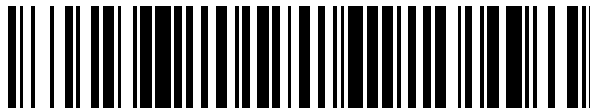


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 298**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/56** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08803037 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2183270**

54 Título: **Uso de depsipéptidos cíclicos para inhibir calicreína 7**

30 Prioridad:

**17.08.2007 EP 07114505**

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

**22.01.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse, 35  
4056 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**KRASTEL, PHILIPP;  
LIECHTY, BRIGITTA-MARIA;  
SCHMITT, ESTHER y  
SCHREINER, ERWIN PAUL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 527 298 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

Uso de depsipéptidos cíclicos para inhibir calicreína 7

Campo de la invención

La presente invención se refiere a depsipéptidos cíclicos, o a un derivado de los mismos.

## 5 Antecedentes de la invención

La calicreína 7 es una S1 serina proteasa de la familia de genes de la calicreína que presenta actividad de tipo quimotripsina. La calicreína humana 7 (hK7, KLK7 o enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), Swissprot P49862) desempeña un papel importante en la fisiología de la piel (1, 2, 3). Se expresa principalmente en la piel y se ha notificado que desempeña un papel importante en la fisiología de la piel. hK7 está implicada en la degradación de las estructuras cohesivas intercelulares en epitelios escamosos cornificados en el proceso de descamación. El proceso de descamación está bien regulado y equilibrado de manera delicada con la producción *de novo* de corneocitos para mantener un grosor constante del estrato córneo, la capa más externa de la piel implicada de manera crítica en la función de barrera de la piel. Con respecto a esto, se notifica que hK7 puede escindir las proteínas corneodesmosómicas corneodesmosina y desmocolina 1 (4, 5, 6). Se requiere la degradación de ambos corneodesmosomas para la descamación. Además, muy recientemente se ha mostrado que las dos enzimas de procesamiento de lípidos  $\beta$ -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida pueden degradarse por hK7 (7). Ambas enzimas de procesamiento de lípidos se secretan conjuntamente con sus sustratos glucosilceramidas y esfingomielina y procesan estos precursores lipídicos polares para dar sus productos más apolares por ejemplo ceramidas, que posteriormente se incorporan en las membranas laminares extracelulares. La arquitectura de la membrana laminar es crítica para una barrera de la piel funcional. Finalmente, se ha mostrado que hK7 activa el precursor de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) para dar su forma activa *in vitro* (8). Dado que los queratinocitos expresan IL-1 $\beta$  pero no la forma activa de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  específica (ICE o caspasa 1), se propone que la activación de IL-1 $\beta$  en la epidermis humana se produce mediante otra proteasa, siendo hK7 un posible candidato.

Recientes estudios vinculan una actividad de hK7 aumentada con enfermedades cutáneas inflamatorias tales como dermatitis atópica, psoriasis o síndrome de Netherton. Esto puede conducir a una degradación no controlada de corneodesmosomas dando como resultado una descamación mal regulada, una degradación potenciada de enzimas de procesamiento de lípidos dando como resultado una arquitectura de membrana laminar alterada o una activación no controlada de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . El resultado neto sería una función de barrera de la piel alterada e inflamación (véase también el documento WO-A-2004/108139). El documento WO2005075667 se refiere al uso de moduladores de KLK7 para el tratamiento de enfermedades.

Debido al hecho de que la actividad de hK7 se controla a varios niveles, diversos factores podrían ser responsables de una actividad de hK7 aumentada en enfermedades cutáneas inflamatorias. En primer lugar, la cantidad de proteasa que se expresa puede verse influida por factores genéticos. Tal vinculación genética, un polimorfismo en la región 3'-UTR en el gen de hK7, se describió recientemente (9). Los autores plantean la hipótesis de que la inserción de 4 pares de bases descrita en la región 3'-UTR del gen de calicreína 7 estabiliza el ARNm de hK7 y da como resultado una sobreexpresión de hK7. En segundo lugar, dado que hK7 se secreta mediante cuerpos laminares en el espacio extracelular del estrato córneo como zimógeno y no puede autoactivarse, necesita activarse por otra proteasa por ejemplo hK5 (5). La actividad no controlada de tal enzima activante puede dar como resultado una sobreactivación de hK7. En tercer lugar, hK7 activada puede inhibirse mediante inhibidores naturales tales como LEKTI, ALP o elafina (10, 11). La expresión reducida o la falta de tales inhibidores pueden dar como resultado una actividad de hK7 potenciada. Recientemente se encontró que mutaciones en el gen *spink5*, que codifica para LEKTI, causan síndrome de Netherton (12) y una única mutación puntual en el gen está vinculada con dermatitis atópica (13, 14). Finalmente, otro nivel de control de la actividad de hK7 es el pH. hK7 tiene un pH óptimo de neutro a ligeramente alcalino (2) y hay un gradiente de pH desde neutro hasta ácido desde las capas más internas hasta las más externas de la piel. Factores ambientales tales como jabón pueden dar como resultado un aumento del pH en las capas más externas del estrato córneo hacia el pH óptimo de hK7 aumentando así la actividad de hK7.

La hipótesis de que una actividad de hK7 aumentada está vinculada con enfermedades cutáneas con una barrera de la piel alterada incluyendo enfermedades cutáneas inflamatorias e hiperproliferativas está respaldada por los siguientes estudios: En primer lugar, pacientes con síndrome de Netherton muestran un aumento de la actividad serina proteasa dependiente del fenotipo, una disminución de corneodesmosomas, una disminución de las enzimas de procesamiento de lípidos  $\beta$ -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida, y una función de barrera alterada (15, 16). En segundo lugar, un ratón transgénico que sobreexpresa calicreína humana 7 muestra un fenotipo cutáneo similar al encontrado en pacientes con dermatitis atópica (17, 18, 19). En tercer lugar, en la piel de pacientes con dermatitis atópica y psoriasis se describieron niveles elevados de hK7 (17, 20). Además, la actividad de K7 aumentada y por tanto la disfunción de la barrera epitelial también pueden desempeñar un papel importante en la patología de otras enfermedades epiteliales tales como enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de

Crohn.

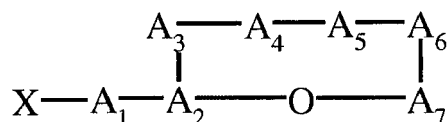
- 5 Por tanto, se considera que hK7 es una posible diana para el tratamiento de enfermedades implicadas con disfunción epitelial tales como enfermedades cutáneas inflamatorias y/o hiperproliferativas y pruríticas tales como dermatitis atópica, psoriasis, síndrome de Netherton u otras dermatosis pruríticas tales como prurigo nodular, picazón inespecífica de las personas ancianas así como otras enfermedades con disfunción de la barrera epitelial tales como enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn y existe una necesidad de moduladores específicos (agonistas o inhibidores) de la misma.

El tratamiento puede ser mediante aplicación local o sistémica tal como cremas, pomadas y supositorios o mediante aplicación oral o s.c. o i.v., respectivamente.

- 10 *Chondromyces* es un género de la familia *Polyangiaceae*, que pertenece al orden *Myxococcales* dentro de las delta-proteobacterias. Las bacterias del orden *Myxococcales*, también denominadas mixobacterias, son bacterias gram-negativas en forma de bastón con dos características que las distinguen de la mayoría de las demás bacterias. Pululan sobre superficies sólidas usando un mecanismo de deslizamiento activo y se agregan para formar cuerpos fructíferos con la inanición (Kaiser (2003)). Los presentes inventores han identificado depsipéptidos cíclicos producidos por *Chondromyces* que pueden modular específicamente calicreína 7.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a depsipéptidos cíclicos que tienen la estructura de la fórmula (I):



en la que el enlace éster se encuentra entre el grupo carboxilo de A<sub>7</sub> y el grupo hidroxilo de A<sub>2</sub>,

- 20 en la que X y A<sub>1</sub> son cada uno independientemente opcionales, y

en la que X es cualquier residuo químico;

A<sub>1</sub> es un aminoácido convencional;

A<sub>2</sub> es treonina o serina o 5-metilhidroxiprolina;

- 25 A<sub>3</sub> es un aminoácido convencional no básico o derivado del mismo, o un aminoácido no convencional no básico, en el que el derivado de aminoácido convencional no básico se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-acilo, S-alquilo, S-arilo, S-S-alquilo, alcocarbonilo, O-carbonil-alcoxilo, carbonato, O-carbonil-ariloxilo, O-carbonil-alquilamino, O-carbonil-arilamino, N-alquilo, N-dialquilo, N-trialquilamonio, N-acilo, N-carbonil-alcoxilo, N-carbonil-ariloxilo, N-carbonil-alquilamino, N-carbonil-arilamino, N-sulfonilalquilo o N-sulfonilarilo;

A<sub>4</sub> es Ahp, deshidro-AHP o prolina;

- 30 A<sub>5</sub> es isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, treonina o valina;

A<sub>6</sub> es alanina, fenilalanina, triptófano, tirosina o un derivado de tirosina de los mismos, en el que el derivado de tirosina se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-heteroarilo, O-acilo, O-PO<sub>3</sub>H u O-SO<sub>3</sub>H o de un derivado que está halogenado, en la posición orto o meta;

A<sub>7</sub> es leucina, isoleucina o valina;

- 35 en la que el átomo de nitrógeno del enlace amida entre A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub> puede estar sustituido con un metilo;

en la que Ahp es 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso como medicamento para tratar una enfermedad dependiente de calicreína 7.

Preferiblemente, la enfermedad dependiente de calicreína 7 se selecciona del grupo que consiste en dermatosis pruríticas tales como prurigo nodular, psoriasis pustular y cáncer, en particular cáncer de ovarios.

Descripción de las figuras

Figura 1: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto (II) (600 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).

5 Figura 2: espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto (II) (150 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).

Figura 3: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto (VIII) (600 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).

Figura 4: espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto (VIII) (150 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).

Figura 5: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se ha convertido en 3-amino-2-piperidona (ejemplo 4).

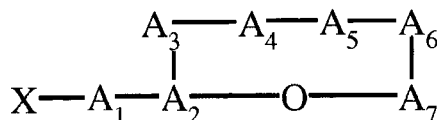
10 Figura 6: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del depsipéptido cíclico según el ejemplo 5.

Figura 7: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del depsipéptido cíclico según el ejemplo 6.

Figura 8: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de un derivado del depsipéptido cíclico según el ejemplo 7.

Descripción detallada de la invención

15 Tal como se describió anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a depsipéptidos cíclicos, o a un derivado de los mismos, que tienen la estructura de la fórmula (I):



en la que el enlace éster se encuentra entre el grupo carboxilo de  $\text{A}_7$  y el grupo hidroxilo de  $\text{A}_2$ ,

en la que X y  $\text{A}_1$  son cada uno independientemente opcionales, y

en la que X es cualquier residuo químico;

20  $\text{A}_1$  es un aminoácido convencional;

$\text{A}_2$  es treonina o serina o 5-metilhidroxiprolina;

25  $\text{A}_3$  es un aminoácido convencional no básico o derivado del mismo, o un aminoácido no convencional no básico, en el que el derivado de aminoácido convencional no básico se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-acilo, S-alquilo, S-arilo, S-S-alquilo, alcocarbonilo, O-carbonil-alcóxilo, carbonato, O-carbonil-ariloxilo, O-carbonil-alquilamino, O-carbonil-arilamino, N-alquilo, N-dialquilo, N-trialquilamonio, N-acilo, N-carbonil-alcóxilo, N-carbonil-ariloxilo, N-carbonil-alquilamino, N-carbonil-arilamino, N-sulfonilalquilo o N-sulfonilarilo;

$\text{A}_4$  es Ahp, deshidro-AHP o prolina;

$\text{A}_5$  es isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, treonina o valina;

30  $\text{A}_6$  es alanina, fenilalanina, triptófano, tirosina o un derivado de tirosina de los mismos, en el que el derivado de tirosina se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-heteroarilo, O-acilo, O- $\text{PO}_3\text{H}$  u O- $\text{SO}_3\text{H}$  o de un derivado que está halogenado, en la posición orto o meta;

$\text{A}_7$  es leucina, isoleucina o valina;

en la que el átomo de nitrógeno del enlace amida entre  $\text{A}_5$  y  $\text{A}_6$  puede estar sustituido con un metilo;

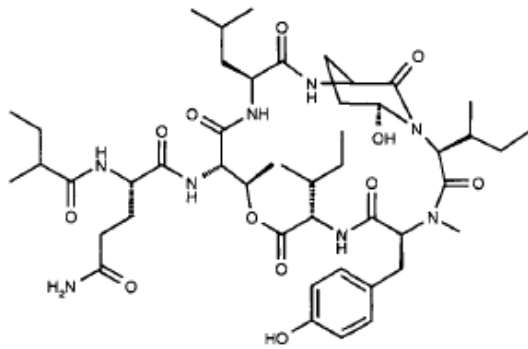
en la que Ahp es 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

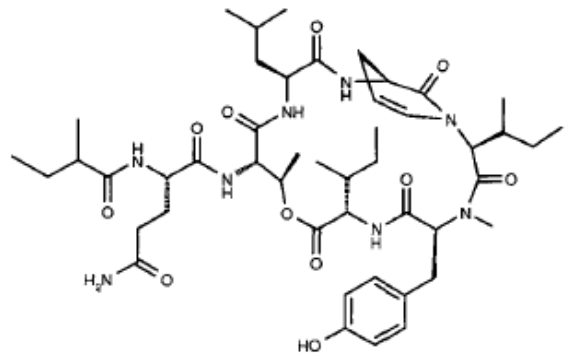
para su uso como medicamento para tratar una enfermedad dependiente de calicreína 7.

Preferiblemente, la enfermedad dependiente de calicreína 7 se selecciona del grupo que consiste en dermatosis pruríticas tales como prurigo nodular, psoriasis pustular y cáncer, en particular cáncer de ovarios.

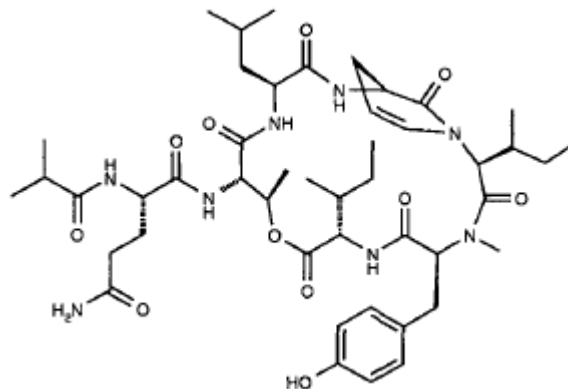
5 Realizaciones específicas de depsipéptidos cíclicos de la invención son:



Fórmula (III)



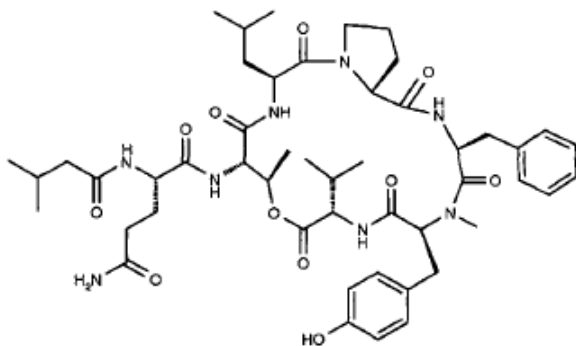
Fórmula (IV)



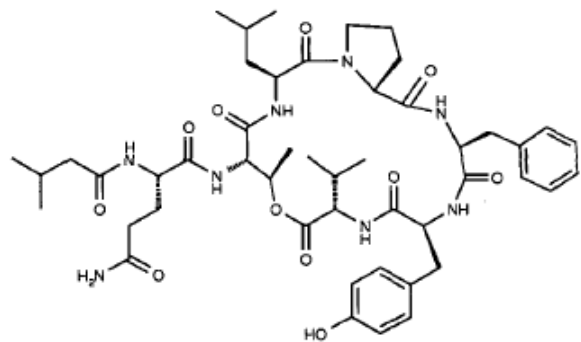
Fórmula (V)

10 Los depsipéptidos cíclicos de fórmula (III)-(V) pueden producirse por la cepa *Chondromyces crocatus* de la invención (DSM 19329).

Otras realizaciones específicas de depsipéptidos cíclicos de la invención son:



Fórmula (IX)



Fórmula (X)

## ES 2 527 298 T3

Los depsipéptidos cíclicos de fórmula (IX)-(X) pueden producirse por el *Chondromyces robustus* de la invención (DSM 19330).

