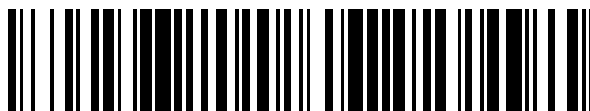


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 645**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008** **E 08867746 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2197899**

54 Título: **Péptidos cíclicos que contienen como mínimo un resto azaβ³ aminoacilado y sus usos.**

30 Prioridad:

10.10.2007 FR 0707108

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
UNIVERSITÉ DE RENNES I (33.3%) y
BAUDY FLOC'H, MICHÈLE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LAURENCIN, MATHIEU;
ZATYLYN-GAUDIN, CÉLINE;
HENRY, JOËL y
BAUDY FLOC'H, MICHÈLE**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 525 645 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

Péptidos cíclicos que contienen como mínimo un resto aza β^3 aminoacilado y sus usos.

5 **[0001]** La presente invención tiene por objeto péptidos cíclicos que incluyen al menos un resto aza β^3 aminoacilo, así como sus usos en compuestos farmacéuticos.

10 **[0002]** La mayoría de los medicamentos antiinfecciosos disponibles pertenecen a la clase de moléculas químicas pequeñas, pero en la actualidad muchos proyectos de investigación y desarrollo se interesan en la clase de péptidos terapéuticos.

15 **[0003]** De esta forma, las propiedades anti-infecciosas de algunos péptidos son tema de descubrimientos interesantes en el campo de las sustancias antibacterianas, las cepas bacterianas cada vez son más resistentes a los medicamentos antimicrobianos, de ahí la necesidad de encontrar nuevas moléculas activas.

20 **[0004]** Recientemente, un grupo ha demostrado que podía construir péptidos antibacterianos y antifúngicos muy pequeños compuestos tan solo de cuatro aminoácidos. Uno de los aminoácidos se sustituye por su enantiómero y una cadena de ácidos grasos está unida a la secuencia del péptido (C₁₆-KKkK). En ese caso, la estructura tridimensional no parece ser un punto básico para la actividad anti-infecciosa del péptido (Makovitzki A., Avrahami D., Shai, Y. PNAS, 2006, 10, 15997). En cambio, la secuencia del péptido y la longitud del ácido graso determinan el espectro de actividad antimicrobiana.

25 **[0005]** También se ha descrito una nueva familia, se trata de los péptidos cíclicos, alternando aminoácidos L y D (Fernández-López S., Kim HS., Choi E., Delgado M. Granja JR., Khazanov A., Kraehenbuehl K., Long G., Weinberger DA, Wilcoxon KM., Ghadiri MR., Nature, 2001, 412, 452; Dartois, V., Sanchez-Quesada J., Cabezas E., Chi E., Dubbelde C., Dunn C., Granja J., Gritzen C., Weinberger D., Ghadiri M.R., Parr T.R. Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49, 3302; documento WO 02/090503). Estos péptidos sintéticos con propiedades antimicrobianas se autoestructuran y pueden dirigirse a las membranas microbianas y producir en las mismas brechas conducentes a la destrucción de las bacterias *in vitro* e *in vivo*.

30 **[0006]** Esta diversidad de estructuras y de tipos de acción proporcionan a los péptidos antimicrobianos un gran potencial como agentes anti-infecciosos frente a bacterias multirresistentes. Varias moléculas se encuentran en una fase de desarrollo avanzada en el marco de infecciones localizadas y los primeros candidatos contra las infecciones sistémicas están actualmente en evaluación.

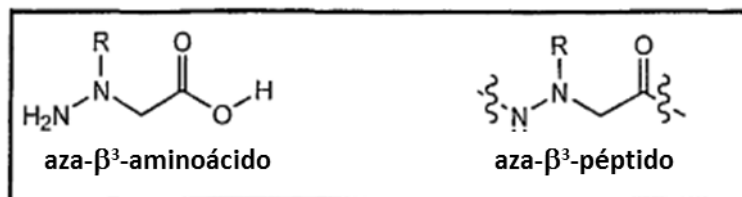
35 **[0007]** Estos péptidos antimicrobianos son uno de los elementos clave de la defensa inmune innata de los organismos multicelulares y por tanto se encuentran tanto en el reino animal como en el reino vegetal. También, las nanoestructuras basadas en péptidos ofrecen muchas posibilidades de variación y permiten acceder a nuevos objetos nanoscópicos.

40 **[0008]** Para enfrentarse a la aparición de nuevos agentes patógenos y sobre todo a la aparición de los microorganismos multirresistentes, es fundamental identificar nuevos antibióticos.

45 **[0009]** Sin embargo, la utilización de péptidos está limitada por una rápida eliminación en medio biológico, inestabilidad metabólica vinculada a su rápida degradación por peptidasas que actúan sobre los enlaces amida. Además, con la excepción de las estructuras estrictamente biológicas, existen pocos pseudopéptidos antimicrobianos biomiméticos que tengan una actividad y una estabilidad superiores al péptido natural.

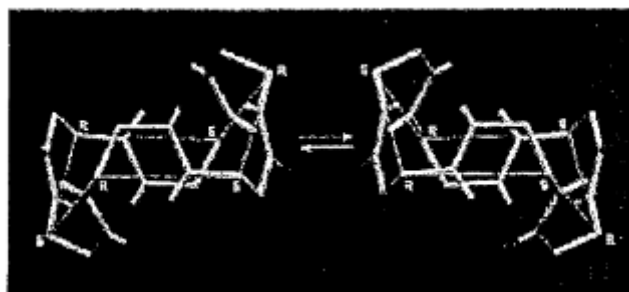
50 **[0010]** De este modo, los inventores han desarrollado la síntesis de análogos de aminoácidos, los aza β^3 -aminoácidos, que, una vez incorporados a las secuencias peptídicas, forman pseudopéptidos cuya vida útil está mejorada.

55 **[0011]** Estos aza β^3 -aminoácidos o ácidos hidrazinoacéticos N^osustituidos (Cheguillaume A., Doubli-Bounoua I., Baudy-Floc'h M., Le Grel P. Synlett, 2000, 3, 331; documento WO 2004/111086) son monómeros que se pueden considerar como derivados aza de los β^3 -aminoácidos. Los aza- β^3 -aminoácidos enlazan su cadena lateral a un átomo de nitrógeno de configuración no fijada, modificación que se traduce en una pérdida de la quiralidad del monómero si se compara la relación con los β^3 -aminoácidos. No obstante, gracias a la inversión más o menos rápida del nitrógeno, este monómero podrá imitar la orientación de la cadena lateral de un β^3 -aminoácido de configuración R o S. Por otra parte, la prolongación de la cadena con un grupo metileno aportará una cierta flexibilidad al monómero.



Los aza- β^3 -péptidos análogos aza de los β^3 -péptidos.

[0012] La capacidad de inversión de la configuración de la cadena lateral en el átomo de nitrógeno se ha validado mediante la cristalización de los aza- β^3 -hexapéptidos cíclicos. Efectivamente, El estudio mediante RX de estos cristales demuestra que los átomos de nitrógeno que soportan las cadenas laterales de estos oligómeros alternan configuraciones R y S a lo largo de la secuencia. Los aza- β^3 -ciclohexapéptidos existen, por tanto, en forma de dos invertómeros en equilibrio similares a las dos formas de silla del ciclohexano (Le Grel P., Salaün A., Potel M., Le Grel B., Lassagne F., J. Org. Chem. 2006)



Representación tridimensional de un aza- β^3 -ciclohexapéptido en el estado cristalino.

[0013] Los aza- β^3 -aminoácidos pueden adoptar las dos configuraciones y pueden formar enlaces de hidrógeno.

[0014] Los inventores han descubierto de modo sorprendente que alternando α -aminoácidos de configuración fija y aza- β^3 -aminoácidos en los péptidos cíclicos, se fija la configuración de los átomos de nitrógeno, formando de esta manera estructuras quirales que tienen las cadenas laterales cómodas para formar nanotubos que pueden perforar las membranas bacterianas.

[0015] También, la presente invención tiene por objeto péptidos cíclicos que tienen una alternancia aleatoria entre restos L- α -aminoacilos y restos aza- β^3 -aminoacilos que tienen la fórmula (A) siguiente:



en la que

R₁ representa una cadena lateral seleccionada del grupo que incluye cadenas proteogénicas y no proteogénicas, con la condición de que dos restos L- α -aminoacilo estén separados por al menos un resto aza- β^3 -aminoacilo y que el número total de los restos L- α -aminoacilo y de los restos aza- β^3 -aminoacilo esté comprendido entre 4 y 8, caracterizado por que los péptidos cíclicos se seleccionan entre hexapéptidos y octapéptidos.

