

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 418**

21 Número de solicitud: 201431627

51 Int. Cl.:

**C07C 39/15** (2006.01)  
**C07C 15/18** (2006.01)  
**C07C 211/45** (2006.01)  
**C07C 215/82** (2006.01)  
**C07C 25/18** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/138** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**06.11.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**10.05.2016**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (40.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES;  
WAGENINGEN UNIVERSITEIT (25.0%) y  
INHIBOX LIMITED (35.0%)**

72 Inventor/es:

**MARINA MORENO, Alberto;  
VELIKOVA, Nadya Raycoba;  
FINN, Paul William;  
FULLE, Simeone y  
WELLS, Jerry**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Inhibidores de la histidina quinasa con actividad antibacteriana**

57 Resumen:

Inhibidores de la histidina quinasa con actividad antibacteriana.

La presente invención se refiere a un grupo de compuestos con actividad inhibidora de la autofosforilación y actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* entre otras, y al uso de dichos compuestos para la fabricación de antibióticos.

ES 2 569 418 A2

**Inhibidores de la histidina quinasa con actividad antibacteriana**

**DESCRIPCIÓN**

5 La invención se refiere a un grupo de compuestos con una mayor actividad de inhibición de la autofosforilación y la actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Por lo tanto, los compuestos de la invención son útiles para la fabricación de antibióticos.

10

**ESTADO DEL ARTE**

Hay una necesidad urgente de descubrir nuevos antibacterianos para combatir el creciente problema mundial de-resistencia a los antibióticos. Los *sistemas de dos componentes* (TCS, *Two-component systems*) se han propuesto durante casi dos décadas como prometedoras dianas para el diseño de drogas antibacterianas. Los TCS están altamente presentes en bacterias y se utilizan para la transducción de señales, pero no están presentes en los mamíferos, por lo que son atractivas dianas para el diseño de medicamentos (Casino, P., V. Rubio, and A. Marina, *The mechanism of signal transduction by two-component systems*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(6): p. 763-71). Además, los TCS están involucrados en la regulación de una variedad de procesos relacionados con la patogenicidad bacteriana, incluyendo la virulencia, la formación de biopelículas, la resistencia a los antibióticos, y la persistencia bacteriana. Algunos TCS son esenciales o condicionalmente esenciales para el crecimiento bacteriano. Además, el alto grado de conservación entre los sitios activos de los TCS y la existencia de múltiples TCS en cada bacteria sugieren que debería ser posible identificar un inhibidor de múltiples redes de regulación de TCS con un amplio espectro de actividad. En general, es de esperar que atacar a los TCS efectivamente incapacite a las bacterias para adaptarse a los cambios ambientales y fisiológicos.

30

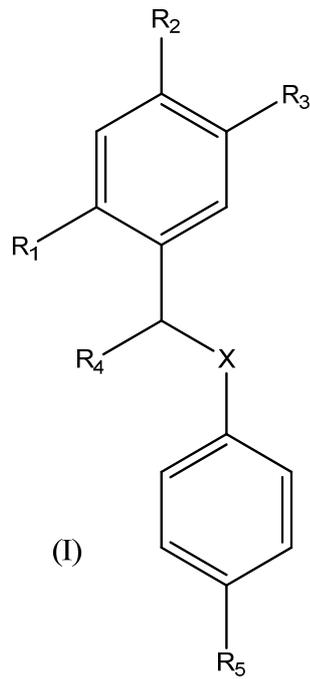
Un TCS prototípico consiste en una histidina quinasa (HK) unida a la membrana y un regulador de respuesta asociado (RR, *response regulator*) con actividad transcripcional (Casino, P., V. Rubio, and A. Marina, *The mechanism of signal transduction by two-component systems*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(6): p. 763-71).

