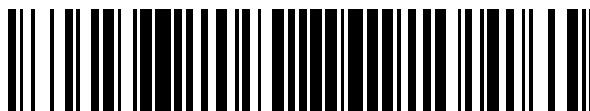


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 538**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2009** **E 09738253 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 2283123**

54 Título: **Inhibidores de la tirosina cinasa bacteriana y sus usos**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 49941 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GRANGEASSE, CHRISTOPHE ANTOINE LOUIS;
NESSLER, SYLVIE MARIANNE;
MORERA, SOLANGE ROSE THÉODORA;
MEYER, PHILIPPE ROGER;
COZZONE, ALAIN JEAN y
TERREUX, RAPHAËL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 547 538 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

Inhibidores de la tirosina cinasa bacteriana y sus usos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de las tirosina cinasas bacterianas y, en particular, a inhibidores de las mismas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La fosforilación/desfosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más potentes y versátiles de la regulación molecular en los organismos vivos. Durante muchos años, sin embargo, se consideraba que la fosforilación/desfosforilación de proteínas era exclusiva de eucariotas. Fue después de un largo periodo de controversia que se documentó la existencia de esta modificación en bacterias (para revisión, véase [1]). Los primeros estudios se centraron esencialmente en la caracterización del "sistema de dos componentes" [2] y del "sistema de fosfotransferasa PTS" [3], características bien conocidas de la señalización y regulación bacterianas en las que las proteínas se fosforilan en histidinas y ácidos aspárticos. Después, y en gran parte gracias a la genómica, la presencia generalizada de genes que codifican serina/treonina cinasas [4] y fosfatasa similares a las eucarióticas también resultó indiscutible en bacterias [5]. Además, experimentos de espectrometría de masas de alta precisión han permitido recientemente caracterizar más de cien sitios de fosforilación de serina y treonina en dos modelos bacterianos [6, 7].

[0003] Asimismo se ha descubierto que algunos miembros bacterianos de la gran familia de proteínas que contienen el lazo P [8, 9], caracterizadas por el motivo de unión a nucleótidos Walker A [10], presentan una actividad proteína cinasa [11]. El primer miembro de esta nueva familia de proteína cinasas que contienen un lazo P caracterizado estructural [12] y funcionalmente [13] fue una serina cinasa, la HPr cinasa/fosforilasa bifuncional implicada en una ruta de señalización que regula el uso de las fuentes de carbono en bacterias [14].

[0004] En la fosforilación de tirosina en bacterias se avanzó más despacio, y no fue hasta 1997 que se caracterizó el primer gen que codifica una tirosina cinasa bacteriana [15]. Esta enzima no está relacionada estructural y funcionalmente con sus homólogos eucariotas. Al igual que la HPr cinasa/fosforilasa, pertenece a la familia de las proteína cinasas que contienen un lazo P. Este tipo concreto de tirosina cinasas se ha identificado en numerosas bacterias [16], definiendo así una familia bacteriana idiosincrática de BY-cinasas (por Bacterial tYrosine kinases) [17].

[0005] En las proteobacterias y actinobacterias, las BY-cinasas están codificadas en forma de un único polipéptido, mientras que en los firmicutes se encuentran en forma de dos proteínas que interactúan. Los dominios N-terminal periplasmático y C-terminal citoplasmático de las BY-cinasas de proteobacterias y actinobacterias son homólogos al adaptador de membrana y la BY-cinasa citoplasmática de firmicutes, respectivamente. Todas las BY-cinasas que se han examinado sufren una autofosforilación en un agrupamiento C-terminal de tirosinas, pero también fosforilan otras proteínas. Entre los primeros sustratos proteicos endógenos identificados de las BY-cinasas se encuentran proteínas implicadas en la producción de polisacáridos [18-20], así como los factores sigma de la ARN polimerasa [21] y proteínas de unión a ADN de cadena sencilla [22]. Por lo tanto, las BY-cinasas están implicadas en muchos otros procesos biológicos importantes, que incluyen la respuesta al estrés, el metabolismo de ADN, la resistencia a antibióticos, el control del ciclo celular bacteriano y la patogenicidad [17, 23].

[0006] El mecanismo por medio del cual las BY-cinasa controlan la biosíntesis de polisacáridos extracelulares es el mejor documentado. Desde el año 2000, un número creciente de publicaciones han analizado este proceso, y la fosforilación de tirosinas ha resultado ser una característica clave en la formación de la cápsula [24]. Las BY-cinasas se han caracterizado como polisacárido copolimerasas (PCP) pertenecientes a las maquinarias de multiproteínas transmembranales implicadas en la síntesis y/o la exportación de un gran número de polisacáridos extracelulares [25]. Sin embargo, la función exacta de su fosforilación sigue sin esclarecerse, incluso aunque se ha mostrado que influye tanto en la longitud como en la cantidad del polímero producido [26-28], modificando de este modo las propiedades fisicoquímicas de la cápsula [29]. La cápsula desempeña funciones críticas en la virulencia de las bacterias patógenas. Por ejemplo, en las bacterias patógenas para seres humanos, tales como *Staphylococcus aureus*, la cápsula fomenta la virulencia en modelos de infección en animales [30, 31]. La cápsula de *S. aureus* ha mostrado estar implicada en la protección contra la fagocitosis [32] y en la modulación de la respuesta inmunológica del huésped [33]. Por lo tanto, las tirosina cinasas bacterianas pueden considerarse posibles dianas terapéuticas.

Página 2a.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 **[0007]** Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar inhibidores de las BY-cinasas y sus usos. La invención viene definida por las reivindicaciones.

10 **[0008]** De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto que consta de una región peptídica que comprende o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas de la BY-cinasa de una bacteria, o un análogo como se define en la reivindicación 1, y un análogo peptídico de adenina PNA(A), en el que la región peptídica y el PNA están unidos entre sí. El agrupamiento de tirosinas es un péptido con una longitud de 5 a 35 aminoácidos (aa), más generalmente de 5 a 20 aa, que se encuentra de forma natural en el extremo C-terminal de las tirosina cinasas bacterianas y que contiene al menos dos y hasta 7 restos tirosina. Más adelante se proporcionarán ejemplos. En Trends in Biochemical Sciences 32(2), febrero de 2007, páginas 86-94, se describen secuencias que comprenden el agrupamiento de tirosinas de diferentes tirosina cinasas bacterianas.

20 **[0009]** De acuerdo con una característica, la unión entre ambas especies es un enlace peptídico. El compuesto puede presentar un número de restos aminoácido comprendido entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15. Este compuesto puede actuar como inhibidor de las BY-cinasas.

[0010] De acuerdo con una característica, el PNA(A) está unido al extremo C-terminal de la región peptídica.

25 **[0011]** De acuerdo con otra característica, el PNA(A) está unido a la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G. Este resto aminoácido puede ser endógeno o no, y en el último caso es un resto aminoácido añadido o insertado. La K o G puede sustituir a un resto Y de la región peptídica.

30 **[0012]** De acuerdo con otra característica, el PNA(A) está unido al extremo C-terminal de la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G. Este resto aminoácido puede ser endógeno o no, y en el último caso es un resto aminoácido añadido o insertado.

[0013] De acuerdo con otra característica, el compuesto presenta un número de restos aminoácido comprendido entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15.

35 **[0014]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica o fármaco que comprende un compuesto como se define en la presente memoria y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Este compuesto puede actuar como inhibidor de las BY-cinasas.

40 **[0015]** De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco (medicamento) de la invención comprende al menos dos compuestos de este tipo, presentando cada uno una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes.

45 **[0016]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto inhibidor o una composición farmacéutica o un fármaco de la invención para el uso en el tratamiento de una infección bacteriana o en la prevención de una infección bacteriana.

50 **[0017]** De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la invención comprende al menos dos compuestos inhibidores de este tipo que comprenden, se componen esencialmente o se componen de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes y la composición se usa para tratar o prevenir una infección bacteriana que implique a estas bacterias.

55 **[0018]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de este compuesto inhibidor de la invención para la preparación de un fármaco para el uso en el tratamiento de una infección bacteriana o en la prevención de una infección bacteriana.

[0019] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la

invención comprende al menos dos compuestos inhibidores de este tipo que presentan una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes y la composición se usa para tratar o prevenir una infección bacteriana que implique a estas bacterias.

5

[0020] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto contra una infección bacteriana, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto, una composición farmacéutica o un fármaco de la invención a dicho sujeto.

10 **[0021]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para prevenir una infección bacteriana en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto, una composición farmacéutica o un fármaco de la invención a dicho sujeto.

[0022] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la invención comprende al menos dos compuestos inhibidores de este tipo que presentan una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes y el procedimiento se usa para prevenir una infección o tratar una infección causada por estas bacterias.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0023] Los polisacáridos extracelulares se consideran importantes factores de virulencia en las bacterias patógenas. La biosíntesis de las cápsulas polisacáridas implica a menudo enzimas denominadas polisacárido copolimerasas (PCP). Estas PCP también albergan una actividad tirosina autocinasa, por lo que también se denominan BY-cinasas (por bacterial tyrosine kinases). Se ha establecido claramente que la producción de los polímeros polisacáridos es controlada por la actividad tirosina cinasa de las PCP. Por lo tanto, cabe imaginar que el bloqueo de la actividad tirosina cinasa de las PCP afecte a la capacidad de ciertas bacterias para producir polisacáridos extracelulares y, de este modo, a su capacidad para infectar a un huésped y/o inducir enfermedades.