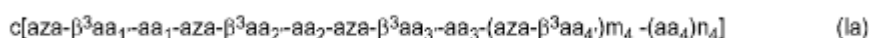
[0016] En el sentido de la presente invención se entenderá por proteogénicos todos los aminoácidos naturales o sintéticos que participan en la constitución de proteínas o de los polipéptidos, en particular: ácido aspártico (Asp o D), asparagina (Asn o N), treonina (Thr o t), serina (Ser o S), Ácido glutámico (Glu o E), glutamina (Gln o Q), glicina (Gly o G), alanina (Ala o a), cisteína (Cys o C), valina (Val o V), metionina (met o M), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), tirosina (Tiro o Y), fenilalanina (Phe o F), histidina (his o H), lisina (lys o K), triptófano (Trp o W), prolina (pro o P) y la arginina (Arg o R).

[0017] En una realización especialmente ventajosa de la invención, los péptidos cíclicos se seleccionan entre hexapéptidos y octapéptidos.

[0018] De forma ventajosa, Los restos L- α -aminoacilados se seleccionan del grupo que incluye los restos de los aminoácidos siguientes: arginina (Arg o R), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), fenilalanina (Phe o F), serina (Ser o S), treonina (Thr o T) y triptófano (Trp o W) y en los restos aza- β^3 -aminoacilos de fórmula (A), RI <4a> en el grupo que incluye los restos de aminoácidos naturales o los restos de aminoácidos no naturales.

[0019] En otra realización ventajosa de la invención los restos de aminoácidos naturales comprendidos en la estructura de los restos de aza- β^3 -aminoacilo se seleccionan del grupo que incluye los restos arginina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina y triptófano y los restos de aminoácidos no naturales se seleccionan del grupo que incluye los restos 1-naftilalanina [(1)Nal], 2-naftilalanina [(2)Nal], de 4-fenilfenilalanina (4Bip), difenilalanina (Dip), 9-antracenilalanina [(9)Ath], 4-piridilalanina [(4)Pal], 3-piridilalanina [(3)Pal], 2-piridilalanina [(2)Pal], fluorofenilalanina (4-Fpa), dodecilalanina (Ami), Nonilalanina (Non), Octilalanina (Oct), ciclohexilalanina (Cha), 4-fluoro-1-naftilalanina (4-F-I-Nal), homoserina (Hse), homo i-hidroxitreonina, y Norleucina (Nie).

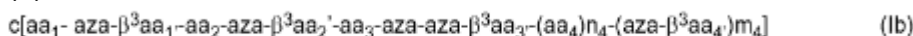
[0020] En una realización especialmente ventajosa de la invención, los péptidos cíclicos tienen la secuencia (Ia):



en la que,

cada uno de los aa_1 , aa_2 , aa_3 , y aa_4 , representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los aza- β^3aa_1 , aza- β^3aa_2 , aza- β^3aa_3 y aza- β^3aa_4 , representa independientemente entre sí un aza- β^3 -aminoacilo, que tiene la fórmula (A), y m_4 y n_4 representan cada uno simultáneamente 0 o 1,

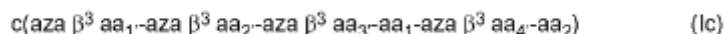
o la secuencia (Ib):



en la que,

cada uno de los aa_1 , aa_2 , aa_3 , y aa_4 , representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los aza- β^3aa_1 , aza- β^3aa_2 , aza- β^3aa_3 y aza- β^3aa_4 , representa independientemente entre sí un resto aza- β^3 -aminoácido, que tiene la fórmula (A), y m_4 y n_4 representan cada uno simultáneamente 0 o 1,

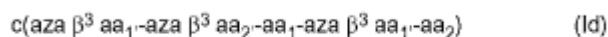
o la secuencia (Ic):



en la que,

cada uno de los aa_1 , y aa_2 representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los aza- β^3aa_1 , aza- β^3aa_2 , aza- β^3aa_3 y aza- β^3aa_4 , representa independientemente entre sí un resto aza- β^3 -aminoácido, que tiene la fórmula (A)

o la secuencia (Id):



en la que,

cada uno de los aa_1 y aa_2 representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los aza- β^3aa_1 y aza- β^3aa_2 representa independientemente entre sí un aza- β^3 -aminoacilo, que tiene la fórmula (A).

[0021] De acuerdo con una realización especial de la invención, los Péptidos cíclicos se seleccionan del grupo que incluye las secuencias siguientes:

SEC ID N° 1: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (1)Nal-Leu-aza β^3 (1)Nal-] (NafNaf),
SEC ID N° 2: c[-Lys-aza β^3 Lys-Leu-aza β^3 (1)Nal-Leu-aza β^3 (1)Nal-] (NalNal),
SEC ID N° 3: c[-Lys-aza β^3 Lys-Trp-aza β^3 Leu-Trp-aza β^3 Leu-] (TrypTryp),
SEC ID N° 4: c[-Lys-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 Leu-Trp-aza β^3 Leu-] (3KW),
SEC ID N° 5: c[-Trp-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 Lys-Trp-aza β^3 Leu-] (3K2),
SEC ID N° 6: c[-Lys-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 Lys-Trp-aza β^3 (1)Nal-] (4KW),
SEC ID N° 7: c[-Ser-aza β^3 (1)Nal-Phe-aza β^3 Lys-Thr-aza β^3 Lys-Ser-aza β^3 Lys-] (SNalF),
SEC ID N° 8: c[-Leu-aza β^3 Arg-Arg-aza β^3 (1)Nal-Leu-aza β^3 (1)Nal-] (RNaf),

SEC ID N° 9: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (1)Nal-aza β^3 Leu-aza β^3 (1)Nal-] (Nafaza),
 SEC ID N° 10: c[-Phe-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (1)Nal-Phe-aza β^3 (1)Nal-] (PheNal),
 SEC ID N° 13: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (1)-Nal-Leu-aza β^3 (4F-1)Nal-] (4FluoINaf),
 SEC ID N° 14: c[-Lys-aza β^3 Lys-Trp-aza β^3 Oct-Trp-aza β^3 Oct-] (OctOct),
 SEC ID N° 15: c[-Lys-aza β^3 Lys-Cha-aza β^3 Amy-Trp-aza β^3 (1)Nal-] (Chado),
 SEC ID N° 16: c[-Arg-aza β^3 Lys-Cha-aza β^3 (4)Fpa-Trp-aza β^3 Cha-] (FluoKil),
 SEC ID N° 17: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (2)Nal-Leu-aza β^3 (2)Nal-] (Naf2Naf2),
 SEC ID N° 18: c[-Phe-aza β^3 Lys-Arg-aza β^3 (2)Nal-Phe-aza β^3 (2)Nal-] (PheNar2),
 SEC ID N° 19: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 (1)Nal-Leu-aza β^3 (4)Fluo-(1)Nal-] (4FluoNaf),
 SEC ID N° 20: c[-Leu-aza β^3 Lys-Lys-aza β^3 Bip-Leu-aza β^3 Bip-] (BipBip),

[0022] Los péptidos cíclicos de acuerdo con la invención tienen la ventaja de excluir totalmente la presencia de D- α -aminoácidos, aminoácidos no naturales de coste elevado.

[0023] De acuerdo con la invención, los péptidos cíclicos se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida del experto en la materia a partir de productos disponibles en el comercio o preparados según las técnicas descritas en la bibliografía. Especialmente, se pueden preparar según la técnica descrita por Busnel O, Bi L, Dali H, Cheguillaume A, Chevance S, Bondon A, Muller S, Baudy-Floch M., J Org Chem. 2005 Dec 23;70(26):10701-8.

[0024] Los péptidos cíclicos de acuerdo con la invención se muestran activos contra cepas bacterianas, especialmente bacterias Gram negativas del Grupo 2 (patógenas): *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y las bacterias Gram positivas *Bacillus megaterium* (grupo 1) y *Streptococcus aureus* (grupo 2).

[0025] Comparativamente, estos pseudopéptidos cíclicos no ocasionan la lisis de las células sanguíneas y son poco o nada citotóxicos a las concentraciones a las que inhiben, sin embargo, la proliferación de bacterias patógenas.

