

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 432**

51 Int. Cl.:

C07K 14/805 (2006.01)
C07D 487/22 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01)
A61K 38/42 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2010 E 10815682 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2476701**

54 Título: **Agentes antimicrobianos a base de derivados de hemina**

30 Prioridad:

10.09.2009 RU 2009133914

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

23.01.2015

73 Titular/es:

**OBSHESTVO S OGRANICHENNOI
OTVETSTVENNOSTIYU "PHARMENTERPRISES"
(100.0%)
pr-t Vernadskogo d. 86 bldg. 5
Moscow 119 571, RU**

72 Inventor/es:

**NEBOLSIN, VLADIMIR EVGENIEVICH y
ZHELTUKHINA, GALINA ALEXANDROVNA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 527 432 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

Agentes antimicrobianos a base de derivados de hemina

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo de la química bioorgánica y se refiere al desarrollo de agentes antimicrobianos y composiciones de derivados de hemina novedosos y a la producción de derivados de hemina novedosos.

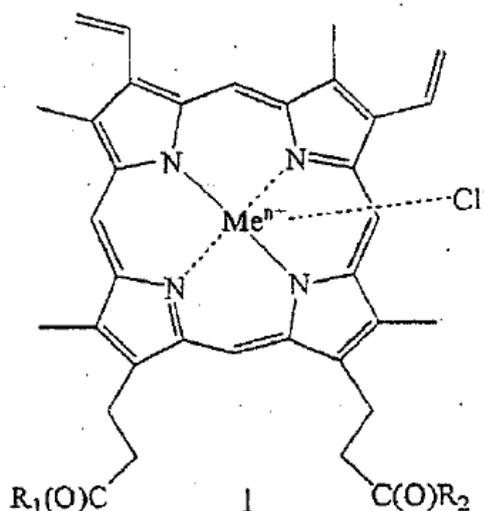
10 **Antecedentes de la técnica**

Se sabe que muchas enfermedades peligrosas en seres humanos y animales están provocadas por microorganismos, tales como bacterias y microhongos. Las bacterias provocan enfermedades epidémicas tales como cólera, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, peste, difteria, tularemia, brucelosis, así como tuberculosis, septicemia (contaminación de la sangre), lepra, sífilis y otras. En animales, las bacterias provocan muermo, ántrax, tuberculosis y otras enfermedades. Las enfermedades fúngicas afectan principalmente a la piel y las membranas mucosas, siendo ejemplos particulares queratomycosis, infección por *Microsporium*, tricofitosis y criptococosis.

La estrategia en la lucha contra los microorganismos implica la administración de agentes antimicrobianos, tales como agentes antibacterianos (incluyendo antibióticos) y agentes antimicóticos. Sin embargo, muchos agentes conocidos sufren desventajas tales como toxicidad, sensibilidad a enzimas proteolíticas, un efecto hemolítico y un rango de actividad antimicrobiana insuficiente. En particular, las bacterias desarrollan rápidamente resistencia a los agentes antimicrobianos conocidos, principalmente a los antibióticos. En este contexto, es de gran interés la búsqueda de agentes antimicrobianos no tóxicos y biocompatibles novedosos que no provoquen resistencia.

Se sabe que la hemina tiene una actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* [Y. Nitzan, H. Ladan, S. Gozansky y Z. Malik, "Characterization of Hemin Antibacterial Action on *Staphylococcus aureus*", FEMS Microbiol. Lett., 1987, vol. 48 (3), págs. 401-406]. Sin embargo, su insolubilidad en agua, su actividad hemolítica y su efecto antibacteriano a corto plazo dificultan el uso de la hemina como agente antibacteriano.

Con la propósito de diseñar derivados biológicamente activos se han realizado intentos para modificar la hemina conjugándola con aminoácidos y péptidos. Como resultado de la modificación de los grupos carboxilo de la hemina preparando las amidas correspondientes, se han preparado y caracterizado compuestos de fórmula general (I), en la que R_1 y R_2 , iguales o diferentes, son -OH o un aminoácido o un resto peptídico, y en la que R_1 y R_2 no pueden ser simultáneamente -OH.



Se ha encontrado que algunos derivados de hemina con péptidos de fórmula general (I), en particular aquéllos en los que uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH (compuesto V) o -ArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH (compuesto VI), tienen una actividad nucleasa (nucleolítica), que se manifiesta como la capacidad de destruir ADN de plásmido [patente rusa n.º 2250906, 27 de abril de 2005; Zheltukhina, G.A., Lobanova, T.N., Nebolsin, V.E., Gallyamov, M.O., Dranitsyna, S.M. y Kostanyan, I.A., Bioorg. Khim., 2006, vol. 32, n.º 2, págs. 198-210].

Algunos derivados de hemina con aminoácidos y péptidos de fórmula general (I), concretamente aquéllos en los que uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH (compuesto V), o $R_1 = R_2 =$ -ArgOMe (compuesto VII), pueden inhibir la proteinasa del VIH y, como consecuencia, ejercen una acción antiviral anti-VIH

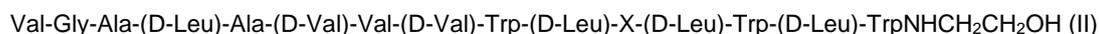
[patente rusa n.º 2238950, 27 de octubre de 2004].

Se ha demostrado la actividad antiviral de algunos derivados de hemina de fórmula general (I), concretamente para aquéllos en los que $R_1 = R_2 = -\text{SerOMe}$ (compuesto VIII), $R_1 = R_2 = -\beta\text{AlaHis}$ (compuesto X), $R_1 = R_2 = -\text{ArgOMe}$ (compuesto VII), $R_1 = R_2 = -\beta\text{AlaHA}$ (compuesto IX, HA = radical histamina), o en los que uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es $-\text{ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH}$ (compuesto V) o $-\text{ArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH}$ (compuesto VI) [solicitud rusa n.º 2007125604, 20 de enero de 2009].

Sin embargo, la actividad antibacteriana y antifúngica de los derivados de hemina mencionados anteriormente no se conoce en la técnica.

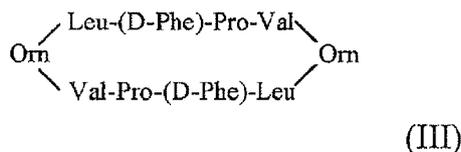
Por otro lado, recientemente se ha prestado mucha atención al diseño de agentes antimicrobianos novedosos a base de péptidos antimicrobianos (AMP) [A. Giuliani, G. Pirri y S. F. Nicoletto, "Antimicrobial Peptides: An Overview of a Promising Class of Therapeutics", Central European Journal of Biology, 2007, vol. 2 (1), págs. 1-33].

De los péptidos antimicrobianos conocidos, pueden mencionarse la gramicidina D lineal, que es una mezcla de péptidos de fórmula (II):



en la que X = Trp, Tyr o Phe

[W. E. Herrelland y D. Heilman, "Experimental and Clinical Studies on Gramicidin", J. Clin. Invest., 1941, vol. 20, págs. 583-591]; y gramicidina S cíclica de fórmula (III):



[G. Nagamurthi y S. Rambhav, "Gramicidin-S: Structure - Activity Relationship", J. Biosci., 1985, vol. 7, n.º 3-4, págs. 323-329].

El compuesto II es eficaz contra bacterias Gram positivas [W. E. Herrell y D. Heilman, "Experimental and Clinical Studies on Gramicidin", J. Clin. Invest., 1941, vol. 20, n.º 583] y contra algunos virus, en particular el virus del herpes [patente estadounidense n.º 6001808, 1999]. El compuesto III es eficaz principalmente contra bacterias Gram positivas en concentraciones de 5 a 15 μM [Jingbo Xiao, Bernard Weisblum y Peter Wipf, "Electrostatic versus Steric Effects in Peptidomimicry: Synthesis and Secondary Structure Analysis of Gramicidin S Analogues with (E)-Alkene Peptide Isosteres", J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (16), págs. 5742-5743]. Los compuestos II y III se usan en la práctica médica sólo para aplicaciones tópicas. Las desventajas de estos agentes antimicrobianos consiste en sus longitudes relativamente largas y los costes relativamente altos asociados; un rango de efectos antibacterianos, antifúngicos y antivirales insuficiente; y efectos secundarios de su aplicación, principalmente hemólisis de eritrocitos y reacciones alérgicas.

Además, hay un péptido Arg-Gly-Asp (IV), que es un fragmento de péptidos antimicrobianos de la familia de las cecropinas, de muchas proteínas microbianas y de la fibronectina de la superficie de células de mamífero [A. J. Kastin, "Handbook of Biologically Active Peptides", Elsevier/Academic Press, EE.UU., 2006, pág. 576]. Sin embargo, todavía no se ha estudiado su utilidad como agente para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

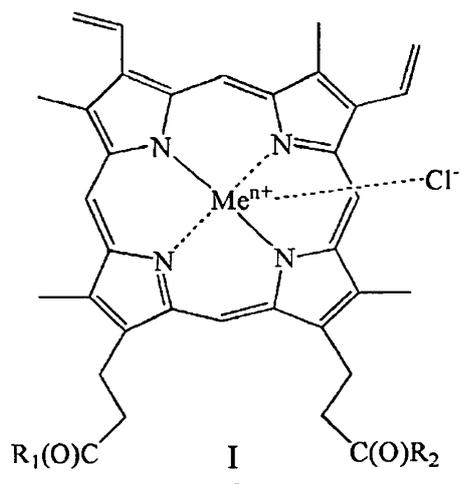
Los mayores obstáculos para el uso de los AMP en la práctica clínica consisten en sus costes relativamente altos, su susceptibilidad a enzimas proteolíticas y el efecto hemolítico intrínseco de muchos AMP.

Además, en la actualidad la mejor ruta para producir péptidos antimicrobianos es un método en fase sólida, lo que los hace muy caros y que su uso no sea rentable. Por tanto, es de gran interés una búsqueda de análogos más cortos de AMP y sus derivados, en particular, para conjugados con compuestos de otras clases.

En el contexto de la persistente necesidad de mejorar los agentes antimicrobianos en lo que respecta a la reducción de la toxicidad y otros efectos secundarios de los mismos y para aumentar su actividad contra las cepas resistentes, se han propuesto derivados de hemina para su uso como tales agentes.

Sumario de la invención

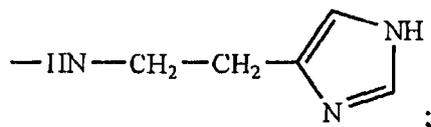
Esta invención se refiere al uso de derivados de hemina de fórmula general (I)



en la que R₁ y R₂ son iguales o diferentes, y en la que

5 uno cualquiera de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp o Phe o Tyr (gramicidina D), -N^δ-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S), -Arg-Gly-Asp-OH o -Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH;

10 o R₁ y R₂ son cada uno -ArgOMe, -SerOMe, -βAlaHA, -βAlaHis, -NHCH₂CH₂OH, -GlyOMe, -NHCH(CH₂OH)CH₂OH, -NHCH₂CH(OH)CH₂OH, -Glu(ArgOMe)-ArgOMe, -HA o -Arg-ArgOMe,



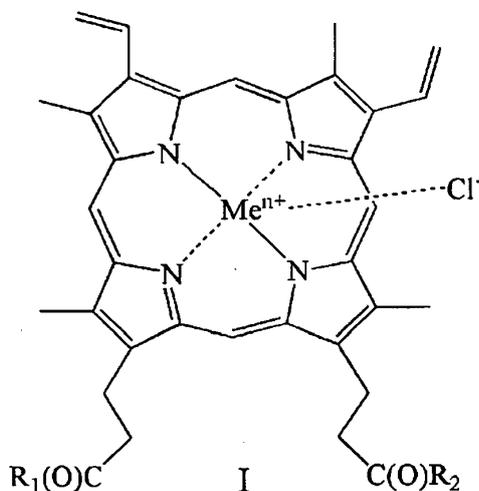
en las que HA es el radical histamina

15 y Meⁿ⁺ es Fe²⁺ o Fe³⁺;

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como agentes antibacterianos y antifúngicos.

20 Adicionalmente, la invención se refiere a un agente antibacteriano y/o antifúngico a base de los compuestos mencionados anteriormente de fórmula (I) y a las composiciones farmacéuticas y/o antisépticas correspondientes, y a su uso para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades provocadas por microorganismos.

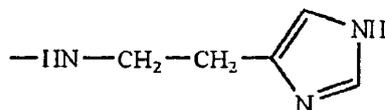
Todavía adicionalmente, la invención se refiere a un uso no terapéutico de un compuesto de fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



25 en la que R₁ y R₂ son iguales o diferentes, y en la que uno cualquiera de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-

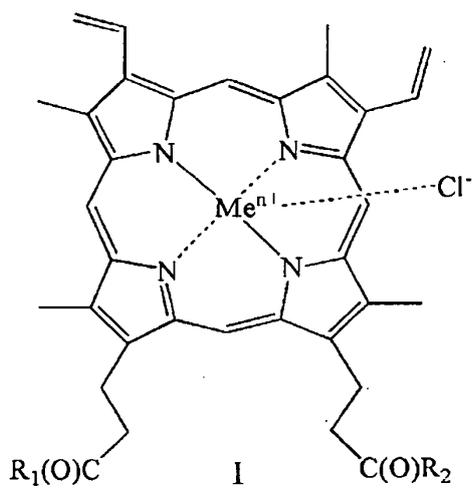
Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp, Phe o Tyr (gramicidina D), -N^δ-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S), -Arg-Gly-Asp-OH, SEQ ID NO: 1 [-Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH]; o R₁ y R₂ son cada uno -NHCH₂CH₂OH, -GlyOMe, -NHCH(CH₂OH)CH₂OH, -NHCH₂CH(OH)CH₂OH, -Glu(ArgOMe)-ArgOMe, -HA, -Arg-ArgOMe, en las que HA es el radical histamina

5



y Meⁿ⁺ es Fe²⁺ o Fe³⁺ como agente antimicrobiano.

10 Todavía adicionalmente, la invención se refiere a derivados de hemina novedosos de fórmula general (I)



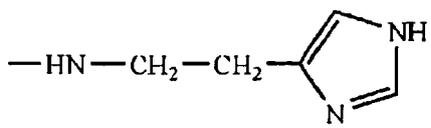
en la que R₁ y R₂ son iguales o diferentes,

15

y en la que uno cualquiera de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp o Phe o Tyr (gramicidina D), -N^δ-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S), -Arg-Gly-Asp-OH o -Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH;

20

o R₁ y R₂ son cada uno -NHCH₂CH₂OH, -GlyOMe, -NHCH(CH₂OH)CH₂OH, -NHCH₂CH(OH)CH₂OH, -Glu(ArgOMe)-ArgOMe, -HA o -Arg-ArgOMe,



en los que HA es el radical histamina

25

y Meⁿ⁺ es Fe²⁺ o Fe³⁺;

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y a un procedimiento para la producción de estos compuestos.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los gráficos de las dinámicas de liberación de carboxifluoresceína inducida por derivados de hemina en modelos de liposomas.