30 **[0024]** Un objetivo de la invención es, por lo tanto, proporcionar compuestos inhibidores capaces de interferir con la actividad tirosina cinasa y con la formación de la cápsula.

[0025] En la presente memoria los autores mencionan una serie de bacterias patógenas que codifican una PCP que ha mostrado influir de alguna manera en la producción de su cápsula polisacárida. Indican la secuencia de aminoácidos de su extremo C-terminal (es decir, el motivo de la agrupación de tirosinas (YC)) que se podría usar para diseñar un inhibidor péptido-PNA.

[0026] En la presente memoria se contemplan bacterias Gram positivas y Gram negativas.

40 **[0027]** A continuación se proporcionan, a modo de ilustración, ejemplos de bacterias y la secuencia de su agrupación de tirosinas, pero la enumeración no se deberá considerar de manera limitativa.

Streptococcus pneumoniae:

45 **[0028]**

- Causa principal de las neumonías bacterianas.
- Coloniza las vías respiratorias superiores.
- Causa también otitis media, sinusitis, bacteremia y meningitis.
- 50 - La cápsula polisacárida es esencial para enfermedades invasivas.

PCP/BY-cinasa: CpsfD
YC del extremo C-term.: SVDKYGVYGFYGNYGKK (SEQ ID NO:1)

55 *Staphylococcus aureus*:

[0029]

- La infección se produce sobre todo cuando se rompen las barreras cutáneas o mucosas y en huéspedes con un

sistema inmunológico comprometido.

- Responsable de un amplio espectro de enfermedades.
- Potencial invasivo para inducir osteomielitis y endocarditis.
- Importante papel en infecciones nosocomiales.

5 - Reciente aparición de cepas resistentes a antibióticos (vancomicina, meticilina).

PCP/BY-cinasa:	CapB1 serotipo 5
YC del extremo C-term.:	KTKVDKSSSYHYHGGDE (SEQ ID NO:2)
PCP/BY-cinasa:	CapB2 serotipo 5
YC del extremo C-term.:	KDKSASYYAYYGTDES (SEQ ID NO:3)

10

Escherichia coli:

[0030]

15

- Diferentes serotipos: enterohemorrágico (EHEC), enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), etc.
- Responsable de enfermedades graves como colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, infección de las vías urinarias, diarrea.

20

PCP/BY-cinasa:	Wzc de E.coliK30
YC del extremo C-term.:	KASSYYRYGHNHYGYSYDDKK (SEQ ID NO:4)
PCP/BY-cinasa:	Wzc de E.coliK12
YC del extremo C-term.:	RRASAYQDYGYYEYKSDAK (SEQ ID NO:5)
PCP/BY-cinasa:	Etk de E.coliK12
YC del extremo C-term.:	KRASTAYSYGYNYYGYSYSEKE (SEQ ID NO:6)
PCP/BY-cinasa:	Etk de E.coli O157:H7
YC del extremo C-term.:	RRASAYQDYGYYEYKSDAK (SEQ ID NO:7)

25

Erwinia species (amylovora, carotovora, stewartii, chrysanthemi...):

30

[0031]

- Causa enfermedades de podredumbre blanda en muchas especies de plantas.
- Marchitez de Stewart en maíz dulce, fuego bacteriano en maloideas (manzanos, perales y algunos árboles ornamentales, etc.).

35

PCP/BY-cinasa:	AmsA de <i>E. amylovora</i>
YC del extremo C-term.:	KSANNYGYGYDYYDYSYQQGEKS (SEQ ID NO:8)

40 *Klebsiella pneumoniae:*

[0032]

- Papel en infecciones nosocomiales.
- Neumonía o infecciones de las vías urinarias.
- Causa también síntomas graves (absceso hepático...).

45

PCP/BY-cinasa:	Orf6
YC del extremo C-term.:	KKATNKYGYGYNYYDYSYSDKK (SEQ ID NO:9)

50

Acinetobacter species (calcoaceticus, baumannii, johnsonii...).

[0033]

- Patógenos nosocomiales muy importantes.
- Contribuyen a la morbilidad y mortalidad de los pacientes, especialmente de los hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos.
- Reciente aparición de cepas resistentes a antibióticos (carbapenem).

55

PCP/BY-cinasa: Ptk de *A. johnsonii*
YC del extremo C-term.: SSAGYGYGYGY-NYAYAYKANKESD (SEQ ID NO:10)

Pseudomonas (Rastonia) solanacearum:

5

[0034]

- El exopolisacárido EPS I se ha descrito como principal factor de virulencia.
 - Causa una enfermedad de marchitamiento letal en muchos tipos de plantas.
- 10 - Infección a través de orificios naturales o heridas en las raíces.

PCP/BY-cinasa: EPSB
YC del extremo C-term.: DPNTYRYGYGSRYGRYRYVQYGYTSNSKPPEAESA (SEQ ID NO:11)

15 *Shigella species (flexneri, boydii, sonnei, dysenteriae):*

[0035]

- Causa la más contagiosa de las disenterías bacterianas (shigellosis).
- 20 - Invade el epitelio colónico y rectal e induce una grave inflamación y destrucción epitelial.
- Los pacientes pueden desarrollar complicaciones secundarias (septicemia, neumonía, síndrome urémico hemolítico).
 - 165 millones de casos cada año (1,1 millones de fallecimientos).

25 PCP/BY-cinasa: SF2571 de *S. flexneri*
YC del extremo C-term.: RASAYQDYGYEYKSDAK (SEQ ID NO:12)

Salmonella typhi:

30 **[0036]**

- Patógeno transmitido por alimentos.
 - Importantes patógenos para seres humanos y animales
 - Salmonelosis
 - Las infecciones provocan enterocolitis con diarrea y dolor abdominal.
- 35 - Los genes de resistencia integrados suponen un importante riesgo para la salud pública.

PCP/BY-cinasa: ST2329 de la cepa CT18
YC del extremo C-term.: RATGYQDYGYEYQSDSK (SEQ ID NO:13)

40 *Vibrio cholerae*

[0037]

- Patógeno para seres humanos.
- 45 - La cápsula es crítica para la virulencia en infecciones extraintestinales.
- Causa el cólera.
 - Aparición de nuevas cepas epidémicas.

50 PCP/BY-cinasa: VC0937
YC del extremo C-term.: KKASRYSGYYHYQAYYGEETKSGAAK (AEQ ID NO:14)

- [0038]** De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto que comprende una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas YC de la BY-cinasa de una bacteria, o un fragmento o un análogo o derivado del mismo, y
- 55 un análogo peptídico de adenina PNA(A), en la que la región peptídica y el PNA están unidos entre sí. Este compuesto puede actuar como inhibidor de las BY-cinasas.

[0039] De acuerdo con una característica, la unión entre las dos especies es un enlace peptídico.

[0040] De acuerdo con una característica, el YC se selecciona de una de las SEQ ID NO: 1 a 14.

[0041] El YC es un péptido con una longitud de 5 a 35, más generalmente de 5 a 20 aminoácidos, que se encuentra de forma natural en el extremo C-terminal de las tirosina cinasas bacterianas y que contiene al menos dos y hasta 7 restos tirosina. La región peptídica puede presentar un número de restos aminoácido comprendido entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15, con más preferencia entre 7 y 11. La región peptídica puede presentar la secuencia de un YC natural. Como alternativa puede contener un fragmento peptídico de un YC natural. Asimismo puede ser un derivado, es decir que es un YC o presenta un fragmento peptídico de un YC, y la parte YC se ha modificado para aumentar la afinidad por la BY-cinasa.

10

[0042] De acuerdo con otra característica, el YC se selecciona del grupo formado por:

DKYGVYGFYGNYGK (SEQ ID NO:15)
 SSYYHYGD (SEQ ID NO:16)
 ASYYAAYGT (SEQ ID NO:17)
 SSYYRYGH (SEQ ID NO:18)
 NHYGYSYDK (SEQ ID NO:19)
 SAYQDYGYEYK (SEQ ID NO:20)
 TAYSYCYNYYGYSYSE (SEQ ID NO:21)
 SAYQDYGYEYK (SEQ ID NO:22)
 NNYGYGYDYYDYSYQQ (SEQ ID NO:23)
 NKYGYGNYYDYSYSD (SEQ ID NO:24)
 AGYGYGYNYAYAYKA (SEQ ID NO:25)
 NTRYRGYGS (SEQ ID NO:26)
 SRYGRYRYVQGYTS (SEQ ID NO:27)
 SAVQDYGYEYK (SEQ ID NO:28)
 TGYQDYGYEYQS (SEQ ID NO:29)
 SRYSGYYHYQAYYGE (SEQ ID NO:30)

15 o un fragmento del mismo.