[0026] Los péptidos cíclicos de acuerdo con la invención se pueden utilizar como medicinas o para desinfección o la antisepsia (desinfección de superficies) en el ser humano o en animales, especialmente en animales y en el hombre.

[0027] Ventajosamente se pueden utilizar como agentes antiinfecciosos o antimicrobianos, especialmente como antibacterianos, antibióticos, antiparasitarios, antivirales, antimicóticos o antifúngicos.

[0028] La invención también tiene por objeto composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido cíclico de acuerdo con la invención.

[0029] En este marco, se pueden utilizar junto con cualquier otro excipiente farmacéuticamente aceptable y en cualquier forma que pueda ser farmacéuticamente aceptable tal como por ejemplo, comprimidos, cápsulas duras, cápsulas blandas, jabones y lociones.

[0030] En una realización especialmente ventajosa de la invención, los péptidos cíclicos se pueden asociar con al menos otro agente antiinfeccioso especialmente seleccionado entre el grupo que comprende penicilina, vancomicina, eritromicina u otros agentes terapéuticos.

[0031] De acuerdo con la invención, los péptidos cíclicos se pueden utilizar, por tanto, para tratar cualquier tipo de enfermedad infecciosa, especialmente las infecciones intrahospitalarias, tuberculosis, septicemia, neumonía y enfermedades respiratorias.

[0032] La invención tiene igualmente por objeto el uso de péptidos cíclicos de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades infecciosas seleccionadas en el grupo que comprende especialmente las infecciones intrahospitalarias, tuberculosis, septicemia, neumonía y enfermedades respiratorias.

[0033] La invención tiene igualmente por objeto un método de tratamiento de las infecciones en el hombre o en los animales que comprende la puesta en contacto de las células microbianas con al menos un péptido cíclico de acuerdo con la invención en una cantidad suficiente para inducir la destrucción de las células microbianas sin inducir la muerte de las células de dicho ser humano o animal.

[0034] También se pueden utilizar como desinfectantes en cosmetología, para desinfección de superficies o en el ámbito agroalimentario.

[0035] Los ejemplos 1 y 2 y las figuras 1 a 6 que sirven para ilustrar la invención.

La figura 1 muestra la síntesis del péptido NafNaf de acuerdo con el ejemplo 1.

La figura 2A representa las concentraciones mínimas que inhiben la proliferación bacteriana (MIC) de péptidos para diferentes cepas; el primer valor corresponde a la concentración más débil que inhibe la actividad bacteriana y el segundo valor, que corresponde a la última concentración para la que se sigue observando el crecimiento bacteriano, donde el valor de MIC está comprendido entre estos dos valores; la figura 2B representa las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) del péptido NafNaf para diferentes cepas.

La figura 3 representa la actividad antibacteriana del péptido NafNaf a dosis crecientes para *Staphylococcus aureus* determinada según el ejemplo 2. La columna "PBB + Bact" corresponde al control, donde las bacterias no entran en contacto con los pseudopéptidos, la columna "PBB" corresponde al control sin bacterias, y la columna "Ampi 1 µg/ml" corresponde a la ampicilina tomada como patrón de actividad antibacteriana.

La figura 4 representa la actividad antibacteriana del péptido NafNaf a dosis crecientes para *Salmonella typhimurium* determinada según el ejemplo 2. La columna "PBB + Bact" corresponde al control, donde las bacterias no entran en contacto con los pseudopéptidos, la columna "PBB" corresponde al control sin bacterias, y la columna

"Ampi 1 µg/ml" corresponde a la ampicilina tomada como patrón de actividad antibacteriana.

La figura 5 representa la curva de actividad hemolítica del pseudopéptido cíclico NafNaf determinada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3.

La figura 6 muestra la citotoxicidad del pseudopéptido NafNaf a diferentes concentraciones en células normales y células cancerosas.

La figura 7 representa las concentraciones mínimas que inhiben la proliferación bacteriana (MIC) después de 48 horas en el medio de cultivo rico en TSB (Tryptic Soy Broth, *caldo de soja triptico*) en diferentes cepas para los péptidos de acuerdo con la invención. La actividad antibacteriana se mide de acuerdo con el ejemplo 5. ND: actividad antibacteriana no detectada entre la gama de concentraciones ensayada; + Bacterias Gram positivas; - Bacterias Gram negativas;

La figura 8 representa la curva de actividad hemolítica de los péptidos de acuerdo con la invención determinada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6.

Ejemplo 1: Preparación del pseudopéptido cíclico NafNaf

[0036] Se representa en la Figura 1. Los números romanos utilizados en el párrafo siguiente se refieren a dicha figura.

[0037] Una resina de cloruro de 2-clorotritilo cargada con 1 mmol/g de L-leucina cuya función amina está protegida por un grupo Fmoc (9-Fluorenilmetiloxycarbonilo) (II) se dispone para su hinchado mediante un flujo continuo de dimetilformamida (DMF) durante 5 minutos. El grupo amino de la leucina fijo en la resina se desprotege por paso de la resina por una disolución de piperidina al 20 % en DMF para dar (III); el Fmoc-aza-β³-(1)Nal-OH de fórmula (IV) se activa por una mezcla de N-Hidroxibenzotriazol/O-benzotriazol-N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato/N-Etildisopropil amina (HOBt/TBTU/DIEA) en las proporciones (1/1/2) en disolución en el DMF y acoplado después a la resina desprotegida (III) durante dos horas en flujo continuo, y se obtiene (V). Se realiza seguidamente una desprotección del grupo amina por eliminación del grupo Fmoc por paso sobre la resina de una disolución de piperidina al 20 % en el DMF para obtener (VI) después se realiza un nuevo acoplamiento en las condiciones descritas anteriormente para obtener (VII). Se recomienda realizar el ciclo de activación-acoplamiento-desprotección tantas veces como sea necesario, después se separa el péptido final de su soporte por escisión en diclorometano (DCM) que contienen ácido trifluoroacético (TFA) al 2 %. Se obtiene el compuesto de fórmula (VIII) que cicla en un medio de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/HOBt con alta dilución (4.10⁻⁴ M) en presencia de 4 equivalentes de agentes de acoplamiento HOBt, EDC y DIEA; esta ciclación dura dos días. Se obtiene el compuesto (IX) que se trata con una mezcla TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5) para desproteger las cadenas laterales y obtener el compuesto (Ia), o NafNaf.

Ejemplo 2: Medida de la actividad antibacteriana en medio pobre en PB

2.1. Modo operativo

[0038] Los ensayos se realizaron sobre cepas bacterianas Gram negativas del Grupo 2 (patógenas): *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y las cepas Gram positivas: *Bacillus megaterium* (grupo 1) y *Streptococcus aureus* (grupo 2).

[0039] Las bacterias se incuban en un medio pobre en PB para bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium* y en un medio pobre enriquecido en extracto de ternera PBB en el caso de dos bacterias adicionales: *Streptococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium* con concentraciones crecientes de péptido o sus análogos, comprendidas entre 1 y 320 µg/ml. Este ensayo se realiza en microplacas de 96 pocillos. Tras una incubación de 18 horas a 30°C o 37 °C, se realiza una lectura de la densidad óptica de las microplacas a 595 nm destinada a evaluar el crecimiento bacteriano y a determinar la concentración inhibidora mínima (MIC) de cada molécula ensayada. Cada medida se realiza por triplicado.

[0040] Además, la concentración bactericida mínima (MBC) se determina dispersando el contenido de los pocillos en los que no se ha producido crecimiento bacteriano en placas que contenían medios ricos (*Luria broth* o (LB) o *Brain Heart Infusion* (BHi)). La MBC corresponde a la concentración a la que no se detecta ninguna colonia bacteriana después de una incubación de 24 horas a 30 o 37° C.

2.2. Resultados

[0041] Se proporcionan en la tabla de la figura 2 y en las figuras 3 y 4.

[0042] Las cinco secuencias ensayadas resultan activas, aunque solamente dos secuencias (NafNaf y TrypTryp) presentan concentraciones inhibitoras de la proliferación bacteriana (MIC) inferiores a 100 µg/ml (figura 2).

[0043] La secuencia NafNaf tiene valores MIC inferiores a 100 µg/ml para todas las bacterias ensayadas (figura 2).