35

La figura 2 muestra los gráficos de la actividad hemolítica (evaluada como la intensidad de liberación de hemoglobina a partir de eritrocitos) frente a la concentración de derivados de hemina.

Descripción detallada de la invención

40

Los inventores se sorprendieron de descubrir que los compuestos de la fórmula (I) anterior, que representa conjugados de hemina con péptidos, aminoácidos, o análogos de los mismos, son agentes antimicrobianos prometedores.

Las ventajas de los derivados de hemina de fórmula (I) consisten en su biocompatibilidad y biodegradabilidad, baja toxicidad con respecto a las células humanas normales, la ausencia de efecto hemolítico y una alta eficacia antibacteriana, en particular, contra cepas resistentes, combinada con una actividad antifúngica.

Sin querer restringirse a una teoría en particular, los inventores sugieren que el efecto antimicrobiano de los compuestos de fórmula (I) puede surgir parcialmente de su acción destructiva de las membranas lipídicas, sabiéndose que esta acción es uno de los principales mecanismos del efecto antimicrobiano. Esta acción se demuestra en el ejemplo 12 y en la figura 1.

Por tanto, se han producido y estudiado los siguientes compuestos novedosos de fórmula (I):

Compuesto (XI): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -Arg-Gly-Asp-OH;

Compuesto (XII): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp, Phe o Tyr, (gramicidina D);

Compuesto (XIII): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -N^δ-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S);

Compuesto (XIV): $R_1 = R_2 =$ -NHCH₂CH₂OH;

Compuesto (XV): $R_1 = R_2 =$ -GlyOMe;

Compuesto (XVI): $R_1 = R_2 =$ -NHCH(CH₂OH)CH₂OH;

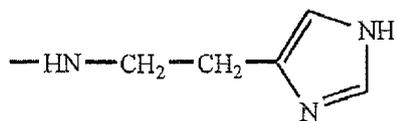
Compuesto (XVII): $R_1 = R_2 =$ -NHCH₂CH(OH)CH₂OH;

Compuesto (XVIII): $R_1 = R_2 =$ -Glu(ArgOMe)-ArgOMe;

Compuesto (XIX): $R_1 = R_2 =$ -HA;

Compuesto (XX): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH; y

Compuesto (XXI): $R_1 = R_2 =$ -Arg-ArgOMe;



en el que HA es

Aparte de los compuestos novedosos mencionados anteriormente, se han estudiado algunos de los derivados de hemina de fórmula general (I) y se encontró que muestran propiedades similares, concretamente:

Compuesto (V): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH;

Compuesto (VI): uno de R_1 y R_2 es -OH y el otro es -ArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH;

Compuesto (VII): $R_1 = R_2 =$ -ArgOMe;

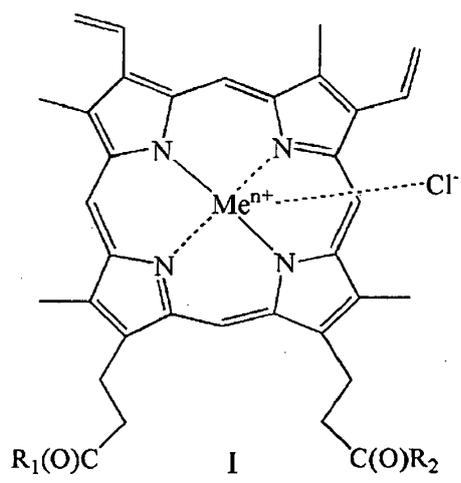
Compuesto (VIII): $R_1 = R_2 =$ -SerOMe;

Compuesto (IX): $R_1 = R_2 =$ -βAlaHA, en el que HA es el radical histamina; y

Compuesto (X): $R_1 = R_2 =$ -βAlaHis.

Los compuestos (V) y (VI) se dan a conocer en la patente rusa n.º 2250906, 27 de abril de 2005 y en el artículo de Zheltukhina, G.A., Lobanova, T.N., Nebolsin, V.E., Gallyamov, M.O., Dranitsyna, S.M. y Kostanyan, I.A., Bioorg. Khim., 2006, vol. 32, n.º 2, págs. 198-210; el compuesto (VII) se da a conocer en la patente rusa n.º 2238950, 27 de octubre de 2004; y los compuestos (VIII), (IX) y (X) se dan a conocer en la solicitud rusa n.º 2007125604, 20 de enero de 2009. Sin embargo, aún no se ha estudiado la actividad antimicrobiana (en particular, antibacteriana o antifúngica) de estos compuestos.

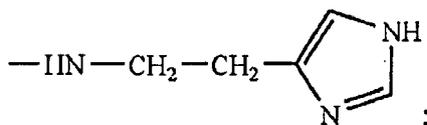
Por tanto, esta invención se refiere al uso de derivados de hemina de fórmula general (I)



en la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes, con tal que ambos de R_1 y R_2 no sean simultáneamente $-OH$, y en la que

5 uno cualquiera de R_1 y R_2 es $-OH$ y el otro es $-ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH$, $-ArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH$, $-Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH_2CH_2OH$, en el que $X=Trp$ o Phe o Tyr (gramicidina D), $-N^{\delta}$ -ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val) $_2$ (gramicidina S), $-Arg-Gly-Asp-OH$ o $-Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH$;

10 o R_1 y R_2 son cada uno $-ArgOMe$, $-SerOMe$, $-\beta AlaHA$, $-\beta AlaHis$, $-NHCH_2CH_2OH$, $-GlyOMe$, $-NHCH(CH_2OH)CH_2OH$, $-NHCH_2CH(OH)CH_2OH$, $-Glu(ArgOMe)-ArgOMe$, $-HA$ o $-Arg-ArgOMe$,



en los que HA es el radical histamina

15 y Me^{n+} es Fe^{2+} o Fe^{3+} ;

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como agentes antimicrobianos.

La actividad antimicrobiana comprende actividades tanto antibacterianas como antifúngicas.

20 Los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente son activos contra bacterias Gram positivas, tales como los géneros bacterianos *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*), *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*) y *Micrococcus* (por ejemplo, *Micrococcus luteus*), en particular, contra bacterias resistentes a agentes antibacterianos conocidos. Preferiblemente, las bacterias enumeradas anteriormente son las cepas BKM B-501 de *Bacillus subtilis*, 209P de *Staphylococcus aureus*, BKM B-871 de *Enterococcus faecalis* o BKM Ac-2230 de *Micrococcus luteus*. Todavía más preferiblemente, los compuestos mencionados anteriormente tienen actividad antibacteriana contra las cepas resistentes n.º 25923 ATCC de *Staphylococcus aureus*, n.º 100 KC de *Staphylococcus aureus*, n.º 533 de *Staphylococcus epidermidis*, n.º 559 de *Enterococcus faecalis* o n.º 569 de *Enterococcus faecium*.

30 Además, los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente son activos contra los microhongos *Cryptococcus* (en particular, *Cryptococcus neoformans*, preferiblemente la cepa n.º 3465 de *Cryptococcus neoformans*) y de microhongos *Candida* (en particular, *Candida albicans*, preferiblemente la cepa n.º 927 de *Candida albicans*).

35 Los compuestos de fórmula (I) pueden existir como isómeros o mezclas de isómeros. Por ejemplo, si se modifica uno de los dos grupos carboxilo de la hemina, puede formarse una mezcla de los derivados (6) y (7).

Todos los aminoácidos de los derivados de hemina son L-aminoácidos a menos que se especifique lo contrario.

40 Los compuestos de fórmula (I) pueden usarse o bien en forma de sales con ácidos farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, láctico, tartárico, cítrico, clorhídrico u otro ácido) o bien en forma de sales de sus grupos carboxilo con iones de metales alcalinos o alcalinotérreos (tales como sodio, potasio y calcio) o con, por ejemplo, bases farmacéuticamente aceptables (tales como amoniaco y etanolamina).

45 Los compuestos de fórmula (I) mencionados anteriormente y/o sales de los mismos pueden usarse como

componentes activos de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, en formas sólidas, semisólidas o líquidas) formuladas con un portador o excipiente orgánico o inorgánico.

5 El componente activo en la composición puede formularse con portadores farmacéuticamente aceptables y no tóxicos convencionales que son adecuados para preparar disoluciones, comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, emulsiones, suspensiones, pulverizaciones, inhaladores, gotas, pomadas u otras formas farmacéuticas. Los portadores pueden ser agua, glucosa, lactosa, goma arábica, gelatina, almidón, trixilitol de magnesio, talco, almidón de maíz, urea, polietilenglicol y otros portadores adecuados para la fabricación de preparaciones sólidas, blandas o líquidas. En el presente documento, pueden usarse estabilizadores, agentes espesantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes como aditivos.

Un compuesto de fórmula (I) está contenido en la composición en una cantidad suficiente para proporcionar el efecto antimicrobiano.

15 En la fabricación de una forma farmacéutica unitaria, la cantidad del componente activo formulado con un portador puede variar dependiendo del receptor de la terapia y de la vía particular de administración del agente terapéutico.

Por ejemplo, cuando se usan compuestos de la presente invención como disoluciones para inyección, el contenido del principio activo en la disolución oscila entre el 0,001 y el 1% en peso. Los diluyentes para los compuestos pueden ser disolución de cloruro de sodio al 0,9%, agua destilada, disolución de procaína para inyecciones, solución de Ringer y disolución de glucosa. Cuando se usan compuestos de fórmula general (I) como comprimidos o supositorios, la cantidad del compuesto oscila entre 1,0 y 100,0 mg por unidad de forma farmacéutica. Para comprimidos y supositorios, el excipiente farmacéutico puede ser cualquier base farmacéuticamente adecuada.

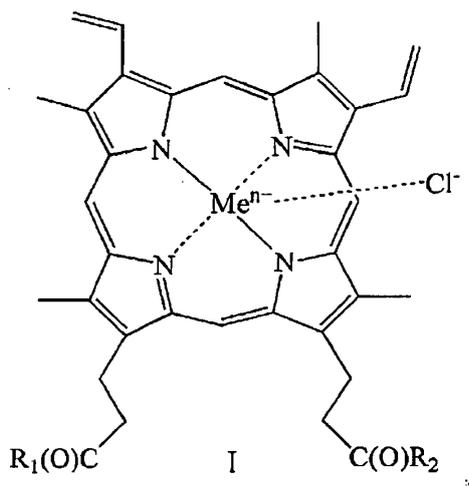
25 Dado que los compuestos de fórmula general (I) son tanto solubles en agua como lipófilos, pueden usarse como disoluciones acuosas, disoluciones alcohólicas, pomadas, cremas, etc.

Además, la invención se refiere a un agente terapéutico antimicrobiano a base de los compuestos mencionados anteriormente de fórmula (I) y a su uso para el tratamiento de enfermedades provocadas por las bacterias y/o microhongos mencionados anteriormente, comprendiendo este uso administrar a un paciente que lo necesite dicho compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica del mismo.

El uso está previsto para tratar pacientes mamíferos, en particular seres humanos. Las dosis recomendadas de un compuesto de fórmula (I) son de desde 0,01 hasta 10 mg/kg.

35 Dado que los compuestos de fórmula (I) tienen actividades antibacterianas y antifúngicas, pueden usarse asimismo como (o en) agentes antisépticos y/o desinfectantes. Estos agentes pueden prepararse como, por ejemplo, disoluciones con diversos disolventes, tales como agua y alcoholes inferiores (por ejemplo, 1-propanol o 2-propanol).

40 Otro objeto de la invención consiste en derivados de hemina novedosos de fórmula general (I)

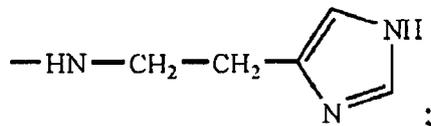


en la que R₁ y R₂ son iguales o diferentes,

45 y en la que uno cualquiera de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp o Phe o Tyr (gramicidina D), -N^δ-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S), -Arg-Gly-Asp-OH o -Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH;

o R₁ y R₂ son cada uno -NHCH₂CH₂OH, -GlyOMe, -NHCH(CH₂OH)CH₂OH, -NHCH₂CH(OH)CH₂OH, -Glu(ArgOMe)-ArgOMe, -HA o -Arg-ArgOMe,

5



en los que HA es el radical histamina

y Meⁿ⁺ es Fe²⁺ o Fe³⁺,

10 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para producir los compuestos novedosos de fórmula (I) descritos anteriormente.

15 Los compuestos de fórmula (I) se producen haciendo reaccionar un derivado de hemina activado en grupo(s) carboxilo(s) con un componente de amino.

Los componentes de amino pueden ser péptidos, aminoácidos (en su mayoría, α -aminoácidos), o análogos de los mismos, en particular, Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH₂CH₂OH, en el que X=Trp o Phe o Tyr (gramicidina D), ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂ (gramicidina S), Arg-Gly-Asp-OH, NH₂CH₂CH₂OH, GlyOMe, NH₂CH(CH₂OH)CH₂OH, -NH₂CH₂CH(OH)CH₂OH, Glu(ArgOMe)-ArgOMe, histamina (HA), Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH y Arg-ArgOMe.

25 Preferiblemente, los grupos amino de los componentes de amino (por ejemplo, los grupos α -amino de los aminoácidos) se acilan con un éster de bis-N-oxisuccinimida de hemina; o para preparar derivados de monohemina, con un éster de 6(7)-mono-N-oxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida de hemina; o con un derivado de hemina activado en un grupo carboxilo, en el que el agente activador es un pirocarbonato de di-terc-butilo en presencia de piridina. Las reacciones se llevan a cabo en DMF durante de 0,5 a 2 h a una temperatura de desde -15° hasta +30°C.

30 Por tanto, se reivindican agentes antimicrobianos eficaces novedosos con actividades antibacterianas y antifúngicas a base de derivados de hemina. Sus ventajas consisten en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad contra cepas bacterianas resistentes, no toxicidad y estar libres de efectos secundarios. Además, las concentraciones en las que los compuestos reivindicados son tóxicos para las células normales superan sus CMI (concentraciones mínimas inhibitorias) y CMB (concentraciones mínimas bactericidas) en de dos a tres órdenes de magnitud. Por
35 tanto, es altamente probable que los compuestos reivindicados tengan un amplio rango de actividad antimicrobiana, lo que los convierte en prometedores para su uso como agentes terapéuticos.

Además, se ilustrará la invención mediante ejemplos que no se pretende que limiten el alcance de la misma.