Realizaciones específicas adicionales de los depsipéptidos cíclicos de la presente invención son:

Tabla 1

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Número CAS</b>
Lingbiastatina 4	928202-70-4
Micropeptina KT946	925421-06-3
Cianopeptolina 1021	914606-83-0
Cianopeptolina 993	914606-81-8
Cianopeptolina 1063	912460-67-4
Largamida G	911297-59-1
Largamida F	911297-58-0
Largamida E	911297-57-9
Largamida D	911297-56-8
Cianopeptolina 954	866718-63-0
sin nombre	861388-86-5
sin nombre	848891-15-6
sin nombre	848888-25-5
sin nombre	848780-62-1
sin nombre	848780-61-0
Micropeptina 88Y	844636-95-9
Micropeptina 88N	844636-94-8
Cianopeptolina 963A	790300-44-6
sin nombre	745771-53-3
sin nombre	685502-64-1
Planctopeptina BL 1061	637300-26-6
Planctopeptina BL 843	637300-24-4
Planctopeptina BL 1125	637300-22-2
Tasipeptina B	546123-47-1
Tasipeptina A	546123-46-0

## ES 2 527 298 T3

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Número CAS</b>
Nostopeptina BN920	501903-96-4
sin nombre	500145-57-3
Scyptolina B	403479-63-0
Scyptolina A	403479-62-9
sin nombre	370867-67-7
sin nombre	370867-66-6
sin nombre	370867-65-5
Somamida B	350811-52-8
Micropeptina SD 1002	344939-97-5
Micropeptina SD 979	344939-95-3
Oscilapeptilida 97B	264909-20-8
Oscilapeptilida 97A	264909-19-5
Micropeptina T 1	249730-25-4
Micropeptina SF 909	248582-49-2
Oscilapeptina E	239088-24-5
Oscilapeptina D	239088-21-2
Oscilapeptina C	239088-18-7
Oscilapeptina B	239088-16-5
Nostopeptina D	227930-54-3
Nostopeptina C	227930-53-2
Nostopeptina J	227930-51-0
Nostopeptina I	227930-50-9
Nostopeptina F	227930-47-4
Nostopeptina E	227930-46-3
Simplostatina 2	225915-64-0
Derivado de micropeptina 88D	208040-93-1
Triacetato de micropeptina 88D	208040-91-9
Micropeptina 88F	208040-86-2

ES 2 527 298 T3

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Número CAS</b>
Micropeptina 88E	208040-84-0
Micropeptina 88D	208040-82-8
Micropeptina 88C	208040-80-6
Micropeptina 88B	208040-78-2
Micropeptina 88A	208040-76-0
Micropeptina 103	190771-26-7
Nostopeptina B	185980-89-6
Nostociclina	181622-50-4
Anabaenopeptilida 202B	173450-69-6
Anabaenopeptilida 90B	173450-68-5
Anabaenopeptilida 202a	173429-63-5
Anabaenopeptilida 90A	173429-62-4
Oscilapeptina G	172548-91-3
Oscilapeptina A	167172-72-7
Nostopeptina A	157744-21-3
Microcistilida A	157242-32-5
Aeruginoeptina 917S-B	157231-94-2
Aeruginoeptina 917S-C	157203-82-2
Aeruginoeptina 228B	152510-34-4
Aeruginoeptina 228A	152510-33-3
Aeruginoeptina 95B	152510-32-2
Aeruginoeptina 95A	152510-31-1
Dolastatina 13	120231-23-4
Derivado de dolastatina 13	120231-24-5
Derivado de dolastatina 13	125310-66-9
Asperglicina E	630410-95-6
Asperglicina D	630410-94-5
Asperglicina C	630410-92-3



Nombre del compuesto	Número CAS
Asperglicina B	630410-90-1
Asperglicina A	630410-89-8
Nostopeptina K	227930-52-1
Nostopeptina H	227930-49-6
Nostopeptina G	227930-48-5
Ictiopeptina A	946828-32-6
Ictiopeptina B	946828-33-7
Lingbiastatina 5	957130-98-2
Lingbiastatina 6	957130-99-3
Lingbiastatina 7	957131-00-9
Cianopeptolina 1138	1009081-69-9
sin nombre	957187-61-0
Micropeptina T20	224947-46-0

Lista de abreviaturas

Ahp 3-Amino-6-hidroxi-2-piperidona

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

5 hK7 Calicreína humana 7

HPLC Cromatografía de líquidos de alto rendimiento/a alta presión

HTS Selección de alto rendimiento

IC Cultivo intermedio

ID Identificación

10 MB Mixobacteria

MC Cultivo principal

PC Pre-cultivo

pO<sub>2</sub> Presión parcial de oxígeno en caldo de cultivo (100% = saturación con aire)

rpm Rotaciones por minuto

15 SCCE Enzima quimotriptica del estrato córneo

SPEX Extracción en fase sólida

vvm Tasa de aireación (volumen de aire por volumen de cultivo y por minuto)

Un "residuo químico" puede ser cualquier resto químico orgánico o inorgánico. La expresión "residuo químico" incluye, pero no se limita a, grupo alifático sustituido o no sustituido, por ejemplo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o halógeno. Por ejemplo, un residuo químico tal como se define en las reivindicaciones puede ser cualquiera de los grupos químicos descritos a continuación en el presente documento.

La expresión "residuo químico" incluye, pero no se limita a, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas y similares.

Ejemplos de resto químico inorgánico son, por ejemplo, halógenos, tales como Br o Cl.

Un "grupo alifático" es un resto no aromático que puede contener cualquier combinación de átomos de carbono, átomos de hidrógeno, átomos de halógeno, oxígeno, nitrógeno u otros átomos, y opcionalmente contiene una o más unidades de insaturación, por ejemplo, dobles y/o triples enlaces. Un grupo alifático puede ser de cadena lineal, ramificado o cíclico y preferiblemente contiene entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 átomos de carbono, más normalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono. Además de grupos hidrocarbonados alifáticos, los grupos alifáticos incluyen, por ejemplo, polialcohalquilos, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas, por ejemplo. Tales grupos alifáticos pueden estar adicionalmente sustituidos.

Los términos "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>", "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" o "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>", tal como se usan en el presente documento, se refieren a radicales hidrocarbonados saturados, de cadena lineal o ramificada, que contienen entre uno y tres, uno y doce, o uno y seis átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen radicales metilo, etilo, propilo e isopropilo; los ejemplos de radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen, pero no se limitan a, radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, neopentilo y n-hexilo; y los ejemplos de radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> incluyen, pero no se limitan a, radicales etilo, propilo, isopropilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares.

El término "alquilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un alquilo, tal como un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes alifáticos.

Los sustituyentes alifáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, --F, --Cl, --Br, --I, --OH, hidroxilo protegido, éteres alifáticos, éteres aromáticos, oxo, --NO<sub>2</sub>, --CN, --alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno (tal como perhaloalquilos), alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, --alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, --NH<sub>2</sub>, amino protegido, --NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NH-arilo, --NH-heteroarilo, --NH-heterocicloalquilo, --dialquilamino, --diarilamino, --diheteroarilamino, --O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --O-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --O-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --O-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --O-arilo, --O-heteroarilo, --O-heterocicloalquilo, --C(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)-arilo, --C(O)-heteroarilo, --C(O)-heterocicloalquilo, --CONH<sub>2</sub>, --CONH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH-arilo, --CONH-heteroarilo, --CONH-heterocicloalquilo, --CO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>-arilo, --CO<sub>2</sub>-heteroarilo, --CO<sub>2</sub>-heterocicloalquilo, --OCO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>-arilo, --OCO<sub>2</sub>-heteroarilo, --OCO<sub>2</sub>-heterocicloalquilo, --OCONH<sub>2</sub>, --OCONH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH-arilo, --OCONH-heteroarilo, --OCONH-heterocicloalquilo, --NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-arilo, --NHC(O)-heteroarilo, --NHC(O)-heterocicloalquilo, --NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-arilo, --NHC(O)-heteroarilo, --NHC(O)-heterocicloalquilo, --NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)-arilo, --NHC(O)-heteroarilo, --NHC(O)-heterocicloalquilo, --NHC(S)NR<sub>2</sub>, NHC(S)NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH-arilo, --NHC(S)NR-heteroarilo, --NHC(S)NH-heterocicloalquilo, --NHC(NH)NH<sub>2</sub>, NHC(NH)NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH-arilo, --NHC(NH)NH-heteroarilo, --NHC(NH)NH-heterocicloalquilo, --NHC(NH)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)-arilo, --NHC(NH)-heteroarilo, --NHC(NH)-heterocicloalquilo, --C(NR)NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NR)NH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH-arilo, --C(NH)NH-heteroarilo, --C(NH)NH-heterocicloalquilo, --S(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)-arilo, --S(O)-heteroarilo, --S(O)-heterocicloalquilo-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, --SO<sub>2</sub>NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH-arilo, --SO<sub>2</sub>NH-heteroarilo, --SO<sub>2</sub>NH-heterocicloalquilo, --NHSO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>-arilo, --NHSO<sub>2</sub>-heteroarilo, --NHSO<sub>2</sub>-heterocicloalquilo, --CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, --CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, --arilo, --arilalquilo, --heteroarilo, --heteroarilalquilo, --heterocicloalquilo, --cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, polialcohalquilo, polialcoxilo,

-metoximetoxilo, -metoxietoxilo, --SH, --S--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --S--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --S--arilo, --S--heteroarilo, -S-heterocicloalquilo o metiltiometilo. Se entiende que los arilos, heteroarilos, alquilos y similares pueden estar adicionalmente sustituidos.

5 Los términos "alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>" o "alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", tal como se usan en el presente documento, representan un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarbonado que contiene desde dos hasta doce o de dos a seis átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los grupos alqueno incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, alcadienos y similares.

10 El término "alqueno sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo "alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>" o "alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes alifáticos. Los términos "alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>" o "alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>", tal como se usan en el presente documento, representan un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarbonado que contiene desde dos hasta doce o de dos a seis átomos de carbono que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los grupos alquino representativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares.

15 El término "alquino sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo "alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>" o "alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes alifáticos. El término "alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, tal como se definió anteriormente, unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos de alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen, pero no se limitan a, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo, n-pentoxilo, neopentoxilo y n-hexoxilo.

Los términos "halo" y "halógeno", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

25 El término "arilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillos carbocíclico mono o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo, pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares.

El término "arilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo, tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes aromáticos.

30 Los sustituyentes aromáticos incluyen, pero no se limitan a, --F, --Cl, --Br, --I, --OH, hidroxilo protegido, éteres alifáticos, éteres aromáticos, oxo, --NO<sub>2</sub>, --CN, --alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno (tal como perhaloalquilos), alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, --alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, --NH<sub>2</sub>, amino protegido, --NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NH--arilo, --NH--heteroarilo, --NH--heterocicloalquilo, --dialquilamino, --diarilamino, --diheteroarilamino, --O--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --O--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --O--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --O--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --O--arilo, --O--heteroarilo, --O--heterocicloalquilo, --C(O)--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --C(O)--arilo, --C(O)--heteroarilo, --C(O)--heterocicloalquilo, --CONH<sub>2</sub>, --CONH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --CONH--arilo, --CONH--heteroarilo, --CONH--heterocicloalquilo, --CO<sub>2</sub>--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --CO<sub>2</sub>--arilo, --CO<sub>2</sub>--heteroarilo, --CO<sub>2</sub>--heterocicloalquilo, --OCO<sub>2</sub>--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --OCO<sub>2</sub>--arilo, --OCO<sub>2</sub>--heteroarilo, --OCO<sub>2</sub>--heterocicloalquilo, --OCONH<sub>2</sub>, --OCONH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --OCONH--arilo, --OCONH--heteroarilo, --OCONH--heterocicloalquilo, --NHC(O)--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, NHC(O)--arilo, --NHC(O)--heteroarilo, --NHC(O)--heterocicloalquilo, --NHCO<sub>2</sub>--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHCO<sub>2</sub>--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHCO<sub>2</sub>--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHCO<sub>2</sub>--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHCO<sub>2</sub>--arilo, --NHCO<sub>2</sub>--heteroarilo, --NHCO<sub>2</sub>--heterocicloalquilo, --NHC(O)NH<sub>2</sub>, NHC(O)NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(O)NH--arilo, --NHC(O)NH--heteroarilo, --NHC(O)NH--heterocicloalquilo, --NHC(S)NH<sub>2</sub>, NHC(S)NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(S)NH--arilo, --NHC(S)NH--heteroarilo, --NHC(S)NH--heterocicloalquilo, --NHC(NH)NH<sub>2</sub>, NHC(NH)NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)NH--arilo, --NHC(NH)NH--heteroarilo, --NHC(NH)NH--heterocicloalquilo, NHC(NH)--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHC(NH)--arilo, --NHC(NH)--heteroarilo, --NHC(NH)--heterocicloalquilo, --C(NH)NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --C(NH)NH--arilo, --C(NH)NH--heteroarilo, --C(NH)NH--heterocicloalquilo, --S(O)--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --S(O)--arilo, --S(O)--heteroarilo, --S(O)--heterocicloalquilo--SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, --SO<sub>2</sub>NH--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --SO<sub>2</sub>NH--arilo, --SO<sub>2</sub>NH--heteroarilo, --SO<sub>2</sub>NH--heterocicloalquilo, --NHSO<sub>2</sub>--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>--

- 5 cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --NHSO<sub>2</sub>-arilo, --NHSO<sub>2</sub>-heteroarilo, --NHSO<sub>2</sub>-heterocicloalquilo, --CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, --CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -arilo, -arilalquilo, -heteroarilo, -heteroarilalquilo, -heterocicloalquilo, --cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, polialcohalquilo, polialcoxilo, --metoximetoxilo, -metoxietoxilo, --SH, --S--alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, --S--alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S--alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, --S--cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, --S-arilo, --S-heteroarilo, --S-heterocicloalquilo o metiltiometilo. Se entiende que los arilos, heteroarilos, alquilos y similares pueden estar adicionalmente sustituidos.
- El término "arilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al compuesto original a través de un residuo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, fenetilo y similares.
- 10 El término "arilalquilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilalquilo, tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes aromáticos.
- 15 El término "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo o radical aromático mono, bi o tricíclico que tiene desde cinco hasta diez átomos de anillo de los cuales al menos un átomo de anillo se selecciona de S, O y N; ninguno, uno o dos átomos de anillo son heteroátomos adicionales independientemente seleccionados de S, O y N; y los átomos de anillo restantes son carbono, en el que cualquier N o S contenido dentro del anillo puede estar opcionalmente oxidado. Heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo y similares. El anillo heteroaromático puede unirse a la estructura química a través de un átomo de carbono o heteroátomo.
- 20 El término "heteroarilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o cuatro sustituyentes aromáticos.
- El término "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>", tal como se usa en el presente documento, representa un grupo monovalente derivado de un compuesto de anillo carbocíclico saturado, monocíclico o bicíclico, mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo[2.2.1]heptilo y biciclo[2.2.2]octilo.
- 25 El término "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes alifáticos.
- 30 El término "heterocicloalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 ó 7 miembros o un sistema condensado de grupos bi o tricíclicos, en el que (i) cada anillo contiene entre uno y tres heteroátomos independientemente seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, (ii) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 1 dobles enlaces y cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 dobles enlaces, (iii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, (iv) el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, (v) cualquiera de los anillos anteriores puede estar condensado con un anillo de benceno, y (vi) los átomos de anillo restantes son átomos de carbono que pueden estar opcionalmente sustituidos con oxo. Los grupos heterocicloalquilo representativos incluyen, pero no se limitan a, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo y tetrahidrofurilo.
- 35 El término "heterocicloalquilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterocicloalquilo, tal como se definió anteriormente, sustituido con uno, dos, tres o más sustituyentes alifáticos.
- 40 El término "heteroarilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al compuesto original a través de un residuo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piridinilmetilo, pirimidinilmetilo y similares.
- El término "heteroarilalquilo sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilalquilo, tal como se definió anteriormente, sustituido mediante sustitución independiente de uno, dos o tres o más sustituyentes aromáticos.
- 45 El término "alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o dos grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, tal como se definió anteriormente, unidos al resto molecular original a través de un átomo de nitrógeno. Los ejemplos de alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> incluyen, pero no se limitan a, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino y propilamino.
- 50 El término "alquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura --NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) en la que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> es tal como se definió anteriormente.
- El término "dialquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura --N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), en la que

alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> es tal como se definió anteriormente. Ejemplos de dialquilamino son, pero no se limitan a, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino, piperidino y similares.

El término "alcoxicarbonilo" representa un grupo éster, es decir, un grupo alcoxilo, unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo tal como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo y similares.

5 El término "carboxaldehído", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de fórmula --CHO.

El término "carboxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de fórmula --COOH.

El término "carboxamida", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de fórmula --C(O)NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) o -C(O)N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), --C(O)NH<sub>2</sub>, NHC(O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)C(O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) y similares.

10 El término "grupo protector de hidroxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico lábil que se conoce en la técnica para proteger un grupo hidroxilo frente a reacciones no deseadas durante procedimientos de síntesis. Tras dicho(s) procedimiento(s) de síntesis el grupo protector de hidroxilo tal como se describe en el presente documento puede eliminarse selectivamente. Grupos protectores de hidroxilo tal como se conocen se describen de manera general en T. H. Greene y P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999). Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen benciloxicarbonilo, 4-nitrobenciloxicarbonilo, 4-bromobenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, metoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, difenilmetoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2-furfuriloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, acetilo, formilo, cloroacetilo, trifluoroacetilo, metoxiacetilo, fenoxiacetilo, benzoílo, metilo, t-butilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsilil-etilo, 1,1-dimetil-2-propenilo, 3-metil-3-butenilo, alilo, bencilo, parametoxibencildifenilmetilo, trifenilmetilo (tritilo), tetrahidrofurilo, metoximetilo, metiltiommetilo, benciloximetilo, 2,2,2-tricloroetoximetilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, metanosulfonilo, para-toluenosulfonilo, trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo y similares. Grupos protectores de hidroxilo preferidos para la presente invención son acetilo (Ac o --C(O)CH<sub>3</sub>), benzoílo (Bn o --C(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) y trimetilsililo (TMS o --Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

25 El término "hidroxilo protegido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo hidroxilo protegido con un grupo protector de hidroxilo, tal como se definió anteriormente, incluyendo grupos benzoílo, acetilo, trimetilsililo, trietilsililo, metoximetilo, por ejemplo.

30 El término "grupo protector de amino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico lábil que se conoce en la técnica para proteger un grupo amino frente a reacciones no deseadas durante procedimientos de síntesis. Tras dicho(s) procedimiento(s) de síntesis el grupo protector de amino tal como se describe en el presente documento puede eliminarse de manera selectiva. Grupos protectores de amino tal como se conocen se describen de manera general en T. H. Greene y P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999). Los ejemplos de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, t-butoxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares.

35 El término "amino protegido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino protegido con un grupo protector de amino tal como se definió anteriormente.