[0044] Este péptido es muy activo para el estafilococo dorado (*Streptococcus aureus*) responsable de numerosas enfermedades hospitalarias, con un valor MIC inferior a 5 µg/ml y un valor MBC inferior a 10 µg/ml (figura 2).

[0045] Es también activo para bacterias patógenas gram negativas relativamente resistentes, tales como *K. pneumoniae* responsables de infecciones respiratorias e intestinales (figura 2). Su actividad antimicrobiana es equivalente a la de los mejores péptidos cíclicos que alteran aminoácidos D y L con valores MIC de una decena de µg/ml para las bacterias Gram positivas y comprendidas entre 15 y 80 µg/ml para las gram negativas.

[0046] El pseudopéptido NafNaf es activo a concentraciones de interés para el conjunto de las cepas estudiadas, especialmente para las bacterias patógenas como *Streptococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium* donde es activo para concentraciones inferiores a 20 µg/ml. (figuras 3 y 4).

[0047] La ampicilina (Ampi) seleccionada como referencia es activa a partir de 1 µg/ml para *Streptococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium*. Esta concentración puede variar según la cepa bacteriana estudiada

Ejemplo 3: Medida de la actividad hemolítica del péptido NafNaf sobre eritrocitos de conejo

3.1. Modo operativo

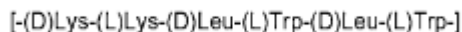
[0048] La actividad hemolítica de los pseudopéptidos se ensaya en células sanguíneas de conejo. Los eritrocitos recientes de conejo se lavan tres veces con un tampón fosfato salino [tampón PBS (pH 7,4)] por centrifugación durante 5 min a 900 g y el aglomerado final se suspende en PBS. Las disoluciones del pseudopéptido NafNaf diluidas en PBS (90 µl) se colocan en una placa de 96 pocillos. A estas disoluciones se añaden 90 µl de disolución de eritrocitos de conejo a un 2% (v/v) para conseguir un volumen final de 180 µl y una concentración de 1% (v/v) de células sanguíneas. Las suspensiones obtenidas se incuban 1 hora a 37° C. A continuación, las muestras se centrifugan a 500 g durante 5 min. Se transfieren 100 µl de sobrenadante de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos. La liberación de hemoglobina se cuantifica midiendo la absorbancia a 415 nm del sobrenadante mediante un lector de microplacas. Los controles correspondientes a la ausencia de hemólisis (blanco) y a una hemólisis del 100 % consisten, respectivamente, a una adición de 90 µl de tampón PBS y 90 µl de una disolución de Triton X-100 al 2 % a los 90 µl de disolución de células sanguíneas al 2%. Cada medida se realiza por triplicado.

3.2. Resultados

[0049] Se proporcionan en la figura 5.

[0050] La concentración del péptido NafNaf para la que se consigue una hemólisis del 50% es de 120 µg/ml.

[0051] Esta concentración es más elevada que la del péptido cíclico de estructura cercana que alterna los aminoácidos D y L y que responde a la fórmula siguiente:



que es hemolítica a 80 µg/ml.

[0052] Así, NafNaf no tiene actividad hemolítica a las concentraciones a las que tiene actividad bactericida, especialmente no tiene acción sobre los eritrocitos a 20 µg/ml, concentración a la que es bactericida para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*.

Ejemplo 4: Evaluación de la citotoxicidad in vitro**4.1. Modo operativo**

[0053] Los efectos de los diferentes pseudopéptidos cíclicos sobre el crecimiento celular se evaluó en placas de 96 pocillos estériles. Las células se siembran a $5 \cdot 10^5$ células por ml de medio de cultivo (100 μ l por pocillo). Los diferentes pseudopéptidos (10 μ l por pocillo), diluidos en un suero salino, se añaden en el momento de la siembra con la concentración adecuada (desde 1 μ g/ml hasta 1 mg/ml). Las incubaciones se realizan a 37°C en atmósfera húmeda que contienen un 5% de CO₂ durante 24 o 48 horas.

[0054] Tras la exposición a los compuestos, se evalúa el crecimiento celular midiendo la formación de formazano a partir de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La absorbancia a 540 nm se mide con un lector de microplacas Titertek Multiscan MCC/340. Cada medida se realiza por triplicado.

4.2. Resultados

[0055] Se proporcionan en la figura 6.

[0056] La citotoxicidad del pseudopéptido NafNaf se ha medido en células de hámster (CHO-K1) y en una línea de células de ratón (Ascite 302-sp).

[0057] Este pseudopéptido no tiene ningún efecto citotóxico sobre las células de hámster a 10 μ g/ml, concentración bactericida para cepas bacterianas como *S. aureus* y la dosis letal para el 50% de las células (DL₅₀) es de aproximadamente 40 μ g/ml.

[0058] Estos resultados obtenidos con las células de hámster no cancerosas se confirman por los resultados obtenidos para la línea de células de ratón Ascite 302-sp que es una línea celular derivada de células cancerosas. La LD₅₀ es ligeramente más débil, pero tiene también un ligero efecto sobre la viabilidad celular a 10 μ g/ml.

Ejemplo 5: Medida de la actividad antibacteriana en medio rico**5.1. Modo operativo**

[0059] Los ensayos se realizaron sobre cepas bacterianas Gram negativas *Escherichia coli* A Tee 25922, *Salmonella enterica* A Tee 13076, *Pseudomonas aeruginosa* A Tee 27853, *Klebsiella oxytoca* eIP 7932, *Enterobacter aerogenes* A Tee 13048 y *Aeromonas caviae* A Tee 15468 y cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATee 25923, *Enterococcus faecalis* eIP 186, *Streptococcus equinus* ATee 5623, *Listeria monocytogenes* SOR 100, *Bacillus megaterium* ATee 10778, *Lactococcus gaviae* ATee 43921, *Micrococcus luteus* ATee 10240.

[0060] Las bacterias (105 UFC/ml) se incuban en un medio rico TSB (Tryptic Soy Broth) con concentraciones crecientes de ciclopseudopéptidos (0,78, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 μ M). Este ensayo se realiza en microplacas de 96 pocillos. Tras una incubación de 48 horas a 20 °C o 37 °C, se realiza una lectura de la densidad óptica de las microplacas a 595 nm destinada a evaluar el crecimiento bacteriano y a determinar la concentración inhibidora mínima (MIC) de cada molécula ensayada. Cada medida se realiza por triplicado.

5.2. Resultados

[0061] Se proporcionan en la tabla de la Figura 7.

[0062] Las cinco secuencias ensayadas resultan activas.

[0063] Los cinco ciclopseudopéptidos pueden inhibir el crecimiento de todas las bacterias Gram positivas ensayadas (bacterias de *S.aureus* a *M. luteus* en la tabla de la Figura 7) para valores de concentraciones inferiores o iguales a 50 μ M ($\leq$ 50 μ M)

[0064] A diferencia de los ciclopseudopéptidos que parecen menos activos para las bacterias Gram negativas (bacterias de *E. coli* a *A. caviae* tabla de la Figura 7) y uno de estos (Chado) no presenta por otra parte ninguna actividad sobre las bacterias Gram negativas a las concentraciones ensayadas. Las secuencias OctOct y Chado están compuestas por restos aza- β^3 aminoácidos que incluyen las cadenas alquiladas (C8 o C12) como cadenas laterales. Esta modificación química parece también inducir una actividad antibacteriana preferentemente dirigida contra las bacterias Gram negativas.

[0065] *A. caviae* es resistente a todos los ciclopseudopéptidos a las concentraciones ensayadas, y la proliferación de las otras cinco cepas bacterianas Gram negativas está inhibida por los ciclopseudopéptidos NafNaf, 4FluoNaf y Fluokill para valores de MIC comprendidos entre 12,5 y 50 (μ M).

[0066] Puesto que algunos valores de MIC son inferiores a 10 μM en bacterias potencialmente patógenas para el hombre como *L. monocytogenes* y *S. equinus*, se puede prever una aplicación terapéutica en el hombre.