40 Notaciones

DCC = N,N'-diciclohexilcarbodiimida

DMSO = dimetilsulfóxido

45

DOPC = dioleoilfosfatidilcolina

GrD = gramicidina D

50

HA = histamina

Hem = radical hemina

MeOH = metanol

55

MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

MH = medio Mueller-Hinton

60

OMe = metil éter

ONb = éster de N-oxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida

O'Bu = terc-butil éter

Z = grupo carboxibenzoxilo

5

DMSO = dimetilsulfóxido

DMF = N,N'-dimetilformamida

10

IR = espectroscopía infrarroja

IC = inhibición del crecimiento

CF = carboxifluoresceína

15

CMB = concentración mínima bactericida

CMI = concentración mínima inhibitoria

20

CMS = concentración mínima supresora

RP-HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa

Tris = tris(hidroximetil)aminometano

25

CCF = cromatografía en capa fina

CLF = cloroformo

30

EA = acetato de etilo

Todas las cantidades expresadas en porcentaje son porcentajes en peso a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

35

Los reactivos usados fueron: L-aminoácidos y sus derivados adquiridos de Bachem (Alemania) y Reanal (Hungría); DOPC (de Sigma-Aldrich); carboxifluoresceína (Fluka, Alemania); MES (Sigma-Aldrich); Tris (Sigma-Aldrich); gramicidina D (Sigma-Aldrich); gramicidina S (Kraspharma, Rusia); y cloruro de potasio de calidad para reactivo analítico (la norma rusa) (Khimmed, Rusia).

40

Todos los disolventes eran anhídridos, excepto por aquéllos usados para la extracción de disoluciones acuosas. Se verificó la identidad de los compuestos preparados mediante CCF en placas Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania) en los siguientes sistemas: (1) cloroformo-metanol (9:1), (2) cloroformo-metanol (8:2), (3) cloroformo-metanol (5:3), (4) cloroformo-metanol-ácido acético (5:3:1), (5) metanol-ácido acético-agua (4:1:1), y (6) butanol-ácido acético-agua (4:1:1). Se revelaron los cromatogramas con el reactivo cloro-toluidina, ninhidrina o mediante fluorescencia en UV.

45

Se obtuvieron espectros de masas de alta resolución en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Ultraflex (Bruker, Alemania) usando desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI TOF); se usaron matrices de ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

50

Se registraron espectros IR en un espectrómetro por transformada de Fourier Magna 750 (Nicolet, EE.UU.).

Se registraron espectros electrónicos en un espectrofotómetro Jasco modelo UV/VS 7800 (Japón).

55

Se llevó a cabo RP-HPLC en un instrumento Gilson 305 (Gilson, Francia).

Se llevó a cabo RP-HPLC preparativa en una columna Luna de 10 µ, de fase inversa C5, 250 x 21,2 mm (Phenomenex, EE.UU.) en las siguientes condiciones:

60

elución isocrática con una disolución de TFA al 0,1% en agua y una velocidad de flujo de 4 ml/min. Se registró la absorción a una longitud de onda de 220 nm (7).

Se monitorizó la dinámica de liberación de CF de los liposomas en un fluorímetro Cary Eclipse (Varian, EE.UU.).

65

Se obtuvieron liposomas con una miniextrusora Avanti (Avanti Polar Lipids, EE.UU.).

Ejemplo 1*6,7-Bis(éster N^α-glicilmetílico)-protohemina IX (compuesto XV, R₁ = R₂ = -GlyOMe)*

5 A una suspensión de 0,030 g (0,236 mmol) de H-GlyOMe-HCl en 1,5 ml de DMF se le añadieron 0,033 ml (0,236 mmol) de Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante 3 min. A la disolución resultante, se le añadió una disolución de 0,100 g (0,118 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 5 ml de DMF y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en condiciones (1) y (2). Se concentró la disolución hasta 0,5 ml a vacío y se añadieron 6 ml de dietil éter. Se disolvió el residuo resultante en CLF para precipitar cristales blancos de Et₃N-HCl y se decantó la disolución para deshacerse de ellos. Se eliminó el disolvente a vacío. Para introducir contraiones Cl⁻, se disolvió el residuo en 15 ml de CLF-MeOH (8:2), se agitó dos veces con 7,5 ml de ácido clorhídrico 0,5 N y se lavó con agua hasta una reacción neutra. Se eliminó el disolvente a vacío. Se purificó la sustancia en una columna (20 x 2 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH (8:2). Se recogió la fracción que contenía la sustancia con R_f de 0,71 (2). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,063 g (67%); R_f: 0,26 (1), 0,71 (2). Espectro electrónico, λ_{máx}, nm, CLF:MeOH (8:2), (ε x 10⁻³): 400 (115,9), 508 (9,38), 640 (3,81). Espectro FT-IR, ν, cm⁻¹, pastilla de KBr: 1737 (CO ést.), 1648 (amida I), 1539 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 758,5.

Ejemplo 2

20 *6,7-Bis-histaminil-protohemina IX (compuesto XIX, R₁ = R₂ = HA)*

25 A una disolución de 0,026 g (0,236 mmol) de histamina en 1,5 ml de DMF se le añadió una disolución de 0,100 g (0,118 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 4 ml de DMF y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en condiciones (2) y (3). Se concentró la disolución hasta 1 ml a vacío y se añadieron 10 ml de dietil éter. Para introducir contraiones Cl⁻, se disolvió el residuo en 4 ml de MeOH y se añadieron 0,093 ml (0,354 mmol) de HCl 3,8 N/MeOH para ajustar el pH a 4. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se purificó la sustancia en una columna (31 x 2 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH (5:3). Se recogió la fracción que contenía la sustancia con R_f de 0,64 (3). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,049 g (51%); R_f: 0,25 (2), 0,64 (3). Espectro electrónico, λ_{máx}, nm, CLF:MeOH (8:2), (ε x 10⁻³): 388 (49,1), 508 (4,18), 640 (1,76). Espectro FT-IR, ν, cm⁻¹, pastilla de KBr: 1644 (amida I), 1543 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 802,3.

Ejemplo 3

35 *6,7-Bis[bis(éster N^α-L-arginilmetílico)-L-glutamil]-protohemina IX (compuesto XVIII, R₁ = R₂ = -Glu(ArgOMe)-ArgOMe)*

40 *(1) Diclorhidrato de ácido bis(éster N^α-arginilmetílico)-L-glutámico*

45 A una suspensión de 0,069 g (0,266 mmol) de H-ArgOMe-2HCl en 2 ml de DMF se le añadieron 0,074 ml (0,531 mmol) de Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A la disolución resultante se le añadieron 0,077 g (0,133 mmol) de éster bis(pentafluorofenílico) de ácido Boc-glutámico (que se había preparado por adelantado) y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (5). Se concentró la disolución hasta 1 ml a vacío y se añadieron 10 ml de dietil éter. Se separó un precipitado oleoso del disolvente mediante decantación y se eliminó el disolvente residual a vacío. Se purificó la sustancia en una columna (23 x 1 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue metanol-ácido acético-agua (4:0,5:0,5). Se recogió la fracción que contenía la sustancia con R_f de 0,67 (5). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,073 g (77%); R_f: 0,67 (5). [α]_D²⁵ - 8,53° (C, 0,38; MeOH). Espectro FT-IR, ν, cm⁻¹, pastilla de KBr: 1735 (CO ést.), 1653 (amida I), 1542, 1558 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 588,31.

55 A 0,073 g (0,0946 mmol) de ácido bis(éster N^α-arginilmetílico)-Boc-L-glutámico (V) se vertieron 6 ml de HCl ~3 N/MeOH. Se agitó la suspensión resultante durante 2 h a temperatura ambiente. Se monitorizó el procedimiento mediante CCF en las condiciones (6). Tras alcanzar la conversión completa al dipéptido con amino no protegido, se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se cristalizó un residuo oleoso bajo dietil éter anhídrido; se separó el solvente mediante decantación.

60 *(2) 6,7-Bis[(éster N^α-L-arginil-bis-metílico)-L-glutamil]-protohemina IX (compuesto XVIII)*

65 A una suspensión del H-Glu(ArgOMe)₂-3HCl preparado en 1,5 ml de DMF se le añadieron 0,047 ml (0,335 mmol) de Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante 2 min. Se observó precipitación de Et₃N-HCl. A la suspensión resultante se le añadió una disolución de 0,047 g (0,0558 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 2 ml de DMF y se agitó durante 22 h a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (6). Se concentró la disolución hasta 1 ml a vacío y se añadieron 10 ml de dietil

éter. Para introducir contraiones Cl⁻ se disolvió el residuo en 4 ml de MeOH y se añadió HCl 3,8 N/MeOH para ajustar el pH a 4. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se purificó la sustancia tres veces en una columna (13 x 1 cm) empaquetada con Sephadex LH-20; el eluyente fue MeOH. Se recogió la fracción que contenía la sustancia con Rf de 0,07 (6). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,030 g (34%); Rf: 0,07 (6); Rf_(alúmina): 0,70 (6).
 5 Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, CLF:MeOH (8:2), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 400 (92,2), 508 (6,31), 636 (2,39). Espectro FT-IR, ν , cm⁻¹, pastilla de KBr: 1737 (CO ést.), 1649 (amida I), 1528 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 1554,97.

Ejemplo 4

10 *6,7-Bis-N-(2-hidroxiethyl)amida de protohemina IX (compuesto XIV, R₁ = R₂ = -NH-CH₂-CH₂-OH)*

A una disolución de 0,050 g (0,0591 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 3 ml de DMF se le añadieron 0,010 ml (0,118 mmol) de aminoetanol y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (2) y (3). Se concentró la disolución hasta 1 ml a vacío y se añadieron 10 ml de dietil éter. Para introducir contraiones Cl⁻ se disolvió el residuo en 3 ml de MeOH y se añadió HCl 3,8 N/MeOH para ajustar el pH a 4. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se purificó la sustancia en una columna (24 x 1 cm) equipada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH (5:3). Se recogió la fracción que contenía la sustancia con Rf de 0,52 (3). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,036 g (82,5%); Rf: 0,35 (2), 0,52 (3). Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, CLF:MeOH (8:2), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 400 (183,0), 508 (5,23), 640 (2,08). Espectro FT-IR, ν , cm⁻¹, pastilla de KBr: 1632 (amida I), 1549 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 702,5.

Ejemplo 5

25 *6,7-Bis-N-(1,3-dihidroxiopropan-2-il)amida de protohemina IX (compuesto XVI, R₁ = R₂ = -HN-CH(CH₂OH)-CH₂OH)*

A una disolución de 0,050 g (0,0591 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 3 ml de DMF se le añadió una disolución de 0,012 g (0,118 mmol) de 2-amino-1,3-propanodiol en 0,5 ml de DMF y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (4). Se concentró la disolución hasta 0,5 ml a vacío y se añadieron 6 ml de dietil éter. Para introducir contraiones Cl⁻ se disolvió el residuo en 9 ml de CLF-MeOH (8:2), se agitó una vez con 4 ml de ácido clorhídrico 0,06 N saturado con NaCl y se lavó con agua hasta una reacción neutra. Se eliminó el disolvente a vacío. Se purificó la sustancia en una columna (21 x 2 cm) empaquetada con Sephadex LH-20; el eluyente fue MeOH. Se recogió la fracción que contenía la sustancia con Rf de 0,56 (4). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,018 g (36%); Rf: 0,56 (4). Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, CLF:MeOH (8:2), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 400 (40,5), 508 (2,68), 640 (1,02). Espectro FT-IR, ν , cm⁻¹, pastilla de KBr: 1629 (amida I), 1550 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 762,0.

Ejemplo 6

40 *6,7-Bis-N-(2,3-dihidroxiopropil)amida de protohemina IX (compuesto XVII, R₁ = R₂ = -HN-H₂C-CH(OH)-CH₂OH)*

A una disolución de 0,050 g (0,0591 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 3 ml de DMF se le añadieron 0,009 ml (0,118 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (3) y (4). Se concentró la disolución hasta 0,5 ml a vacío y se añadieron 6 ml de dietil éter. Para introducir contraiones Cl⁻ se disolvió el residuo en 3 ml de MeOH y se añadió HCl 3,8 N/MeOH para ajustar el pH a 4. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se purificó la sustancia en una columna (30 x 2 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH:AcOH (5:3:0,5). Se recogió la fracción que contenía la sustancia con Rf de 0,69 (4). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,023 g (46%); Rf: 0,33 (3), 0,69 (4). Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, CLF:MeOH (8:2), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 396-400 (24,2), 488 (2,14), 600 (1,40). Espectro FT-IR, ν , cm⁻¹, pastilla de KBr: 1634 (amida I), 1565 (amida II). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 762,0.

Ejemplo 7

55 *6(7)-Mono(-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-Trp-D-Leu-X-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NH-CH₂CH₂OH)amida de protohemina IX (compuesto XII, en el que uno de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-Trp-D-Leu-X-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NH-CH₂CH₂OH, en el que X = Trp, Tyr, Phe)*

A una disolución de 32 mg (0,017 mmol) de gramicidina D en 0,650 ml de DMF seca se le añadieron 48 μ l de HCl 1 N en metanol. Se agitó la mezcla de reacción durante 72 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Rendimiento: 30 mg (98%). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 1854,0.

A una disolución de 30 mg (0,016 mmol) de gramicidina D deformilada en 0,2 ml de DMF se le añadieron 13,2 mg (0,016 mmol) de éster de 6(7)-mono-N-oxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida de hemina y se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se disolvió el residuo en cloroformo. Se purificó el

residuo en una columna (30 x 2 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH (9:1). Rendimiento: 23,5 mg (59%). Espectro FT-IR, ν , cm⁻¹, pastilla de KBr: 1634 (amida I), 1565 (amida II). Rf: 0,65 (1).

5 Ejemplo 8

6(7)-Mono[ciclo(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂]amida de protohemina IX (compuesto XIII, en el que uno de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -N³-[ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)₂])

10 A una disolución de 50 mg (0,077 mmol) de hemina en 0,5 ml de DMF seca se le añadieron 1 ml de piridina y 25,3 mg (0,116 mmol) de pirocarbonato de di-terc-butilo y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente, a una suspensión de 93,5 mg (0,077 mmol) de diclorhidrato de gramicidina S en 0,5 ml de DMF se le añadieron 22 μ l (0,154 mmol) de trietilamina y se agitó durante 2 min.

15 Al anhídrido de hemina mixto resultante se le añadió una disolución de gramicidina S con amino no protegido y se agitó durante 3 h. Se eliminó el disolvente a vacío a 30°C. Se disolvió el residuo en cloroformo. Se purificó el residuo en una columna (30 x 2 cm) empaquetada con gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania); el eluyente fue CLF-MeOH (12:1). Rendimiento: 20 mg (15%). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 1739,5. Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, cloroformo:metanol (4:1), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 400 (105), 492 (10,6), 640 (6).

20

Ejemplo 9

6(7)-Mono(Arg-Gly-Asp)-protohemina IX (compuesto XI, en el que uno de R₁ y R₂ es -OH y el otro es Arg-Gly-Asp-OH)

25

A una suspensión de 20 mg (0,038 mmol) de Arg-Gly-Asp-CH₃COOH-CF₃COOH en 0,5 ml de DMF se le añadieron 5 μ l (0,038 mmol) de trietilamina y se agitó durante 2 min. Entonces, se añadieron 62 μ l (0,251 mmol) de bis-(O,N-trimetilsilil)acetamida y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A la suspensión resultante se le añadieron 32 mg (0,038 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX y se agitó la mezcla de reacción durante 6 h. Entonces, se eliminó el disolvente a vacío y se disolvió el precipitado en metanol para desililar los grupos carboxilo del tripéptido. Se cristalizó el producto diana en metanol. Rendimiento: 20 mg (54%). Espectro de masas, m/z: [M]⁺ 981,3.