El término "acilo" incluye residuos derivados de ácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos carboxílicos, ácidos carbámicos, ácidos carbónicos, ácidos sulfónicos y ácidos fosforosos. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfínulos aromáticos, sulfínulos alifáticos, sulfonilos aromáticos, sulfamilos alifáticos, sulfamilos aromáticos, fosfatos aromáticos y fosfatos alifáticos.

40 Un "aminoácido" es una molécula que contiene grupos funcionales tanto amina como carboxilo con la fórmula general NH<sub>2</sub>CHR<sub>1</sub>COOH. El término aminoácido incluye aminoácidos convencionales y aminoácidos no convencionales.

45 Los "aminoácidos convencionales" son alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

Un "aminoácido convencional que no es ácido aspártico" se selecciona del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

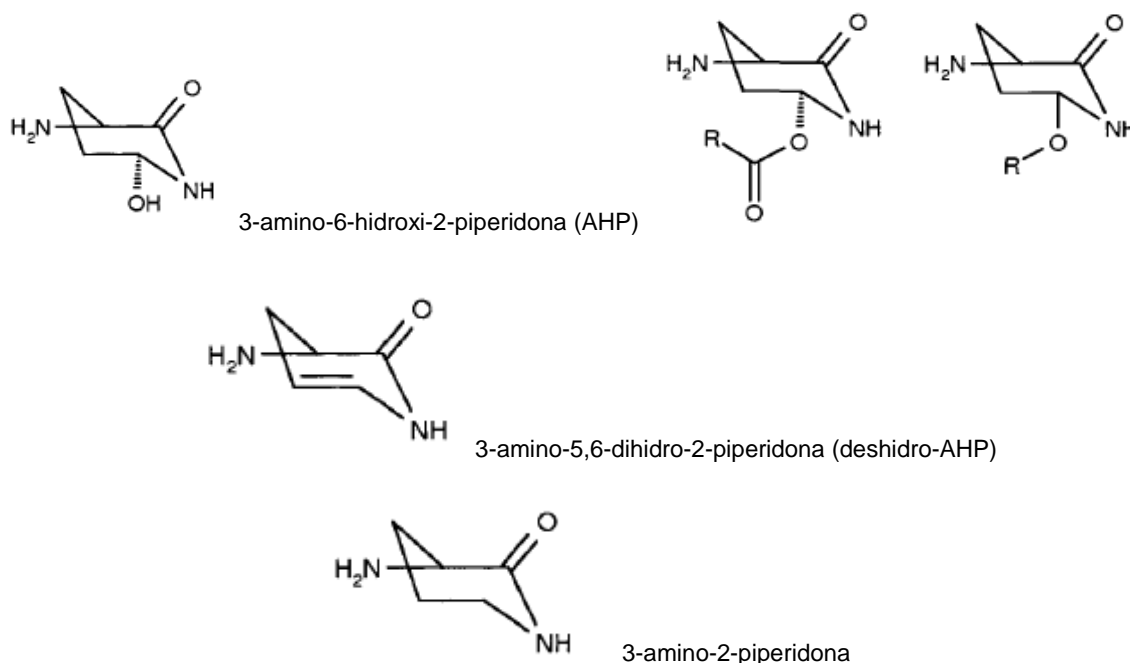
50 Los "aminoácidos no convencionales" son aminoácidos (moléculas que contienen grupos funcionales tanto amina como carboxilo) que no son uno de los aminoácidos convencionales. Ejemplos de los mismos son selenocisteína (incorporada en algunas proteínas en un codón UGA), pirrolisina (usada por algunas bacterias metanogénicas en

enzimas para producir metano y codificada por el codón UAG), lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona, ácido gamma-aminobutírico, ornitina, citrulina, homocisteína, dopamina o hidroxiprolina.

5 Los "aminoácidos convencionales no básicos" son alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

"Ahp" (3-amino-6-hidroxi-2-piperidona) es un aminoácido no convencional encontrado, por ejemplo, en cianobacterias. Los "derivados de Ahp" incluyen, pero no se limitan a, 3-amino-5,6-dihidro-2-piperidona (deshidro-AHP), 3-amino-2-piperidona y derivados de éter y éster de AHP. Un derivado de Ahp preferido es 3-amino-2-piperidona.

10 Diferentes miembros de esta familia de aminoácidos no convencionales son:



15 Los "derivados de aminoácido" incluyen, pero no se limitan a, O-alquilo, O-arilo, O-acilo, S-alquilo, S-arilo, S-S-alquilo, alcoxycarbonilo, O-carbonil-alcoxilo, carbonato, O-carbonil-ariloxilo, O-carbonil-alquilamino, O-carbonil-arilamino, N-alquilo, N-dialquilo, N-trialquilamonio, N-acilo, N-carbonil-alcoxilo, N-carbonil-ariloxilo, N-carbonil-alquilamino, N-carbonil-arilamino, N-sulfonilalquilo o N-sulfonilarilo.

20 Los "derivados de aminoácido convencional no básico" incluyen, pero no se limitan a, O-alquilo, O-arilo, O-acilo, S-alquilo, S-arilo, S-S-alquilo, alcoxycarbonilo, O-carbonil-alcoxilo, carbonato, O-carbonil-ariloxilo, O-carbonil-alquilamino, O-carbonilarilamino, N-alquilo, N-dialquilo, N-trialquilamonio, N-acilo, N-carbonil-alcoxilo, N-carbonil-ariloxilo, N-carbonil-alquilamino, N-carbonil-arilamino, N-sulfonilalquilo o N-sulfonilarilo.

Los "derivados de tirosina" incluyen, pero no se limitan a, -O-alquilo, O-arilo, O-heteroarilo, O-acilo, O-PO<sub>3</sub>H y O-SO<sub>3</sub>H, así como halogenación, en la posición orto o meta.

25 Los "derivados de depsipéptido" incluyen, pero no se limitan a, depsipéptidos modificados tal como se describe en el presente documento y aquellos descritos específicamente en los siguientes ejemplos. Dichos derivados pueden prepararse usando métodos bien conocidos en la técnica.

30 La invención se refiere además a sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los compuestos de la presente invención y a métodos para obtener tales compuestos. Un método de obtención del compuesto es mediante cultivo de *Chondromyces*, o un mutante o una variante del mismo, en condiciones adecuadas, preferiblemente usando el protocolo de fermentación descrito a continuación en el presente documento.

Pueden prepararse "sales" de compuestos de la presente invención que tienen al menos un grupo de formación de sal de una manera conocida en sí misma. Por ejemplo, pueden formarse sales de compuestos de la presente invención que tienen grupos ácidos, por ejemplo, tratando los compuestos con compuestos metálicos, tales como

sales de metales alcalinos de ácidos carboxílicos orgánicos adecuados, por ejemplo, la sal de sodio del ácido 2-  
 5 etilhexanoico, con compuestos orgánicos de metal alcalino o metal alcalinotérreo, tales como los correspondientes  
 hidróxidos, carbonatos o hidrogenocarbonatos, tales como hidróxido, carbonato o hidrogenocarbonato de sodio o  
 potasio, con compuestos de calcio correspondientes o con amoníaco o una amina orgánica adecuada, usándose  
 10 preferiblemente cantidades estequiométricas o tan sólo un pequeño exceso del agente de formación de sales. Se  
 obtienen sales de adición de ácido de compuestos de la presente invención de manera habitual, por ejemplo,  
 tratando los compuestos con un ácido o un reactivo de intercambio de aniones adecuado. Pueden formarse sales  
 internas de compuestos de la presente invención que contienen grupos de formación de sales ácidas o básicas, por  
 ejemplo, un grupo carboxilo libre y un grupo amino libre, por ejemplo, mediante la neutralización de sales, tales  
 como sales de adición de ácido, hasta el punto isoeléctrico, por ejemplo, con bases débiles, o mediante tratamiento  
 con intercambiadores de iones.

Pueden convertirse sales de una manera habitual en los compuestos libres; pueden convertirse sales de metales y  
 amonio, por ejemplo, mediante tratamiento con ácidos adecuados, y sales de adición de ácido, por ejemplo,  
 mediante tratamiento con un agente básico adecuado.

15 Pueden separarse mezclas de isómeros que pueden obtenerse según la invención de una manera conocida en sí  
 misma en los isómeros individuales; pueden separarse diastereoisómeros, por ejemplo, mediante reparto entre  
 mezclas de disolventes polifásicas, recristalización y/o separación cromatográfica, por ejemplo sobre gel de sílice o,  
 por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos a presión media sobre una columna de fase inversa, y pueden  
 20 separarse racematos, por ejemplo, mediante la formación de sales con reactivos de formación de sales ópticamente  
 puros y separación de la mezcla de diastereoisómeros que puede obtenerse de ese modo, por ejemplo por medio de  
 cristalización fraccionada, o mediante cromatografía sobre materiales de columna ópticamente activos.

Pueden someterse productos intermedios y productos finales a tratamiento final y/o purificarse según métodos  
 convencionales, por ejemplo, usando métodos cromatográficos, métodos de distribución, (re)cristalización y  
 similares.

25 Los depsipéptidos cíclicos de la invención inhiben calicreína 7. Un "inhibidor" es un depsipéptido cíclico que inhibe  
 una reacción enzimática con una  $CI_{50}$  medida de menos de 100  $\mu$ M, por ejemplo 50  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M o 10  $\mu$ M. Se  
 prefieren particularmente depsipéptidos cíclicos con una  $CI_{50}$  de menos de 30  $\mu$ M para calicreína humana 7, por  
 ejemplo depsipéptidos cíclicos con una  $CI_{50}$  de menos de 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM  
 o menos.

30 La  $CI_{50}$  para calicreína humana puede medirse usando el sustrato extinguido por fluorescencia Ac-Glu-Asp(EDANS)-  
 Lys-Pro-Ile-Leu-Phe<sup>^</sup>Arg-Leu-Gly-Lys(dabcil)-Glu-NH<sub>2</sub> (en el que <sup>^</sup> indica el enlace escindible, identificado mediante  
 análisis de EM) que puede adquirirse de Biosyntan (Berlín, Alemania). Se realizan reacciones enzimáticas en  
 tampón de citrato de sodio 50 mM a pH 5,6 que contiene NaCl 150 mM y CHAPS al 0,05% (p/v). Para la  
 35 determinación de valores de  $CI_{50}$  se realiza el ensayo a temperatura ambiente en placas de 384 pocillos. Todos los  
 volúmenes de ensayo finales son de 30  $\mu$ l. Se disuelven los compuestos de prueba en el 90% (v/v) de DMSO/agua y  
 se diluyen en agua (que contiene CHAPS al 0,05% (p/v)) hasta 3 veces la concentración de ensayo deseada. Las 11  
 concentraciones de compuesto final son: 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y  
 30  $\mu$ M. Para cada ensayo, se añaden 10  $\mu$ l de agua/CHAPS ( $\pm$  compuesto de prueba) por pocillo, seguido por 10  $\mu$ l  
 de disolución de proteasa (diluida con 1,5x tampón de ensayo). La concentración de proteasa en la disolución de  
 40 ensayo final es de 0,2 nM (según las concentraciones de enzima determinadas mediante el método de Bradford).  
 Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se inicia la reacción mediante adición de 10  $\mu$ l de disolución de  
 sustrato (sustrato disuelto en 1,5x tampón de ensayo, la concentración final es de 2  $\mu$ M). Se obtiene el efecto del  
 compuesto sobre la actividad enzimática a partir de las curvas de progresión lineal y se determina a partir de dos  
 45 lecturas, la primera tomada directamente tras la adición de sustrato (t = 0 min) y la segunda tras 1 hora (t = 60 min).  
 Se calcula el valor de  $CI_{50}$  a partir de la representación gráfica del porcentaje de inhibición frente a la concentración  
 de inhibidor usando software de análisis de regresión no lineal (XLfit, vers. 4.0; ID Business Solution Ltd., Guildford,  
 Surrey, R.U.).

La calicreína humana 7 (hK7) es una enzima con actividad serina proteasa ubicada en la piel humana. Se describió  
 50 por primera vez como enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) y puede desempeñar un papel en la  
 descamación del estrato córneo mediante escisión de proteínas del estrato córneo (por ejemplo, corneodesmosina y  
 placoglobina). El estrato córneo es la capa más externa formadora de barrera de la epidermis y consiste en células  
 epiteliales cornificadas rodeadas por lípidos altamente organizados. Está formándose continuamente mediante  
 diferenciación epidérmica y en la epidermis normal el grosor constante del estrato córneo se mantiene mediante un  
 55 equilibrio entre la proliferación de los queratinocitos y la descamación. La expresión potenciada de SCCE en  
 enfermedad cutánea inflamatoria puede tener significación etiológica (Hansson, *et al.* (2002)). Se encontró que  
 ratones transgénicos que expresan calicreína humana 7 en queratinocitos epidérmicos desarrollaban cambios  
 cutáneos patológicos con aumento del grosor epidérmico, hiperqueratosis, inflamación dérmica y prurito grave. Se  
 ha notificado una asociación genética entre una inserción de 4 pb (AACC) en la región 3'UTR del gen de la enzima

quimotriptica del estrato córneo y la dermatitis atópica (Vasilopoulos, *et al.* (2004)), lo que sugiere que la enzima puede tener un papel importante en el desarrollo de dermatitis atópica. La dermatitis atópica es una enfermedad con una barrera de la piel alterada que afecta al 15%-20% de los niños. La calicreína 7 es una S1 serina proteasa de la familia de genes de la calicreína que presenta una actividad de tipo quimotripsina, véase también Egelrud, T.; J. Invest. Dermatol. (1993) 101, 200-204 y Radau, G.; Pharmazie (2000), 55, 555-560. La calicreína humana 7 (hK7, KLK7 o enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), Swissprot P49862) desempeña un papel importante en la fisiología de la piel (1, 2, 3). Se expresa principalmente en la piel y se ha notificado que desempeña un papel importante en la fisiología de la piel. hK7 está implicada en la degradación de las estructuras cohesivas intercelulares en epitelios escamosos cornificados en el proceso de descamación. El proceso de descamación está bien regulado y equilibrado de manera delicada con la producción *de novo* de corneocitos para mantener un grosor constante del estrato córneo, la capa más externa de la piel implicada de manera crítica en la función de barrera de la piel. Con respecto a esto, se notifica que hK7 puede escindir las proteínas corneodesmosómicas corneodesmosina y desmocolina 1 (4, 5, 6). Se requiere la degradación de ambos corneodesmosomas para la descamación. Además, muy recientemente se ha mostrado que las dos enzimas de procesamiento de lípidos  $\beta$ -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida pueden degradarse mediante hK7 (7). Ambas enzimas de procesamiento de lípidos se secretan conjuntamente con sus sustratos glucosilceramidas y esfingomielina y procesan estos precursores lipídicos polares para dar sus productos más apolares por ejemplo ceramidas, que posteriormente se incorporan en las membranas laminares extracelulares. La arquitectura de la membrana laminar es crítica para una barrera de la piel funcional. Finalmente, se ha mostrado que hK7 activa el precursor de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) para dar su forma activa *in vitro* (8). Dado que los queratinocitos expresan IL-1 $\beta$  pero no la forma activa de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  específica (ICE o caspasa 1), se propone que la activación de IL-1 $\beta$  en la epidermis humana se produce mediante otra proteasa, siendo hK7 un posible candidato.

Recientes estudios vinculan una actividad de hK7 aumentada con enfermedades cutáneas inflamatorias tales como dermatitis atópica, psoriasis o síndrome de Netherton. Esto puede conducir a una degradación no controlada de corneodesmosomas dando como resultado una descamación mal regulada, una degradación potenciada de enzimas de procesamiento de lípidos dando como resultado una arquitectura de membrana laminar alterada o una activación no controlada de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . El resultado neto sería una función de barrera de la piel alterada e inflamación (véase también el documento WO-A-2004/108139).

Debido al hecho de que la actividad de hK7 se controla a varios niveles, diversos factores podrían ser responsables de una actividad de hK7 aumentada en enfermedades cutáneas inflamatorias. En primer lugar, la cantidad de proteasa que se expresa puede verse influida por factores genéticos. Tal vinculación genética, un polimorfismo en la región 3'-UTR en el gen de hK7, se describió recientemente (9). Los autores plantean la hipótesis de que la inserción de 4 pares de bases descrita en la región 3'-UTR del gen de calicreína 7 estabiliza el ARNm de hK7 y da como resultado una sobreexpresión de hK7. En segundo lugar, dado que hK7 se secreta mediante cuerpos laminares en el espacio extracelular del estrato córneo como zimógeno y no puede autoactivarse, necesita activarse por otra proteasa por ejemplo hK5 (5). La actividad no controlada de tal enzima activante puede dar como resultado una sobreactivación de hK7. En tercer lugar, hK7 activada puede inhibirse mediante inhibidores naturales tales como LEKTI, ALP o elafina (10, 11). La expresión reducida o la falta de tales inhibidores pueden dar como resultado una actividad de hK7 potenciada. Recientemente se encontró que mutaciones en el gen *spink5*, que codifica para LEKTI, causan síndrome de Netherton (12) y una única mutación puntual en el gen está vinculada con dermatitis atópica (13, 14). Finalmente, otro nivel de control de la actividad de hK7 es el pH. hK7 tiene un pH óptimo de neutro a ligeramente alcalino (2) y hay un gradiente de pH desde neutro hasta ácido desde las capas más internas hasta las más externas de la piel. Factores ambientales tales como jabón pueden dar como resultado un aumento del pH en las capas más externas del estrato córneo hacia el pH óptimo de hK7 aumentando así la actividad de hK7.