[0043] De acuerdo con otra característica, la región peptídica se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO: 15 a 30.

20 **[0044]** De acuerdo con otra característica, el fragmento YC se selecciona del grupo formado por:

KYCVYGFYGN SEQ ID NO:31)
 SYYHY (SEQ ID NO:32)
 HYGYSY (SEQ ID NO:33)
 AYSYGNYYGYS (SEQ ID NO:34)
 NYGYGYDYYDYS (SEQ ID NO:35)
 KYGYGNYYDYS (SEQ ID NO:36)
 GYGYGYNYAY (SEQ ID NO:37)
 DYGYEY (SEQ ID NO:38)

25 o un fragmento del mismo.

[0045] De acuerdo con otra característica, la región peptídica se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO: 31 a 38.

30 **[0046]** En una realización referente a *S. aureus*, la región peptídica comprende una de las secuencias siguientes:

SASYAY (SEQ ID NO:39)
 ESSYGAY (SEQ ID NO:40)
 KHSEYGY (SEQ ID NO:41)
 YNYYGYS (SEQ ID NO:42)
 KHSEGEY (SEQ ID NO:43)
 SSSYYHY (SEQ ID NO:44)
 VYGFYGN (SEQ ID NO:45)

[0047] De acuerdo con una característica, el PNA(A) está unido al extremo C-terminal de la región peptídica.

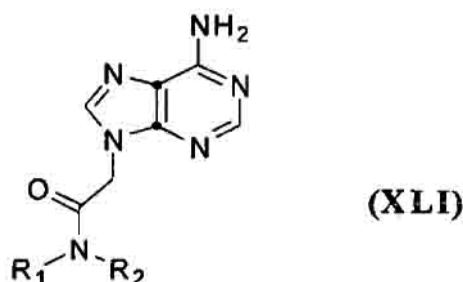
5 **[0048]** De acuerdo con otra característica, el PNA(A) está unido a la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G. Este resto aminoácido puede ser endógeno o no, y en el último caso es un resto aminoácido añadido o insertado.

10 **[0049]** De acuerdo con otra característica, el PNA(A) está unido al extremo C-terminal de la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G. Este resto aminoácido K o G puede ser endógeno o no, y en el último caso es un resto aminoácido añadido o insertado. La K o G puede sustituir a un resto Y de la región peptídica.

[0050] De acuerdo con otra característica, el compuesto presenta un número de restos aminoácido comprendido entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15.

15 **[0051]** En una realización referente a *S. aureus*, el compuesto se selecciona del grupo de compuestos BYK001, BYK002, BYK003, BYK004, BYK005 y BYK007.

20 **[0052]** El PNA(A) es un análogo peptídico de adenina con la fórmula general (XLI):



en la que:

25 R_1 y R_2 son independientemente alquilo sustituido con carboxilo, carbonilo, alcohol o amino primario (es decir, -COOH, -C(O)R, siendo R alquilo o H, -OH o -NH₂).

[0053] De acuerdo con otra característica, el resto aminoácido K y el PNA(A) están unidos a través del átomo de nitrógeno de la cadena lateral de este aminoácido.

30 **[0054]** De acuerdo con otra característica, el resto aminoácido K se encuentra en un extremo terminal de la región peptídica.

[0055] De acuerdo con otra característica, el aminoácido K se encuentra dentro de la región peptídica y puede ser un aminoácido endógeno o un aminoácido añadido.

35 **[0056]** Una realización preferida consiste en un compuesto que presenta una fórmula seleccionada de:

KYGVYGFYGNK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 46)
 SYYHYK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 47)
 HYGYSYK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 48)
 AYSYGYNYYGYSK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 49)
 NYGYGYDYYDYSK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 50)
 KYGYGYNYYDYSK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 51)
 GYGYGYGYNYAYK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 52)
 DYGYYEYK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 53).

[0057] De acuerdo con otra característica, la G se encuentra en un extremo terminal de la región peptídica. Puede ser un aminoácido endógeno o un aminoácido añadido.

5

[0058] Una realización preferida consiste en un compuesto que presenta una fórmula seleccionada de:

KYGVYGFYGNK(PNA(A)) (SEQ ID NO: 54)
 SYYHYG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 55)
 HYGYSYG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 56)
 AYSYGYNYYGYSG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 57)
 NYGYGYDYYDYSG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 58)
 KYGYGYNYYDYSG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 59)
 GYGYGYGYNYAYG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 60)
 DYGYYEYEG(PNA(A)) (SEQ ID NO: 61).

10 **[0059]** De acuerdo con otra característica, alquilo en R₁ y R₂ es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 5, preferentemente 1 a 3, con más preferencia 1 o 2 átomos de carbono.

[0060] De acuerdo con otra característica, R₁ es -CH₂CH₂NH₂ en la fórmula (XLI).

15 **[0061]** De acuerdo con otra característica, R₂ es -CH₂C(O)OH en la fórmula (XLI).

[0062] De acuerdo con otra característica, R₁ es -CH₂CH₂NH₂ y R₂ es -CH₂C(O)OH en la fórmula (XLI).

[0063] De acuerdo con otra característica, R₂ es alquilo sustituido con un grupo seleccionado de: -C(O)O~, -C(O)~, -C(O)R'~, siendo R' alquilo o H, -O~ y -NH~; donde ~ representa el enlace que une el PNA(A) al resto aminoácido J.

[0064] Salvo que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria poseen el significado que entiende generalmente un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

25

[0065] La expresión "interferir con" como se usa en la presente memoria significa reducir o inhibir.

[0066] La expresión "presente de forma natural" como se usa en la presente memoria en relación con un objeto, tal como una proteína, un péptido o un aminoácido, indica que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, se considera que una proteína, péptido o aminoácido que está presente en un organismo o que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio está presente de forma natural.

30

[0067] La expresión "resto aminoácido" como se usa en la presente memoria abarca tanto aminoácidos presentes de forma natural como aminoácidos no presentes de forma natural. Ejemplos de aminoácidos no presentes de forma natural incluyen sin limitación D-aminoácidos (es decir, un aminoácido de quiralidad opuesta a la de la forma presente de forma natural), N- α -metilaminoácidos, C- α -metilaminoácidos, β -metilaminoácidos y D- o L- β -aminoácidos. Otros aminoácidos no presentes de forma natural incluyen, por ejemplo, β -alanina (β -Ala), norleucina (Nle), norvalina (Nva), homoarginina (Har), ácido 4-aminobutírico (γ -Abu), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), ácido 6-aminohexanoico (ϵ -Ahx), ornitina (orn), sarcosina, ácido α -aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropiónico (2,3-diaP), D- o L-fenilglicina, D-(trifluorometil)-fenilalanina y D-p-fluorofenilalanina.

40

[0068] Una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas YC de la BY-cinasa de una bacteria, o un fragmento o un análogo del mismo, presenta toda o parte de la secuencia de aminoácidos del agrupamiento o presenta una secuencia de aminoácidos que puede contener restos aminoácido no presentes de forma natural y/o el PNA(A). Preferentemente, la región peptídica coincide con la secuencia de aminoácidos del agrupamiento o de la parte seleccionada del agrupamiento. El término "análogo" indica que puede haber algunos cambios de restos aminoácido que no afectan sustancialmente a la función del YC o que pueden incluso incrementar la afinidad. El término "fragmento" se refiere a un fragmento del YC en el que el número de restos aminoácido asciende preferentemente a al menos 4 restos aminoácido, por ejemplo entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15 restos.

[0069] El término "endógeno" usado en relación con un resto aminoácido significa que el resto aminoácido está presente en la secuencia nativa del YC.

[0070] El término "añadido" usado en relación con un resto aminoácido significa que el resto aminoácido es exógeno a la secuencia nativa, es decir que se añade o inserta.

[0071] Como se usa en la presente memoria, un "enlace peptídico" puede ser un enlace peptídico presente de forma natural o un enlace peptídico no presente de forma natural (es decir, modificado). Ejemplos de enlaces peptídicos modificados adecuados son conocidos en la técnica e incluyen sin limitación $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{CH}=\text{CH}$ (cis o trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{SO}-$, $-\text{CS}-\text{NH}-$ y $-\text{NH}-\text{CO}-$ (es decir, un enlace peptídico inverso) (véanse, por ejemplo, Spatola, Vega Data vol. 1, edición 3, (1983); Spatola en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Morley, J.S., Trends Pharm. Sci. págs. 463-468 (1980); Hudson y col., Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185 (1979); Spatola y col., Life Sci. 38:1243-1249 (1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314 (1982); Almquist y col., J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980); Jennings-White y col., Tetrahedron Lett. 23:2533 (1982); Szelke y col., EP 45665 (1982); Holladay y col., Tetrahedron Lett. 24:4401-4404 (1983); y Hruby, Life Sci. 31:189-199 (1982)).