Ejemplo 6: Medida de la actividad hemolítica de diferentes péptidos de acuerdo con la invención sobre eritrocitos de cordero

6.1. Modo operativo

[0067] La actividad hemolítica de los pseudopéptidos se ensaya en células sanguíneas de cordero. Los eritrocitos de cordero se lavan tres veces con un tampón fosfato salino [tampón PBS (pH 7,4)] por centrifugación durante 5 min a 900 g y el aglomerado final se suspende en PBS. Para determinar la concentración de la disolución de eritrocitos, se introduce una concentración de glóbulos rojos que corresponde a una $\text{DO}_{540\text{ nm}}$ para el pocillo de control, 100% de hemólisis en presencia de Triton X-100 de 0,8. Las disoluciones de los diferentes pseudopéptidos diluidas en agua (100 μl) se colocan en una placa de 96 pocillos. A estas disoluciones se añaden 50 μl de disolución tampón PBS 2X, después 50 μl de disolución de eritrocitos de cordero para conseguir un volumen final de 200 μl . Las suspensiones obtenidas se incuban 1 hora a 37° C. A continuación, las muestras se centrifugan a 500 g durante 5 min. Se transfieren 130 μl de sobrenadante de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos. La liberación de hemoglobina se cuantifica midiendo la absorbancia a 540 nm del sobrenadante mediante un lector de microplacas. Los controles correspondientes a la ausencia de hemólisis (blanco) y a una hemólisis del 100 % consisten, respectivamente, en añadir 100 μl de tampón PBS y 100 μl de una disolución de Triton X-100 al 2 % a los pocillos que contienen 100 μl de disolución de eritrocitos en suero salino (50 μl de PBS 2X y 50 μl de disolución de células sanguíneas). Cada medida se realiza por triplicado.

6.2. Resultados

[0068] Se proporcionan en la figura 8.

[0069] Los compuestos NafNaf, 4-Fluo-1-Naf, y FluoKil no muestran actividad hemolítica significativa a las dosis ensayadas.

[0070] OctOct y ChaDo tienen una actividad hemolítica máxima de, respectivamente, 52 % y 61 % a 100 μM . Sin embargo, a 12,5 μM , concentración a la que inhiben el crecimiento de muchas bacterias Gram positivas, sus actividades hemolíticas son inferiores a aproximadamente 10 % para OctOct y de 20 % para ChaDo

LISTADO DE SECUENCIAS

[0071]

<110> CNRS LAURENCIN, Mathieu ZATYLN-Y-GAUDIN, Céline HENRY, Joël BAUDY-FLOC'H, Michèle

<120> PÉPTIDOS CÍCLICOS QUE CONTIENEN COMO MÍNIMO UN RESTO AZA-BETA-3 AMINOACILADO Y SUS USOS

<130> WOB 07 CA CNR AZAB

<150> FR 0707108

<151> 10-10- 2007

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza- β 3-aminoacilo

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa1 = aza β 3K

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal

10

<400> 1

Leu Xaa Lys Xaa Leu Xaa
 1 5

15

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3Nal

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa3 = azaβ3Nal

<400> 2

Lys Xaa Leu Xaa Leu Xaa
 1 5

40

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3L

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa2 = azaβ3L

ES 2 525 645 T3

<400> 3

Lys Xaa Trp Xaa Trp Xaa
1 5

5 <210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3L

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3L

<400> 4

Lys Xaa Lys Xaa Trp Xaa
1 5

30 <210> 5
<211> 6
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3K

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3L

55 <400> 5

Trp Xaa Lys Xaa Trp Xaa
1 5

60 <210> 6
<211> 6

ES 2 525 645 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

15

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3K

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3(1)Nal

<400> 6

Lys	Xaa	Lys	Xaa	Trp	Xaa
1				5	

25

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

35

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3(1)Nal)

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3K

45

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3K

50

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa4 = azaβ3K

<400> 7

Ser	Xaa	Phe	Xaa	Thr	Xaa	Ser	Xaa
1				5			

55

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60

	<220>	
	<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo	
5	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (2)..(2) <223> Xaa1 = azaβ3R	
10	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (4)..(4) <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal	
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (6)..(6) <223> Xaa3 = azalβ3(1)Nal	
20	<400> 8	Leu Xaa Arg Xaa Leu Xaa 1 5
25	<210> 9 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Péptido cíclico que comprende cuatro restos aza-β3-aminoacilo	
35	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (2)..(2) <223> Xaa1 = azaβ3K	
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (4)..(4) <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal	
45	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(5) <223> Xaa3 = azaβ3L	
50	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (6)..(6) <223> Xaa4 = azaβ3(1)Nal	
	<400> 9	Leu Xaa Lys Xaa Xaa Xaa 1 5
55	<210> 10 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminocíclico	

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa3 = azaβ3(1)Nal
 15
 <400> 10

 Phe Xaa Lys Xaa Phe Xaa
 1 5
 20
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3L
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 = azaβ3(1)Nal
 40
 <400> 11

 Leu Xaa Lys Xaa Xaa
 1 5
 45
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 = azaβ3K
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 60

<223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 = azaβ3(1)Nal
 <400> 12

 Xaa Lys Xaa Leu Xaa
 1 5
 10
 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa3 = azaβ3(4F-1)Nal
 35 <400> 13

 Leu Xaa Lys Xaa Leu Xaa
 1 5
 40 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 50 <223> Xaa1 = azaβ3K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 55 <223> Xaa2 = azaβ3Oct
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 60 <223> Xaa3 = azaβ3Oct

<400> 14

Lys Xaa Trp Xaa Trp Xaa
1 5

5 <210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

<220>
<221> MISC_FEATURE
15 <222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (3)..(3)
<223> Xaa2 = cha (ciclohexialanina)

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (4)..(4)
<223> Xaa3 = azaβAmy

<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (6)..(6)
<223> Xaa4 = azaβ3(1)Nal

<400> 15

Lys Xaa Xaa Xaa Trp Xaa
1 5

35 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

-

<220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa2 = Cha (ciclohexilalanina)

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa3 = aza(β3(4)Fpa

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)

ES 2 525 645 T3

<223> Xaa4 = azaβ3Cha

<400> 16

5 Arg Xaa Xaa Xaa Trp Xaa
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3(2)Nal

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3(2)Nal

30 <400> 17

Leu Xaa Lys Xaa Leu Xaa
1 5

35 <210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa1 = azaβ3K

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa2 = azaβ3(2)Nal

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa3 = azaβ3(2)Nal

<400> 18

Phe Xaa Arg Xaa Phe Xaa
1 5

60 <210> 19

	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo	
	<220>	
10	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Xaa1 = azaβ3K	
	<220>	
15	<221> MISC_FEATURE.	
	<222> (4)..(4)	
	<223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal	
	<220>	
20	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(6)	
	<223> Xaa3 = azaβ3(4)Fluo-(1)Nal	
	<400> 19	
		Leu Xaa Lys Xaa Leu Xaa
25		1 5
	<210> 20	
	<211> 6	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo	
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Xaa1 = azaβ3K	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4)..(4)	
	<223> Xaa2 = azaβ3Bip	
45	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(6)	
	<223> Xaa3 = azaβ3Bip	
50	<400> 20	
		Leu Xaa Lys Xaa Leu Xaa
		1 5
	<210> 21	
55	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo	
	<220>	

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 = azaβ3K
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa2 = azaβ3Bip
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa3 = azaβ3Bip
 15 <400> 21

 Xaa Lys Xaa Leu Xaa
 1 . 5

 20 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3R

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa2 = azaβ3(1)Nal

 <400> 22

 Leu Xaa Arg Xaa Leu
 1 5

 40 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido cíclico que comprende dos restos aza-β3-aminoacilo

 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa1 = azaβ3K

 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa2 = azaβ(1)Nal

 60 <400> 23

ES 2 525 645 T3

Leu Xaa Lys Leu Xaa
1 5

5 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 = azaβ3K

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa2 = azaβ3(2)Nal

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa3 = azaβ3(2)Nal

<400> 24

Xaa Arg Xaa Phe Xaa
1 5

30 <210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido cíclico que comprende tres restos aza-β3-aminoacilo

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 = azaβ3K

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa2 = azaβ3(2)Nal

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa3 = azaβ3(2)Nal

<400> 25

Xaa Lys Xaa Leu Xaa
1 5

55

REIVINDICACIONES

1. Péptidos cíclicos que tienen una alternancia aleatoria entre restos L- α -aminoacilos y restos aza- β^3 -aminoacilos que tienen la fórmula (A) siguiente:



en la que R1 representa una cadena lateral seleccionada del grupo que incluye cadenas proteogénicas y no proteogénicas,

con la condición de que dos restos L- α -aminoacilo estén separados por al menos un resto aza- β^3 -aminoacilo y que el número total de los restos L- α -aminoacilo y de los restos aza- β^3 -aminoacilo esté comprendido entre 4 y 8, **caracterizado por que** los péptidos cíclicos se seleccionan entre hexapéptidos y octapéptidos.