Una actividad de hK7 aumentada está vinculada con enfermedades cutáneas con una barrera de la piel alterada incluyendo enfermedades cutáneas inflamatorias e hiperproliferativas. En primer lugar, pacientes con síndrome de Netherton muestran un aumento de la actividad serina proteasa dependiente del fenotipo, una disminución de corneodesmosomas, una disminución de las enzimas de procesamiento de lípidos  $\beta$ -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida, y una función de barrera alterada (15, 16). En segundo lugar, un ratón transgénico que sobreexpresa calicreína humana 7 muestra un fenotipo cutáneo similar al encontrado en pacientes con dermatitis atópica (17, 18, 19). En tercer lugar, en la piel de pacientes con dermatitis atópica y psoriasis se describieron niveles elevados de hK7 (17, 20). Además, la actividad de K7 aumentada y por tanto la disfunción de la barrera epitelial también pueden desempeñar un papel importante en la patología de otras enfermedades epiteliales tales como enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.

El tratamiento puede ser mediante aplicación local o sistémica tal como cremas, pomadas y supositorios o mediante aplicación oral o s.c. o i.v., respectivamente, de una manera bien conocida en la técnica.

En un aspecto los depsipéptidos según la invención se obtienen cultivando una cepa *Chondromyces crocatus* que se depositó el 24 de abril de 2007 en DSMZ (DSM 19329) o se obtienen cultivando una cepa *Chondromyces robustus* que se depositó el 24 de abril de 2007 en DSMZ (DSM 19330).



El depósito de las cepas se realizó según los términos del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes. Las cepas depositadas se liberarán al público de manera irrevocable y sin restricción ni condición tras expedirse una patente. Las cepas depositadas se proporcionan únicamente por conveniencia para los expertos en la técnica y no son una admisión de que se requiera un depósito para permitir su reproducción.

Debe entenderse que la presente invención no se limita al cultivo de las cepas particulares *Chondromyces crocatus* y *Chondromyces robustus*. En vez de eso, la presente invención contempla el cultivo de otros organismos que pueden producir depsipéptidos, tales como mutantes o variantes de las cepas que pueden derivarse de este organismo mediante medios conocidos tales como irradiación con rayos X, irradiación ultravioleta, tratamiento con mutágenos químicos, exposición a fago, selección con antibióticos y similares.

Los depsipéptidos de la presente invención pueden biosintetizarse mediante diversos microorganismos. Los microorganismos que pueden sintetizar los compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bacterias del orden *Myxococcales*, también denominadas mixobacterias. Los ejemplos no limitativos de miembros que pertenecen a los géneros de mixobacterias incluyen *Chondromyces*, *Sorangium*, *Polyangium*, *Byssophaga*, *Haploangium*, *Jahnia*, *Nannocystis*, *Koffleria*, *Myxococcus*, *Coralococcus*, *Cystobacter*, *Archangium*, *Stigmatella*, *Hyalangium*, *Melittangium*, *Pyxicoccus*. La taxonomía de mixobacterias es compleja y se hace referencia a Garrity GM, Bell JY, Lilburn TG (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes, Bergey's manual of systematic bacteriology, 2ª edición, versión 5.0, mayo de 2004. (<http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>).

Los compuestos de las formulas estructurales (I-X) se producen mediante la fermentación aerobia de un medio adecuado en condiciones controladas mediante inoculación con un cultivo de *Chondromyces crocatus* o *Chondromyces robustus*. El medio adecuado es preferiblemente acuoso y contiene fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables.

Los medios adecuados incluyen, sin limitación, los medios de crecimiento mencionados a continuación en los ejemplos 1 y 2. La fermentación se realiza durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 días a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 40°C; sin embargo, para resultados óptimos, se prefiere realizar la fermentación a aproximadamente 30°C. El pH del medio de nutrientes durante la fermentación puede ser de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0.

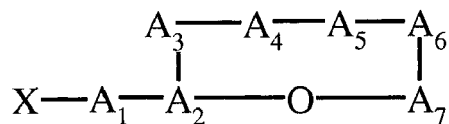
Los medios de cultivo inoculados con los microorganismos que producen depsipéptidos pueden incubarse en condiciones aerobias usando, por ejemplo, un agitador rotativo o un fermentador de tanque con agitación. La aireación puede conseguirse mediante la inyección de aire, oxígeno o una mezcla gaseosa apropiada en los medios de cultivo inoculados durante incubación. En cuanto se ha acumulado una cantidad suficiente de los compuestos antibióticos, pueden concentrarse y aislarse del cultivo de una manera convencional y habitual, por ejemplo mediante extracción y métodos cromatográficos, precipitación o cristalización, y/o de una manera dada a conocer en el presente documento. Como ejemplo para la extracción, puede mezclarse y agitarse el cultivo con un disolvente orgánico adecuado tal como n-butanol, acetato de etilo, ciclohexano, n-hexano, tolueno, acetato de n-butilo o 4-metil-2-pentanona, los compuestos antibióticos en la fase orgánica pueden recuperarse mediante eliminación del disolvente a presión reducida. El residuo resultante puede reconstituirse opcionalmente, por ejemplo, con agua, etanol, metanol o una mezcla de los mismos, y volverse a extraer con un disolvente orgánico adecuado tal como hexano, tetracloruro de carbono, cloruro de metileno, diclorometano o una mezcla de los mismos. Tras la eliminación del disolvente, los compuestos pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante métodos cromatográficos. Como ejemplo para cromatografía, pueden aplicarse fases estacionarias tales como gel de sílice u óxido de aluminio, con disolventes de elución orgánicos o mezclas de los mismos, incluyendo éteres, cetonas, ésteres, hidrocarburos halogenados o alcoholes, o cromatografía de fase inversa con gel de sílice modificado que tiene diversos grupos funcionales y eluyendo con disolventes orgánicos o mezclas acuosas de los mismos, tales como acetonitrilo, metanol o tetrahidrofurano a diferente pH. Otro ejemplo es una cromatografía de reparto, por ejemplo en el modo de sólido-líquido o en el líquido-líquido. También puede aplicarse cromatografía de exclusión molecular, por ejemplo usando Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) y eluyendo con diferente disolventes, preferiblemente con alcoholes.

Tal como resulta habitual en este campo, los procedimientos de producción así como de recuperación y purificación pueden monitorizarse mediante una variedad de métodos analíticos, incluyendo bioensayos, CCF, HPLC o una combinación de los mismos, y aplicando diferentes métodos de detección, para CCF normalmente luz UV, vapor de yodo o pulverización de reactivos colorantes, para HPLC normalmente luz UV, métodos sensibles a la masa o de dispersión de la luz. Por ejemplo una técnica de HPLC se representa usando una columna de fase inversa con un gel de sílice funcionalizado y aplicando un eluyente que es una mezcla en gradiente lineal de un disolvente polar miscible con agua y agua a un pH específico, y un método de detección con luz UV a diferentes longitudes de onda y un detector sensible a la masa.

Los depsipéptidos biosintetizados mediante microorganismos pueden someterse opcionalmente a modificaciones químicas al azar y/o dirigidas para formar compuestos que son derivados o análogos estructurales. Tales derivados

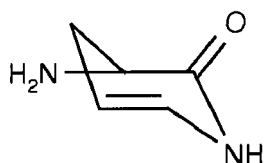
o análogos estructurales que tienen actividades funcionales similares están dentro del alcance de la presente invención. Los depsipéptidos pueden modificarse opcionalmente usando métodos bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

5 Por ejemplo, pueden prepararse derivados de los depsipéptidos de la invención mediante derivatización de depsipéptidos cíclicos de fórmula

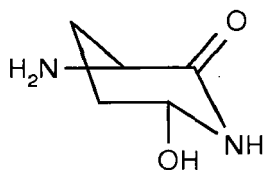


lo que comprende

a) – la preparación de compuestos en los que A<sub>4</sub> es

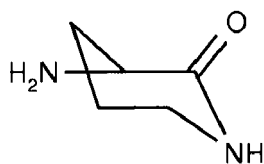


10 mediante tratamiento de un compuesto en el que A<sub>4</sub> es

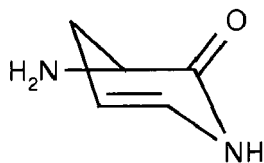


con un ácido orgánico o inorgánico, por ejemplo ácido trifluoroacético, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o un ácido de Lewis, por ejemplo eterato de trifluoruro de boro en un disolvente, por ejemplo diclorometano, THF, o sin un disolvente a una temperatura de entre -78°C y 150°C, preferiblemente entre -30°C y temperatura ambiente.

15 b) – la preparación de compuestos en los que A<sub>4</sub> es

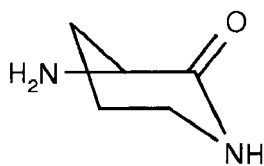


mediante tratamiento de un compuesto en el que A<sub>4</sub> es

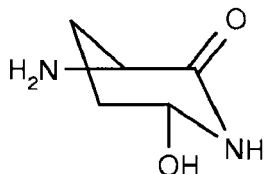


20 con hidrógeno molecular o una fuente del mismo, por ejemplo ciclohexeno, formiato de amonio, en presencia de un catalizador, por ejemplo, paladio en un disolvente, por ejemplo, 2-propanol a una temperatura de entre -50 y 100°C, preferiblemente a temperatura ambiente.

c) – la preparación de compuestos en los que A<sub>4</sub> es

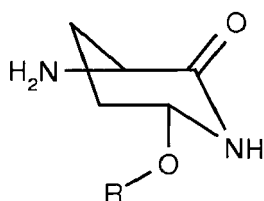


mediante tratamiento de un compuesto en el que A<sub>4</sub> es

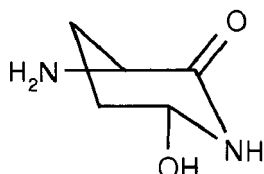


- 5 con un ácido orgánico o inorgánico, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o un ácido de Lewis, por ejemplo eterato de trifluoruro de boro en presencia de un agente reductor, por ejemplo trietilsilano, un disolvente, por ejemplo diclorometano, THF, o sin un disolvente a una temperatura de entre -78°C y 150°C, preferiblemente entre -50°C y temperatura ambiente.

d) – la preparación de compuestos en los que A<sub>4</sub> es



- 10 mediante tratamiento de un compuesto en el que A<sub>4</sub> es



- 15 con un alcohol sustituido o no sustituido y un ácido orgánico o inorgánico, por ejemplo ácido trifluoroacético, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o un ácido de Lewis, por ejemplo eterato de trifluoruro de boro en un disolvente, por ejemplo alcoholes sustituidos y no sustituidos, THF, diclorometano, preferiblemente alcoholes sustituidos y no sustituidos, o sin un disolvente a una temperatura de entre -78°C y 150°C, preferiblemente entre -30°C y temperatura ambiente.

- A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, Cl<sub>50</sub>, etcétera, usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están modificados en todos los casos con el término “aproximadamente”.
- 20 Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones. Como mínimo, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, debe interpretarse que cada parámetro numérico al menos a la luz del número de cifras significativas y aplicando técnicas de redondeo habituales. Independientemente de que los intervalos y parámetros numéricos que exponen el alcance amplio de la
- 25 invención sean aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos, las tablas y las figuras se notifican con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico puede contener de manera inherente ciertos errores resultantes de variaciones en los experimentos, mediciones de pruebas, análisis estadísticos y similares.

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta
- 30 invención. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, regirá la presente memoria

descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 Producción de los compuestos (II)-(VII)

Cepa: Se aisló la cepa *Chondromyces crocatus* de una muestra medioambiental, madera podrida de un nogal, en los laboratorios.

Se identificó la cepa de manera inequívoca como *Chondromyces crocatus* basándose en la morfología de los cuerpos fructíferos así como en la secuencia parcial del gen de ARN 16S. Se asignó *C. crocatus* al grupo de riesgo biológico 1 por DSMZ (DSMZ (2007)). *Chondromyces* es un género en la familia *Polyangiaceae*, que pertenece al orden *Myxococcales* dentro de las delta-proteobacterias. Las bacterias del orden *Myxococcales*, también denominadas mixobacterias, son bacterias gram-negativas en forma de bastón con dos características que las distinguen de la mayoría de las demás bacterias. Pululan sobre superficies sólidas usando un mecanismo de deslizamiento activo y se agregan para formar cuerpos fructíferos con la inanición (Kaiser (2003)).

15 La cepa *Chondromyces crocatus* de la invención se depositó en DSMZ con el número de registro 19329.

La cepa *Chondromyces crocatus* de la invención no está disponible como cultivo puro y no puede mantenerse sin una cepa de compañía. La cepa de compañía puede obtenerse y mantenerse como cultivo puro cultivando en línea una alícuota de un cocultivo de fermentación sobre placas de agar (medio LB). Se realizó una observación similar por el grupo de Reichenbach (Jacobi, *et al.* (1996), Jacobi, *et al.* (1997)). Basándose en una secuencia de ADN parcial del gen de ARNr de 16S de la cepa de compañía de *Chondromyces crocatus* de esta invención, la coincidencia más próxima es *Bosea thiooxidans* del orden *Rhizobiales* dentro de las Alfa-proteobacterias. El ARNr de 16S de fragmento con secuencia de 424 pb investigado tenía una identidad de aproximadamente el 98% (al menos 8 intercambios de nucleótidos) con la secuencia AF508112 (*B. thiooxidans*) de Genbank. Se aisló *B. thiooxidans* de muestras de tierra recogidas de diferentes campos agrícolas alrededor de Calcuta, India. Puede oxidar compuestos de azufre inorgánicos reducidos en presencia de algunos sustratos orgánicos y se describió como una nueva especie y un nuevo género en 1996 (Das, *et al.* (1996)). Un árbol filogenético derivado de secuencias parciales de ARN de 16S de las 5 especies de *Bosea* descritas indica una posición separada para la cepa de compañía de *Bosea* aislada de *C. crocatus*.

Cultivo: Se realizaron cultivos en fermentador de 100 l según el siguiente protocolo: Se iniciaron precultivos mediante inoculación de 5 ml (=10%) de un cultivo líquido de cepa *Chondromyces crocatus* de la invención en 50 ml de medio MD1 (adaptado según Bode *et al.* 2003, véase la tabla 6) en un matraz de agitación con deflectores de 200 ml. Tras 11 días de incubación a 30°C y 120 rpm en un agitador rotatorio se inició un 1<sup>er</sup> cultivo intermedio mediante inoculación de 10 ml cada uno (=10%) del precultivo en 5 x 100 ml de medio MD1 en matraces de agitación con deflectores de 500 ml. Tras 7 días de incubación a 30°C y 120 rpm en un agitador rotatorio se inició un 2<sup>o</sup> cultivo intermedio mediante inoculación de 25 ml cada uno (=5%) del 1<sup>er</sup> cultivo intermedio en 19 x 500 ml de medio MD1 en matraces de agitación sin deflectores de 2 l. Tras 6 días de incubación a 30°C y 150 rpm en un agitador rotatorio se usó todo el 2<sup>o</sup> cultivo intermedio (9,5 litros = 9,5%) para inocular 100 litros de medio de producción POL1 (adaptado según Kunze *et al.* 1995, véase la tabla 7).

Este cultivo principal de 100 l se realizó en un fermentador de tanque de acero a escala de 100 l. Se controló la temperatura a 30°C, la aireación fue de 20 l/min (= 0,2 vvm) y la velocidad de agitación fue de 50 rpm. Se mantuvo una ligera sobrepresión de 0,5 bar dentro del recipiente del fermentador. Se mantuvo el pH del cultivo a 6,9-7,1 mediante adición controlada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N o NaOH 3 N. Tras una fase de latencia de aproximadamente 1 día el consumo de oxígeno se aceleró durante aproximadamente 4 días lo que indicó un crecimiento exponencial del cultivo. Durante los 2 últimos días el consumo de oxígeno se redujo ligeramente lo que indicó una fase estacionaria del cultivo. Tras 7 días se recogió el cultivo con un título de 5,3 mg/l de un depsipéptido cíclico según la fórmula II.

Extracción: Se transfirió todo el caldo de fermentación a un recipiente de acero de 1600 l y se decantó durante 1 hora. Se recogió el sedimento celular húmedo (200 g) de la fracción de fondo mediante filtración a través de un filtro de papel. Se extrajo el sedimento celular 3 veces mezclándolo con turrax 30 minutos cada uno con 10 l de acetato de etilo. Después se separó el agua residual de la fase de disolvente. Se lavó la fase de disolvente con 5 l de agua y después se evaporó para obtener un extracto seco denominado "extracto celular".

Se extrajo el filtrado de cultivo con 200 l de acetato de etilo. Tras un tiempo de contacto de 2 horas, incluyendo 1 hora de mezclado con turrax, se separó la fase orgánica, se lavó con 20 l de agua y finalmente se evaporó para obtener un extracto seco denominado "extracto de filtrado de cultivo".

Aislamiento de compuesto: Se disolvió el extracto de filtrado de cultivo (4,4 g) en 80 ml de metanol. Se retiraron los componentes insolubles mediante centrifugación y se evaporó el sobrenadante hasta sequedad proporcionando 3,3 g de extracto. Se disolvió el extracto en 7,5 ml de MeOH, 3 ml de DMSO y 0,5 ml de diclorometano y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (Waters Sunfire RP18 10  $\mu$ m, 30x150 mm) usando ácido fórmico al 0,01% (disolvente A), y acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1% (disolvente B) como disolventes. La velocidad de flujo fue de 50 ml/min. El gradiente se muestra en la tabla 1. Se purificó el material en 7 series cromatográficas. De cada serie se analizaron las fracciones recogidas mediante HPLC, se combinaron las fracciones que contenían el depsipéptido cíclico según la invención y se evaporaron a vacío hasta sequedad. La cromatografía proporcionó 134 mg de depsipéptido cíclico (II) con una pureza de >97% y 80 mg con una pureza del 90%.