[0072] El término "alquilo" como se usa en la presente memoria se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de uno a diez átomos de carbono o a un grupo hidrocarbonado cíclico de tres a diez átomos de carbono. Dicho grupo alquilo está sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo de: alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroalquilo, aralquilo, hidroxilo, alcoxi, aralquilo, ariloxi, carboxi, acilo, aroilo, halo, nitro, trihalometilo, ciano, alcocicarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcocicarbonilo, acilamino, aroilamino, dialquilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, alquiltio, aralquiltio, ariltio, alquilenilo y NZ_1Z_2 , donde Z_1 y Z_2 son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo y aralquilo. Ejemplos de este término incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, l-butilo (o 2-metilpropilo), ciclopropilmetilo, i-amilo, n-amilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y similares.

[0073] El término "alqueno" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de dos a diez átomos de carbono que presenta al menos un enlace doble carbono-carbono. Dicho grupo alqueno puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes definidos anteriormente. Ejemplos de este grupo incluyen alilo y vinilo.

[0074] El término "alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de dos a diez átomos de carbono que presenta al menos un enlace triple carbono-carbono. Dicho grupo alquino puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes definidos anteriormente. Ejemplos de este grupo incluyen etinilo y propargilo.

[0075] El término "heteroalquilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo de 2 a 10 átomos de carbono en el que al menos un carbono está reemplazado por un heteroátomo, tal como N, O o S.

[0076] El término "arilo" (o "Ar") como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo carbocíclico aromático que contiene entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 átomos de carbono, o a múltiples anillos condensados en los que al menos un anillo es un grupo carbocíclico aromático que contiene entre 6 y aproximadamente 10 átomos de carbono. Dicho grupo arilo, o Ar, puede estar sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes definidos anteriormente. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, toliilo, xililo, bifenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antrilo, fenantrilo, 9-fluorenilo y similares.

[0077] El término "aralquilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal o ramificada en el que al menos uno de los átomos de hidrógeno está reemplazado por un

grupo arilo, pudiendo estar el grupo arilo sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes definidos anteriormente. Ejemplos de grupos aralquilo incluyen bencilo, 4-fenilbutilo, 3,3-difenilpropilo y similares.

[0078] El término "alcoxi" como se usa en la presente memoria se refiere a RO-, en el que R es alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo como se han descrito anteriormente. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, l-propoxi, n-butoxi y heptoxi.

[0079] El término "ariloxi" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "aril-O", en el que el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de grupos ariloxi incluyen fenoxi y naftoxi.

[0080] El término "alquiltio" como se usa en la presente memoria se refiere a RS-, en el que R es alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo como se han descrito anteriormente. Ejemplos de grupos alquiltio incluyen metiltio, etiltio, l-propiltio y heptiltio.

[0081] El término "ariltio" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "aril-S", en el que el grupo arilo es como se ha definido anteriormente. Ejemplos de grupos ariltio incluyen feniltio y naftiltio.

[0082] El término "aralquiloxi" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "aralquil-O-", en el que el grupo aralquilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de grupos aralquiloxi incluyen benciloxi.

[0083] El término "aralquiltio" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "aralquil-S-", en el que el grupo aralquilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de grupos aralquiltio incluyen benciltio.

[0084] El término "dialquilamino" como se usa en la presente invención se refiere a un grupo -NZ₂Z₂, en el que Z₁ y Z₂ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo alquilo, alquenilo y alquinilo como se han descrito anteriormente. Ejemplos de grupos dialquilamino incluyen etilmetilamino, dimetilamino y dietilamino.

[0085] El término "alcoxycarbonilo" como se usa en la presente memoria se refiere a R-O-CO-, en el que R es alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo alquilo, alquenilo y alquinilo como se han descrito anteriormente. Ejemplos de grupos alcoxycarbonilo incluyen metoxycarbonilo y etoxycarbonilo.

[0086] El término "ariloxycarbonilo" como se usa en la presente memoria se refiere a "aril-O-CO-", en el que arilo es como se ha definido anteriormente. Ejemplos de grupos ariloxycarbonilo incluyen fenoxycarbonilo y naftoxycarbonilo.

[0087] El término "aralcoxycarbonilo" como se usa en la presente memoria se refiere a "aralquil-O-CO-", en el que aralquilo es como se ha definido anteriormente. Ejemplos de grupos aralcoxycarbonilo incluyen benciloxycarbonilo.

[0088] El término "acilo" como se usa en la presente memoria se refiere a RC(O)-, en el que R es alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, un anillo heterocíclico o un anillo heteroaromático, siendo alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heterocíclico y heteroaromático como se han definido anteriormente.

[0089] El término "aroílo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo ArC(O)-, en el que Ar es como se ha definido anteriormente.

[0090] El término "carboxi" como se usa en la presente memoria se refiere a ROC(O)-, en el que R es H, alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo alquilo, alquenilo y alquinilo como se han definido anteriormente.

[0091] El término "carbamoílo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo H₂N-CO.

[0092] El término "alquilcarbamoílo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "Z₁Z₂N-CO-", en el que uno de Z₁ y Z₂ es hidrógeno y el otro de Z₁ y Z₂ se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo alquilo, alquenilo y alquinilo como se han definido anteriormente.

[0093] El término "dialquilcarbamoílo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "Z₁Z₂N-CO-", en el que Z₁ y Z₂ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo, siendo alquilo, alquenilo y alquinilo como se han definido anteriormente.

[0094] El término "acilamino" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo "acil-NH-", en el que acilo es como se ha definido anteriormente.

5 **[0095]** El término "halo" como se usa en la presente memoria se refiere a fluoro, cloro, bromo o yodo. En una realización, "halo" se refiere a fluoro, cloro o bromo.

[0096] Otros términos químicos que aparecen en la presente memoria se emplean conforme al uso convencional en la técnica, por ejemplo según el McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (ed. Parker, S., 1985),
10 McGraw-Hill, San Francisco.

[0097] La expresión "funcionalidad reactiva" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo químico presente en una primera molécula que es capaz de unirse o que puede ser modificado y/o activado para ser capaz de unirse a una segunda molécula.

15 **[0098]** El término "sujeto" o "paciente" como se usa en la presente memoria se refiere a un animal o ser humano que necesita tratamiento o prevención. El ser humano es el objetivo principal.

[0099] Se contempla la administración de los inhibidores de la invención "en combinación con" uno o más
20 agentes terapéuticos adicionales y puede incluir la administración simultánea (concomitante) y la administración consecutiva. Con la administración consecutiva se pretende abarcar la administración de los agentes terapéuticos al sujeto en distinto orden y a través de diferentes vías.

[0100] Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de +/-
25 10% respecto al valor nominal. Se entiende que cualquier valor dado proporcionado en la presente memoria siempre lleva incluida esta variación, tanto si se hace referencia específicamente a ello como si no.

[0101] Los aminoácidos presentes de forma natural se identifican siempre con las abreviaturas convencionales de tres letras o de una letra indicadas a continuación, que son aceptadas universalmente en la
30 técnica de péptidos y son recomendadas por la comisión sobre la nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB:

Tabla 1. Códigos de aminoácidos

Nombre	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Nombre	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Ácido glutámico	Glu	E	Serina	Ser	S
Glutamina	Gln	Q	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

[0102] Las secuencias peptídicas expuestas en la presente memoria se escriben conforme a la convención
35 aceptada universalmente, según la cual el aminoácido N-terminal está a la izquierda y el aminoácido C-terminal está a la derecha.

[0103] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica o un fármaco que comprende un compuesto como se define en la presente memoria y un diluyente, vehículo o
40 excipiente farmacéuticamente aceptable. Este compuesto puede actuar como inhibidor de las BY-cinasas.

[0104] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco (medicamento) de la invención comprende al menos dos de estos compuestos, cada uno de los cuales presenta una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas
45 presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes.

[0105] De acuerdo con diferentes realizaciones, la composición farmacéutica o el fármaco comprende uno o varios (2 o más) compuestos inhibidores dirigidos contra una de las bacterias siguientes:

- 5 *Streptococcus pneumoniae*
Staphylococcus aureus
Escherichia coli
Erwinia species (amylovora, carotovora, stewartii, chrysanthemi...)
Klebsiella pneumoniae
- 10 *Acinetobacter species (calcoaceticus, baumannii, johnsonii...)*
Pseudomonas (Rastonia) solanacearum
Shigella species (flexneri, boydii, sonnei, dysenteriae)
Salmonella typhi
Vibrio cholerae.

[0106] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto inhibidor o una composición farmacéutica o un fármaco de la invención para el uso en el tratamiento de una infección bacteriana o en la prevención de una infección bacteriana.

[0107] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la invención comprende al menos dos de estos compuestos, cada uno de los cuales presenta una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes.

[0108] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto inhibidor de la invención para la preparación de un fármaco para el uso en el tratamiento de una infección bacteriana o en la prevención de una infección bacteriana.

[0109] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la invención comprende al menos dos de estos compuestos, cada uno de los cuales presenta una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes.

[0110] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto contra una infección bacteriana, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor, una composición farmacéutica o un fármaco de la invención a dicho sujeto.

[0111] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para prevenir una infección bacteriana en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor, una composición farmacéutica o un fármaco de la invención a dicho sujeto.