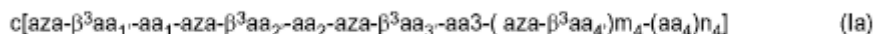
2. Péptidos cíclicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizados por que** los restos L- α -aminoacilados se seleccionan del grupo que incluye los restos de los aminoácidos siguientes: arginina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina y triptófano.

3. Péptidos cíclicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizados por que** en los restos aza- β^3 -aminoacilos que tienen la fórmula (A), R1 representa una cadena lateral seleccionada del grupo que comprende restos de aminoácidos naturales o restos de aminoácidos no naturales.

4. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizados por que** los restos de aminoácidos naturales se seleccionan del grupo que comprende restos de arginina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina y triptófano.

5. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizados por que** los restos de aminoácidos naturales se seleccionan del grupo que comprende restos 1-naftilalanina [(1)Nal], 2-naftilalanina [(2)Nal], 4-fenilfenilalanina (4Bip), difenilalanina (Dip), 9-antracenilalanina [(9)Ath], 4-piridilalanina [(4)Pal], 3-piridilalanina [(3)Pal], 2-piridilalanina [(2)Pal], fluorofenilalanina (4-Fpa), dodecilalanina (Amy), Nonilalanina (Non), Octilalanina (Oct), ciclohexilalanina (Cha), 4-fluoro-1-naftilalanina (4-F-I-Nal), homoserina (Hse), homo γ -hidroxitreonina, y Norleucina (Nie).

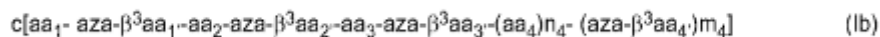
6. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 1 que tienen la secuencia (1a)



en la que

cada uno de los aa_1 , aa_2 , aa_3 , y aa_4 , representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los $aza-\beta^3aa_1$, $aza-\beta^3aa_2$, $aza-\beta^3aa_3$, y $aza-\beta^3aa_4$, representa independientemente uno de otro un aza- β^3 -aminoácido, que tiene la fórmula (A), y m_4 y n_4 representan cada uno simultáneamente 0 o 1.

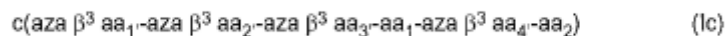
7. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 1 que tienen la secuencia (1b)



en la que,

cada uno de los aa_1 , aa_2 , aa_3 , y aa_4 , representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo, cada uno de los $aza-\beta^3aa_1$, $aza-\beta^3aa_2$, $aza-\beta^3aa_3$, y $aza-\beta^3aa_4$ representa independientemente uno de otro un aza- β^3 -aminoácido, que tiene la fórmula (A), y m_4 y n_4 representan cada uno simultáneamente 0 o 1.

8. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 1 que tienen la secuencia (1c):

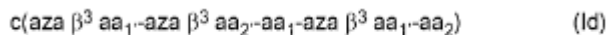


en la que,

cada uno de los aa_1 y aa_2 representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoacilo,

cada uno de los $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_1$, $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_2$, $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_3$, y $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_4$ representa independientemente uno de otro un $\text{aza-}\beta^3\text{-aminoácido}$, que tiene la fórmula (A).

9. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 1 que tienen la secuencia (1d):



en la que,

cada uno de los aa_1 y aa_2 representa independientemente entre sí un resto L- α -aminoácido,

cada uno de los $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_1$, $\text{aza-}\beta^3\text{-aa}_2$, representa independientemente entre sí un resto $\text{aza-}\beta^3\text{-aminoácido}$, que tiene la fórmula (A).

10. Péptidos cíclicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 **caracterizados por que** se seleccionan del grupo que comprende las siguientes secuencias:

SEC ID N° 1: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Leu-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (NafNaf),
 SEC ID N° 2: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Leu-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Leu-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (NalNal),
 SEC ID N° 3: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Trp-aza-}\beta^3\text{Leu-Trp-aza-}\beta^3\text{Leu-}$] (TrypTryp),
 SEC ID N° 4: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3\text{Leu-Trp-aza-}\beta^3\text{Leu-}$] (3KW),
 SEC ID N° 5: c[-Trp- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3\text{Lys-Trp-aza-}\beta^3\text{Leu-}$] (3K2),
 SEC ID N° 6: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3\text{Lys-Trp-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (4KW),
 SEC ID N° 7: c[-Ser- $\text{aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Phe-aza-}\beta^3\text{Lys-Thr-aza-}\beta^3\text{Lys-Ser-aza-}\beta^3\text{Lys-}$] (SNalF),
 SEC ID N° 8: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Arg-Arg-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Leu-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (RNaf),
 SEC ID N° 9: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-aza-}\beta^3\text{Leu-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (Nafaza),
 SEC ID N° 10: c[-Phe- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Phe-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (PheNal),
 SEC ID N° 13: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(1)\text{-Nal-Leu-aza-}\beta^3(4F-1)\text{Nal-}$] (4FluoINaf),
 SEC ID N° 14: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Trp-aza-}\beta^3\text{Oct-Trp-aza-}\beta^3\text{Oct-}$] (OctOct),
 SEC ID N° 15: c[-Lys- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Cha-aza-}\beta^3\text{Amy-Trp-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-}$] (Chado),
 SEC ID N° 16: c[-Arg- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Cha-aza-}\beta^3(4)\text{Fpa-Trp-aza-}\beta^3\text{Cha-}$] (FluoKil),
 SEC ID N° 17: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(2)\text{Nal-Leu-aza-}\beta^3(2)\text{Nal-}$] (Naf2Naf2),
 SEC ID N° 18: c[-Phe- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Arg-aza-}\beta^3(2)\text{Nal-Phe-aza-}\beta^3(2)\text{Nal-}$] (PheNar2),
 SEC ID N° 19: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3(1)\text{Nal-Leu-aza-}\beta^3(4)\text{Fluo-(1)Nal-}$] (4FluoNaf),
 SEC ID N° 20: c[-Leu- $\text{aza-}\beta^3\text{Lys-Lys-aza-}\beta^3\text{Bip-Leu-aza-}\beta^3\text{Bip-}$] (BipBip).

11. Péptidos cíclicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores como medicamentos.

12. Péptidos cíclicos de acuerdo con la reivindicación 11 **caracterizados por que** el medicamento es un antiinfeccioso o un desinfectante.

13. Composición farmacéutica que comprende al menos un péptido cíclico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10 asociadas a cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Uso de al menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades infecciosas.