5

10

Tabla 2

Gradiente de HPLC usado para la purificación del depsipéptido cíclico (II)		
tiempo (min)	disolvente A (%)	disolvente B (%)
0,0	90	10
1,0	90	10
23,0	50	50
23,1	0	100
27,0	0	100
27,1	90	10
30,0	90	10

Tabla 3

Gradiente usado para la separación de fase normal			
tiempo (min)	ciclohexano (%)	acetato de etilo (%)	metanol (%)
0	75	25	0
10	75	25	0
33	25	75	0
56	20	70	10
79	0	50	50
93	0	50	50

15

20

Se disolvió el extracto celular (6,67 g) en diclorometano/metanol 4:1. Se filtró la disolución y se adsorbió el filtrado sobre diatomea (2 g de diatomea/1 g de extracto, Isolute®, International Sorbent Technology Ltd., Hengoed Mid Glam, R.U.) seguido por evaporación. Se cargó el residuo sólido sobre una columna de gel de sílice previamente empaquetada (4x18 cm, 90 g de gel de sílice 40-63) y se eluyó con un gradiente de ciclohexano, acetato de etilo y metanol. El gradiente se muestra en la tabla 2, la velocidad de flujo fue de 28 ml/min. Se recogieron volúmenes de fracciones de 28 ml. Se combinaron las fracciones según los picos visibles en el perfil de UV lo que proporcionó 12 fracciones combinadas (A-L). Se purificaron adicionalmente las fracciones que contenían los depsipéptidos (H-J) usando cromatografía de fase inversa. El método cromatográfico y el procedimiento de tratamiento final son idénticos al método de purificación descrito para el filtrado de cultivo. En total se aislaron 46,1 mg de depsipéptido

## ES 2 527 298 T3

cíclico (II), 17,9 mg de depsipéptido cíclico según la fórmula (III) y 6,1 mg de una mezcla 1:1 de los depsipéptidos (VI) y (VII).

También se encontraron otros depsipéptidos cíclicos en menor concentración en el extracto celular. Entre estos otros depsipéptidos cíclicos estaban los de la fórmula (IV) y (V).

### 5 Caracterización de compuestos:

Datos físicos del compuesto (II)

IR (pastilla de KBr): 3337, 3297, 3062, 2966, 2936, 2877, 1736, 1659, 1533, 1519, 1464, 1445, 1410, 1385, 1368, 1249, 1232, 1205, 989, 832  $\text{cm}^{-1}$

FT-EM (9,4 T APEX-III): 951,5165; calc. para  $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_{12}+\text{Na}$ : 951,5162

10  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz)  $d_6$ -DMSO  $\delta_{\text{H}}$ : -0,10 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,65 (4H, m), 0,78 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,82 (3H, t, J = 7,2 Hz), 0,85 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,89 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,02 (1 H, m), 1,03 (6H, 2 x d, J = 7,0 Hz), 1,10 (1 H, m), 1,21 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,25 (1 H, m), 1,40 (1 H, m), 1,52 (1 H, m), 1,76 (6H, m), 1,84 (1 H, m), 1,93 (1 H, m), 2,15 (2H, m), 2,48 (1 H, m), 2,59 (1 H, m), 2,69 (1 H, m), 2,72 (3H, s), 3,17 (1 H, m), 4,32 (2H, m), 4,44 (2H, m), 4,64 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 4,71 (1 H, m), 4,94 (1 H, s), 5,06 (1 H, m), 5,49 (1 H, m), 6,08 (1 H, d, J = 2,2 Hz), 6,65 (2H, d, J = 8,4), 6,74 (1 H, s), 7,00 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,27 (1 H, s), 7,36 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 7,66 (1 H, d, J = 10,2 Hz), 7,74 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 8,02 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 8,43 (1H, d, J = 8,1 Hz), 9,19 (1H, s).

15  $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz)  $d_6$ -DMSO  $\delta_{\text{C}}$ : 10,35,  $\text{CH}_3$ ; 11,22,  $\text{CH}_3$ ; 13,79,  $\text{CH}_3$ ; 16,00,  $\text{CH}_3$ ; 17,63,  $\text{CH}_3$ ; 19,49, 2 x  $\text{CH}_3$ ; 20,83,  $\text{CH}_3$ ; 21,72,  $\text{CH}_2$ ; 23,30,  $\text{CH}_3$ ; 23,70,  $\text{CH}_2$ ; 24,16, CH; 24,41,  $\text{CH}_2$ ; 27,35,  $\text{CH}_2$ ; 29,74,  $\text{CH}_2$ ; 30,07,  $\text{CH}_3$ ; 31,44,  $\text{CH}_2$ ; 33,13, CH; 33,19,  $\text{CH}_2$ ; 33,68, CH; 37,39, CH; 39,05,  $\text{CH}_2$ ; 48,75, CH; 50,59, CH; 52,01, CH; 54,11, CH; 54,65, CH; 55,24, CH; 60,60, CH; 71,86 CH; 73,89, CH; 115,28, 2 x CH; 127,31, Cq; 130,35, 2 x CH; 156,25, Cq; 169,09, Cq; 169,25, Cq; 169,34, Cq; 169,74, Cq; 170,60, Cq; 172,41, Cq; 172,52, Cq; 173,78, Cq; 176,32, Cq

Datos físicos del compuesto de fórmula (III)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 965,5318; calc. para  $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_{12}+\text{Na}$ : 965,5318

25  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz)  $d_6$ -DMSO  $\delta_{\text{H}}$ : -0,10 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,64 (4H, m), 0,78 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,82 (3H, t, J = 7,0 Hz), 0,83 (3H, t, J = 7,3 Hz), 0,85 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,89 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,01 (3H, d, J = 7,1 Hz), 1,04 (1H, m), 1,10 (1 H, m), 1,21 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,25 (1 H, m), 1,32 (1 H, m), 1,40 (1 H, m), 1,53 (2H, m), 1,77 (6H, m), 1,84 (1 H, m), 1,92 (1 H, m), 2,12 (1 H, m), 2,16 (1 H, m), 2,28 (1 H, m), 2,59 (1 H, m), 2,68 (1 H, m), 2,72 (3H, s), 3,17 (1 H, m), 4,32 (1 H, m), 4,38 (1 H, m), 4,43 (1 H, d, J = 10,2 Hz), 4,46 (1 H, m), 4,63 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 4,71 (1 H, m), 4,94 (1 H, m), 5,06 (1 H, m), 5,49 (1 H, m), 6,11 (1 H, s, ancho), 6,65 (2H, d, J = 8,8 Hz), 6,73 (1 H, s), 7,00 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,27 (1 H, s), 7,37 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 7,66 (1 H, d, J = 10,2 Hz), 7,75 (1 H, d, J = 9,7 Hz), 8,07 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 8,45 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 9,24 (1 H, ancho)

Datos físicos del compuesto de fórmula (IV)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 947,5196; calc. para  $\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_{11}+\text{Na}$ : 947,5213

35  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz)  $d_6$ -DMSO  $\delta_{\text{H}}$ : 0,08 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,68 (3H, t, J = 7,2 Hz), 0,71 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,78 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,83 (3H, t, J = 7,3 Hz), 0,84 (1 H, m), 0,87 (3H, t, J = 7,2 Hz), 0,88 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,99 (3H, d, J = 7,1 Hz), 1,08 (1 H, m), 1,17 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,18 (1H, m), 1,31 (2H, m), 1,43 (1H, m), 1,51 (1 H, m), 1,54 (1H, m), 1,76 (2H, m), 1,90 (1 H, m), 1,94 (1 H, m), 2,01 (1 H, m), 2,10 (1 H, m), 2,16 (1 H, m), 2,26 (1 H, m), 2,46 (2H, m), 2,73 (1 H, m), 2,74 (3H, s), 3,19 (1 H, m), 4,34 (1 H, m), 4,36 (1 H, m), 4,51 (1 H, m), 4,55 (1 H, m), 4,66 (1 H, d, J = 10,0 Hz), 4,79 (1 H, d, J = 11,0 Hz), 5,19 (1 H, m), 5,28 (1 H, m), 5,44 (1 H, m), 6,25 (1 H, d, J = 7,3 Hz), 6,33 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 6,68 (2H, d, J = 8,8 Hz), 6,75 (1 H, s), 7,04 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,28 (1 H, s), 7,32 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 7,91 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 8,05 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 8,57 (1 H, d, J = 8,9 Hz), 9,38 (1 H, ancho)

Datos físicos del compuesto de fórmula (V)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 933,5053; calc. para  $\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{N}_8\text{O}_{11}+\text{Na}$ : 953,5056

45  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz)  $d_6$ -DMSO  $\delta_{\text{H}}$ : 0,08 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,68 (3H, t, J = 7,2 Hz), 0,71 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,79 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,83 (1 H, m), 0,88 (3H, t, J = 7,2 Hz), 0,89 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,01 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,03 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,08 (1 H, m), 1,17 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,20 (1 H, m), 1,31 (1 H, m), 1,42 (1 H, m), 1,54 (1 H, m), 1,74 (2H, m), 1,91 (2H, m), 2,02 (1H, m), 2,10 (1H, m), 2,15 (1H, m), 2,46 (3H, m), 2,75 (3H, s), 2,76 (1H, m), 3,19 (1H, m),

4,32 (1 H, m), 4,34 (1 H, m), 4,51 (1 H, m), 4,55 (1 H, m), 4,66 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 4,79 (1 H, d, J = 11,0 Hz), 5,19 (1 H, m), 5,28 (1 H, m), 5,43 (1 H, m), 6,25 (1 H, d, J = 7,0 Hz), 6,33 (1 H, d, J = 8,5 Hz), 6,68 (2H, d, J = 8,8 Hz), 6,75 (1 H, s), 7,04 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,28 (1 H, s), 7,31 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 7,90 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 7,99 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 8,52 (1 H, d, J = 8,8 Hz), 9,30 (1 H, ancho)

## 5 Ejemplo 2: Producción de compuestos (VIII, IX, X)

**Cepa:** Se aisló la cepa *Chondromyces robustus* de una muestra de estiércol. Se identificó la cepa *Chondromyces robustus* de la invención como *Chondromyces robustus* basándose en la morfología de los cuerpos fructíferos así como en la secuencia parcial del gen de ARN de 16S. Se asignó *C. robustus* al grupo de riesgo biológico 1 por DSMZ (DSMZ (2007)). *Chondromyces* es un género de la familia *Polyangiaceae*, que pertenece al orden *Myxococcales* dentro de las Delta-proteobacterias. Las bacterias del orden *Myxococcales*, también denominadas mixobacterias, son bacterias gram-negativas en forma de bastón con dos características que las distinguen de la mayoría de las demás bacterias. Pululan sobre superficies sólidas usando un mecanismo de deslizamiento activo y se agregan para formar cuerpos fructíferos con la inanición (Kaiser (2003)).

La cepa *Chondromyces robustus* de la invención se depositó en DSMZ con el número de registro 19330.

**Cultivo:** Se realizaron cultivos en fermentador de 100 l según el siguiente protocolo: Se iniciaron precultivos mediante inoculación de 20 ml cada uno (=20%) de un cultivo líquido de la cepa *Chondromyces robustus* de la invención en 6 x 100 ml de medio MD1 (adaptado según Bode *et al.* 2003) en matraces de agitación con deflectores de 500 ml. Tras 1 día de incubación a 30°C y 120 rpm en un agitador rotatorio se inició un 1<sup>er</sup> cultivo intermedio mediante inoculación de 100 ml cada uno (=25%) del precultivo en 6 x 400 ml de medio MD1 en matraces de agitación con deflectores de 2 l. Tras 3 días de incubación a 30°C y 120 rpm en un agitador rotatorio se inició un 2<sup>o</sup> cultivo intermedio mediante inoculación de 3 litros (=20%) del 1<sup>er</sup> cultivo intermedio en un fermentador de tanque de acero de 20 l que contenía 15 litros de medio MD1. Se controló la temperatura a 30°C, la aireación fue de 20 l/min (= 1,0 vvm) y la velocidad de agitación fue de 80 rpm. Se mantuvo una ligera sobrepresión de 0,5 bar dentro del recipiente del fermentador. Aunque no había ningún control del pH, el pH del cultivo sólo disminuyó ligeramente desde pH 6,95 al inicio hasta pH 6,88 en el día 7. Tras 7 días se usó todo el 2<sup>o</sup> cultivo intermedio (18 litros = 20%) para inocular 90 litros de medio de producción POL1 (adaptado según Kunze *et al.* 1995) (volumen inicial = 108 litros). Se realizó el cultivo principal en un fermentador de tanque de acero a escala de 100 l. Se controló la temperatura a 30°C, la aireación fue de 30 l/min (= 0,3 vvm) y la velocidad de agitación al comienzo fue de 50 rpm y tras 4 días de 80 rpm. Se mantuvo una ligera sobrepresión de 0,5 bar dentro del recipiente del fermentador. Se mantuvo el pH del cultivo a 6,8-7,2 mediante adición controlada H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N o NaOH 1,5 N. Tras 14 días se recogió el cultivo con un título de 3 mg/l.

**Extracción:** Se transfirió todo el caldo de fermentación a un recipiente de acero de 1600 l y se decantó durante 1 hora. Se recogió el sedimento celular húmedo (aproximadamente 200 g) de la fracción de fondo mediante filtración a través de un filtro de papel. Se extrajo el sedimento celular 3 veces mezclándolo con turrax 30 minutos cada uno con 10 l de acetato de etilo. Después se separó el agua residual de la fase de disolvente. Se lavó la fase de disolvente con 5 l de agua y después se evaporó para obtener 11,9 g de extracto seco denominado "extracto celular".

Se extrajo el filtrado de cultivo con 200 l de acetato de etilo. Tras un tiempo de contacto de 2 horas, incluyendo 1 hora de mezclado con turrax, se separó la fase orgánica, se lavó con 20 l de agua y finalmente se evaporó para obtener 12,5 g de extracto seco denominado "extracto de filtrado de cultivo".

**Aislamiento de compuesto:** Se disolvió cada extracto (de micelio y de filtrado de cultivo) en diclorometano/metanol 4:1. Se filtró la disolución y se adsorbió el filtrado sobre diatomea (2 g de diatomea/1 g de extracto, Isolute®, International Sorbent Technology Ltd., Hengoed Mid Glam, R.U.) seguido por evaporación. Se cargó el residuo sólido sobre una columna de gel de sílice previamente empaquetada (4x18 cm, 100 g de gel de sílice 40-63) y se eluyó con un gradiente de ciclohexano, acetato de etilo y metanol. El gradiente se muestra en la tabla 4, la velocidad de flujo fue de 28 ml/min. Se recogieron volúmenes de fracciones de 28 ml. Se combinaron las fracciones según los picos visibles en el perfil de UV. Se purificó adicionalmente la fracción que contenía el depsipéptido cíclico de la invención usando cromatografía de fase inversa (Waters Sunfire RP18 10 µm, 30x150 mm) usando ácido fórmico al 0,01% (disolvente A), y acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1% (disolvente B) como disolventes. La velocidad de flujo era de 50 ml/min. El gradiente se muestra en la tabla 5. Para la inyección se disolvió el material en MeOH/DMSO 1:1 (concentración de 200 mg/ml). Se analizaron las fracciones recogidas mediante HPLC, se combinaron las fracciones que contenían el depsipéptido cíclico de la invención y se evaporaron a vacío hasta sequedad. La cromatografía del extracto proporcionó 52 mg de depsipéptido cíclico (VIII) puro (>97%). Pudo aislarse un total de 85 mg de depsipéptido cíclico (VIII) puro a partir de los extractos combinados.

También se encontraron otros depsipéptidos cíclicos en menor concentración en el extracto celular. Entre estos otros depsipéptidos cíclicos estaban los de la fórmula (IX) y (X).

Tabla 4

<i>Gradiente usado para la separación de fases normal</i>			
tiempo (min)	ciclohexano (%)	acetato de etilo (%)	metanol (%)
0	75	25	0
10	75	25	0
33	25	75	0
56	20	70	10
79	0	50	50
93	0	50	50

Tabla 5

<i>Gradiente de HPLC usado para la purificación del depsipéptido cíclico (VIII)</i>		
tiempo (min)	disolvente A (%)	disolvente B (%)
0,0	75	25
1,0	75	25
23,0	55	45
23,1	0	100
27,0	0	100
27,1	75	25
30,0	75	25

5 Medios (Ajustados a pH 7,0 con HEPES 50 mM)

Tabla 6

*MD1 (medio de precultivo)*

Sustancia	Concentración [g/l]
Casitona	3
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2



*MD1 (medio de precultivo)*

D(+)-Glucosa, libre de agua	1
Cianocobalamina	0,5 mg
Antiespumante B	0,2 ml
Disolución de ferrioxamina [100 ng/ml]	1 ml

Tabla 7

*POL1 (medio de producción)*

Sustancia	Concentración [g/l]
Alburex	4
Almidón soluble	3
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2
Cianocobalamina	0,25 mg
HEPES	12
Disolución de oligoelementos convencional 1901	1 ml
XAD16	35

5 Caracterización de compuestos:

Datos físicos del compuesto (VIII)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 985,5007; calc. para C<sub>49</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>+Na: 985,5005.