30

Ejemplo 10

35

N⁶-[6(7)-(Protohemina IX)-il]-ArgArgTrpTrpArgPhe-OH (compuesto XX, en el que uno de R₁ y R₂ es -OH y el otro es -ArgArgTrpTrpArgPhe-OH)

(a) Síntesis en fase sólida de ArgArgTrpTrpArgPhe-OH (compuesto XXI) sobre polímero de cloruro de 2-clorotritilo

40

Determinación del grado de unión de los aminoácidos de partida. A 0,1 g del polímero que contenía 1,43 mmol de grupos reactivos e hinchado previamente en 5 ml de dicloroetano se le añadió una disolución recién preparada de 0,044 g (0,1143 mmol) de Fmoc-Phe-OH y 0,040 ml (0,286 mmol) de trietilamina en 2 ml de dicloroetano y se agitó con aire durante 25 min a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 2 ml de metanol-trietilamina (9:1) y se agitó la mezcla durante 1 min. Se eliminó mediante filtración el polímero de peptidilo, se lavó con dicloroetano (2 min x 3), DMF (2 min x 2), isopropanol (2 min x 2), DMF (2 min x 2), isopropanol (2 min x 2), metanol (2 min x 1) y dietil éter (2 min x 2), y se secó a vacío mediante un chorro de agua. Se determinó espectrofotométricamente el grado de sustitución de la resina. A 10 mg del polímero de Fmoc-Phe así preparado se le añadió 1 ml de una disolución al 20% de piperidina en DMF y se agitó durante 20 min a 25°C. Se eliminó mediante filtración la resina, se tomó una alícuota de filtrado, se midió la absorción óptica de la disolución del producto N-(9-fluorenilmetil)piperidina a 289 nm. Se calculó el grado de sustitución de la resina a partir de

50

$$c = A_{289} \times V \times W / 5800,$$

55 donde c es el contenido de grupo activo en el polímero, A₂₈₉ es la densidad óptica de la disolución en relación con una referencia, W es el peso de la muestra de polímero (mg) y 5800 es la absorptividad molar de N-(9-fluorenilmetil)piperidina. El contenido en Fmoc-Phe del polímero era de 0,3 mmol/g.

A 0,331 g del polímero que contenía 0,099 mmol de Cl e hinchado previamente en 3,3 ml de dicloroetano se le añadió una disolución recién preparada de 0,115 g (0,3 mmol) de Fmoc-Phe-OH y 0,034 ml (0,25 mmol) de trietilamina en 0,6 ml de dicloroetano, y se agitó durante 25 min a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 6 ml de metanol-trietilamina (9:1) y se agitó la mezcla durante 1 min. Se eliminó mediante filtración el polímero de peptidilo y se lavó con dicloroetano (2 min x 3), DMF (2 min x 2), isopropanol (2 min x 2), DMF (2 min x 2), isopropanol (2 min x 2), metanol (2 min x 1) y dietil éter (2 min x 2). Cada porción de la disolución de lavado era de 2 ml. El ciclo de síntesis comprendía: (1) activación de 10 min del aminoácido Fmoc que va a unirse (3 equiv.) con DIC (3 equiv.) y

65

HOBt (3,6 equiv.) en 1 ml de DMF; (2) desbloqueo de los grupos α -amino mediante exposición a una disolución de piperidina al 20% en DMF (3 ml x 3) durante 30 min; (3) lavado del polímero de peptidilo con DMF (1,5 ml x 8 x 3 min); (4) lavado adicional del polímero de peptidilo con una disolución de HOBt (3,6 equiv.) en 1,5 ml de DMF durante 3 min; (5) condensación del aminoácido Fmoc activado (3 equiv.) con el polímero de peptidilo durante 24 h; (6) lavado del polímero de peptidilo con DMF (1,5 ml x 2 x 2 min); y (7) monitorización de la finalización de la sustitución de grupos amino tras la unión de cada aminoácido Fmoc siguiente mediante la prueba de ninhidrina; si la prueba era positiva, se repitió la etapa de condensación. Se llevaron a cabo dos etapas de condensación para los siguientes aminoácidos: Arg², Trp³, Trp⁴, Arg⁵ y Arg⁶.

10

Condiciones de síntesis de H-ArgArgTrpTrpArgPhe-OH

N.º	Aminoácido (AA)	Cantidades de reactivo	Tiempo de reacción de condensación, h	Prueba de ninhidrina
1	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	24	+
	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	2	-
2	Fmoc-Trp-OH	0,127 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	24	+
	Fmoc-Trp-OH	0,127 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	3	-
3	Fmoc-Trp-OH	0,127 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	24	+
	Fmoc-Trp-OH	0,127 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	3	-
4	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	24	+
	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	5	+
	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	12	-
5	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	16	+
	Fmoc-Arg-OH*	0,118 g de AA (0,3 mmol) 0,048 g de HOBt (0,36 mmol) 0,046 ml de DIC (0,3 mmol)	16	

*Antes de la reacción, se convirtió la función lateral Fmoc-Arg-OH en DMF a clorhidrato añadiendo un equivalente de HCl acuoso 12 N. Se eliminaron mediante destilación los disolventes a vacío; el secado fue sobre NaOH.

Tras haber terminado la síntesis y haberse desbloqueado el grupo α -amino, se lavaron 0,143 g del polímero de peptidilo con DMF (1 ml x 8 x 2 min) y luego con HOBt (3,6 equiv.) en 1 ml de DMF.

15 (b) N^α-[6(7)-(Protohemina IX)-il]-ArgArgTrpTrpArgPhe-OH (compuesto XX)

A 0,29 g del polímero de peptidilo (XX) con protección Fmoc escindida se le añadieron 3 equiv. de éster de 6(7)-mono-N-oxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida de protohemina IX (II) en 4,5 ml de DMF, se agitó durante 5 h y se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente. Se separó el polímero de peptidilo de hemina y se lavó con DMF (2 ml x 7 x 3 min). La prueba de ninhidrina fue negativa. Se lavó el polímero de peptidilo de hemina con DCM (2 ml x 2 x 2 min), se secó a vacío con una bomba de chorro de agua, se le añadieron 4,5 ml de TFA-TFE-DCM (1:1:8) y luego se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 h. Se separó el polímero y se lavó con TFA-TFE-DCM (1:1:8) (1 ml x 4 x 1 min). Se trituró el residuo con dietil éter anhidro enfriado (tomados en un exceso de 10 a 12 veces de volumen); se eliminó mediante precipitación un filtrado, se lavó dos veces con dietil éter y se secó a vacío. Se purificó el producto en una columna (150 x 20 mm) empacutada con Sephadex LH-20; se eluyó el producto diáfano con metanol-agua (20:1). Rendimiento: 0,027 g (25%). Rf. 0,5 (6). Espectro electrónico (metanol), $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^{-3}$,

25

$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 393,4 (65,8), 474,8 (8,7), 578,0 (3,61), 607,2 (3,19). Espectro de masas, m/z : 1605 $[M]^+$ (calc.: 1603,5).

Ejemplo 11

5 *6,7-Bis[(éster N^α-L-arginilmetílico)-L-arginil]-protohemina IX (compuesto XXI, R₁ = R₂ = -Arg-ArgOMe)*

(a) *Éster de N-oxisuccinimida de N^α,N^ε,N^ε-tribenciloxicarbonilarginina*

10 A una disolución de 0,410 g (0,709 mmol) de Z₃ArgOH en 5 ml de CLF (anhidr.) se le añadieron 0,0816 g (0,709 mmol) de N-oxisuccinimida en 1 ml de DMF. Se enfrió la mezcla de reacción hasta -10°C y se añadieron gota a gota 0,146 g (0,709 mmol) de DCC en 5 ml de CLF durante 10 min. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a 0°C, luego durante 5 h a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 17 h a una temperatura de 4 a 5°C. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (11). Se separó un precipitado de DCU mediante filtración doble; se eliminó el disolvente a vacío. Se cristalizó el residuo mediante éter de petróleo en acetato de etilo. Se secó el residuo sólido a vacío sobre CaCl₂ anhidro. Rendimiento: 0,380 g (81%); Rf: 0,68 (11). Espectro FT-IR, ν , cm^{-1} , pastilla de KBr: 1742 (CO ést.), 1610 (OCONH), 1541 (OCONH), 1262 (arom.). Espectro de masas, m/z : $[M]^+$ 673,7. In [106]: p.f. 85-86. $[\alpha]_D^{25}$ - 9,7° (C 2; dioxano).

20 (b) *Éster metílico de N^α,N^ε,N^ε-tribenciloxicarbonilarginilarginina*

25 A una suspensión de 0,023 g (0,0890 mmol) de H-ArgOMe-2HCl en 2 ml de DMF se le añadieron 0,024 ml (0,178 mmol) de Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A la disolución resultante se le añadieron 0,060 g (0,890 mmol) del éster de N-oxisuccinimida de N^α,N^ε,N^ε-tribenciloxicarbonilarginina preparado anteriormente mezclado con 1,5 ml de DMF y se agitó durante 22 h a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (2). Se concentró el disolvente hasta 1 ml a vacío y se añadieron 10 ml de dietil éter. Se separó un precipitado oleoso del disolvente mediante decantación; se eliminó el disolvente residual a vacío. Se disolvió el residuo en 15 ml de CLF:Me-OH (8:2) y se lavó con agua. Se eliminó la fase orgánica a vacío. Se purificó la sustancia mediante cromatografía en columna en gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania) (8 x 3 cm); el eluyente fue CLF:MeOH (9:1). Se recogieron las fracciones que contenían la sustancia con Rf de 0,48 (2). Se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 0,056 g (78%); Rf: 0,48 (2). Espectro FT-IR, ν , cm^{-1} , pastilla de KBr: 1727 (CO ést.), 1642 (amida I), 1548 (amida II). Espectro de masas, m/z : $[M]^+$ 748.

30 (c) *6,7-Bis[(éster N^α-L-arginilmetílico)-L-arginil]-protohemina IX*

35 A 0,054 g (0,0511 mmol) de éster metílico de N^α-arginil-Z₃-arginina se vertieron 8 ml de metanol-ácido acético-agua (6:1:1). A la disolución se le añadió un catalizador de paladio y se llevó a cabo una hidrogenación a temperatura ambiente durante 1 h, monitorizándose la reacción mediante CCF en el sistema (2). Cuando finalizó la reacción, se eliminó mediante filtración el catalizador y se lavó con agua; se eliminó el disolvente a vacío a 40°C. A una suspensión del H-ArgArgOMe-3CH₃COOH preparado en 2 ml de DMF se le añadieron 0,0216 ml (0,1542 mmol) de Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante 2 min. Se observó precipitación de Et₃N-HCl. A la suspensión resultante se le añadió una disolución de 0,022 g (0,0257 mmol) de éster de 6,7-bis-N-oxisuccinimida de protohemina IX (I) en 1 ml de DMF y se agitó durante 3,5 h a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF en las condiciones (5). Se concentró la disolución hasta 1 ml a vacío y se añadieron 7 ml de dietil éter. Para introducir contraiones Cl⁻ se disolvió el residuo en 15 ml de CLF:MeOH (8:2), se agitó dos veces con 7,5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y se lavó con agua hasta una reacción neutra. Se eliminó el disolvente a vacío. Se purificó la sustancia mediante CCF preparativa en gel de sílice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemania) (11 x 14 cm); el eluyente fue MeOH:AcOH:H₂O (4:1:1). Rendimiento: 0,015 g (40%). Rf: 0,1 (5). Espectro electrónico, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, CLF:MeOH (8:2), ($\epsilon \times 10^{-3}$): 400 (79,2), 478 (5,72), 596 (3,41). Espectro FT-IR, ν , cm^{-1} , pastilla de KBr: 1739 (CO ést.), 1642 (amida I), 1531 (amida II). Espectro de masas, m/z : $[M]^+$ 1270,4.

Ejemplo 12

Estudios del efecto destructivo de los derivados de hemina de fórmula general (I) sobre las membranas lipídicas

55 Durante el estudio del efecto de derivados de hemina sobre la permeabilidad de las membranas lipídicas, se midió la liberación de carboxifluoresceína (CF) desde los liposomas cargados con carboxifluoresceína inducida por estos derivados como se describe en [Y. N. Antonenko, T. B. Stoilova, S. I. Kovalchuk, *et al.*, "Large Unselective Pore in Lipid Bilayer Membrane Formed by Positively Charged Peptides Containing a Sequence of Gramicidin A", FEBS Letters, 2005, vol. 579, págs. 5247-5252]. Se prepararon liposomas usando una disolución madre de DOPC en cloroformo con una concentración de 20 mg/ml. Se concentró una porción de 200 μl de la disolución madre bajo flujo de nitrógeno; se añadió una porción de 0,4 ml de una disolución tampón que contenía Tris 10 mM, MES 10 mM, KCl 100 mM y CF 100 mM; y se agitó la mezcla durante 2 min y luego se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación agitándose tras el final de cada ciclo. Se extruyó la mezcla resultante de liposomas multilaminares a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,1 μm usando una miniextrusora Avanti (Avanti Polar Lipids, EE.UU.). Se separó la CF no incluida en liposomas mediante cromatografía de gel en

Sephadex G-50. Se dejó el Sephadex durante la noche en agua para que se hinchase. Se empaquetó una columna de 20 ml con Sephadex hinchado y luego se equilibró con 60 ml de un tampón que contenía Tris 10 mM, MES 10 mM y KCl 100 mM (tampón A). El volumen de la suspensión de liposomas que contenían CF era de 500 μ l (la concentración de lípidos era de 0,045 mg/ml). Se colocó la suspensión dentro de una célula y se ajustó el volumen a 2 ml con tampón A. A la suspensión de liposomas resultante se le añadieron 10 μ l de una disolución 10^{-4} M de un derivado de hemina de fórmula general (I) en DMSO. Se monitorizó fluorimétricamente la dinámica de liberación de CF. Se excitó la fluorescencia de carboxifluoresceína a una longitud de onda de 490 nm y se detectó a 520 nm (las dos hendiduras eran cada una de 5 nm de ancho). Se calculó la cantidad relativa del colorante liberado desde liposomas en un momento de tiempo particular a partir de

$$\alpha = (F_f - F_0)/(F_m - F_0),$$

donde F_0 y F_f son los niveles de fluorescencia antes y después de la adición del péptido, respectivamente; y F_m es el valor de fluorescencia tras la destrucción completa de los liposomas mediante el detergente Triton X-100, que se añadió hasta una concentración final del 2,4% (en peso).

La figura 1 muestra la dinámica de liberación de carboxifluoresceína desde liposomas bajo el efecto de los derivados de hemina de fórmula general (I) para la razón de lípido/derivado de hemina de 10:1 (mol/mol).