[0112] De acuerdo con una característica, la composición farmacéutica o el fármaco de la invención comprende al menos dos de estos compuestos, cada uno de los cuales presenta una región peptídica que comprende, se compone esencialmente o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas presente de forma natural en la BY-cinasa, o un fragmento o un análogo del mismo, de al menos dos bacterias diferentes.

[0113] De acuerdo con diferentes realizaciones, se emplean en el procedimiento o en el uso de acuerdo con la invención composiciones farmacéuticas o fármacos que comprenden uno o varios (2 o más) compuestos inhibidores dirigidos contra una de las bacterias siguientes:

- Streptococcus pneumoniae*
- 55 *Staphylococcus aureus*
Escherichia coli
Erwinia species (amylovora, carotovora, stewartii, chrysanthemi...)
Klebsiella pneumoniae
Acinetobacter species (calcoaceticus, baumannii, johnsonii...)

Pseudomonas (Rastonia) solanacearum
Shigella species (flexneri, boydii, sonnei, dysenteriae)
Salmonella typhi
Vibrio cholerae.

5

[0114] En el procedimiento y el uso de la invención, cuando se elige administrar varios compuestos al mismo sujeto, estos pueden presentarse en la misma composición farmacéutica o fármaco o por separado.

[0115] Los compuestos inhibidores de la presente invención se pueden preparar usando técnicas de síntesis convencionales conocidas en la técnica. Los componentes de los inhibidores se pueden preparar de forma sucesiva, simultánea o como parte de un solo proceso. Por ejemplo, se puede sintetizar la región peptídica y conjugarla después, usando técnicas químicas de conjugación convencionales, con la molécula PNA(A), que o bien se ha sintetizado por separado o bien se ha adquirido de fuentes comerciales. De forma alternativa, la región peptídica y el PNA(A) se pueden sintetizar juntos como una única molécula.

15

[0116] La región peptídica se puede preparar fácilmente mediante técnicas de síntesis de péptidos convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo mediante técnicas convencionales en solución, suspensión o fase sólida, como los procedimientos de síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos y síntesis clásica en solución.

20

[0117] En una realización de la presente invención, se emplean técnicas en fase sólida para preparar la región peptídica. Los principios de la síntesis química de péptidos en fase sólida son conocidos en la técnica y se pueden encontrar en textos generales sobre la materia, como en Pennington, M.W. y Dunn, B.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 35 (Humana Press, 1994); Dugas, H. y Penney, C., *Bioorganic Chemistry* (1981) Springer-Verlag, Nueva York, págs. 54-92; Merrifield, J.M., *Chem. Soc.*, 85:2149 (1962), y Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, págs. 24-66, Freeman (San Francisco, 1969).

25

[0118] Para preparar el material de partida se usa un soporte polimérico (o resina) insoluble y se une una versión protegida del α -aminoácido requerido a la resina. La resina sirve para anclar la cadena peptídica a medida que se une cada α -aminoácido adicional y se compone de partículas (con un diámetro comprendido generalmente entre aproximadamente 20 y 50 μm) que son químicamente inertes con respecto a los reactivos y disolventes usados en la síntesis peptídica en fase sólida. Estas partículas se hinchan considerablemente en disolventes, lo que facilita el acceso a los brazos conectores. Ejemplos de resinas que se usan en la síntesis peptídica en fase sólida incluyen resinas clorometiladas, resinas hidroximetiladas, resinas de benzhidrilamina y similares. En el mercado están disponibles diversas resinas adecuadas para aplicaciones de síntesis peptídica en fase sólida, por ejemplo resinas de fenilacetamidometilo (PAM), copolímero de hidroximetil-poliestireno/vinilbenceno, poliamida, resina de alcohol p-benciloxibencílico (resina de Wang) y versiones modificadas de las mismas, 4-hidroximetilfenoximetil-copoli(estireno-1% divinilbenceno) y resinas de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetilo y [ácido 5-(4-Fmoc-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi)valérico]-polietilenglicol-poliestireno (que se encuentran en el mercado en Applied Biosystems, Foster City, CA), que se pueden usar en la preparación de la región peptídica de la invención.

40

[0119] El α -aminoácido se acopla a la resina usando un reactivo de acoplamiento convencional, tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) o hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), con o sin 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina (BOPCI). El acoplamiento generalmente se realiza en un disolvente, tal como diclorometano, DMF o NMP.

45

[0120] Después del acoplamiento inicial, el grupo protector de α -amino se elimina usando un reactivo convencional, tal como una solución de ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorhídrico en un disolvente orgánico o piperidina al 20% en el disolvente DMF.

50

[0121] Los grupos protectores de α -amino adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos protectores de tipo acilo (como formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos protectores de tipo uretano aromático (como benciloxicarboilo (Cbz) y Cbz sustituido), grupos protectores de uretano alifático (como t-butiloxicarbonilo (Boc), isopropiloxicarbonilo y ciclohexiloxicarbonilo), grupos protectores de tipo alquilo (como bencilo y trifenilmetilo) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Un grupo lábil protege el grupo alfa-amino del aminoácido. Este grupo se deberá poder eliminar fácilmente después de cada reacción de acoplamiento de manera que se pueda añadir el siguiente aminoácido protegido en α -amino.

55

[0122] Los grupos protectores de cadenas laterales, si se usan, permanecen intactos durante el acoplamiento y típicamente no se eliminan durante la desprotección del grupo protector del extremo amino terminal o durante el acoplamiento. Los grupos protectores de cadenas laterales generalmente se seleccionan de manera que se puedan eliminar una vez completada la síntesis del péptido final y en condiciones de reacción tales que no alteren el péptido.

5 Ejemplos de grupos protectores de cadenas laterales incluyen sin limitación bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y ciclohexilo para Asp; acetilo, benzoilo, tritilo, tetrahidropiraniilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo y Cbz para Ser; nitro, tosilo (Tos), Cbz, adamantiloxicarbonil-mesitoilsulfonilo (Mts) o Boc para Arg; y Cbz, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Cbz) y 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Cbz), ivDde, Tos o Boc para Lys. En la técnica se conocen otros ejemplos.

10 **[0123]** Una vez eliminado el grupo protector de α -amino, se acoplan progresivamente, en el orden deseado, los demás aminoácidos protegidos a la cadena peptídica. Generalmente se usa un exceso de cada aminoácido protegido junto con un activador de grupos carboxilo apropiado, tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC) en cloruro de metileno y/o dimetilformamida (DMF), N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetilen]-N-metilmetanaminio (HATU), N-óxido de hexafluorofosfato de N-[1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU) y hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-il-N-oxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP).

[0124] Una vez sintetizada la secuencia de aminoácidos deseada, se eliminan los grupos bloqueantes estables y el péptido se desacopla del soporte de resina por tratamiento con un reactivo adecuado, tal como Reactivo K, que incluye TFA (82,5%), tioanisol (5%), fenol (5%), H₂O (5%), 1,2-etanoditiol (EDT, 2,5%). El agente de desacoplamiento puede disociar simultáneamente todos los grupos protectores de cadenas laterales. De forma alternativa, los grupos protectores de cadenas laterales se pueden disociar usando un reactivo separado, por ejemplo piperidina al 20% en DMF para grupos Fmoc o hidrazina al 2% en DMF para grupos ivDde.

25 **[0125]** En una realización de la presente invención, la región peptídica se sintetiza en un sintetizador de péptidos disponible en el mercado (como el Pioneer Peptide Synthesizer de Applied Biosystems, Foster City, CA, o el Liberty System de CEM Corporation, Matthews, Carolina del Norte) siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando grupos protectores adecuados para proteger, si fuera necesario, las cadenas laterales de los aminoácidos.

30 **[0126]** Las técnicas anteriores también se pueden usar para sintetizar regiones peptídicas que incluyen uno o más aminoácidos no presentes de forma natural. Se pueden introducir modificaciones covalentes, por ejemplo haciendo reaccionar los restos aminoácido objetivo con un agente de derivación orgánico que sea capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas de los aminoácidos o con el/los resto(s) terminal(es), tal y como se conoce en la técnica. La selección de el/los agente(s) de derivación apropiado(s) la puede efectuar fácilmente un experto en la técnica.

[0127] En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar péptidos con uno o más enlaces peptídicos modificados (véase, por ejemplo, "Solid Phase Peptide Synthesis" Methods in Enzymology (ed. Fields, G.B. (1997) Academic Press, San Diego).

[0128] La región peptídica también se puede preparar en su forma salina. Los péptidos pueden ser lo suficientemente ácidos o lo suficientemente básicos como para reaccionar con una serie de bases inorgánicas, ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos para formar una sal. Los ácidos usados habitualmente para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares.

50 **[0129]** Las sales de adición de base incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos de amonio o alcalinos o alcalinotérreos y similares. Ejemplos de bases útiles para preparar las sales incluyen sin limitación hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

55 **[0130]** La presente invención también contempla que, cuando la región peptídica comprende aminoácidos presentes de forma natural o versiones cuyas ligeramente modificadas, esta se pueda preparar mediante técnicas de ADN recombinante. Tales procedimientos se describen de forma general en Ausubel y col. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, NY (1997 y actualizaciones)) y Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold-Spring Harbor Press, NY (2001)). En general, se prepara una secuencia de ADN que codifica la región

peptídica y se inserta en un vector de expresión adecuado. El vector de expresión se introduce seguidamente en una célula o tejido huésped adecuado mediante uno de los diversos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación o infección con un vector vírico recombinante. La célula o el tejido huésped se cultiva en condiciones que permitan la expresión de la región peptídica y seguidamente se aísla esta de las células/tejido.