FIGURA 1

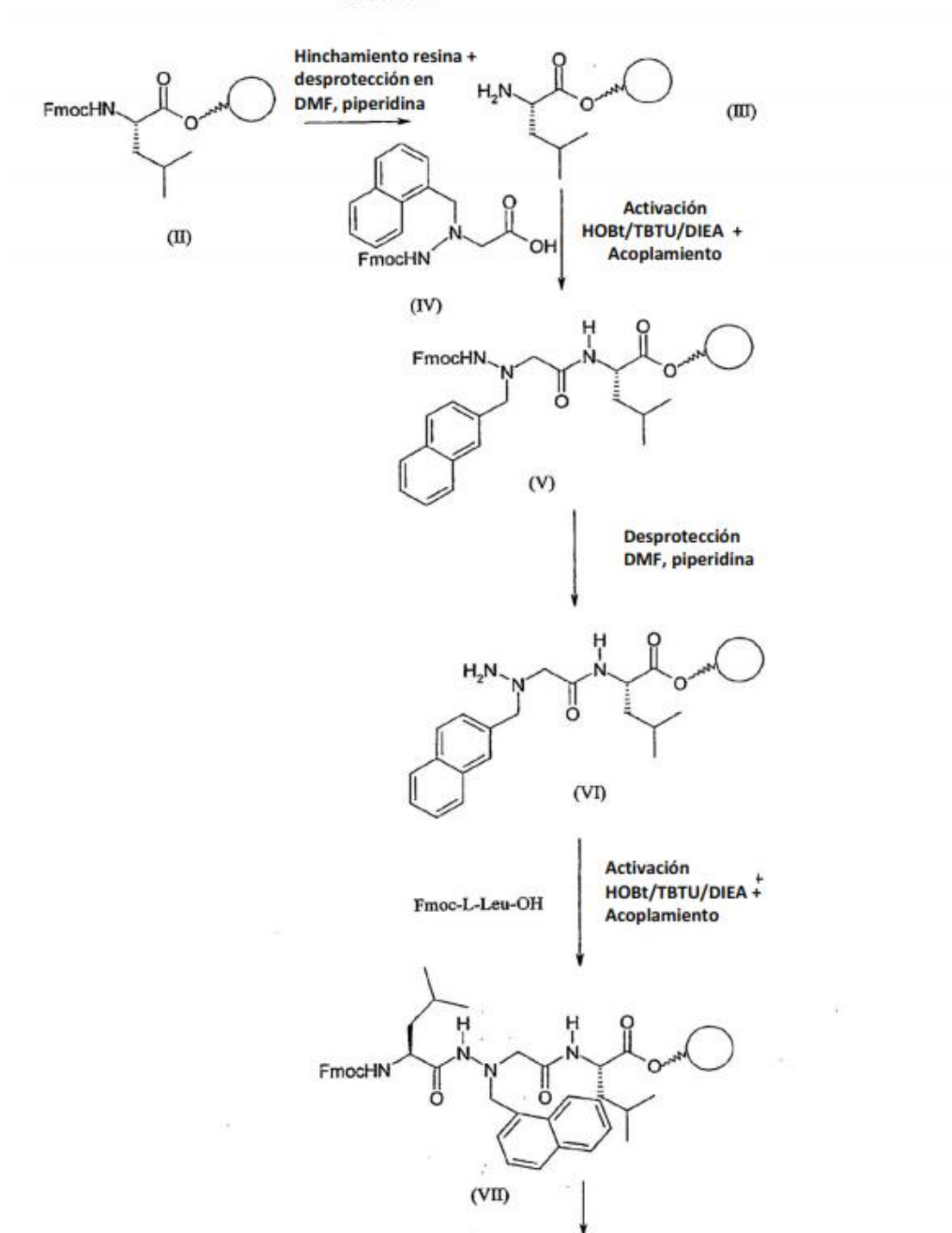


FIGURA 1 (continuación)

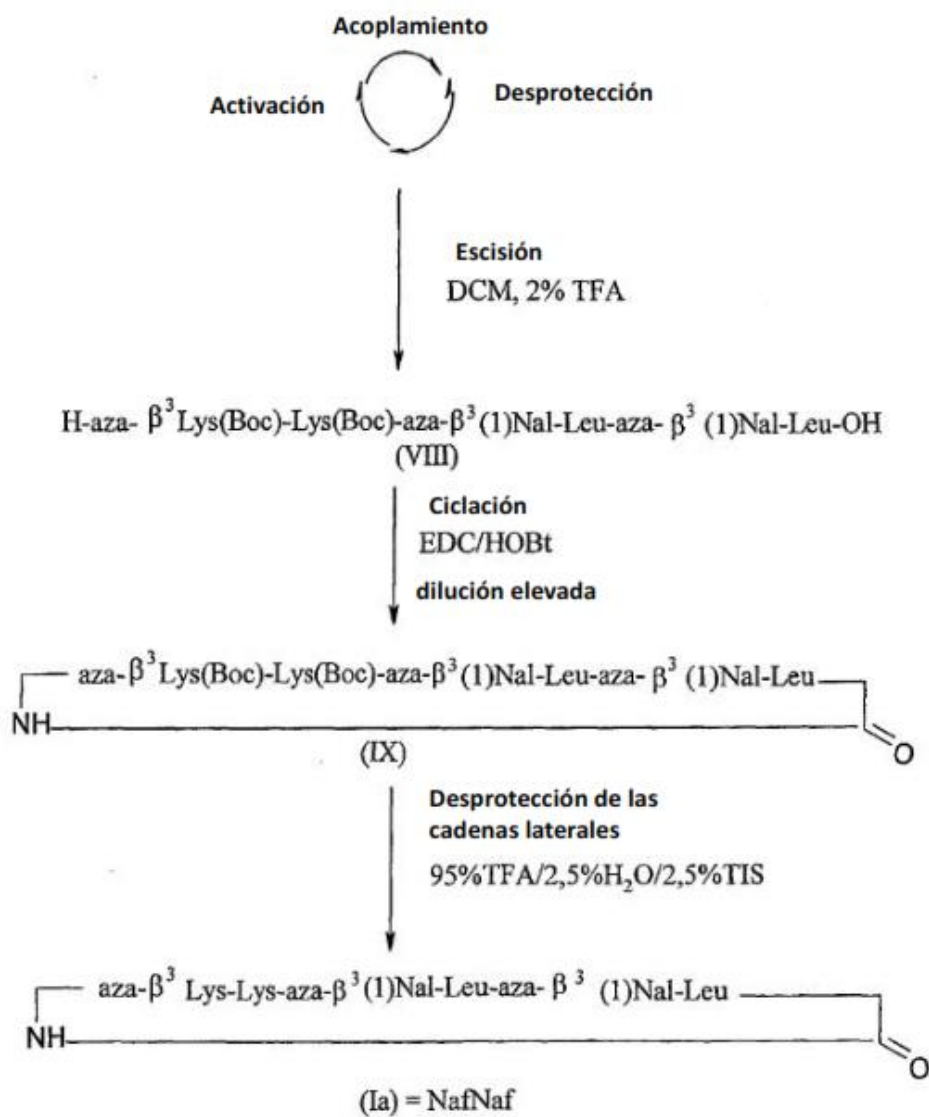


FIGURA 2

Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de la proliferación bacteriana, expresado en µg/ml

A

	NafNaf	TrypTryp	4KW	3K2	3KW
<i>Bacillus megaterium</i> (Gram+ no patógeno)	5_10	20_40	80_160	40_80	160_320
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+ patógeno)	2,5_5	40_80	80_160	160_320	NA
<i>Escherichia coli</i> (Gram- patógeno)	20_40	160_320	NA	> 320	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram- patógeno)	10_20	160_320	160_320	> 320	NA
<i>Salmonella typhimurium</i> (Gram- patógeno)	10_20	80_160	NA	160_320	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Gram- patógeno)	40_80	> 320	NA	NA	NA

NA: sin actividad bacteriana

Concentración bactericida (MBC) para el péptido NafNaf

B

Bacterias	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
MBC (µg/mL)	< 40	< 10	< 80	< 20