Ejemplo 13

Estudios de la actividad antibacteriana de los compuestos de fórmula general (I)

Se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos contra las cepas BKM B-501 de *Bacillus subtilis*, 209P de *Staphylococcus aureus*, BKM B-871 de *Enterococcus faecalis* y BKM Ac-2230 de *Micrococcus luteus* (adquiridas de la Colección de Microorganismos de toda Rusia del Instituto de Bioquímica y Fisiología de Microorganismos, Academia de Ciencias de Rusia). Los principales parámetros que caracterizan la actividad antibacteriana son la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). La CMI es la concentración más baja de un compuesto sometido a prueba que inhibe completamente la reproducción de bacterias en un medio líquido. La MBC es la concentración más baja que provoca la muerte de todas las células.

La CMI se cuantificó inhibiendo el crecimiento de un cultivo en un medio líquido con diluciones en serie de compuestos usando un procedimiento modificado [Amsterdam, D., "Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media", en *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Ed. por Loman, V., 4ª ed., Baltimore: Williams y Wilkins, 1996, págs. 52-111].

Se cultivaron bacterias y se llevaron a cabo pruebas en un medio líquido MH (medio Mueller-Hinton: un extracto seco de caldo de ternera, 4 g/l; almidón, 1,5 g/l; hidrolizado de caseína, 17,5 g/l; catálogo Sigma-Fluka n.º 70192) a 37°C, 100% de humedad y con agitación. Se usaron cultivos (de la 4ª a la 7ª nueva siembra tras la descongelación) en la fase de crecimiento exponencial para las pruebas.

Todos los compuestos sometidos a prueba, excepto la gramicidina D, absorben la luz a 595 nm, una longitud de onda usada para evaluar el crecimiento de cultivo bacteriano. Por tanto, se aplicó una corrección a la absorción en la estimación de la densidad óptica de las suspensiones bacterianas para cada compuesto teniendo en cuenta su concentración en el pocillo. Se derivó la inhibición de crecimiento (GI) bacteriano en porcentaje tras 20 horas de incubar células con un compuesto sometido a prueba a partir de la densidad óptica (A) medida en cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm usando la ecuación

$$GI_i = [(A_{ct} - A_{c0}) - (A_{it} - A_{i0})] \times 100 / (A_{ct} - A_{c0}), \quad (1)$$

en la que los subíndices tienen los siguientes significados: i indica el número de pocillo, c indica un pocillo control con bacterias en el que no se insertó el compuesto sometido a prueba, 0 se refiere a la medición tomada inmediatamente después de la inserción del compuesto sometido a prueba en el pocillo y t se refiere a la medición tomada 20 horas después de la inserción del compuesto.

El protocolo para la determinación experimental de la actividad antibacteriana para los compuestos sometidos a prueba fue el siguiente. Se descongeló rápidamente un criovial con el cultivo de la cepa de prueba (BKM B-501 de *Bacillus subtilis*, 209P de *Staphylococcus aureus*, BKM B-871 de *Enterococcus faecalis* o BKM Ac-2230 de *Micrococcus luteus*) en un medio con DMSO al 7% almacenado en nitrógeno líquido y se inocularon 1,5 ml del medio MH fresco con 100 μ l de la suspensión celular. Se hicieron crecer células durante un día a 37°C y se agitaron en un agitador orbital a 150 rpm. Se verificaron las características morfológicas de la cepa y la ausencia de contaminación con bacterias externas mediante: (a) inoculación en un medio MH con agar (agar 15 g/l) y observación de la forma y el color de las colonias que crecieron y (b) examen de los rasgos morfológicos

característicos bajo un microscopio (Mikmed-2, LOMO, Rusia) equipado con una lente de objetivo 40x. Se cultivaron bacterias adicionales en 1 ml del medio MH líquido a 37°C con agitación. Se sembraron de nuevo las células cada día. Se usaron cultivos celulares en las pruebas comenzando con la 3ª nueva siembra y terminando con la 6ª.

5 Para las pruebas, se transfirieron 5 µl de una suspensión bacteriana en la fase de crecimiento estacionario a 1 ml de un medio MH estéril y se incubó hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (de 3 a 5 h, 37°C, agitación a 150 rpm). Para estimar la concentración de microorganismos, se midió la densidad óptica (A) del cultivo bacteriano resultante a una longitud de onda de 595 nm. El valor de A=0,2 medido a partir de una porción de 200 µl de la suspensión celular en una placa de 96 pocillos, con una corrección para la absorción del medio aplicada, se fijó para que correspondiera a 4×10^8 células/ml para ambas cepas usadas. Teniendo en cuenta las mediciones de las concentraciones celulares, se diluyó la suspensión con el medio MH hasta una concentración de desde 5×10^4 hasta 1×10^5 células/ml y se transfirió a una placa estéril de 96 pocillos en una cantidad de 100 µl por pocillo. Entonces, a las células se le añadieron compuestos sometidos a prueba y se realizaron diluciones en serie de dos veces de estos compuestos en los pocillos de la placa. La concentración máxima de un compuesto en las series fue de 10^{-4} M; la mínima fue de $1,6 \times 10^{-6}$ M. Los estudios de actividad antibacteriana se realizaron por duplicado para cada compuesto y los resultados se promediaron.

Los controles usados fueron: 100 µl de un cultivo bacteriano sin aditivos (cuatro pocillos); un cultivo bacteriano al que se le añadieron DMSO al 1% o agua en el mismo volumen que en los pocillos con la máxima concentración de los compuestos sometidos a prueba (cuatro pocillos); y 100 µl del medio MH estéril sin bacterias y sin compuestos sometidos a prueba para el control de contaminación ocasional en la placa (cuatro pocillos).

Inmediatamente después de la inserción de los compuestos, se midió A_{10} en cada pocillo, y se midió A_{c0} en los pocillos control usando un fotómetro de placas Uniplan (Picon, Rusia) (ambos valores eran necesarios para los cálculos según la ecuación (1)). Se incubó la placa durante 20 h a 37°C y se agitó a 150 rpm. Luego, se midió A_{1t} en cada pocillo y A_{ct} en los pocillos control, y se calculó la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de la ecuación (1). Se determinó la CMI como la concentración mínima del compuesto sometido a prueba a la que la inhibición del crecimiento era del 100%.

En las determinaciones de la CMB, se transfirió el medio de los pocillos en los que la concentración del compuesto sometido a prueba igualaba la CMI, CMIx2 o CMIx4 a placas de Petri con un medio MH con agar (agar 15 g/l) y se extendió uniformemente sobre el área de la placa usando espátulas estériles. Las placas se incubaron durante dos días. Se determinó la CMB como la concentración más baja del compuesto sometido a prueba a la que las colonias no crecían en las placas de Petri.

Todas las pruebas de actividad antibacteriana se repitieron en un intervalo de dos días para evaluar la variabilidad de la resistencia de las células bacterianas hacia los compuestos sometidos a prueba.

Tabla 1
Características de la actividad antibacteriana de los compuestos de fórmula general (I) contra bacterias Gram positivas BKM B-501 de *Bacillus subtilis*

Compuesto	CMI, µM	CMB, µM
V	19±7	38±13
VI	38±13	75±25
VII	3,1±0,8	3,1±0,8
VIII	6,3±1,6	9±4
IX	50±13	100±25
XI	12,5±4	25±7
XII	38±13	38±13
XIV	1,6±0,4	6,3±1,6
XV	12,5±4	25±7
XVI	>200	>200
XVII	>200	>200
XVIII	1,6±0,4 ¹	No se alcanzó
XIX	100±25	No se alcanzó

Hem	13±4	50±13
Gramicidina S	2,5	5

Tabla 2

Características de la actividad antibacteriana de los compuestos de fórmula general (I) contra bacterias Gram positivas 209P de *Staphylococcus aureus*

5

Compuesto	CMI, μM	CMB, μM
V	50	>400 ²
VII	50	200
VIII	25	200
IX	100	400
XI	12,5	No se alcanzó
XII	50	>50 ²
XIV	1,6	3,2
XV	50	50
XVI	>200	>200
XVII	>200	>200
XVIII	6,3	>50 ²
XIX	200	No se alcanzó
Hem	100	200
Gramicidina S	0,8	3,1

Tabla 3

Características de la actividad antibacteriana de los compuestos de fórmula general (I) contra bacterias Gram positivas BKM B-871 de *Enterococcus faecalis*

10

Compuesto	CMI, μM	CMB, μM
V	100	400
VII	50	400
VIII	12,5	25
IX	200	>400 ³
XI	100	No se alcanzó
XII	50	>50 ³
XIV	25	100
XV	100	No se alcanzó
XVI	>200	>200
XVII	>200	>200
XVIII	12,5	>50 ³
XIX	200	No se alcanzó
Hem	1000	>1000
Gramicidina S	3,1	6,3

Tabla 4
Características de la actividad antibacteriana de los compuestos de fórmula general (I) contra bacterias Gram positivas BKM Ac-2230 de *Micrococcus luteus*

Compuesto	CMI, μM	CMB, μM
V	3,1	6,3
VI	25	25
VII	1,6	6,3
VIII	6,3	12,5
IX	6,3	25
XI	50	200
XII	1,6	>6,3 ³
XIV	0,8	1,6
XV	1,6	6,5
XVI	>200	>200
XVII	>200	>200
XVIII	3,1	12,5
XIX	25	25
Hem	12,5	25
Gramicidina S	0,4	0,8

5

Notas para las tablas 1 a 4

¹El compuesto tiene un efecto bacteriostático: inhibe la reproducción de las bacterias en la concentración indicada, pero no las destruye.

10

^{2,3}No se alcanza la CMB. El valor es la concentración máxima usada del compuesto.

Por tanto, los compuestos VII, VIII y XVIII suprimen el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus* en concentraciones de hasta 50 μM (tabla 2).

15

Las bacterias *M. luteus* son altamente sensibles a los compuestos en consideración. Los compuestos V, VI, VII, VIII, IX, hemina, GrD y gramicidina S inhiben el crecimiento de *M. luteus* en concentraciones de hasta 30 μM . Para los compuestos V, VII, VIII, GrD y gramicidina S (tabla 4), las CMI son bastante bajas (inferiores a 10 μM). El Hem y el compuesto VI son ligeramente menos activos (CMI = 12,5 y 25 μM , respectivamente). Todos los compuestos sometidos a prueba eran bactericidas contra *M. luteus*, y sus CMB no superaban 30 μM .

20

Los enterococos *E. faecalis* son (en promedio) más resistentes a los compuestos en consideración que los micrococcos *M. luteus* o estafilococos *S. aureus*. El compuesto XVIII tienen la mayor eficacia contra *E. faecalis*: CMI = 12,5 μM .

25

Todos los compuestos sometidos a prueba son activos contra las bacterias Gram positivas *B. subtilis*. Los compuestos VII y XVIII fueron los más activos con respecto a esto (sus CMI son menores de 10 μM).

Ejemplo 14

30

Determinación de la actividad específica de los derivados de hemina contra cepas bacterianas resistentes

Materiales y métodos

35

Los agentes sometidos a prueba eran derivados de hemina solubles en agua (compuestos VII y XVIII) o derivados solubles en DMSO (compuestos VIII, XV y XIV). La vancomicina fue el compuesto de referencia. Se sometió a prueba cada compuesto por triplicado.

Se usaron en el estudio placas estériles de 96 pocillos con fondo plano de un solo uso, placas de Petri, pipetas,

puntas y tubos de ensayo (Pan-Eco, Moscú).

Los medios nutricionales usados fueron los siguientes. Se preparó un caldo Mueller Hinton de trabajo a partir de medios deshidratados (caldo Mueller Hinton, Acumedia, Baltimore) y se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 15 min.

Se cultivó *Staphylococcus aureus* en el medio deshidratado disponible comercialmente agar de tripticasa y soja (BBL). Se cultivó *Enterococcus faecalis* en el medio deshidratado disponible comercialmente base de agar Columbia (BBL). Estos medios se esterilizaron mediante autoclave a 121°C durante 15 min.

Cepas bacterianas de prueba resistentes

Cepas Gram positivas:

n.º 25923 ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) de *Staphylococcus aureus*;

n.º 100 KC de *Staphylococcus aureus*;

n.º 533 de *Staphylococcus epidermidis*;

n.º 559 de *Enterococcus faecalis*;

n.º 569 de *Enterococcus faecium*.

Se fijo e igualó el inóculo bacteriano a 5×10^5 UFC/ml.

En las tablas a continuación se presentan los resultados como valores promedio.

Estrategia experimental

Para los compuestos solubles en agua, a los pocillos del 2º al 8º se les añadió el disolvente (agua) en una cantidad de 15 µl por pocillo, luego se añadieron al 1º pocillo 30 µl de la disolución madre del compuesto sometido a prueba en agua con una concentración de 1×10^3 M y se ajustó la concentración hasta $0,007 \times 10^3$ M mediante diluciones en serie de dos veces. Se tomó una porción de 10 µl de cada pocillo y se añadieron 190 µl del cultivo bacteriano (10^5 UFC) por pocillo.

Para los compuestos solubles en DMSO, a los pocillos del 2º al 8º se les añadió el disolvente (DMSO) en una cantidad de 10 µl por pocillo, luego se añadieron al 1º pocillo 20 µl de la disolución madre del compuesto sometido a prueba en agua con una concentración 5×10^3 M y se ajustó la concentración a $0,039 \times 10^3$ M mediante diluciones en serie de dos veces. Se tomó una porción de 2 µl de cada pocillo y se añadieron 198 µl del cultivo bacteriano (10^5 UFC) por pocillo.

El control comprendía pocillos sin compuestos sometidos a prueba (control de crecimiento del cultivo). Además, se usó un control de pureza de medios nutricionales y disolventes. Se incubaron las placas en un termostato a 36°C durante 24 horas.

Se evaluó visualmente el crecimiento del cultivo mediante la comparación de cómo crecían los microorganismos en presencia de los compuestos sometidos a prueba y en ausencia de los mismos. Se fijó la CMS (la concentración mínima supresora) igual a la última dilución del agente sometido a prueba que suprimía el crecimiento del cultivo bacteriano.

Los resultados se presentan en las tablas a continuación.

Tabla 5
CMI para derivados de hemina contra cepas Gr+ ($\times 10^{-5}$ M)

Derivados de hemina	25923 de <i>St. aureus</i>	100 KC de <i>St. aureus</i>	533 de <i>St. epiderm</i>	559 de <i>Ent. faecalis</i>	569 de <i>Ent. faecium</i>
II	1,0	>1,0	>1,0	0,42	0,33
VII	2,5	5,0	2,5	2,5	>5,0
VIII	0,260	0,625	0,521	0,312	>5,0
XIV	0,521	>5,0	0,521	0,625	>5,0

XV	2,5	>5,0	2,5	>5,0	>5,0
XVIII	0,078	0,156	0,078	0,078	0,625
XXI	5,0	5,0	5,0	5,0	>5,0
Hem	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0

Tabla 6
CMI para vancomicina contra cepas Gr+ y Gr- (µg/ml)

Cepa bacteriana	Vancomicina
n.º 25923 ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>	1,0
n.º 100 KC de <i>Staphylococcus aureus</i>	1,0
n.º 533 de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0
n.º 559 de <i>Enterococcus faecalis</i>	1,0
n.º 569 de <i>Enterococcus faecium</i>	>32,0

5 Por tanto, los derivados de hemina de fórmula general (I) son activos en diversos grados contra cepas bacterianas Gr+ resistentes.