[0131] Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen sin limitación plásmidos, fagémidos, cósmidos, bacteriófagos, baculovirus y retrovirus y virus de ADN. El vector de expresión seleccionado puede incluir además uno o más elementos reguladores para facilitar la expresión de la región peptídica, por ejemplo promotores, potenciadores, terminadores y señales de poliadenilación. El experto en la técnica apreciará que estos elementos reguladores pueden proceder de diversas fuentes, incluidos genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamíferos o de insectos.

[0132] En el contexto de la presente invención, el vector de expresión puede contener adicionalmente secuencias de ácido nucleico heterólogas que facilitan la purificación de la región peptídica expresada. Ejemplos de tales secuencias de ácido nucleico heterólogas incluyen sin limitación etiquetas de afinidad, tales como etiquetas de afinidad por metales, etiquetas de histidina, secuencias que codifican avidina/estreptavidina, secuencias que codifican la glutatión S transferasa (GST) y secuencias que codifican biotina.

[0133] El experto en la técnica entenderá que la selección de la célula huésped apropiada para la expresión de la región peptídica recombinante dependerá del vector elegido. Ejemplos de células huésped adecuadas incluyen sin limitación células bacterianas, de levadura, de insectos, de plantas y de mamíferos.

[0134] Si la región peptídica no se puede codificar o expresar pero es muy similar a un péptido que se puede codificar o expresar, se pueden usar técnicas de ingeniería genética, como las descritas anteriormente, para preparar el péptido codificable, seguido de uno o más pasos en los que el péptido codificado se modifica mediante técnicas químicas o enzimáticas para preparar la región peptídica final.

[0135] Para conjugar los componentes individuales entre sí se pueden usar técnicas de conjugación convencionales conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Morrison y Boyd, *Organic Chemistry*, 6ª ed. (Prentice Hall, 1992); J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed. (Wiley 1992); G.T. Harmanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, Inc. 1995) y S.S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press, Inc. (1991)).

[0136] Los componentes se conjugan a través de una funcionalidad reactiva presente en uno o más de los componentes, bien directamente o bien por modificación del grupo para introducir un nuevo grupo químico capaz de conjugarse con un segundo componente. Se puede someter a las reacciones de conjugación una variedad de grupos químicos. Por ejemplo, se pueden usar grupos hidroxilo (-OH) para la conjugación con un segundo componente a través de la reacción con haluros alcalinos (R-Cl, R-Br), anhídridos de acilo, haluros de acilo, aldehídos (-CHO), hidrazidas (R-CO-NH-NH₂) y similares. Se pueden usar grupos amino primarios (-NH₂) para la conjugación con un segundo componente a través de la reacción con haluros de alquilo (R-Cl, R-Br, R-I), azidas de arilo, anhídridos de acilo, haluros de acilo, ésteres de acilo, carboxilatos activados con carbodiimidas, aldehídos (-CHO) y similares. Los grupos carboxílicos (-COOH) también se pueden usar para la conjugación con un segundo componente tras activar el grupo. Los agentes de activación adecuados incluyen, por ejemplo, haluros de ácidos orgánicos o inorgánicos (por ejemplo, cloruro de pivaloilo, cloroformiato de etilo, cloruro de tionilo, PCl₅), carbodiimidas (R-CO-OH+R'-N=C=N-R", por ejemplo EDC, DCC), sales de benzotriazoliluronio o fosfonio (TBTU, BOP, PyBOP, HTBU), cloruros de diacilo, diisocianatos y similares.

[0137] Algunos de los reactivos anteriores también se pueden usar como reactivos de reticulación bifuncionales que se pueden emplear para conjugar los componentes del compuesto. En la técnica se conoce una variedad de reactivos de reticulación de este tipo, y muchos están disponibles en el mercado (véanse, por ejemplo, S.S. Wong, *ibid*, y los catálogos de Pierce Chemical Co. y Sigma-Aldrich). Ejemplos incluyen sin limitación diaminas, tales como 1,6-diaminohexano; dialdehídos, tales como glutaraldehído; ésteres de bis-N-hidroxisuccinimida, tales como etilenglicol-bis(éster de N-hidroxisuccinimida del ácido succínico), glutarato de disuccinimidilo, suberato de disuccinimidilo y etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo); diisocianatos, tales como hexametildisocianato; bis-oxiranos, tales como éter 1,4-butanodiol-diglicidílico; ácidos dicarboxílicos, tales como salicilato de succinidilo; ácido 3-maleimidopropiónico, éster de N-hidroxisuccinimida y similares.

[0138] Antes de la conjugación se pueden someter uno o más de los componentes del compuesto a uno o

más procedimientos de purificación, al igual que el compuesto final. Los procedimientos de purificación son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, T. Hanai, HPLC: A Practical Guide, RSC Press, UK 1999; L.M. Harwood, C.J. Moody y J.M. Percy, Experimental Organic Chemistry: Standard and Microscale, Blackwell Scientific Publishing, 1998; Current Protocols in Protein Science, Coligan, J.E., y col. (eds.), John Wiley & Sons (2001 y actualizaciones)) y pueden incluir uno o más pasos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción/interacción hidrófoba, cromatografía de adsorción en gel de sílice y diferentes formas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tales como la HPLC de fase inversa.

Ejemplo 1:

[0139] Para evaluar el efecto inhibitor de un fármaco potencial sobre una BY-cinasa se usan dos procedimientos diferentes, cada uno de los cuales es objeto de la invención. El procedimiento 1 se basa en la detección de la actividad autocinasa de una BY-cinasa en presencia o ausencia del fármaco que se ha de ensayar. En el procedimiento 2 se mide la capacidad de una BY-cinasa para fosforilar un sustrato proteico endógeno en presencia o ausencia del fármaco. Un fármaco se considera eficaz cuando se ven afectadas la actividad autocinasa o cinasa o ambas actividades.

[0140] Para realizar el procedimiento 1 y el procedimiento 2 se purifican primero la BY-cinasa y el sustrato proteico de interés hasta la homogeneidad. Para ello se amplifica por PCR cada gen correspondiente y se clona en un vector de expresión en exceso. Cada proteína se fusiona con una etiqueta (6 histidinas, glutatión S transferasa, etc.), lo que permite su purificación hasta casi la homogeneidad en un solo paso. Las cepas bacterianas y las condiciones de crecimiento usadas para producir la proteína de interés en exceso se eligen de manera que satisfagan los criterios cuantitativos y de solubilidad. La purificación se logra después mediante técnicas cromatográficas basadas en la afinidad de una matriz por la etiqueta fusionada con la proteína de interés. Tras la elución y la precipitación salina las proteínas de interés están listas para los ensayos de inhibición. De forma alternativa, se almacenan entre 4°C y -80°C y se ensayan más adelante.

[0141] El efecto inhibitor de un fármaco se ensaya bien directamente después de la purificación o bien después de un paso subsiguiente de desfosforilación (véase el apartado Desfosforilación).

[0142] Una vez realizado el procedimiento 1 y/o 2, el efecto de un fármaco se puede analizar mediante tres métodos diferentes (véase el apartado Análisis).

Desfosforilación

[0143] Cuando proceda, la BY-cinasa de interés purificada se desfosforila de la siguiente manera. Se mezclan entre 1 y 10 U de fosfatasa alcalina por 30 pmoles de BY-cinasa y se incuban durante 15 min a 10 horas entre 25°C y 42°C en el tampón apropiado proporcionado por el fabricante. El volumen final máximo no debe exceder de 2 ml.

[0144] Tras la desfosforilación, la mezcla se tampona de forma que se obtengan las condiciones de pH que permiten purificar de nuevo la BY-cinasa desfosforilada usando el mismo método cromatográfico que el que condujo a su purificación a partir de la cepa bacteriana que la produce en exceso. Tras la precipitación salina, la BY-cinasa desfosforilada se considera lista para el uso en los ensayos de inhibición. De forma alternativa, se almacena entre 4°C y -80°C y se ensaya más adelante.

Procedimiento 1: Efecto de un fármaco potencial en la actividad autocinasa de una BY-cinasa

[0145] Se incuban 50 pmoles de la BY-cinasa purificada (o de la BY-cinasa desfosforilada) durante 15 min a 1 hora en presencia de 50 pmoles del fármaco en un volumen final de 20 microlitros. La relación BY-cinasa/fármaco varía entre 1/1 y 1/100. La reacción se efectúa en un tampón específico de cada BY-cinasa (condiciones de pH, concentraciones de sal, etc.). Se continúa después con la incubación durante 30" a 1 h en presencia de 5 microcurie de ATP radiactivo (³²P o ³³P) marcado en g-P (actividad específica 3000 Ci/mmol) y ATP 50 micromolar no radiactivo. La reacción se detiene añadiendo 5 microlitros de tampón de carga para electroforesis en gel concentrado 5 veces y calentando durante 5 min a 100°C. La radiactividad unida a la BY-cinasa, correspondiente a la capacidad de la enzima para fosforilarse, se mide como se describe en el apartado Análisis para determinar el posible efecto inhibitor del fármaco estudiado.