10 <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz) d<sub>6</sub>-DMSO δ<sub>H</sub>: 0,74 (6H, d, J = 7,0 Hz), 0,85 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,88 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,89 (6H, d, J = 7,0 Hz), 1,18 (3H, d, J = 6,7 Hz), 1,32 (1 H, m), 1,46 (1 H, m), 1,57 (2H, m), 1,72 (3H, m), 1,81 (1 H, m), 1,88 (1 H, m), 1,98 (1 H, m), 2,02 (2H, m), 2,11 (3H, m), 2,42 (1 H, m), 2,73 (1 H, m), 2,77 (3H, s), 2,87 (1 H, m), 3,12 (1 H, m), 3,64 (1 H, m), 4,23 (1 H, m), 4,40 (1 H, m), 4,58 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 4,75 (2H, m), 4,93 (1 H, m), 5,07 (1 H, s), 5,40 (1 H, m), 6,03 (1 H, s), 6,74 (1 H, s), 6,79 (2H, d, J = 8,4 Hz), 6,84 (2H, d, J = 7,8 Hz), 7,02 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,10 (1H, d, J = 9,3 Hz), 7,14 (1 H, t, J = 7,8 Hz), 7,19 (2H, t, J = 7,8 Hz), 7,26 (1 H, s), 7,42 (1 H, d, J = 9,8 Hz), 7,89 (1 H, d, J = 9,2 Hz), 8,03 (1 H, d, J = 7,9 Hz), 8,38 (1 H, d, J = 8,9 Hz), 9,40 (1 H, s)

15 <sup>13</sup>C-RMN (150 MHz) d<sub>6</sub>-DMSO δ<sub>C</sub>: 17,13, CH<sub>3</sub>; 17,63, CH<sub>3</sub>; 19,32, CH<sub>3</sub>; 20,90, CH<sub>3</sub>; 21,64, CH<sub>2</sub>; 22,34, CH<sub>3</sub>; 22,34, CH<sub>3</sub>; 23,32, CH<sub>3</sub>; 24,10, CH; 25,63, CH; 27,63, CH<sub>2</sub>; 29,30, CH<sub>2</sub>; 30,37, CH<sub>3</sub>; 30,86, CH; 31,52, CH<sub>2</sub>; 32,83, CH<sub>2</sub>; 35,33, CH<sub>2</sub>; 38,98, CH<sub>2</sub>; 44,42, CH<sub>2</sub>; 48,52, CH; 50,19, CH; 50,24, CH; 51,99, CH; 54,62, CH; 55,63, CH; 60,90, CH; 71,86 CH; 73,70, CH; 115,32, 2 x CH; 126,21, CH; 127,50, Cq; 127,74, 2 x CH; 129,42, 2 x CH; 130,43, 2 x CH; 136,72, Cq; 156,23, Cq; 168,93, Cq; 169,18, Cq; 169,18, Cq; 170,18, Cq; 170,39, Cq; 171,72, Cq; 171,96, Cq; 172,50, Cq; 173,82, Cq

Datos físicos del compuesto de fórmula (IX)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 969,5058; calc. para C<sub>49</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>+Na: 969,5056.

5  $^1\text{H-RMN}$  (600 MHz)  $d_6\text{-DMSO } \delta_{\text{H}}$ ): 0,53 (3H, d, J = 6,6 Hz), 0,73 (3H, d, J = 6,6 Hz), 0,74 (3H, d, J = 6,6 Hz), 0,81 (3H, d, J = 6,6 Hz), 0,86 (6H, d, J = 6,6 Hz), 1,08 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,20 (1 H, m), 1,33 (3H, m), 1,52 (1 H, m), 1,64 (1 H, m), 1,80 (2H, m), 2,01 (1 H, m), 2,04 (2H, m), 2,15 (4H, m), 2,25 (1 H, m), 2,30 (1 H, m), 2,74 (3H, s), 2,83 (1 H, m), 3,12 (1 H, m), 3,32 (1 H, m), 3,38 (1 H, m), 4,14 (1 H, m), 4,27 (1 H, m), 4,40 (1 H, m), 4,59 (1 H, m), 4,61 (1 H, m), 4,94 (1 H, m), 4,99 (1 H, m), 5,10 (1 H, m), 6,42 (2H, d, J = 8,8 Hz), 6,75 (1 H, s), 7,04 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,10 (1 H, t, J = 7,3 Hz), 7,15 (2H, t, J = 7,3 Hz), 7,23 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,30 (1 H, s), 7,41 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 8,05 (1 H, d, J = 9,5 Hz), 8,23 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 8,47 (1 H, d, J = 4,4 Hz), 8,71 (1 H, d, J = 10,2 Hz) (señal del protón del grupo hidroxilo de tirosina no visible)

10 Datos físicos del compuesto de fórmula (X)

FT-EM (9,4 T APEX-III): Hallado: 955,4896; calc. para  $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_8\text{O}_{11}+\text{Na}$ : 955,4900.

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz)  $d_6\text{-DMSO } \delta_{\text{H}}$ ):  $\delta_{\text{H}}$ : sin asignación de desplazamientos químicos (mezcla de rotámeros, asignación de estructura basándose en comparación de datos de RMN (grupo N-metilo que falta) con datos de RMN del compuesto (IX).

15 **Ejemplo 3:** Actividad biológica

Los compuestos de la presente invención, por ejemplo incluyendo un compuesto de fórmula II-X, muestran actividad farmacológica y por tanto son útiles como productos farmacéuticos. Por ejemplo, se encuentra que los compuestos de la presente invención inhiben la actividad de calicreína 7.

20 Los compuestos de la presente invención tienen valores de  $\text{CI}_{50}$  de entre 1 nM y 10  $\mu\text{M}$  según se determina en el siguiente ensayo:

Materiales y tampones

25 Se adquiere el sustrato extinguido por fluorescencia Ac-Glu-Asp(EDANS)-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe<sup>^</sup>Arg-Leu-Gly-Lys(dabcil)-Glu-NH<sub>2</sub> (en el que <sup>^</sup> indica el enlace escindible, identificado mediante análisis de EM) de Biosyntan (Berlín, Alemania) y se mantiene como disolución madre 5 mM en DMSO a -20°C. Todos los demás productos químicos son de calidad analítica.

Se realizan reacciones enzimáticas en tampón de citrato de sodio 50 mM a pH 5,6 que contiene NaCl 150 mM y CHAPS al 0,05% (p/v).

30 Todas las disoluciones que contienen proteínas y péptidos se manipulan en tubos con silicona (Life Systems Design, Merenschwand, Suiza). Se transfirieron las disoluciones de compuesto, así como las disoluciones de enzima y las de sustrato, a las placas de 384 pocillos (Cliniplate negra; n.º de cat. 95040020 Labystems Oy, Finlandia) por medio de un pipeteador de 96 canales CyBi-Well (CyBio AG, Jena, Alemania).

Instrumentación para mediciones de FI

35 Para las mediciones de intensidad de fluorescencia (FI) se usa un lector Ultra Evolution (TECAN, Maennedorf, Suiza). El instrumento está equipado con una combinación de un filtro de trayecto de banda de 350 nm (20 nm de ancho de banda) y uno de 500 nm (25 nm de ancho de banda) para la adquisición de excitación y emisión de fluorescencia, respectivamente. Para aumentar la razón señal:fondo, se emplea un espejo dicróico apropiado. Se adquieren los filtros ópticos y el espejo dicróico de TECAN. Los fluoróforos en cada pocillo se excitan mediante tres destellos por medición.

Determinación de valores de  $\text{CI}_{50}$

40 Para la determinación de los valores de  $\text{CI}_{50}$  se realiza el ensayo a temperatura ambiente en placas de 384 pocillos. Todos los volúmenes de ensayo finales fueron de 30  $\mu\text{l}$ . Se disuelven los compuestos de prueba en el 90% (v/v) de DMSO/agua y se diluyen en agua (que contiene CHAPS al 0,05% (p/v)) hasta 3 veces la concentración de ensayo deseada. Las 11 concentraciones de compuesto final son: 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ . Para cada ensayo, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de agua/CHAPS ( $\pm$  compuesto de prueba) por pocillo, seguido por 10  $\mu\text{l}$  de disolución de proteasa (diluida con 1,5x tampón de ensayo). La concentración de proteasa en la disolución de ensayo final es de 0,2 nM (según las concentraciones de enzima determinadas mediante el método de Bradford). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se inicia la reacción mediante adición de 10  $\mu\text{l}$  de disolución de sustrato (sustrato disuelto en 1,5x tampón de ensayo, la concentración final era de

- 2  $\mu$ M). Se obtiene el efecto del compuesto sobre la actividad enzimática a partir de las curvas de progresión lineal y se determina a partir de dos lecturas, la primera tomada directamente tras la adición de sustrato y la segunda tras 1 hora. Se calcula el valor de  $CI_{50}$  a partir de la representación gráfica del porcentaje de inhibición frente a la concentración de inhibidor usando software de análisis de regresión no lineal (XLfit, vers. 4.0; ID Business Solution Ltd., Guildford, Surrey, R.U.).

Tabla 8

	Depsipéptido cíclico (II)	Depsipéptido cíclico según la fórmula (III)	Depsipéptido cíclico según la fórmula (IV)	Depsipéptido cíclico según la fórmula (V)
Enzima	$CI_{50}$ $\mu$ M	$CI_{50}$ $\mu$ M	$CI_{50}$ $\mu$ M	$CI_{50}$ $\mu$ M
Caliceína humana 7	0,001	0,0004	0,005	0,006

Además, los depsipéptidos cíclicos inhibieron quimotripsina humana y elastasa de neutrófilos humanos con una  $CI_{50}$  que osciló entre 0,001  $\mu$ M y 0,02 y entre 0,01  $\mu$ M y 0,07  $\mu$ M, respectivamente.

- 10 Se determinó la actividad biológica del depsipéptido cíclico (VIII) con caliceína 7. Este depsipéptido cíclico de la invención inhibe la caliceína humana 7 con una  $CI_{50}$  de menos de 3 nM. Este depsipéptido cíclico inhibió la quimotripsina humana y la elastasa de neutrófilos humanos con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 0,004  $\mu$ M y aproximadamente 0,0025  $\mu$ M, respectivamente.

#### Ejemplo 4: Derivatización de un depsipéptido cíclico de la invención

- 15 A una disolución de 20 mg de depsipéptido cíclico (II) y 0,027 ml de trietilsilano en 2 ml de diclorometano/acetonitrilo (1:1) a  $-50^{\circ}\text{C}$  se le añadieron lentamente 0,014 ml de eterato de trifluoruro de boro. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta  $-5^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos adicionales, se vertió en una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente a vacío. La purificación del residuo obtenido mediante HPLC (XTerra [5 cm]; gradiente de tampón de acetonitrilo/carbonato de amonio pH 10) proporcionó 9,8 mg de un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se había convertido en 3-amino-2-piperidona.

#### Ejemplo 5: Derivatización de un depsipéptido cíclico de la invención

- 25 A una disolución de 75 mg (0,081 mmol) de depsipéptido cíclico (II) en 5 ml de 1-PrOH se le añadieron 30  $\mu$ l de ácido sulfúrico y se agitó la mezcla de reacción durante 48 horas a ta. Para el tratamiento final, se diluyó la mezcla de reacción con cloruro de metileno y se lavó con disolución sat. de bicarbonato. Tras secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio se eliminó el disolvente y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (cHex/EtOAc (1:1) + el 10% de MeOH). Rendimiento: 65 mg (83%) de un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se había convertido en un 1-propil-cetal-Ahp.

#### Ejemplo 6: Derivatización de un depsipéptido cíclico de la invención

- 30 A una disolución de 75 mg (0,081 mmol) de depsipéptido cíclico (II) en 5 ml de 1-octilOH se le añadieron 30  $\mu$ l de ácido sulfúrico y se agitó la mezcla de reacción durante 48 horas a ta. Para el tratamiento final se diluyó la mezcla de reacción con cloruro de metileno y se lavó con disolución sat. de bicarbonato. Tras secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio se eliminó el disolvente y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (cHex/EtOAc (1:1) + el 10% de MeOH). Rendimiento: 52 mg (62%) de un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se había convertido en un 1-octil-cetal-Ahp.

#### Ejemplo 7: Derivatización de un depsipéptido cíclico de la invención

- 40 Se enfrió una disolución de 25 mg (0,027 mmol) de depsipéptido cíclico (II) en 2 ml de diclorometano (MC) hasta  $0^{\circ}\text{C}$ . Entonces se añadieron DIEA y anhídrido del ácido trifluoroacético (TFAA). Se calentó lentamente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas adicionales. Para el tratamiento final se diluyó la mezcla de reacción con MC y se lavó con ácido clorhídrico y disolución sat. de bicarbonato. Tras secar sobre sulfato de sodio se eliminó el disolvente y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (cHex/EtOAc (1:1) + el 10% de MeOH). Rendimiento: 14 mg (57%) de un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que la amida de  $A_1$  se había convertido en un nitrilo.

**Ejemplo 8:** Derivatización de un depsipéptido cíclico de la invención

A una disolución de 1 g de depsipéptido cíclico (II) en 300 ml de diclorometano/acetonitrilo (1:1) a -50°C se le añadieron lentamente 0,68 ml de eterato de trifluoruro de boro. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta -20°C. Después se añadieron lentamente 0,68 ml adicionales de eterato de trifluoruro de boro, se mantuvo la mezcla de reacción a esta temperatura hasta que ya no pudo observarse material de partida (HPLC). Después se vertió la mezcla de reacción en una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente a vacío proporcionando un derivado del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se había convertido en 3-amino-3,4-dihidro-1H-piridin-2-ona.

Se disolvió el material bruto en 400 ml de 2-propanol, se añadieron 115 mg de Pd/C (al 10%) y se hidrogenó la mezcla a presión atmosférica hasta que se consumió el material de partida (HPLC). Se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía (SiO<sub>2</sub>; cHex/EtOAc (1:1) + el 10% de MeOH) proporcionando 684 mg del depsipéptido cíclico (II) en el que Ahp se había convertido en 3-amino-2-piperidona.

## Bibliografía

- [Bode HB, Zeggel B, Silakowski B, Wenzel SC, Reichenbach H, Müller R (2003)] Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol Microbiol* 47:471-481
- [Das SK, Mishra AK, Tindall BJ, Rainey FA, Stackebrandt E (1996)] Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: Analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int J Syst Bacteriol* 46:981-987
- [Dictionary of Natural Products (2007)] Dictionary of Natural products on CD-ROM, version 15.2, 2007, Hampden Data services Ltd.
- [DSMZ (2007)] Descripción de grupo de riesgo biológico de cepas de *Chondromyces* disponible en el sitio web <http://www.dsmz.de/>
- [Gerth K, Pradell A, Perlova O, *et al.* (2003)] Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol* 106:233-253
- [Hansson L, Backman A, Ny A, Edlund M, Ekholm E, Ekstrand Hammarstrom B, Tornell J, Wallbrandt P, Wennbo H, Egelrud T (2002)] Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol* 118:444-449
- [Ishida K, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K (1996)] The Absolute Stereochemistry of micropeptin 90. *Tetrahedron letters* 37:51-52.
- [Jacobi CA, Reichenbach H, Tindall BJ, Stackebrandt E (1996)] "Candidatus comitans," a bacterium living in coculture with *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria). *Int J Syst Bacteriol* 46:119-122
- [Jacobi CA, Assmus B, Reichenbach H, Stackebrandt E (1997)] Molecular evidence for association between the Sphingobacterium-like organism "Candidatus comitans" and the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Appl Environ Microbiol* 63:719-723
- [Jansen R, Kunze B, Reichenbach H, Höfle G (2002)] The ajudazols A and B, novel isochromanones from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria): Isolation and structure elucidation. *Eur J Org Chem* 2002:917-921
- [Kaiser D (2003)] Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature Reviews Microbiol* 1:45-54
- [Kunze B, Jansen R, Sasse F, *et al.* (1995)] Chondramides A ~ D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria): Production, physicochemical and biological properties. *J Antibiotics* 48:1262-1266
- [La Scola B, Mallet M-N, Grimont PAD, Raoult D (2003)] *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das *et al.* 1996). *Int J Syst Evol Microbiol* 53:15-20

[Lee AY, Smitka TA, Bonjouklian R, Clardy J (1994)] Atomic structure of the trypsin-A90720A complex: a unified approach to structure and function. *Chemistry & Biology* 1:113-117

[Matern U, Schleberger C, Jelakovic S, Weckesser J, Schulz GE (2003)] Binding structure of elastase inhibitor scyptolin A. *Chemistry & Biology* 10:997-1001

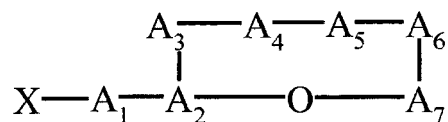
- 5 [Rahid S, *et al.* (2006)] Molecular and biochemical studies of chondramide formation - highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5. *Chem & Biol* 14:667-681

[Rouhiainen L, Paulin L, Suomalainen S, Hyytiäinen H, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K (2000)] Genes encoding for synthetases of cyclic depsipetides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular Microbiology* 37:156-167.

