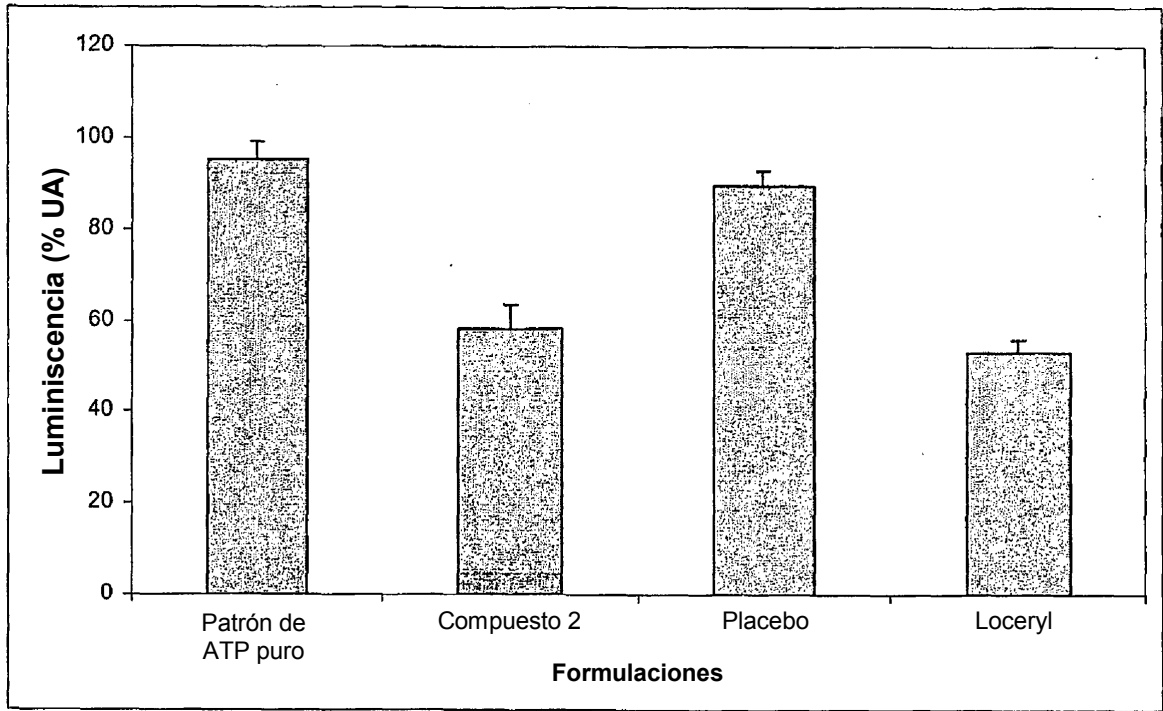


Figura 3

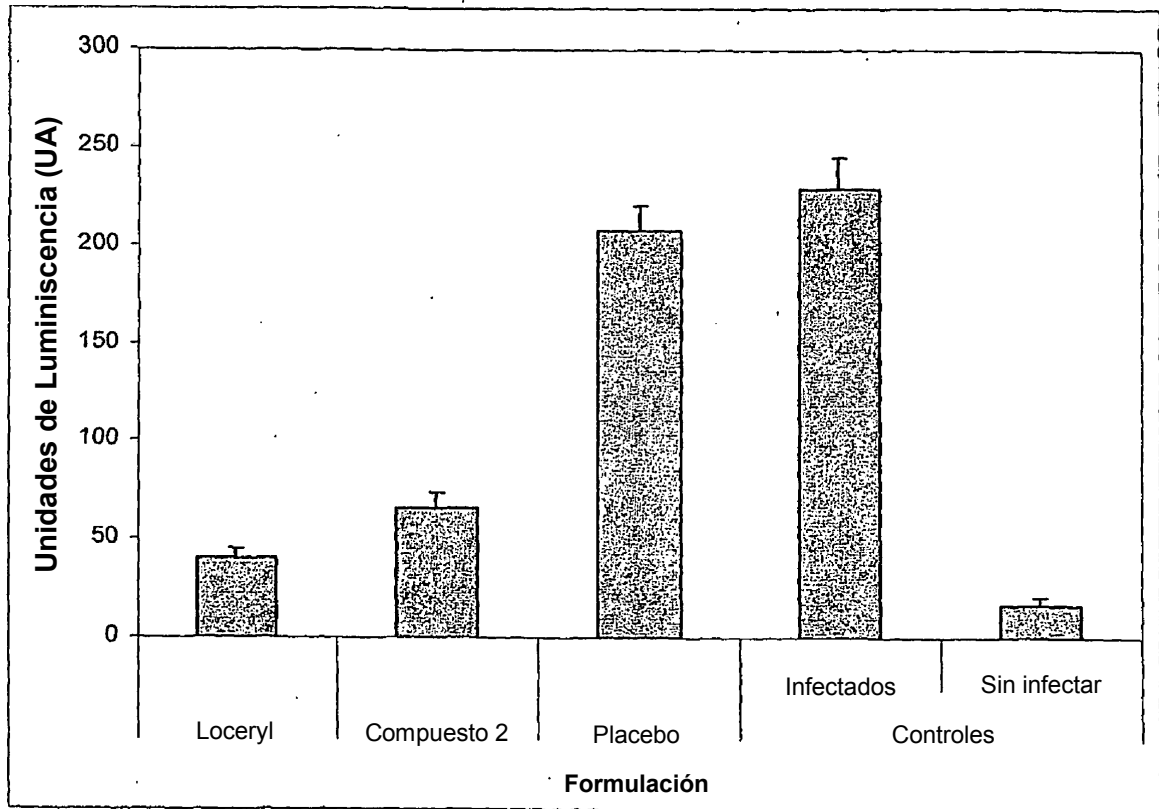


Figura 4