Procedimiento 2: Capacidad de una BY-cinasa para fosforilar un sustrato proteico endógeno en presencia o

ausencia del fármaco potencial

- [0146]** El procedimiento 2 se basa en el procedimiento 1, excepto por que se añaden también entre 5 pmoles y 100 pmoles del sustrato proteico, bien al mismo tiempo que el fármaco o bien concomitantemente con el ATP radiactivo y el ATP no radiactivo. El posible efecto inhibidor del fármaco estudiado se determina como se describe en el apartado Análisis midiendo la radiactividad unida al sustrato proteico.

Análisis

- [0147]** Los fármacos ensayados como se ha descrito en el procedimiento 1 o 2 se analizan respecto a su poder inhibidor mediante los tres métodos indicados a continuación. La señal de fosforilación de una BY-cinasa (procedimiento 1) o de un sustrato proteico (procedimiento 2) incubado con el fármaco se compara con las señales de la BY-cinasa o del sustrato proteico obtenidas en las mismas condiciones pero sin incubación con el fármaco. Cualquier disminución de la señal de fosforilación en uno de los tres métodos indica que la actividad autocinasa o cinasa de una BY-cinasa se ve afectada por el fármaco, el cual, por lo tanto, presenta un efecto inhibidor.

Método 1

- [0148]** Las muestras se analizan mediante SDS-PAGE. Tras la electroforesis, los geles se remojan en ácido tricloroacético al 16% (p/v) durante diez minutos a 90°C. Se tiñen con azul de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en 50% (v/v) de etanol, 7,5% de ácido acético y se secan al vacío. Las bandas radiactivas se visualizan mediante autorradiografía usando películas de exposición directa.

Método 2

- [0149]** El método 2 se basa en el método 1, salvo por que las muestras se analizan mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida sin SDS. Además de en películas de exposición directa, la actividad autocinasa o la fosforilación del sustrato proteico se analiza detectando la aparición de formas fosforiladas teñidas (azul de Coomassie o plata) de la BY-cinasa o del sustrato proteico.

Método 3

- [0150]** Las muestras se analizan bien por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (método 1) o bien por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida sin SDS (método 2). Después se electrotransfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon. Las señales de fosforilación se detectan mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina conjugado con la HRP PY20 (Sigma) o 4G10 (Upstate).

- [0151]** El método 2 y el método 3 también se pueden realizar con ATP radiactivo para detectar las proteínas fosforiladas con un anticuerpo anti-fosfotirosina específico (véase el apartado Análisis).

Ejemplo: Procedimiento para el ensayo de inhibición de la BY-cinasa A1B2 de *Staphylococcus aureus* con el fármaco BYK0001 (véase el ejemplo 2)

- [0152]** El procedimiento se aplicó a A1B2 [34] y CapO [20]. Cada gen se clonó en el vector pQE30 (Qiagen) para permitir la fusión de una etiqueta de histidinas con el extremo C-terminal de A1B1 o CapO. Este plásmido de producción en exceso se transformó en la cepa XL1-blue de *Escherichia coli*. Las células se incubaron a 37°C bajo agitación hasta que A600 alcanzó 0,5. Después se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y el crecimiento continuó durante 3 h a 37°C bajo agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x g durante 10 min, se lavaron en tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol 10%, imidazol 10 mM) que contenía DNasa I y RNasa A a una concentración final de 5 mg/ml cada una, 1 mg/ml de lisozima y un cóctel de inhibidores de proteasas. Las células se rompieron por sonicación. La suspensión resultante se centrifugó a 4°C durante 30 min a 30.000 x g. El sobrenadante se incubó durante 30 min a 4°C bajo agitación suave con la matriz Ni-NTA (Qiagen), adecuada para la purificación de las proteínas de fusión con 6 histidinas. El complejo proteína-resina se empaquetó en una columna para los pasos de lavado y elución. La columna se lavó con tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol 10%, imidazol 20 mM). La elución de la proteína se llevó a cabo con tampón C (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol 10%, imidazol 150 mM). Las fracciones eluidas se recogieron y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones apropiadas se reunieron, se dializaron durante la noche contra tampón D (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol 20%) y se usaron para los

ensayos de inhibición o se almacenaron a +4°C, -20°C o -80°C.

- [0153]** De acuerdo con el procedimiento 1, se incubaron 50 pmoles de A1B2 con 0 pmol, 50 pmoles o 500 pmoles o 5 nmoles de BYK001 durante 15 min a 37°C en un volumen final de 20 ml. Después, la incubación continuó durante 30" o 1' o 2' o 5' en presencia de 5 mCi de [g-³²P] ATP (actividad específica 3000 Ci/mmol). La cantidad de radiactividad incorporada en A1B2 se determinó mediante recuento por centelleo líquido tras la electroforesis en gel. El porcentaje de inhibición de la actividad autocinasa de A1B2 se expresa en relación con la radiactividad incorporada en A1B2 cuando se incubaba sin BYK001.

- 10 **[0154]** Los resultados se presentan en la tabla 2:

BYK001 (pmol)	0				50			
Tiempo de incubación (min)	0,5	1	2	5	0,5	1	2	5
Radiactividad incorporada en A1B2 (cpm)	35453	85435	158973	381765	29233	71683	132537	325711
% de inhibición	0	0	0	0	17,54	16,10	16,63	14,68
	500							
	0,5	1	2	5	0,5	1	2	5
	30724	72475	133624	324983	29899	72528	141005	323749
	13,31	15,17	15,95	14,87	15,67	15,11	11,30	15,20

- [0155]** De acuerdo con el procedimiento 2, se incubaron durante 15 min a 37°C 50 pmoles de A1B2 y 50 pmoles de un sustrato de A1B2, a saber, la proteína CapO, con 50 pmoles o 500 pmoles o 5 nmoles de BYK001 en un volumen final de 20 ml. Después, la incubación continuó durante 30" o 1' o 2' o 5' en presencia de 5 mCi de [g-³²P] ATP (actividad específica 3000 Ci/mmol). La cantidad de radiactividad incorporada en CapO se determinó mediante recuento por centelleo líquido tras la electroforesis en gel. El porcentaje de inhibición de la fosforilación de CapO por A1B2 se expresa en relación con la radiactividad de CapO cuando la incubación se realiza sin BYK001.

- 20 **[0156]** Los resultados se presentan en la tabla 3:

BYK001 (pmol)	0				50			
Tiempo de incubación (min)	0,5	1	2	5	0,5	1	2	5
Radiactividad incorporada en CapO (cpm)	3952	7045	17354	34718	3555	6388	15498	31901
% de inhibición	0	0	0	0	10,05	9,33	10,69	8,11
	500				5000			
	0,5	1	2	5	0,5	1	2	5
	3497	6302	15549	31251	3513	6315	15471	30974
	11,51	10,55	10,40	9,99	11,11	10,36	10,85	10,78

- [0157]** Los resultados demuestran un efecto inhibitor para BYK001 sobre la BY-cinasa A1B2 de *Staphylococcus aureus*.

- 25 **Ejemplo 2: Diseño *in silico* de análogos a partir de BKY001**

- [0158]** Se realizó un análisis de la interacción entre el agrupamiento de tirosinas y las proteína cinasas. Este análisis se llevó a cabo con el paquete de modelado molecular Sybyl (Tripos Inc.) en una estación de trabajo Linux. La energía de interacción entre el agrupamiento de tirosinas y la proteína cinasa se computó con el algoritmo "marsilli gasteiger" usando mecánica molecular con el campo de fuerza Tripos y cargas parciales de los átomos de la estructura.

- [0159]** El agrupamiento de tirosinas se mutó con una lisina y una región PNA unida a su cadena lateral. La estructura global se optimizó energéticamente. La energía de interacción se computó y se usó como patrón para los demás compuestos. Se efectuó un estudio para cada aminoácido del agrupamiento de tirosinas. Tras comprobar la interacción con las cinasas, el aminoácido se mutó a otro que presentaba una interacción óptima en cuanto a enlaces de hidrógeno o interacciones hidrófobas, con el fin de optimizar el compuesto. Se aplicaron diversas estrategias para crear BYK002-7. Véase la tabla 4 siguiente con las fórmulas de estos compuestos y, en la línea debajo de cada fórmula, la correspondencia con las letras de la fórmula (I).