10 Ejemplo 15

Protocolo para la determinación de la actividad hemolítica para los compuestos de fórmula general (I)

15 Se usó sangre capilar humana fresca en estudios de actividad hemolítica. Se determinó la eficacia de hemolisis como la liberación de hemoglobina desde eritrocitos en el medio RPMI-1640 (sin rojo de fenol y con adición de suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 20 mM) para una densidad de eritrocitos inicial de $(1,0 \pm 0,1) \times 10^7$ células/ml tras 3 h de incubación con un agente (37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad, agitación en un agitador orbital).

20 Se caracterizó la actividad hemolítica mediante la fracción de hemoglobina liberada desde los eritrocitos al medio externo. Se separaron eritrocitos, eritrocitos fantasma y especies intermediarias que contenían hemoglobina no liberada mediante centrifugación. Se cuantificó la hemoglobina mediante la absorción del sobrenadante a una longitud de onda de 414 nm (cerca del máximo de la banda Soret para el hemo).

25 Dado que todos los compuestos sometidos a prueba excepto GrD absorben la luz a esta longitud de onda, se aplicó una corrección para la absorción de cada compuesto teniendo en cuenta su concentración en el cálculo de la fracción de liberación de hemoglobina. Se calculó el porcentaje de liberación de hemoglobina (HR) a partir de la densidad óptica (A) medida a una longitud de onda de 414 nm usando la ecuación

$$HR = [(A_{ei} - A_{e0}) - (A_{mi} - A_{m0})] \times 100 / (A_{et} - A_{e0}), \quad (2)$$

30 en la que los subíndices tienen los siguientes significados: e se refiere al sobrenadante de la muestra con eritrocitos, i se refiere a la concentración añadida del compuesto sometido a prueba, o se refiere al sobrenadante de la muestra sin adición del compuesto, m a la disolución sin eritrocitos, y t al sobrenadante de la muestra en la que la lisis de eritrocitos es del 100%. La fracción de liberación de hemoglobina es igual a la fracción de eritrocitos lisados siempre que la lisis sea completa, es decir, que toda la hemoglobina contenida en un eritrocito lo abandona tras la lisis.

35 Se realizaron estudios de actividad hemolítica por duplicado para cada compuesto y se promediaron los resultados.

40 El protocolo experimental para la determinación de la actividad hemolítica fue el siguiente. Se recogió sangre (100 µl) de un dedo de un donante sano en un tubo de ensayo que contenía 0,9 ml del medio RPMI-1640 (sin rojo de fenol) y heparina (10 unidades/ml). Se sedimentaron las células mediante centrifugación durante 5 min a 200 x g y se transfirieron a 10 ml del medio RPMI-1640 (sin rojo de fenol con adición de suero de ternero fetal al 10% y L-glutamina 20 mM; a continuación en el presente documento, el medio completo). Se determinó la densidad de eritrocitos en la suspensión mediante recuentos en una cámara de Goryachev usando un microscopio Mikmed-2 (LOMO, Rusia) y se diluyó la suspensión hasta $(2 \pm 0,2) \times 10^7$ células/ml con el medio completo.

45 Se prepararon series de disoluciones de los compuestos sometidos a prueba en el medio completo mediante diluciones en serie de dos veces (concentración máxima: 200 µM; concentración mínima: 1,6 µM; volumen: 75 µl). A las disoluciones preparadas se les añadieron rápidamente 75 µl de una suspensión de eritrocitos con una densidad

de $(2 \pm 0,2) \times 10^7$ células/ml.

Se prepararon los controles negativos tal como sigue. A 75 μ l de una suspensión de eritrocitos con una densidad de $(2 \pm 0,2) \times 10^7$ células/ml se les añadieron: (a) 75 μ l del medio completo (cuatro muestras), (b) 60 μ l del medio completo y 15 μ l de agua (cuatro muestras), o (c) 73,5 μ l del medio completo y 1,5 μ l de DMSO (cuatro muestras). Para determinar el 100% de liberación de hemoglobina (control positivo; cuatro muestras), se sedimentaron eritrocitos desde una porción de 75 μ l de la suspensión mediante centrifugación (5 min a 200 x g), se resuspendió el sedimento en agua desionizada (50 μ l), y tras completarse la lisis el volumen de muestra se ajustó a 150 μ l con el medio completo.

Se incubaron todas las muestras (excepto el control positivo) durante 3 h a 37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad y con agitación a 150 rpm. Luego, se centrifugaron todas las muestras durante 5 min a 2700 g. A los pocillos de una placa de 96 pocillos se transfirieron 130 μ l del sobrenadante de cada muestra, por pocillo. Tras esto, se midió la densidad óptica en los pocillos de la placa a una longitud de onda de 414 nm usando un analizador fotométrico Uniplan (Picon, Rusia). Se calculó la liberación de hemoglobina a partir de la relación (2). La figura 2 presenta la actividad hemolítica de los derivados de hemina y los compuestos de referencia (gramicidina S, gramicidina D y hemina). Los datos se presentan como un promedio con respecto a dos réplicas \pm desviación estándar.

Figura 2.

El compuesto XII no manifiesta actividad hemolítica hasta que su concentración es de 100 μ M. Los compuestos V, VI, VIII, IX y XVIII tienen actividades hemolíticas bajas (figura 2); la eficacia hemolítica para todos los compuestos sintetizados es menor que para la hemina, y es muy baja hasta cuando las concentraciones máximas de los compuestos (100 μ M).

Ejemplo 16

Estudios de la actividad citotóxica de los compuestos de fórmula general (I) contra leucocitos humanos

Se aislaron leucocitos totales de sangre humana mediante sedimentación no forzada usando sangre venosa recién recogida de un donante sano.

Se expuso a la oscuridad sangre (10 ml) a la que se le habían añadido 10 unidades/ml de heparina durante 2,5 h a una temperatura de 15 a 18°C. Se recogió sobre la capa de eritrocitos que sedimentaban un sobrenadante líquido de color claro (4 ml), se lavó tres veces con solución salina equilibrada de Hanks y se resuspendió en el medio RPMI-1640 (al que se le habían añadido suero bovino fetal al 8%, L-glutamina 2 mM y HEPES 10 mM; a continuación en el presente documento, el medio completo).

Se determinaron las concentraciones de leucocitos y eritrocitos en la suspensión mediante recuentos en cámara de Goryachev, tras lo cual se ajustó la suspensión a una concentración de leucocitos de $(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$ células/ml con el medio completo. La concentración de eritrocitos en la suspensión de células sanguíneas usada para las mediciones no superaba el 30% de la concentración de leucocitos.

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos sometidos a prueba para leucocitos humanos, se transfirió la suspensión celular a pocillos de placas estériles de 96 pocillos, se añadieron los compuestos sometidos a prueba con diluciones en serie de dos veces (el intervalo de concentraciones sometidas a prueba fue de desde 3,2 hasta 100 μ M para GrD y gramicidina S; desde 8 hasta 500 μ M para el compuesto XIII; y desde 8 hasta 1000 μ M para los compuestos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XIV, XV, XIX y Hem), y se agitó cuidadosamente la mezcla. Se realizó el experimento por duplicado.

Como controles sirvieron células a las que se les había añadido una cantidad equivalente del disolvente en el que se prepararon los compuestos sometidos a prueba, concretamente: agua para los compuestos VII y X; una disolución acuosa de DMSO para los compuestos V, VI, VIII y IX; y DMSO para GrD, gramicidina S, Hem, XI, XIII, XIV, XV y XIX. Un control adicional fue una suspensión de leucocitos sin aditivos.

Se incubaron las células con compuestos sometidos a prueba durante 3 h (37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad). Se cuantificaron los valores de muerte leucocitaria usando microscopía de fluorescencia. Se usó tinción con yoduro de propidio (penetra solamente en los núcleos de las células muestras) y Hoechst 33342 (tiñe todos los núcleos) para reconocer las células muertas y las vivas. Se incubaron las células durante 15 min en placas con yoduro de propidio y Hoechst 33342 (37°C, 5% de CO₂) y luego se colocaron las placas bajo un microscopio para su análisis.

Se derivó la fracción de células muertas a partir de imágenes de fluorescencia de células obtenidas en los rangos espectrales azul (Hoechst 33342) y rojo (yoduro de propidio) usando un microscopio de fluorescencia Axio Observer (Zeiss, Alemania) equipado con una lente de objetivo 10x (Plan-Neofluar 10x/0,3). Se usaron los siguientes juegos de filtros de fluorescencia. Para yoduro de propidio: un filtro de excitación paso banda de 530/585 nm, un espejo

dicroico de punto de corte de 600 nm y un filtro de barrera paso largo de 615 nm para su análisis. Para Hoechst 33342: un filtro de excitación paso banda de 359/372 nm, un espejo dicroico de punto de corte de 395 nm y un filtro de barrera paso largo de 397 nm para su análisis.

- 5 Una cámara digital registró 3 tipos de imágenes celulares: (a) una imagen en la luz blanca transmitida; (b) una imagen de fluorescencia azul obtenida con excitación de UV, y (c) una imagen de fluorescencia roja obtenida con excitación de luz verde. Se fotografiaron al menos cuatro campos de vista por pocillo en diversas regiones de un pocillo. Se promediaron los resultados de análisis con respecto a de 1000 a 1500 células para cada concentración de un compuesto sometido a prueba.

10

Tabla 7
Actividades citotóxicas de los compuestos de fórmula general (I) contra leucocitos humanos

Compuesto	Muerte de leucocitos en presencia de 1 mM de compuesto
Hem	40 ± 2
V	5,8 ± 0,3
VI	10,5 ± 0,5
VII	8,0 ± 0,8
VIII	6,1 ± 0,3
IX	3,1 ± 0,3
X	4,9 ± 0,3
XI	8,6 ± 0,4
XIII	14 ± 2
XIV	17,5 ± 0,7
XV	13 ± 1
XIX	13 ± 1
Valores de muerte leucocitaria de referencia	
sin aditivos	4,5 ± 0,7
con adición de agua	4,2 ± 0,7
con adición de DMSO al 10%	4,9 ± 0,4
con adición de DMSO al 100%	8,1 ± 0,7

- 15 Los compuestos V, VII, VIII, IX y X en concentraciones de hasta 1 mM no provocaron la muerte de leucocitos de sangre humana. Un pequeño efecto tóxico de las disoluciones de gramicidina S y de compuesto XI en DMSO se debió completamente al efecto tóxico del disolvente (DMSO). Para los compuestos VI, XIII, XIV, XV y XIX, se descubrió que aparecía un efecto tóxico débil a concentraciones de casi 1 mM para los compuestos XIV, XV y XIX y a concentraciones mayores de 125 µM para los compuestos VI y XIII. El compuesto de referencia (hemina) era considerablemente más tóxico para los leucocitos en comparación con los compuestos reivindicados (el 40% contra el 3-17%; tabla 7).

20

Los resultados demuestran la promesa de los compuestos reivindicados para crear basándose en ellos agentes antimicrobianos biocompatibles no tóxicos, en particular para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades provocadas por diversas bacterias Gram positivas, en particular las resistentes.

25

Ejemplo 17

Estudios de actividad antifúngica de los compuestos de fórmula general (I)

30

Los sujetos de acción fueron células de la cepa de museo n.º 3465 de *Cryptococcus neoformans* y células de la cepa de museo n.º 927 de *Candida albicans* que se hicieron crecer durante un día en un medio de glucosa-peptona-levadura a 32°C. Los compuestos de referencia fueron los siguientes antimicóticos: pimafucin, anfotericina y fluconazol.

35

Se llevaron a cabo experimentos en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Lenmedpolimer) por duplicado. A la

primera columna (0), se le añadieron 10 µl de la disolución madre de un agente soluble en agua con concentraciones de 10⁻² a 10⁻³ mol/l; a la segunda columna se le añadieron también los mismos 10 µl más 10 µl del disolvente correspondiente al compuesto dado, se suspendieron, se transfirieron 10 µl al siguiente pocillo y así sucesivamente hasta el 8º pocillo de la fila. Se prepararon disoluciones madre de los compuestos insolubles en agua de fórmula general (I) (compuestos V, VIII, XII, XIII, XIV y hemina) en DMSO y se diluyeron con DMSO y el medio. Las concentraciones de DMSO en la mezcla de reacción en un pocillo eran ≤ 5%.

Luego, a cada pocillo se le añadieron 190 µl de una suspensión de cultivo de células de *Cr. neoformans* en un medio nutricional sintético (de manera que la concentración celular final fuera de aproximadamente 10³ UFC/ml), conteniendo este medio azul de bromocresol como indicador de pH (pH: 5,5; color de indicador: azul). A medida que el pH se reducía a 4,5, el indicador en el cultivo cambiaba su color a amarillo, indicando de ese modo crecimiento de células fúngicas. El medio sintético comprendía los siguientes componentes: sales, aminoácidos, microelementos, vitaminas, un antibiótico y glucosa (30 componentes en conjunto) [Yarrow, D., "Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts", en: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, Ed. por Kurtzman, C.P, y Fell, J.W., Elsevier, 1998, págs. 77-100]. Tras inocularse con una suspensión celular de *Cr. neoformans*, se incubó la placa a 32°C durante 1 h con agitación, luego se transfirió a un termostato estacionario y se incubó durante entre dos y cinco días a 27°C. Tras inocularse con una suspensión celular de *C. albicans*, se incubaron las placas durante 1 h a 32°C con agitación, luego se transfirieron a un termostato estacionario y se incubaron durante entre uno y cuatro días a 27°C.

Los resultados se presentan en las tablas 8 y 9 a continuación.