- 10 [Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, *et al.* (2004)] Genetic association between an AACCC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 123:62-66

REIVINDICACIONES

1. Depsipéptido cíclico que tiene la estructura de la fórmula (I):



en la que el enlace éster se encuentra entre el grupo carboxilo de A<sub>7</sub> y el grupo hidroxilo de A<sub>2</sub>,

5 en la que X y A<sub>1</sub> son cada uno independientemente opcionales,

y en la que

X es cualquier residuo químico;

A<sub>1</sub> es un aminoácido convencional;

A<sub>2</sub> es treonina o serina o 5-metilhidroxiprolina;

10 A<sub>3</sub> es un aminoácido convencional no básico o derivado del mismo, o un aminoácido no convencional no básico, en el que el derivado de aminoácido convencional no básico se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-acilo, S-alquilo, S-arilo, S-S-alquilo, alcoxicarbonilo, O-carbonil-alcoxilo, carbonato, O-carbonil-ariloxilo, O-carbonil-alquilamino, O-carbonil-arilamino, N-alquilo, N-dialquilo, N-trialquilamonio, N-acilo, N-carbonil-alcoxilo, N-carbonil-ariloxilo, N-carbonil-alquilamino, N-carbonil-arilamino, N-sulfonilalquilo o N-sulfonilarilo;

15 A<sub>4</sub> es Ahp, deshidro-AHP o prolina;

A<sub>5</sub> es isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, treonina o valina;

A<sub>6</sub> es alanina, fenilalanina, triptófano, tirosina o un derivado de tirosina de los mismos, en el que el derivado de tirosina se selecciona de un derivado de O-alquilo, O-arilo, O-heteroarilo, O-acilo, O-PO<sub>3</sub>H u O-SO<sub>3</sub>H o de un derivado que está halogenado, en la posición orto o meta;

20 A<sub>7</sub> es leucina, isoleucina o valina;

en la que el átomo de nitrógeno del enlace amida entre A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub> puede estar sustituido con un metilo;

en la que Ahp es 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona;

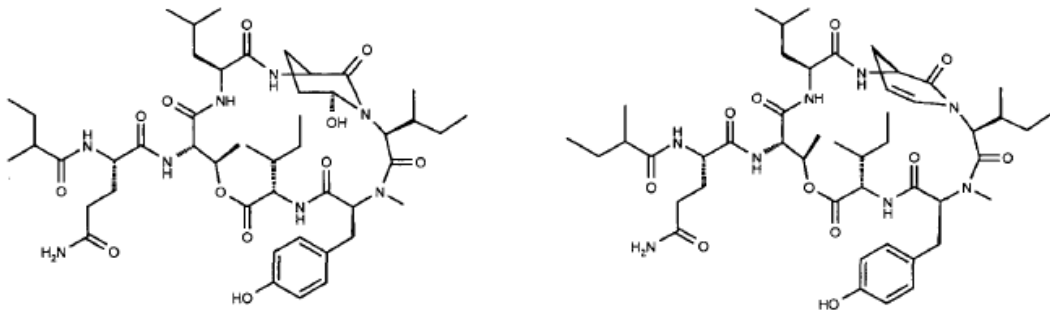
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso como medicamento para tratar una enfermedad dependiente de calicreína 7.

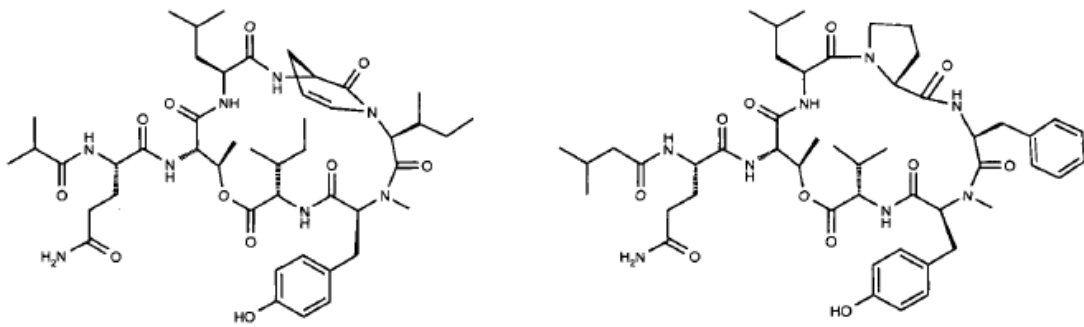
25 2. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento según la reivindicación 1, en los que X es H o un residuo acilo.

3. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento según la reivindicación 1 ó 2, en los que X es CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CO o (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO.

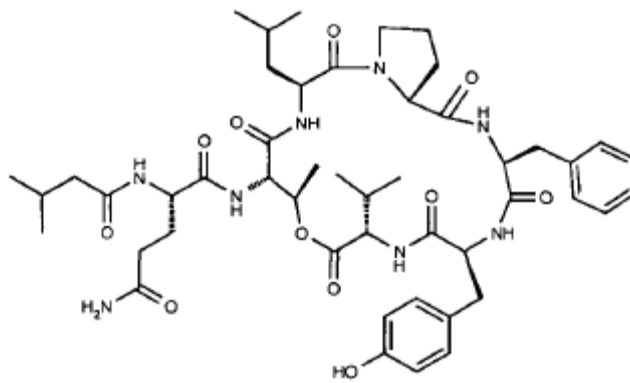
4. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento según la reivindicación 1, seleccionados de



Fórmula (III) Fórmula (IV)



Fórmula (V) Fórmula (IX) o

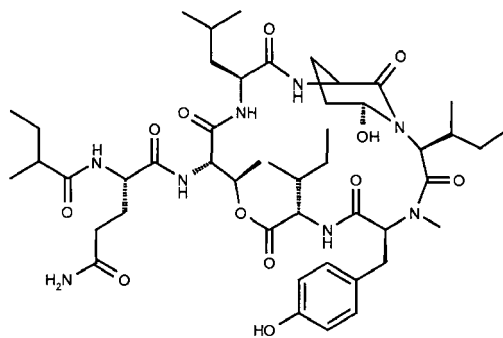


Fórmula (X).

5

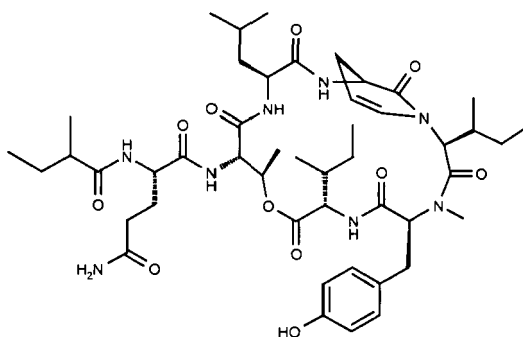
5. Depsipéptido cíclico para su uso como medicamento según la reivindicación 1 con un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN según el mostrado en la figura 1 y un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN según el mostrado en la figura 2.

6. Depsipéptido cíclico de fórmula (III)



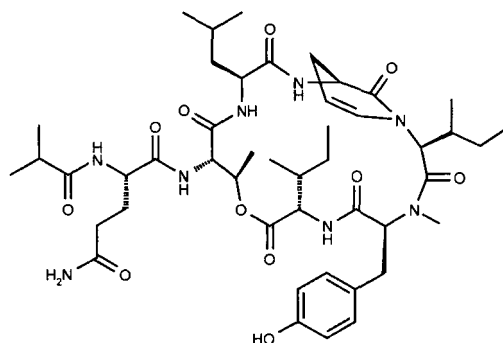
para su uso como medicamento según la reivindicación 1.

7. Depsipéptido cíclico de fórmula (IV)



5 para su uso como medicamento según la reivindicación 1.

8. Depsipéptido cíclico de fórmula (V)



para su uso como medicamento según la reivindicación 1.

9. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento según la reivindicación 1, seleccionados de

Nombre del compuesto	Número CAS
Cianopeptolina 1021	914606-83-0
Cianopeptolina 993	914606-81-8
Cianopeptolina 1063	912460-67-4
Largamida F	911297-58-0



ES 2 527 298 T3

Nombre del compuesto	Número CAS
Largamida E	911297-57-9
Largamida D	911297-56-8
Cianopeptolina 954	866718-63-0
sin nombre	861388-86-5
sin nombre	848891-15-6
sin nombre	848888-25-5
sin nombre	848780-62-1
sin nombre	848780-61-0
Cianopeptolina 963A	790300-44-6
sin nombre	685502-64-1
Planctopeptina BL 1061	637300-26-6
Planctopeptina BL 843	637300-24-4
Planctopeptina BL 1125	637300-22-2
Tasipeptina B	546123-47-1
Tasipeptina A	546123-46-0
Nostopeptina BN920	501903-96-4
Scyptolina A	403479-62-9
sin nombre	370867-67-7
sin nombre	370867-66-6
Micropeptina SD 1002	344939-97-5
Micropeptina SD 979	344939-95-3
Oscilapeptilida 97B	264909-20-8
Oscilapeptilida 97A	264909-19-5
Micropeptina T 1	249730-25-4
Micropeptina SF 909	248582-49-2
Micropeptina 103	190771-26-7
Nostopeptina B	185980-89-6
Oscilapeptina G	172548-91-3

Nombre del compuesto	Número CAS
Microcistilida A	157242-32-5
Aeruginopeptina 917S-C	157203-82-2
Aeruginopeptina 228A	152510-33-3
Aeruginopeptina 95A	152510-31-1
Asperglicina E	630410-95-6
Asperglicina D	630410-94-5
Asperglicina C	630410-92-3
Asperglicina B	630410-90-1
Asperglicina A	630410-89-8
Ictiopeptina A	946828-32-6
Ictiopeptina B	946828-33-7
Micropeptina T20	224947-46-0

5 10. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento para tratar una enfermedad dependiente de calicreína 7 seleccionados del compuesto según la reivindicación 5, en el que Ahp se ha convertido en un 1-propil-cetal-Ahp; el compuesto según la reivindicación 5, en el que Ahp se ha convertido en un 1-octil-cetal-Ahp; el compuesto según la reivindicación 5, en el que la amida de A<sub>1</sub> se ha convertido en un nitrilo; o el compuesto según la reivindicación 5, en el que Ahp se ha convertido en 3-amino-3,4-dihidro-1H-piridin-2-ona; en el que Ahp es 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona.

11. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento para tratar una enfermedad dependiente de calicreína 7 seleccionados de

Nombre del compuesto	Número CAS
Lingbiastatina 4	928202-70-4
Micropeptina KT946	925421-06-3
Largamida G	911297-59-1
Micropeptina 88Y	844636-95-9
Micropeptina 88N	844636-94-8
sin nombre	500145-57-3
Scyptolina B	403479-63-0
sin nombre	370867-65-5
Somamida B	350811-52-8
Oscilapeptina E	239088-24-5

ES 2 527 298 T3

Nombre del compuesto	Número CAS
Oscilapeptina D	239088-21-2
Oscilapeptina C	239088-18-7
Oscilapeptina B	239088-16-5
Nostopeptina D	227930-54-3
Nostopeptina C	227930-53-2
Nostopeptina J	227930-51-0
Nostopeptina I	227930-50-9
Nostopeptina F	227930-47-4
Nostopeptina E	227930-46-3
Simplostatina 2	225915-64-0
Derivado de micropeptina 88D	208040-93-1
Triacetato de micropeptina 88D	208040-91-9
Micropeptina 88F	208040-86-2
Micropeptina 88E	208040-84-0
Micropeptina 88D	208040-82-8
Micropeptina 88C	208040-80-6
Micropeptina 88B	208040-78-2
Micropeptina 88A	208040-76-0
Nostociclina	181622-50-4
Anabaenopeptilida 202B	173450-69-6
Anabaenopeptilida 90B	173450-68-5
Anabaenopeptilida 202a	173429-63-5
Anabaenopeptilida 90A	173429-62-4
Oscilapeptina A	167172-72-7
Nostopeptina A	157744-21-3
Aeruginopeptina 917S-B	157231-94-2
Aeruginopeptina 228B	152510-34-4
Aeruginopeptina 95B	152510-32-2

Nombre del compuesto	Número CAS
Dolastatina 13	120231-23-4
Derivado de dolastatina 13	120231-24-5
Derivado de dolastatina 13	125310-66-9
Nostopeptina K	227930-52-1
Nostopeptina H	227930-49-6
Nostopeptina G	227930-48-5
Lingbiastatina 5	957130-98-2
Lingbiastatina 6	957130-99-3
Lingbiastatina 7	957131-00-9
Cianopeptolina 1138	1009081-69-9
sin nombre	957187-61-0

12. Depsipéptidos cíclicos para su uso como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 10 u 11, para tratar a un sujeto que padece dermatosis pruríticas tales como prurigo nodular, psoriasis pustular, y cáncer, en particular cáncer de ovarios.

5 13. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un depsipéptido cíclico, o derivado del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 10 u 11, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad dependiente de calicreína 7.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad dependiente de calicreína 7 se selecciona del grupo que consiste en dermatosis pruríticas tales como prurigo nodular, psoriasis pustular, y cáncer, en particular cáncer