35

Al detectar los estímulos ambientales, la HK se autofosforila en residuo de histidina conservado (His). Posteriormente, el grupo fosforilo unido a His es transferido a un residuo conservado de ácido aspártico (Asp) en el dominio receptor (RECs, *receiver domains*) de los RR asociado. Para algunos RRs se ha demostrado que la fosforilación altera su afinidad de unión a los sitios de operador alterando la transcripción de genes, un proceso que es debido a cambios conformacionales y a la dimerización del RR. La autofosforilación de la HK comprende dos dominios bien conservados, un dominio de dimerización e histidina-fosfotransferasa (DHp, *histidine phosphotransfer domain*) que contiene la His fosfo-aceptora y un dominio C-terminal catalítico de unión a ATP (CA) que fosforila la His a través de la hidrólisis de ATP. La secuencia y estructura de aminoácidos del dominio de unión a ATP está bien conservado y así se espera que los inhibidores de interfieran con la unión del ATP al dominio CA puedan inhibir múltiples TCS (Casino, P., V. Rubio, and A. Marina, *The mechanism of signal transduction by two-component systems*. *Curr Opin Struct Biol*, 2010. **20**(6): p. 763-71).

#### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



5 donde

$R_1$  y  $R_2$  se seleccionan independientemente de H o OH,

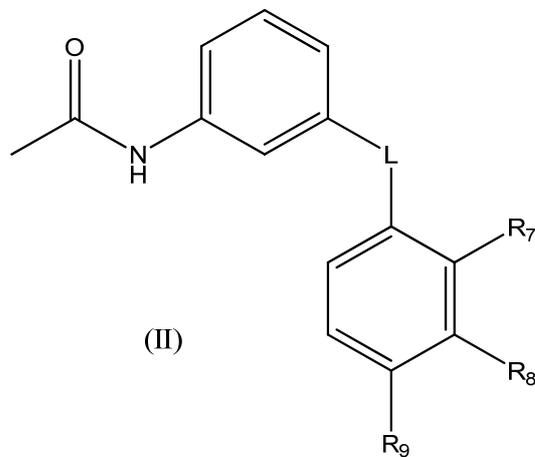
$R_3$  y  $R_4$  se seleccionan independientemente de H o alquilo  $C_1-C_4$ ,

X se selecciona entre NH o  $CHR_6$ , siendo  $R_6$  alquilo  $C_1-C_4$  y

$R_5$  se selecciona de H o halógeno;

10

o un compuesto de fórmula (II):



donde:

L es un enlace sencillo o un grupo  $-(R_{10})_n-NH-R_{11}-$ , siendo n seleccionado entre 0 o 1 y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  el mismo o diferente alquileo  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido por un alquilo  $C_1-C_4$ ,

5  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$  se seleccionan independientemente entre H o halógeno,

o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un antibiótico.

10 En una realización preferida del compuesto de fórmula (I), X es  $CHR_6$ , y preferiblemente  $R_6$  es etilo.

Preferiblemente,  $R_1$  y  $R_3$  son H.

15 Preferiblemente,  $R_2$  es OH.

Preferiblemente,  $R_4$  es etilo.

Preferiblemente,  $R_5$  es halógeno, y más preferiblemente flúor.

20

En otra realización preferida del compuesto de fórmula (I), X es NH.

Preferiblemente,  $R_1$  es OH.

Preferiblemente,  $R_2$  y  $R_4$  son H.

25

Preferiblemente,  $R_3$  es terc-butilo.

Preferiblemente,  $R_5$  es H.

30 En una realización preferida del compuesto de fórmula (II), L es un enlace sencillo.

Preferiblemente,  $R_7$  es halógeno, y más preferiblemente cloro.

Preferiblemente,  $R_8$  y  $R_9$  son H.

En otra realización preferida del compuesto de fórmula (II), L es un grupo  $-(R_{10})_n-NH-R_{11}-$ .

Preferiblemente, n es 0.

5

Preferiblemente,  $R_{11}$  es etil-metileno.

Preferiblemente,  $R_9$  es halógeno, y más preferiblemente flúor.

10

Preferiblemente, n es 1.

Preferiblemente,  $R_{10}$  es metil-metileno.

Preferiblemente,  $R_{11}$  es metileno.

15

Preferiblemente,  $R_7$  y  $R_9$  son H.

Preferiblemente,  $R_8$  es halógeno y más preferiblemente bromo.