Tabla 8
Crecimiento del cultivo de *Cryptococcus neoformans* en presencia de compuestos de fórmula general (I)

Agente		Crecimiento del cultivo de prueba a diversas diluciones del agente el día 2							
		0	: 2	: 4	: 8	: 16	: 32	: 64	: 128
		5,00 x 10 ⁻⁵ M							
1	Gramicidina S	-	-	-	-	-	+	+	+
2	Hem	±	±	±	±	±	±	+	+
3	V	±	±	±	±	±	±	±	+
4	VII	-	±	+	+	+	+	+	+
5	VIII	±	±	±	+	+	+	+	+
6	XVIII	-	-	-	-	+	+	+	+
7	Control	±	+	+	+	+	+	+	+
8	Anfotericina B	-**	-	-	-	-	-	-	-
9	Fluconazol	±**	±	±	+	+	+	+	+

(-) Sin crecimiento; el indicador es azul;

(±) Crecimiento débil; el indicador es amarillo, pero el precipitado de células crecidas se ve como un punto difuso;

(+) Crecimiento fuerte; el indicador es amarillo, y el precipitado de células se ve como un punto compacto;

*El día 2, se observó color azul hasta el 6º pocillo pero con un pequeño precipitado en el fondo; el color amarillo aparece el día 5;

**La concentración del agente en el pocillo 0 es de 5,00 x 10⁻⁴ M.

Tabla 9
Crecimiento del cultivo de *Candida albicans* en presencia de compuestos de fórmula general (I)

Agente	Crecimiento del cultivo de prueba a diversas diluciones del agente						
	0	: 2	: 4	: 8	: 16	: 32	: 64
	1 x 10 ⁻⁴ M						

Gramicidina S	-	-	-	-	+	+	+
Hem	±	+	+	+	+	+	+
V	-	-	±	±	±	±	±
VII	±	+	+	+	+	+	+
VIII	±	±	±	+	+	+	+
XII	±	±	±	+	+	+	+
XIII	±	±	+	+	+	+	+
XIV	±	+	+	+	+	+	+
XV	±	+	+	+	+	+	+
XVIII	-	-	-	±	±	±	±
XX	±	±	±	±	±	±	±
Control	+	+	+	+	+	+	+
Pimafucin	-	-	-	-	-	+	+

Las inoculaciones control de los pocillos que se llevaron a cabo en los días 1 a 4 tras la exposición a los compuestos de fórmula general (I), mostraron un efecto prácticamente fungicida del compuesto XVIII en concentraciones de aproximadamente 5×10^{-5} M.

5 Además, el compuesto XII parecía ser eficaz contra un agente causante de criptococosis (*Cryptococcus humicolus*) con una CMS de 12,5 μ M.

10 Por tanto, los compuestos de fórmula general (I) ejercen efectos fungistático y/o fungicida, dependiendo la magnitud del efecto de la estructura y se manifiesta en el intervalo de concentraciones de desde 10^{-4} hasta 10^{-6} M.

Ejemplo 18

Formas farmacéuticas de ejemplo

15 A. Cápsulas de gelatina

El polvo que va a introducirse en las cápsulas se formula tal como sigue:

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	de 1 a 50 mg
Óxido de magnesio	50 mg
Almidón	de 100 a 200 mg

20 Los componentes enumerados anteriormente se combinan y se introduce la mezcla en cápsulas de gelatina dura en una cantidad de desde 151 hasta 285 mg.

25 B. Forma farmacéutica de comprimido

Una forma farmacéutica de comprimido se fabrica usando los componentes enumerados a continuación:

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	de 1 a 50 mg
Almidón de patata	100 mg
Polivinilpirrolidona	10 mg
Estearato de magnesio	2 mg
Lactosa	de 48 a 82 mg
Aerosil	5 mg

30 Los componentes se combinan y se compactan para producir comprimidos que pesan cada uno 200 mg.

C. Forma farmacéutica de aerosol

Una combinación de aerosol destinada para su administración 10 veces se formula tal como sigue:

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	de 10 a 100 mg
---	----------------

Sulfato de magnesio	150 mg
Lactosa	de 110 a 140 mg

El compuesto se combina con excipientes y se transfiere la mezcla a un dispositivo de pulverización especial.

D. Supositorios

5

Pueden usarse las siguientes bases para supositorios:

bases insolubles en agua (manteca de cacao);

10 bases solubles en agua o miscibles con agua (gelatina-glicerol o poli(óxido de etileno)); y

bases de combinación (jabón-glicerol).

Un ejemplo de formulación para supositorios:

15

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I) en una cantidad de 1 a 50 mg, y manteca de cacao en una cantidad necesaria para obtener un supositorio.

20 Cuando sea necesario, pueden fabricarse supositorios rectales, vaginales o uretrales con excipientes apropiados.

E. Pomadas

Pueden usarse las siguientes bases para pomadas:

25

bases para pomadas hidrocarbonadas, tales como vaselina blanca y vaselina amarilla (Vaselinum album y Vaselinum flavum, respectivamente), aceite de vaselina (Oleum Vaselini), y pomada blanca y pomada líquida (Unguentum album y Unguentum flavum, respectivamente), con aditivos espesantes tales como parafina sólida y cera;

30

bases para pomadas de absorción, tales como vaselina hidrófila (Vaselinum hydrophilicum), lanolina (Lanolinum) y crema fría (Unguentum leniens);

35

bases para pomadas que pueden eliminarse con agua, tales como pomada hidrófila (Unguentum hydrophilum); bases para pomadas solubles en agua, tales como pomada de polietilenglicol (Unguentum Glycolis Polyethyleni); bases de bentonita; y otras.

Una formulación de pomada de ejemplo:

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	de 0,01 g a 0,1 g
Vaselina	10 g

40

Las pomadas se preparan mediante las tecnologías apropiadas.

E. Disolución para inyecciones

45 Los disolventes útiles para preparar disoluciones para inyección incluyen disolución de cloruro de sodio al 0,9%, agua destilada y disolución de procaína. Las formas farmacéuticas unitarias pueden fabricarse como ampollas, viales y ampollas tipo "ampin".

La formulación de la disolución para inyección es tal como sigue:

50

Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	1-50 mg
Agua destilada	de 1 a 2 ml

Las formas farmacéuticas para inyección pueden fabricarse como disoluciones estériles, polvos estériles y comprimidos estériles.

55 Formulaciones de ejemplo para agentes desinfectantes y antisépticos

A. Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I)	del 0,001 al 1%
1-Propanol	del 30 al 40%
2-Propanol	del 10 al 70%
Agua destilada	del 10 al 60%

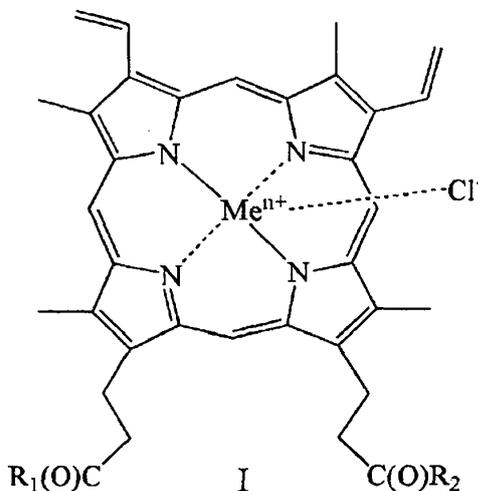
<p>B. Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I) Una base de amonio cuaternario (o una mezcla de las mismas) Agua destilada</p>	<p>del 0,001 al 1% del 2 al 10% hasta el 100%</p>
<p>C. Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I) Dimetilsulfóxido (DMSO) o polietilenglicol (PEG) con MM = de 200 a 12000 Agua destilada</p>	<p>del 0,001 al 1% del 1 al 20% del 1 al 20% hasta el 100%</p>
<p>D. Un compuesto correspondiente a la fórmula general (I) Una mezcla de alcoholes, DMSO, PEG y tensioactivos en diversas combinaciones y proporciones Agua destilada</p>	<p>del 0,001 al 1% del 1 al 80% hasta el 100%</p>
<p>E. Compuestos correspondientes a la fórmula general (I) Agua destilada</p>	<p>del 0,001 al 1% hasta el 100%</p>

5 Por tanto, los derivados de hemina de fórmula general (I) tienen actividades antibacteriana y antifúngica, en particular contra el microorganismo *S. aureus* patógeno para el ser humano y sus cepas resistentes. Además, casi todos los derivados de hemina reivindicados pueden aumentar (en diversos grados) la permeabilidad de las membranas lipídicas modelo, lo que se sabe por la bibliografía que es una parte importante del mecanismo del efecto antimicrobiano (antibacteriano, antifúngico) de los agentes antimicrobianos. La eficacia de los compuestos de fórmula general (I) demuestra su idoneidad para su uso a gran escala en formulaciones de agentes desinfectantes, antisépticos y terapéuticos que tienen un efecto antifúngico y antibacteriano.

10

REIVINDICACIONES

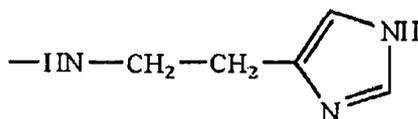
1. Compuesto de fórmula general (I):



en la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes, y en la que

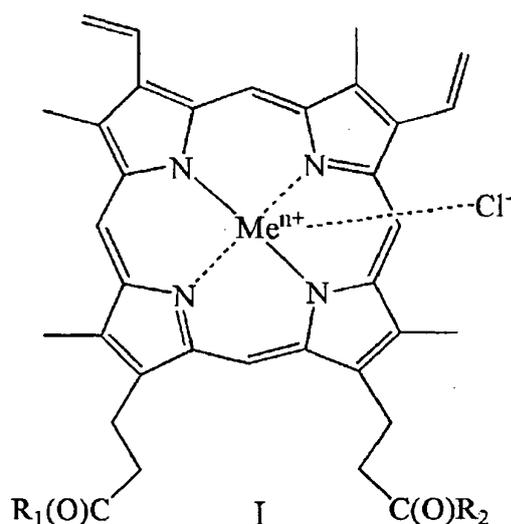
uno cualquiera de R_1 y R_2 es $-\text{OH}$ y el otro es $-\text{Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, en el que $X=\text{Trp, Phe o Tyr (gramicidina D), -N}^{\delta}\text{-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)}_2$ (gramicidina S), $-\text{Arg-Gly-Asp-OH}$, SEQ ID NO: 1 $[-\text{Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH}]$, $-\text{ArgArgTrpHisArgLeuLysGlu (OMe)OH}$ o $-\text{ArgTrpHisArgLeuLysGlu(OMe)OH}$;

o R_1 y R_2 son cada uno $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{GlyOMe}$, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{Glu}(\text{ArgOMe})\text{-ArgOMe}$, $-\text{HA}$, $-\text{Arg-ArgOMe}$, $-\text{ArgOMe}$, $-\text{SerOMe}$, $-\beta\text{AlaHA}$ o $-\beta\text{AlaHis}$, en los que HA es el radical histamina



y Me^{n+} es Fe^{2+} o Fe^{3+} , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades provocadas por bacterias o microhongos, en el que el compuesto se administra a un paciente que lo necesite.

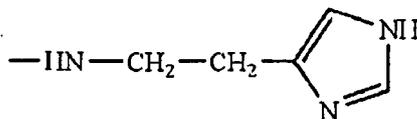
2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que las enfermedades están provocadas por bacterias Gram positivas de los géneros bacterianos *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y/o *Micrococcus*.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que las bacterias son bacterias resistentes.
4. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que las enfermedades están provocadas por microhongos de los géneros microfungicos *Candida* y/o *Cryptococcus*.
5. Derivado de hemina de fórmula general (I):



en la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes, y en la que

5 uno cualquiera de R_1 y R_2 es $-\text{OH}$ y el otro es $-\text{Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-}$
 $(\text{D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, en el que $X=\text{Trp, Phe o Tyr (gramicidina D), -N}^\delta\text{-ciclo-(Orn-Leu-D-}$
 Phe-Pro-Val)_2 (gramicidina S), $-\text{Arg-Gly-Asp-OH}$, SEQ ID NO: 1 [$-\text{Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH}$],

10 o R_1 y R_2 son cada uno $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{GlyOMe}$, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$,
 $-\text{Glu}(\text{ArgOMe})\text{-ArgOMe (XVIII)}$, $-\text{HA}$, $-\text{Arg-ArgOMe}$, en los que HA es el radical histamina



15 y Me^{n+} es Fe^{2+} o Fe^{3+} , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que uno de R_1 y R_2 es $-\text{OH}$ y el otro es $-\text{Arg-Gly-Asp-OH}$, $-\text{Val-}$
 $\text{Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, en el que
 $X=\text{Trp, Phe o Tyr (gramicidina D), -N}^\delta\text{-ciclo-(Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val)}_2$ (gramicidina S) o SEQ ID NO: 1 [$-\text{Arg-}$
 $\text{Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH}$].

7. Compuesto según la reivindicación 5, en el que $R_1 = R_2 = -\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{GlyOMe}$,
 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{Glu}(\text{ArgOMe})\text{-ArgOMe}$, $-\text{HA}$ o $-\text{Arg-ArgOMe}$.

8. Procedimiento para la producción de compuestos de fórmula general (I) según una cualquiera de las
 25 reivindicaciones 5 a 7, que comprende hacer reaccionar un derivado de hemina activado en un(os) grupo(s)
 carboxilo con un componente de amino.

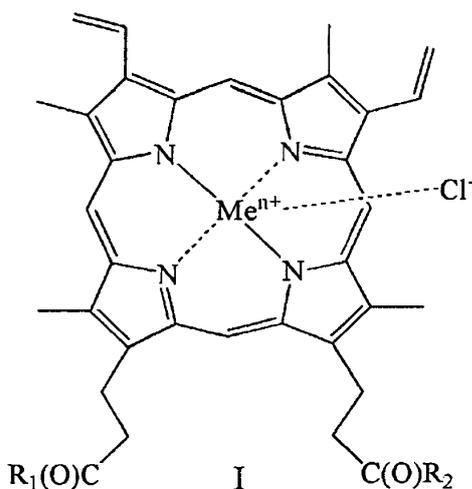
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el derivado de hemina activado es un éster de 6,7-bis-N-
 30 oxisuccinimida de hemina o éster de 6(7)-mono-N-oxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida de hemina y el
 disolvente es N,N-dimetilformamida.

10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que se usa pirocarbonato de di-terc-butilo para activar uno de
 los grupos carboxilo de la hemina, llevándose a cabo el procedimiento en N,N-dimetilformamida en
 presencia de piridina.

35 11. Composición farmacéutica, que comprende como componente activo un compuesto de fórmula (I) según la
 reivindicación 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, formulada con un portador o excipiente
 farmacéuticamente aceptable.

40 12. Composición antiséptica y/o desinfectante, que comprende un compuesto de fórmula (I) según la
 reivindicación 5.

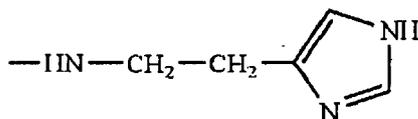
13. Uso no terapéutico de un compuesto de fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del
 mismo:



en la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes, y en la que

5 uno cualquiera de R_1 y R_2 es $-OH$ y el otro es $-Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-$
 $(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH_2CH_2OH$, en el que $X=Trp, Phe$ o Tyr (gramicidina D), $-N^{\delta}$ -ciclo-(Orn-Leu-D-
 $Phe-Pro-Val)_2$ (gramicidina S), $-Arg-Gly-Asp-OH$, SEQ ID NO: 1 [$-Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH$];

10 o R_1 y R_2 son cada uno $-NHCH_2CH_2OH$, $-GlyOMe$, $-NHCH(CH_2OH)CH_2OH$, $-NHCH_2CH(OH)CH_2OH$,
 $-Glu(ArgOMe)-ArgOMe$, $-HA$, $-Arg-ArgOMe$, en los que HA es el radical histamina



15 y Me^{n+} es Fe^{2+} o Fe^{3+} como agente antimicrobiano.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el agente antimicrobiano es un agente antibacteriano, que es
 activo contra los géneros bacterianos Gram positivos *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y/o
Micrococcus.