Nombre	Secuencia										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BYK001	S	A	S	Y	Y	A	Y	K(PNA)	G	T	D
					U	X	Y	Z			
BYK002	E	S	S	T	G	A	Y	K(PNA)	G	T	D
					U	X	Y	Z			
BYK003	K	H	S	E	Y	G	Y	K(PNA)	G	T	K
					U	X	Y	Z			
BYK004	Y	N	Y	Y	G	Y	S	K(PNA)	S	E	K
	U	X	Y	U	X	Y	U	Z			
BYK005	K	H	S	E	G	E	Y	K(PNA)	E	T	K
					U	X	Y	Z			U
BYK006	S	S	S	Y	Y	H	Y	K(PNA)	G	D	E
					U	X	Y	Z			
BYK007	V	Y	G	F	Y	G	N	K(PNA)	G	K	K
			U	X	Y	U	X	Z			

[0160] El análisis revela que la secuencia nativa de BYK0001 posee una buena energía de interacción y que esta energía de interacción se puede aumentar. La inhibición se encuentra en torno al 15% para la molécula BYK0001; de acuerdo con la simulación de la energía de interacción, se espera que el porcentaje de inhibición sea mayor para los análogos (véase la tabla 5 siguiente):

	Energía				
	Energía kcal·mol ⁻¹	Actividad	Prot	BYK	Complejo
BYK001	-61,9	15,00	1281,739	65,474	1285,352
BYK002	-56,3		1271,968	68,134	1283,708
BYK003	-71,3		1291,631	95,058	1315,37
BYK004	-65,3		1371,991	67,776	1374,43
BYK005	-78,5		1276,393	59,693	1293,629
BYK006	-67,7		1247,054	84,704	1264,053
BYK007	-63,7		1250,421	62,767	1249,447
BYK001: SEQ ID NO:62					
BYK002: SEQ ID NO:63					
BYK003: SEQ ID NO:64					
BYK004: SEQ ID NO:65					
BYK005: SEQ ID NO:66					
BYK006: SEQ ID NO:67					
BYK007: SEQ ID NO:68					

REFERENCIAS

10

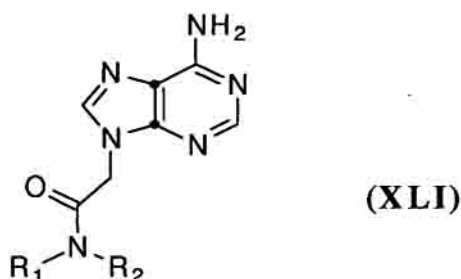
[0161]

1. Cozzone AJ (1988) Annu Rev Microbiol 42:97-125.
2. Hoch JA (2000) Curr Opin Microbiol 3:165-170.
- 15 3. Deutscher J y col. (2006) Microbiol Mol Biol Rev 70:939-1031.
4. Kannan N, Neuwald AF (2005) J Mol Biol 351:956-972.
5. Shi L. y col. (1998) FEMS Microbiol Rev 22:229-253.
6. Macek B y col. (2007) Mol Cell Proteomics 6:697-707.
7. Macek B y col. (2008) Mol Cell Proteomics 7:299-307.
- 20 8. Lander ES y col. (2001) Nature 409:860-921.
9. Iyer LM y col. (2004) J Struct Biol 146:11-31.
10. Saraste M y col. (1990) Trends Biochem Sci 15:430-434.
11. Deutscher J, Saier MH, Jr. (2005) J Mol Microbiol Biotechnol 9:125-131.
12. Fieulaine S y col. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13437-13441.
- 25 13. Mijakovic I. y col. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13442-13447.

14. Reizer J y col. (1998) *Mol Microbiol* 27:1157-1169.
15. Grangeasse C y col. (1997) *Gene* 204:259-265.
16. Cozzzone AJ y col. (2004) *Arch Microbiol* 181:171-181.
17. Grangeasse C y col. (2007) *Trends Biochem Sci* 32:86-94.
- 5 18. Grangeasse C y col. (2003) *J Biol Chem* 278:39323-39329.
19. Mijakovic I y col. (2003) *Embo J* 22:4709-4718.
20. Soulat D y col. (2007) *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:45-54.
21. Klein G y col. (2003) *Mol Microbiol* 48:269-285.
22. Mijakovic I y col. (2006) *Nucleic Acid Res* 34:1588-1596.
- 10 23. Petranovic D y col. (2007) *Mol Microbiol* 63:1797-1805.
24. Whitfield C (2006) *Annu Rev Biochem* 75:39-68.
25. Mororia R y col. (2000) *Microbiology* 146 (Pt 1):1-4.
26. Niemeyer D, Becker A (2001) *J Bacteriol* 183:5163-5170.
27. Nakar D, Gutnick DL (2003) *J Bacteriol* 185:1001-1009.
- 15 28. Obadia B y col. (2007) *J Mol Bio* 1367:42-53.
29. Roberts IS (1996) *Annu Rev Microbiol* 50:285-315.
30. Thakker M y col. (1998) *Infect Immun* 66:5183-5189.
31. O'Riordan K, Lee JC (2004) *Clin Microbiol Rev* 17:218-234.
32. Cunnion KM y col. (2003) *Infect Immun* 71:656-662.
- 20 33. Karakawa WW y col. (1988) *Infect Immun* 56:1090-1095.
34. Plovares-Illana y col. *PLoS Biol* (2008) 6, e143.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que consta de una región peptídica que comprende o se compone de la secuencia peptídica de un agrupamiento de tirosinas YC de la BY-cinasa de bacterias, o un análogo del mismo que presenta algunos cambios de restos aminoácido que no afectan sustancialmente a la función del YC o que aumentan la afinidad, y un análogo peptídico de adenina PNA(A) de fórmula general (XLI):



- 10 en la que:
 R_1 y R_2 son independientemente alquilo sustituido con carboxilo, carbonilo, alcohol o amino primario (es decir, -COOH, -C(O)R, siendo R alquilo o H, -OH o -NH₂);
 en el que la región peptídica y el PNA están unidos entre sí.
- 15 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que la región peptídica y el PNA(A) están unidos entre sí a través de un enlace peptídico.
3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el YC se selecciona de una de las SEQ ID NO:1 a 14.
- 20 4. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el YC se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO:15 a 30 o un fragmento de las mismas.
5. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que la región peptídica se selecciona del grupo
 25 formado por las SEQ ID NO:15 a 30.
6. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el YC se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO:31 a 38 o un fragmento de las mismas.
- 30 7. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que la región peptídica se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO:31 a 38 o un fragmento de las mismas.
8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el PNA(A) está unido al extremo C-terminal de la región peptídica.
- 35 9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el PNA(A) está unido a la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G.
10. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el PNA(A) está unido al
 40 extremo C-terminal de la región peptídica a través de un resto aminoácido K o G.
11. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el compuesto presenta un número de restos aminoácido comprendido entre 4 y 21, preferentemente entre 5 y 15.
- 45 12. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta una fórmula seleccionada de:

KYGVYGFYGNK(PNA(A)) (SEQ ID 46)
 SYYHYK(PNA(A)) (SEQ ID 47)
 HYGYSYK(PNA(A)) (SEQ ID 48)
 AYSYGYNYYGYSK(PNA(A)) (SEQ ID 49)
 NYGYGYDYYDYSK(PNA(A)) (SEQ ID 50)
 KYGYGYNYYDYSK(PNA(A)) (SEQ ID 51)
 GYGYGYGYNYAYK(PNA(A)) (SEQ ID 52)
 DYGYEYK(PNA(A)) (SEQ ID 53)
 SASYYAY K(PNA(A))GTD (SEQ ID 62)
 ESSYGAY K(PNA(A))GTD (SEQ ID 63)
 KHSEYGY K(PNA(A))GTK (SEQ ID 64)
 YNYYGYS K(PNA(A))SEK (SEQ ID 65)
 KHSEGEY K(PNA(A))ETK (SEQ ID 66)
 SSSYYHY K(PNA(A))GDE (SEQ ID 67)
 VYGFYGN K(PNA(A))GKK (SEQ ID 68)

13. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta una fórmula seleccionada de:

KYGVYGFYGNK(PNA(A)) (SEQ ID 54)
 SYYHYG(PNA(A)) (SEQ ID 55)
 HYGYSYG(PNA(A)) (SEQ ID 56)
 AYSYGYNYYGYSG(PNA(A)) (SEQ ID 57)
 NYGYGYDYYDYSG(PNA(A)) (SEQ ID 58)
 KYGYGYNYYDYSG(PNA(A)) (SEQ ID 59)
 GYGYGYGYNYAYG(PNA(A)) (SEQ ID 60)
 5 DYGYEYEG(PNA(A)) (SEQ ID 61)

14. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que alquilo en R₁ y R₂ es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 5, preferentemente 1 a 3, con más preferencia 1 o 2 átomos de carbono.

10 15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que R₁ es -CH₂CH₂NH₂ en la fórmula (XLI).

16. Compuesto según la reivindicación 14, en el que R₂ es -CH₂C(O)OH en la fórmula (XLI).

17. Compuesto según la reivindicación 14, en el que R₁ es -CH₂CH₂NH₂ y R₂ es -CH₂C(O)OH en la
 15 fórmula (XLI).

18. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R₂ es alquilo sustituido con un grupo seleccionado de: -C(O)O~, -C(O)~, -C(O)R'~, siendo R' alquilo o H, -O~ y -NH~; donde ~ representa el enlace que une el PNA(A) al resto aminoácido K o G.