10

Figura 1

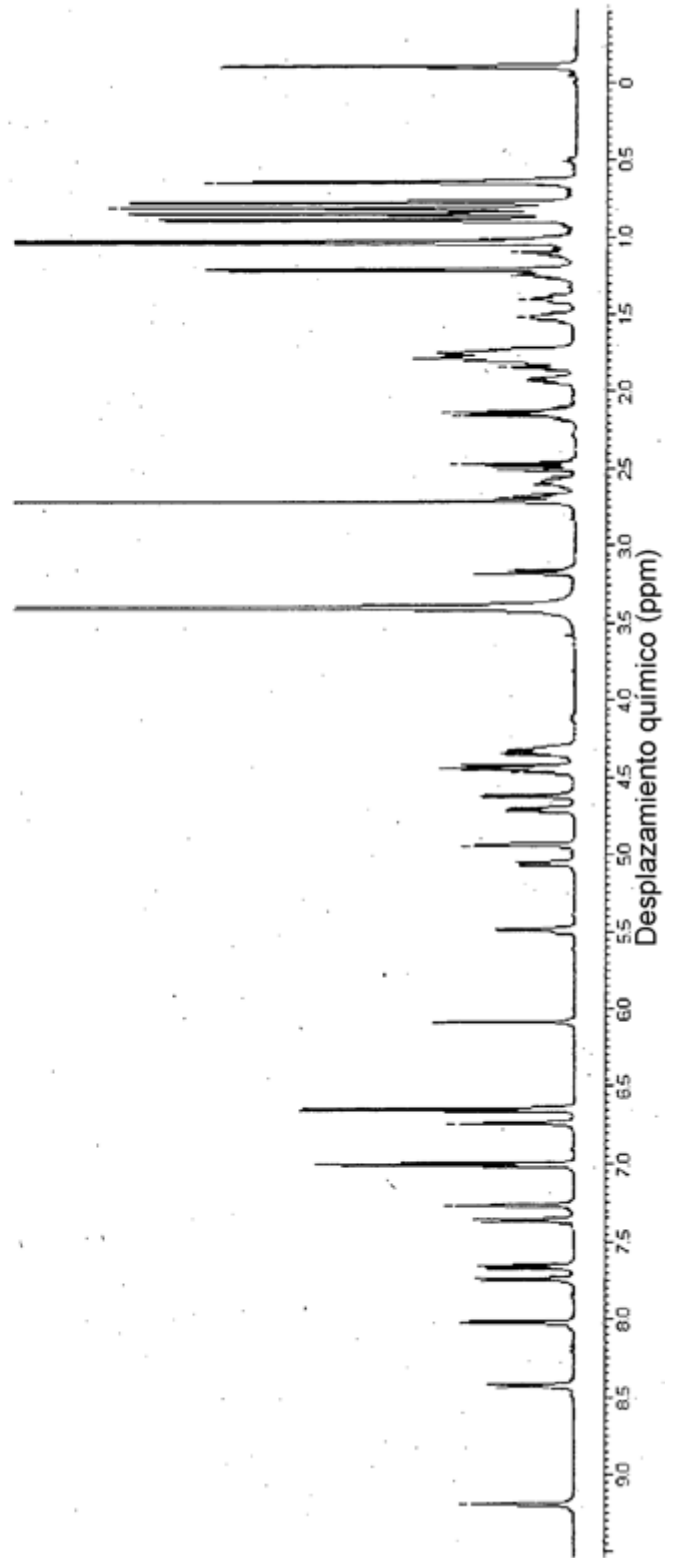


Figura 2

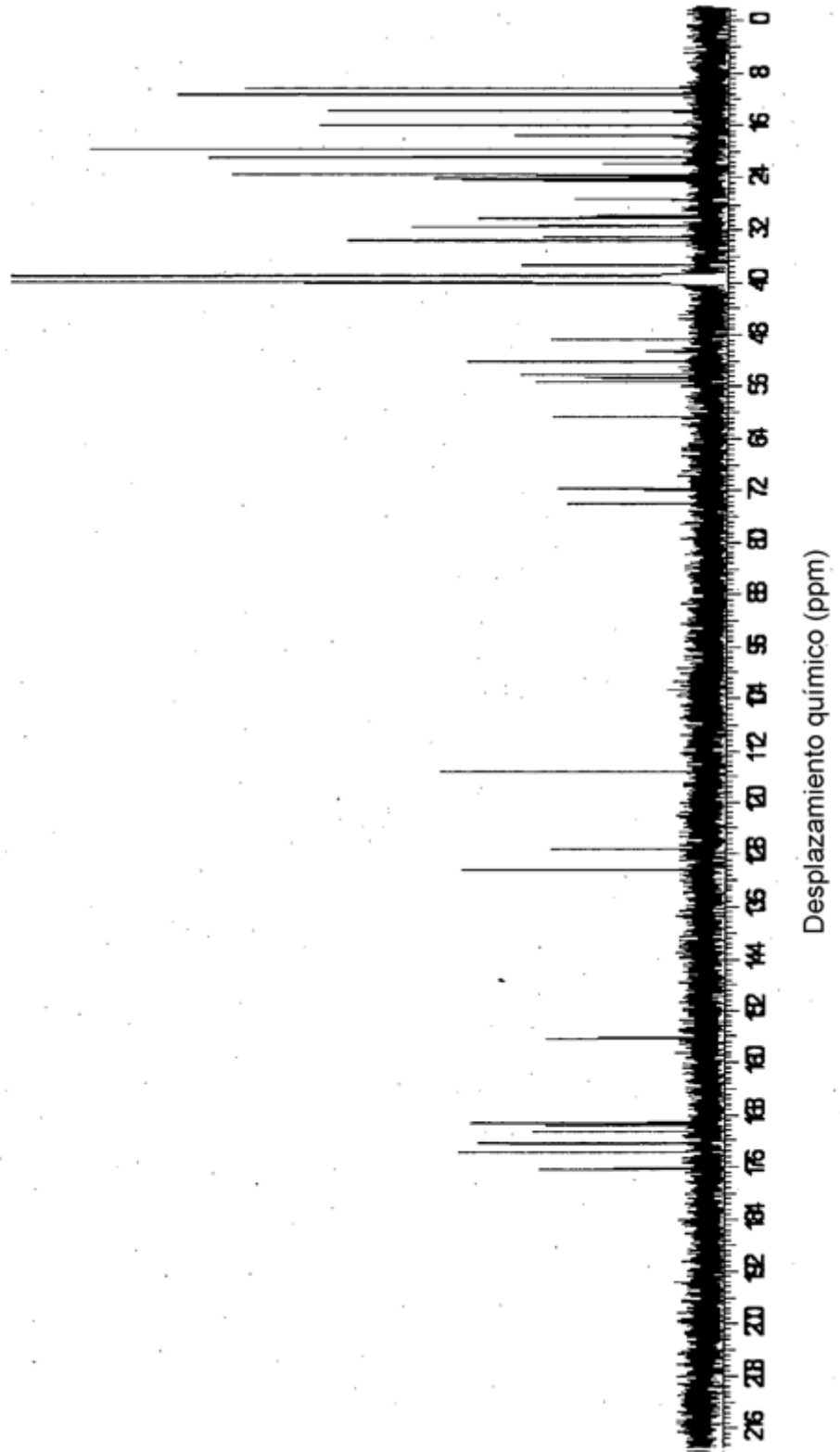


Figura 3

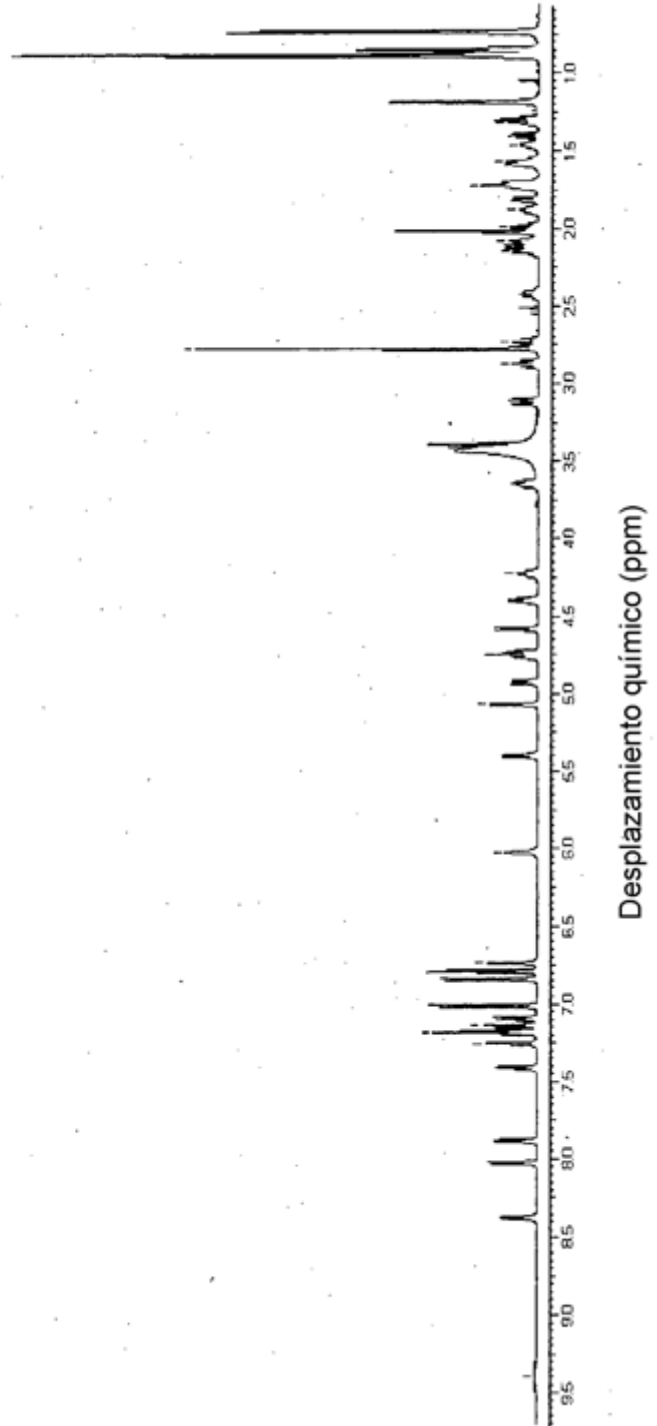


Figura 4

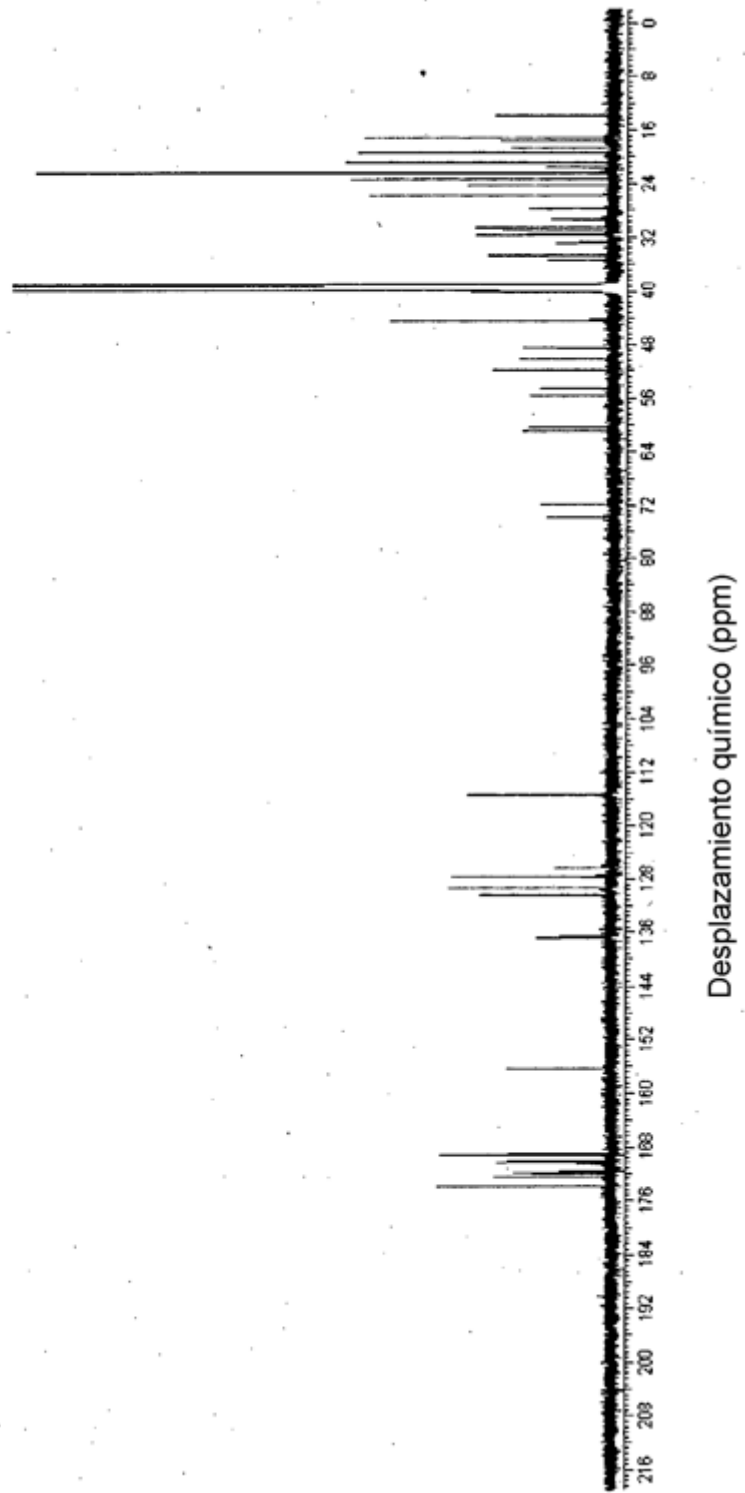




Figura 5

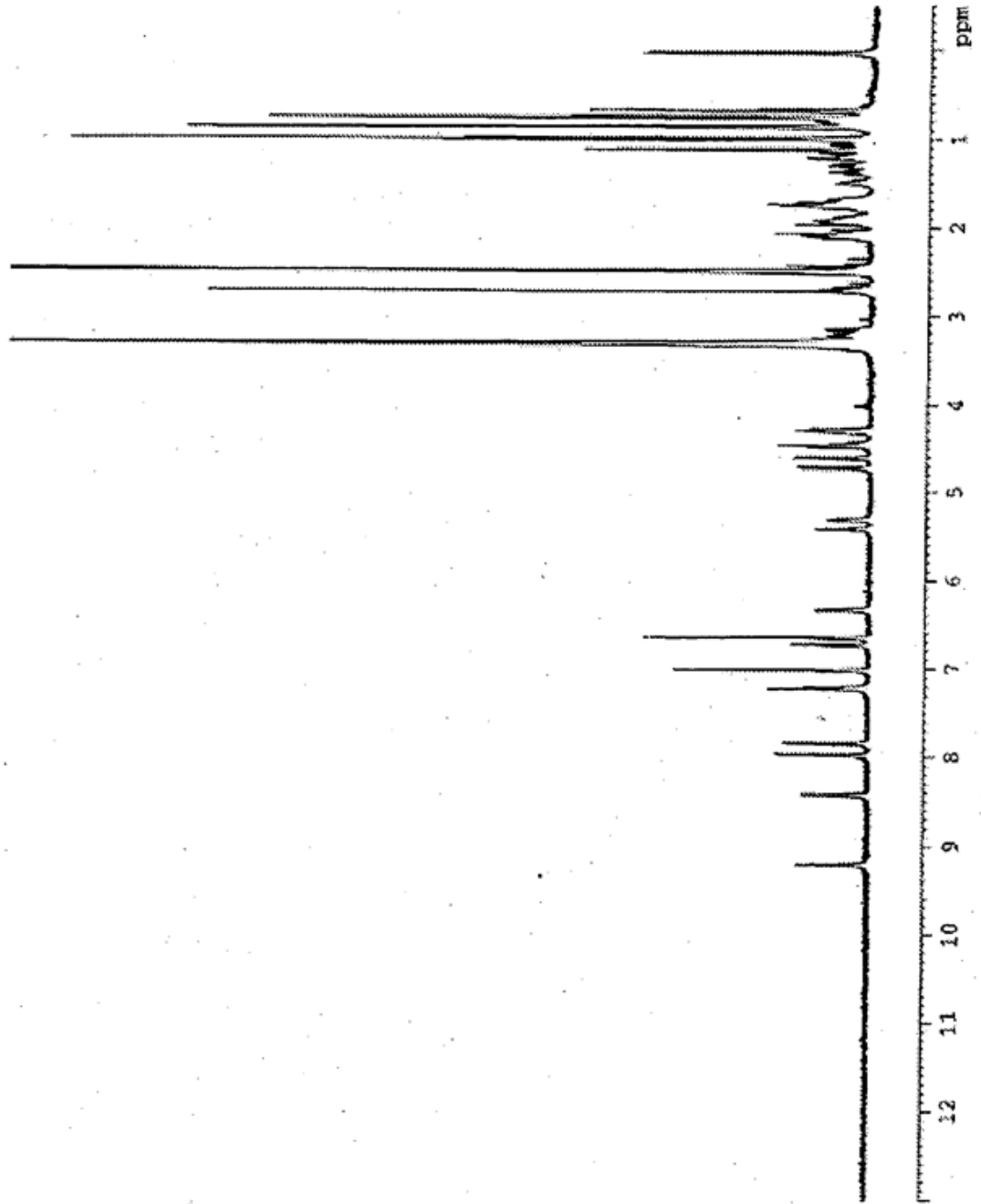


Figura 6

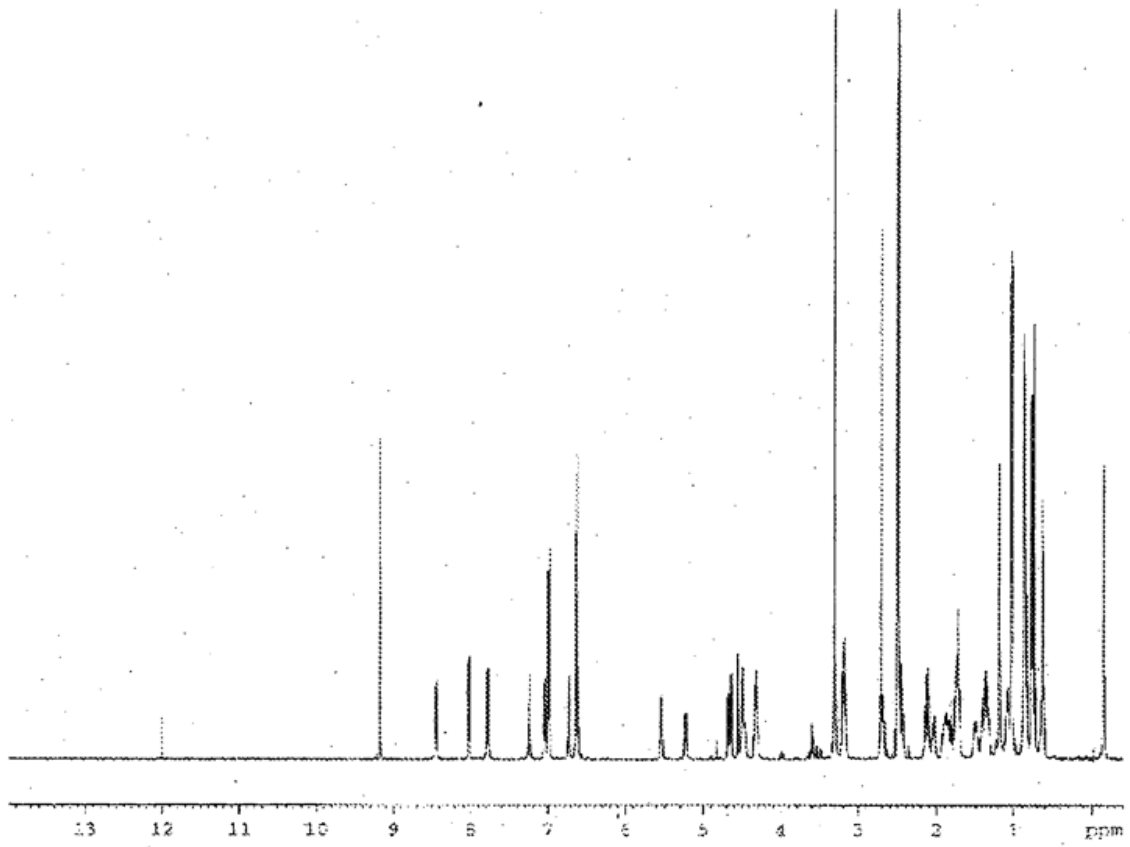


Figura 7

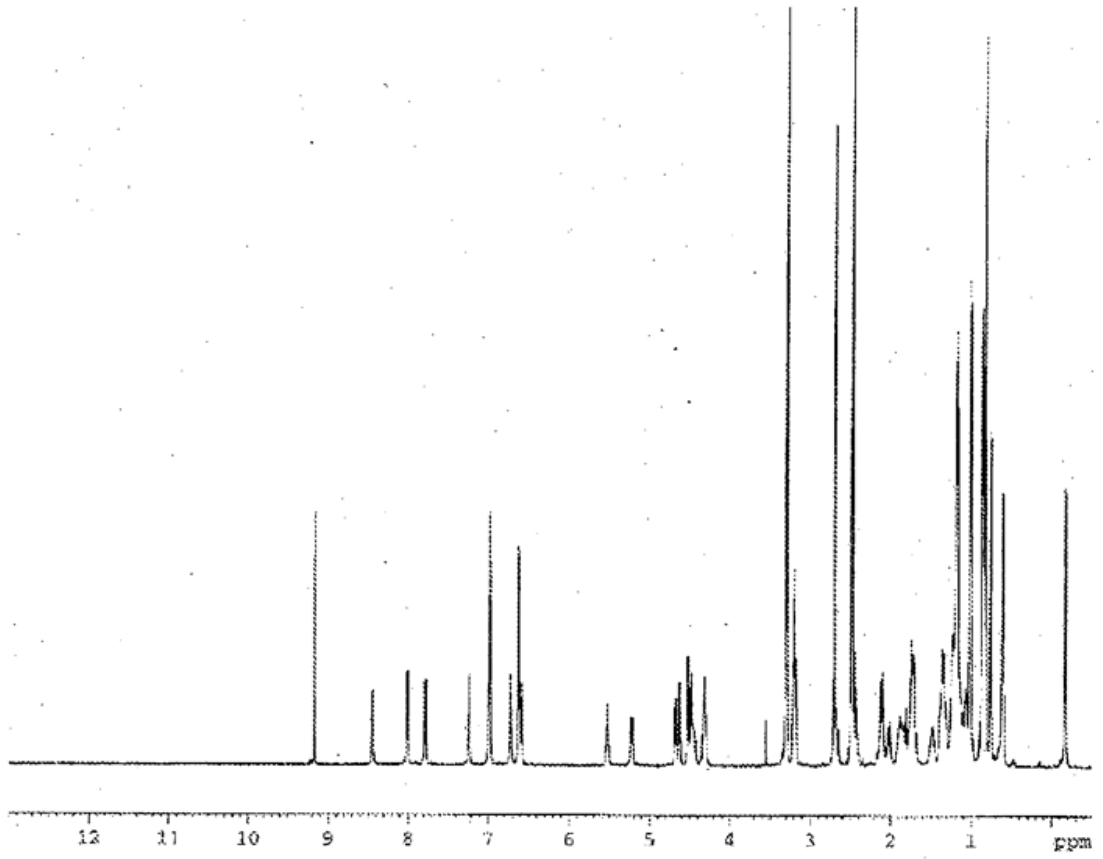


Figura 8