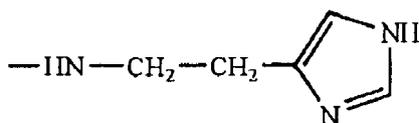
15. Uso según la reivindicación 14, en el que las bacterias son bacterias resistentes.

16. Uso según la reivindicación 13, en el que el agente antimicrobiano es un agente antifúngico, que es activo
 contra los géneros microfungicos *Candida* y/o *Cryptococcus*.

17. Uso según las reivindicaciones 13-16, en el que en el compuesto de fórmula general (I)

uno cualquiera de R_1 y R_2 es $-OH$ y el otro es $-Val-Gly-Ala-(D-Leu)-Ala-(D-Val)-Val-(D-Val)-Trp-(D-Leu)-X-$
 $(D-Leu)-Trp-(D-Leu)-Trp-NHCH_2CH_2OH$, en el que $X=Trp, Phe$ o Tyr (gramicidina D), $-N^{\delta}$ -ciclo-(Orn-Leu-D-
 $Phe-Pro-Val)_2$ (gramicidina S), $-Arg-Gly-Asp-OH$, SEQ ID NO:1 [$-Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Phe-OH$];

o R_1 y R_2 son cada uno $-NHCH_2CH_2OH$, $-GlyOMe$, $-NHCH(CH_2OH)CH_2OH$, $-NHCH_2CH(OH)CH_2OH$,
 $-Glu(ArgOMe)-ArgOMe$, $-HA$, $-Arg-ArgOMe$, en los que HA es el radical histamina



35

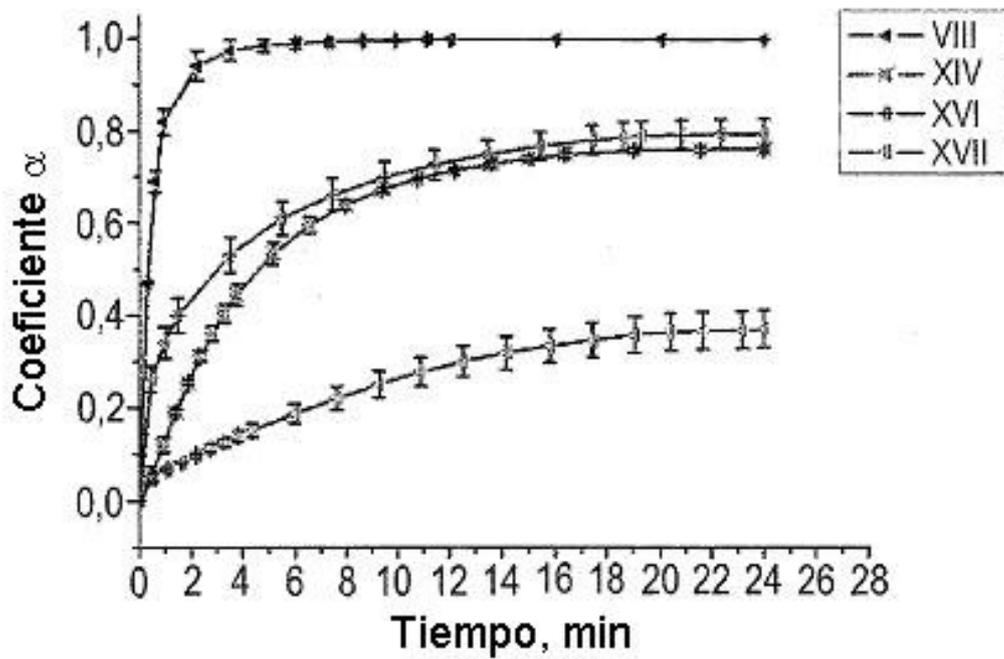
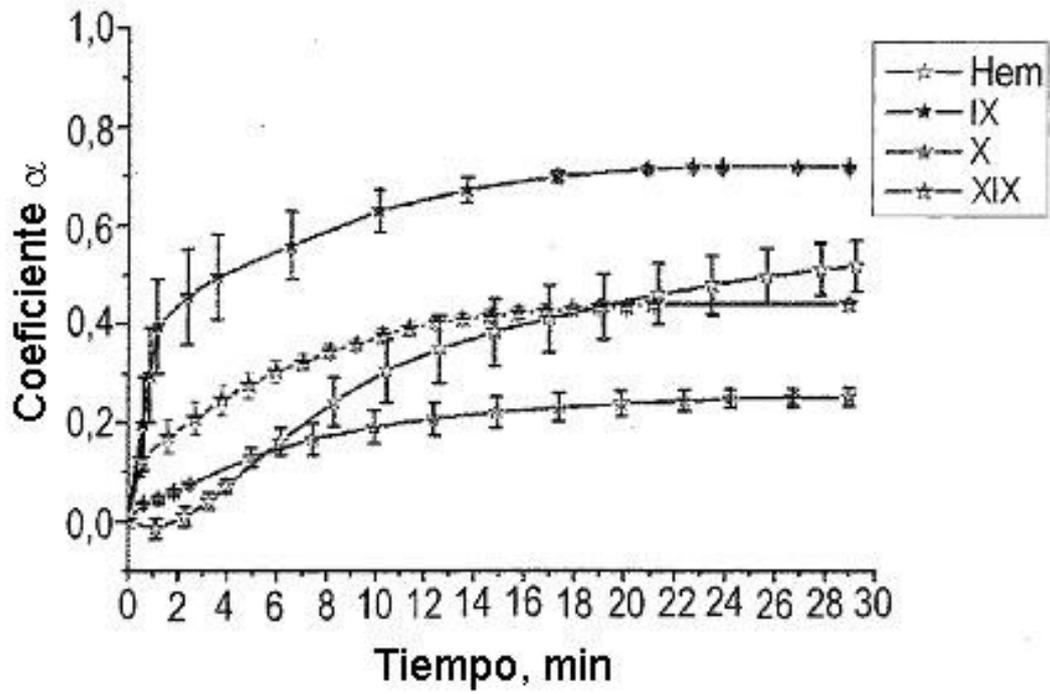


FIG.1

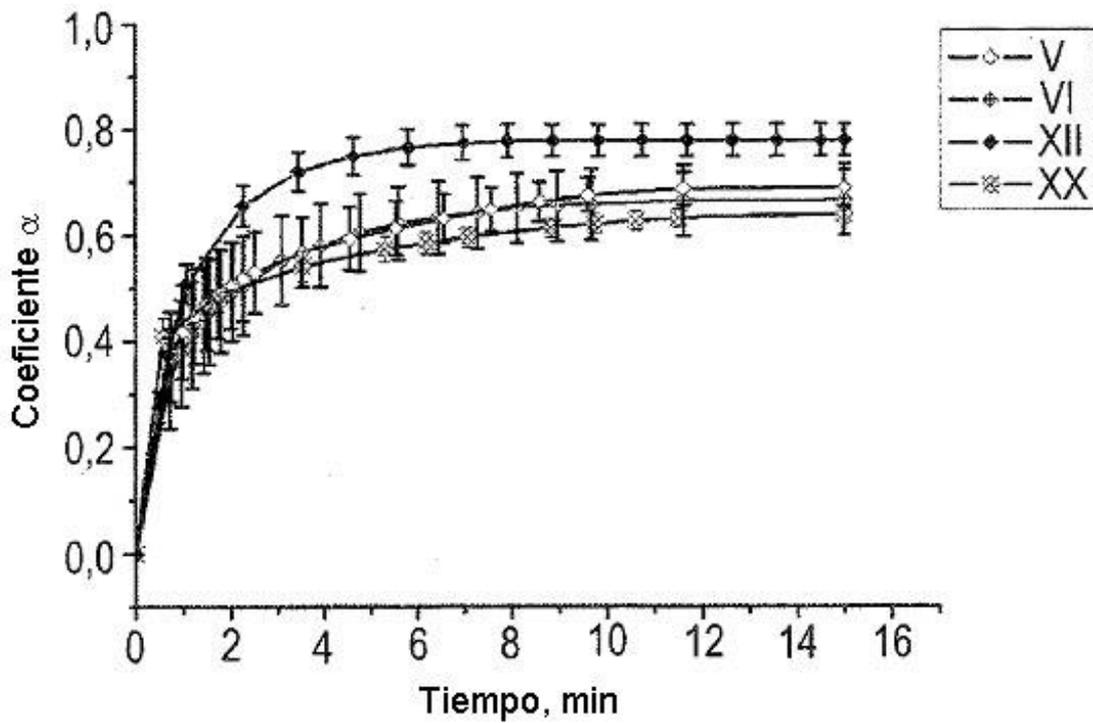
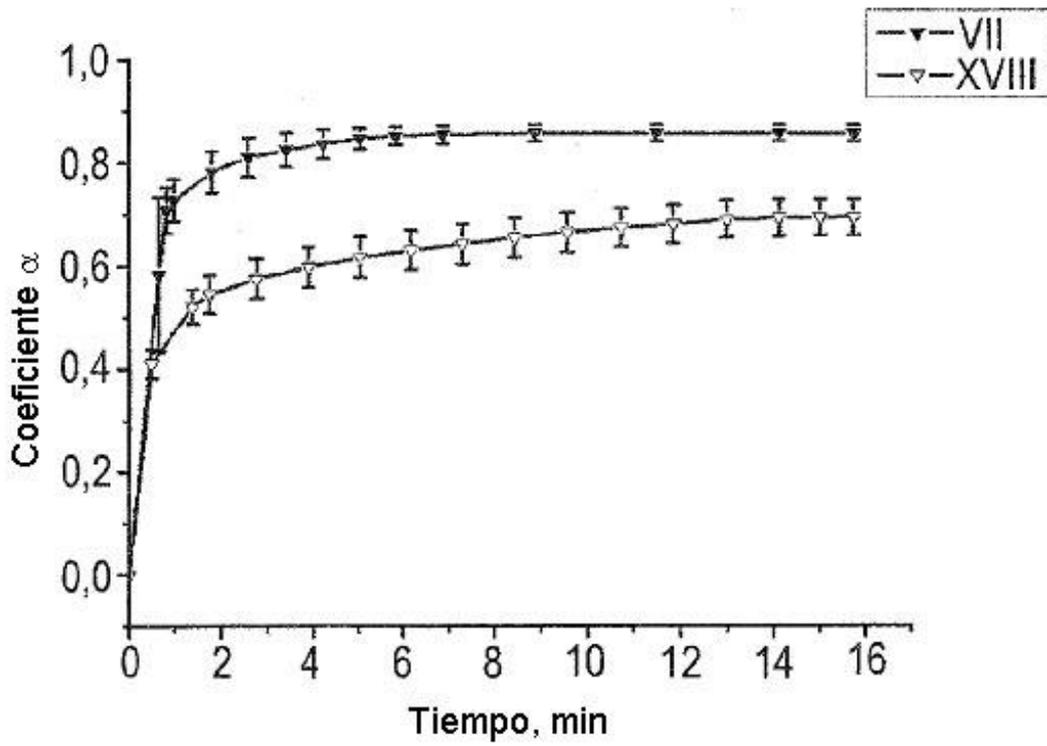


FIG.1 (continuación)

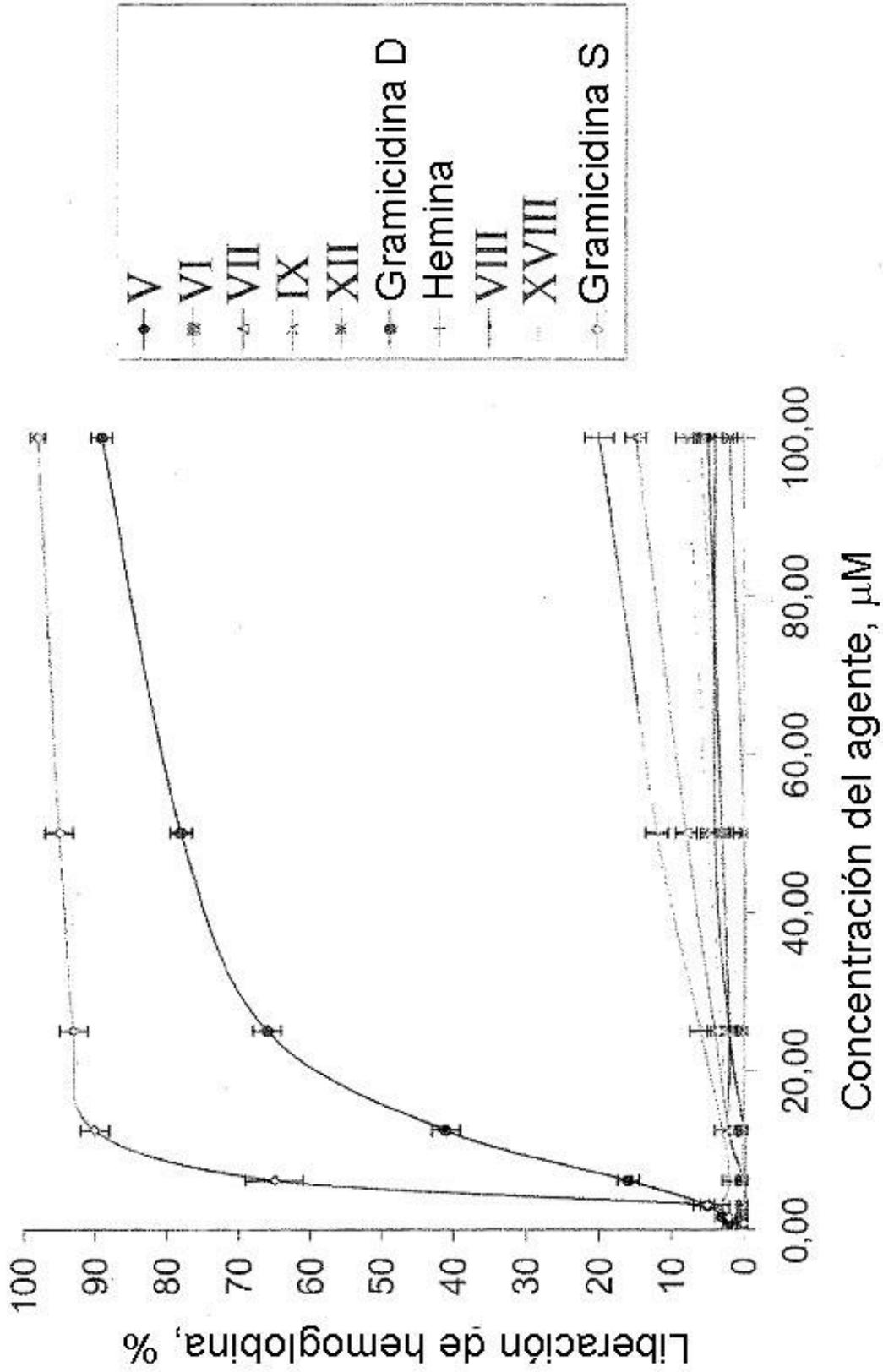


FIG.2