FIGURA 3

Efecto del péptido NafNaf sobre *Staphyococcus aureus*

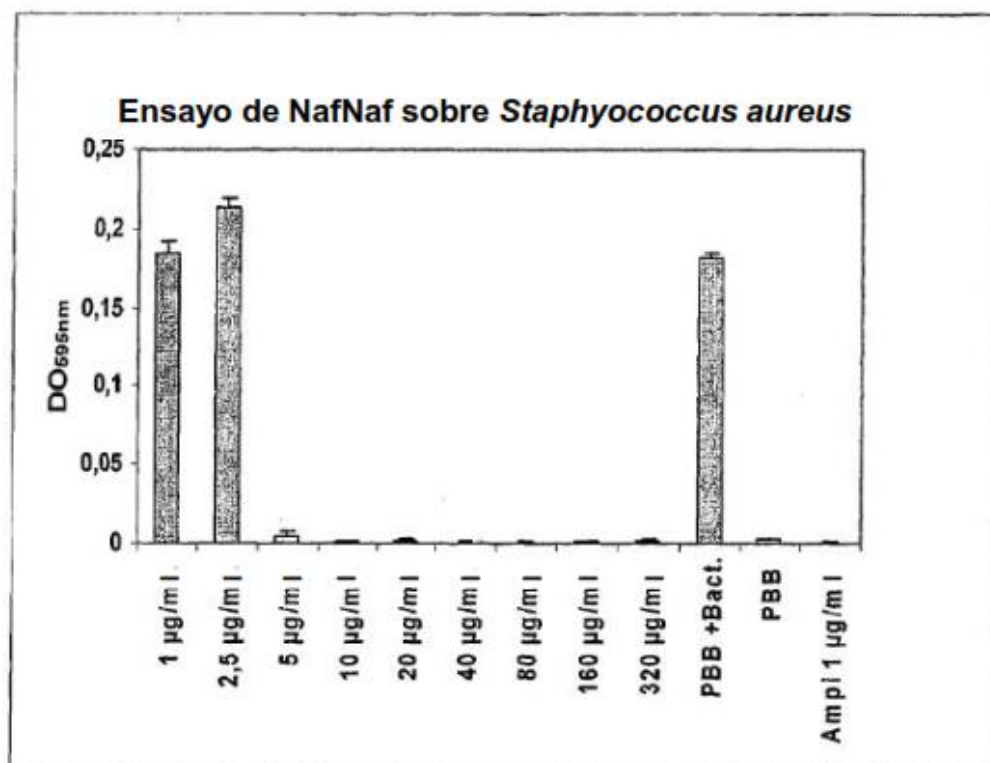


FIGURA 4

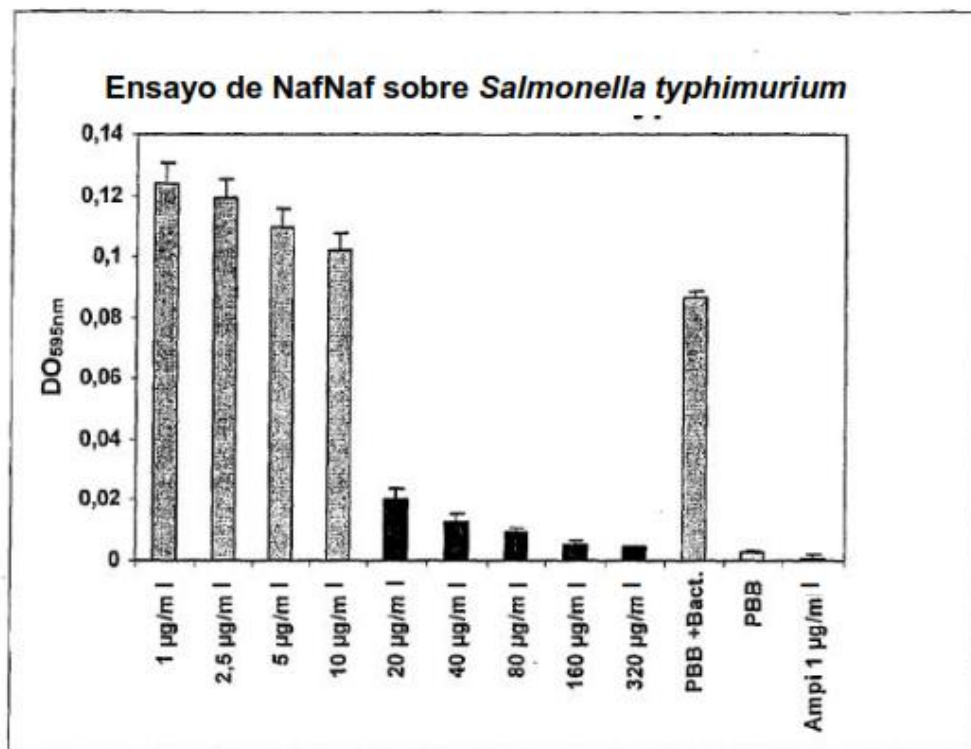
Efecto del péptido NafNaf sobre *Salmonella typhimurium*

FIGURA 5

Curva de actividad hemolítica del pseudopéptido cíclico NafNaf

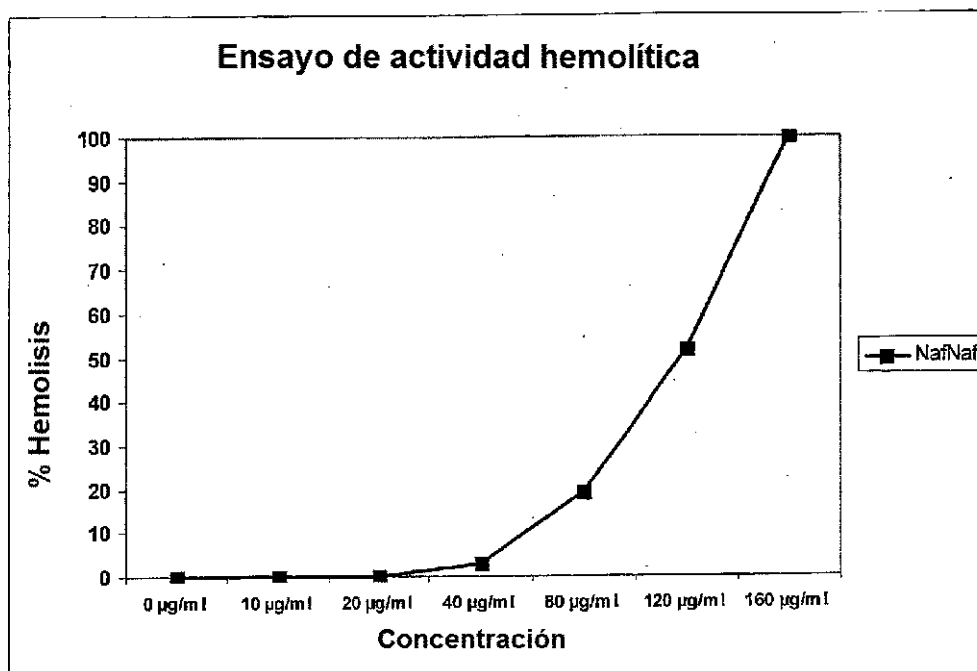


FIGURA 6

Citotoxicidad del pseudopéptido NafNaf en células normales y las células cancerosas

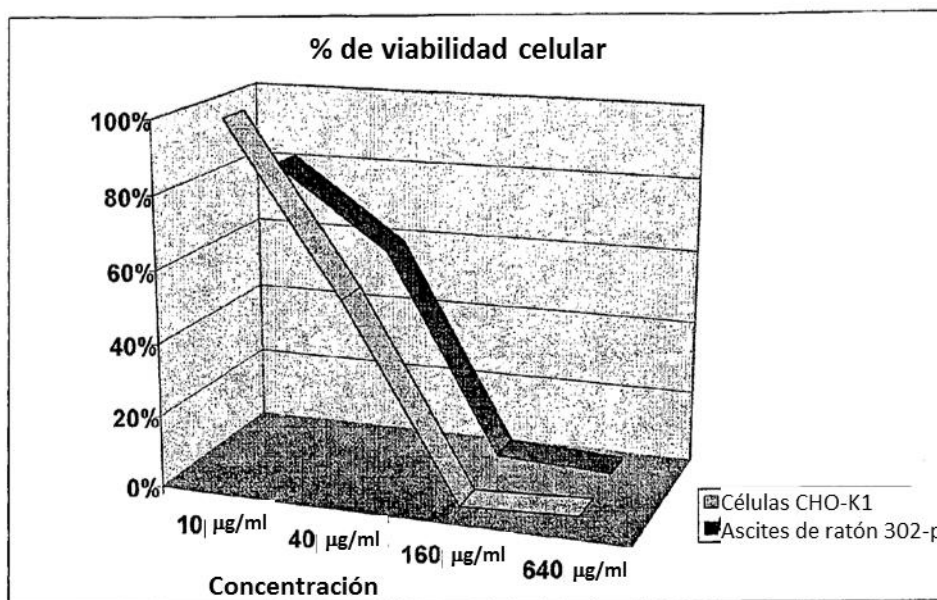


FIGURA 7

Concentraciones inhibidoras mínimas (MIC) de la proliferación bacteriana,
expresado en μM

Pseudopéptido Cepa	NafNaf	4Fluo1Naf	OctOct	Chado	FluoKil
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁺	25	12,5	6,25	25	25
<i>Enterococcus faecalis</i> ⁺	50	25	12,5	12,5	50
<i>Streptococcus equinus</i> ⁺	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25
<i>Listeria monocytogenes</i> ⁻	12,5	6,25	3,12	12,5	6,25
<i>Bacillus megaterium</i> ⁺	3,12	3,12	6,25	12,5	1,56
<i>Lactococcus gaviae</i> ⁺	50	25	6,25	50	25
<i>Micrococcus luteus</i> ⁺	3,12	3,12	3,12	12,5	3,12
<i>Escherichia Coli</i> ⁻	50	25	ND	ND	25
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ⁻	50	25	25	ND	50
<i>Salmonella Enterica</i> ⁻	50	50	ND	ND	50
<i>Klebsiella Oxytoca</i> ⁻	50	25	ND	ND	25
<i>Enterobacter aerogenes</i> ⁻	50	50	ND	ND	12,5
<i>Aeromonas Caviae</i> ⁻	ND	ND	ND	ND	ND

FIGURA 8

Actividad hemolítica de péptidos de acuerdo con la invención sobre eritrocitos de cordero