20

En otra realización preferida, se selecciona el compuesto de fórmula (I) de la lista que consiste en:

- 4- (4- (4-fluorofenil) hexan-3-il) fenol y
- 4-terc-butil-2 - ((fenilamino) metil) fenol

25

En otra realización preferida, se selecciona el compuesto de fórmula (II) a partir de la lista que consiste en:

- N- (3- (1- (4-fluorofenil) propilamino) fenil) acetamida,
- N- (3- (1- (3-bromobencilamino) etil) fenil) acetamida y
- N- (2 '-clorobifenil-3-il) acetamida.

30

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infecciones causadas por bacterias.

En una realización preferida, la bacteria se selecciona del género *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter* y *Enterococcus*.

5

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o fórmula (II).

10

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de prevención o de tratamiento o de prevención de una infección bacteriana, en un animal, un mamífero o un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (I) o de fórmula (II), opcionalmente en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo suficiente para producir el efecto deseado en el que se atenúan los síntomas de la enfermedad. La dosis no debe ser utilizada en proporciones que causen efectos secundarios no deseados, una evaluación clínica adversa y que la hace terapéuticamente intratable. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente y la ruta y frecuencia de administración y puede ser determinado en cada caso.

20

25

Los compuestos de la presente invención representado por la fórmula (I) o por la fórmula (II), y más específicamente, los compuestos específicos que pertenecen a las fórmulas generales descritas anteriormente pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros individuales, enantiómeros o diastereoisómeros y las mezclas de los mismos pertenecen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse por técnicas convencionales.

30

35

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o en forma de solvato, con la intención de que ambas formas estén dentro del

alcance de la presente invención. En este sentido, el término "solvato", como se usa aquí, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, en otras palabras, solvatos del compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) que se puede utilizar para producir un medicamento, así como solvatos farmacéuticamente inaceptables, que pueden ser  
5 útiles para producir solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica a condición de que sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos de solvatación convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

10

Para la aplicación terapéutica, los compuestos de fórmula (I) o de fórmula (II), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, vendrán preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, en otras palabras, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo medicamentos estándar  
15 tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosis estándar. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente mayores que el 70%, más preferiblemente mayores que el 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II), o las sales, solvatos o profármacos  
20 de los mismos.

A menos que se especifique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen dicha  
25 estructura, con exclusión de la sustitución de hidrógeno con un deuterio o un tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o nitrógeno enriquecido con  $^{15}\text{N}$ , están dentro del alcance de la invención.

Los compuestos de fórmula (I) o de fórmula (II) para uso terapéutico se preparan en  
30 forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Estas preparaciones se pueden administrar a través de cualquier vía de administración apropiada, por lo cual dicha preparación se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración seleccionada. En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) proporcionado por esta invención se administra por vía oral,  
35 tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica,

intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas para la administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para obtener de ellos se puede encontrar, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, SA Ediciones, Madrid, o en otras farmacopeas estándar o similares de España y los EE.UU..

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados en combinación con otros fármacos adicionales con el fin de proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, se puede proporcionar en forma de una composición separada para su administración simultánea o no con la administración de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II), o profármaco farmacéuticamente aceptable, solvato, derivado o sal del mismo.

En la presente invención el término "alquilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustitutos tales como halógeno (conocido como haloalquilo), hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, cian, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "alquilenos" se refiere en la presente invención a bi-radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas y comprenden de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), propileno (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), isopropileno, isobutileno, butileno o butileno terciario. Estos grupos alquilenos pueden estar sustituidos con cadenas de alquilo preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, tales como, metil-metileno, acetato-metileno, propil-metileno, etc.

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto

ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica de la presente invención. En toda la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Muestra la autorradiografía de geles SDS-PAGE utilizados para analizar la actividad quinasa de PhoR<sup>S</sup>, PhoR<sup>E</sup> y WalK en presencia de compuestos A5, A6, B7, B13 y B14 o en presencia de DMSO (control negativo).

15

**FIG. 2.** Muestra el autorradiografía de geles SDS-PAGE utilizados para calcular los valores de IC<sub>50</sub> y el ajuste de curvas generadas con el software GraphPad Prisma utilizando dichos datos. A) IC<sub>50</sub> A5 para PhoR<sup>S</sup>, PhoR<sup>E</sup> y WalK, B) IC<sub>50</sub> A6 para PhoR<sup>S</sup>, PhoR<sup>E</sup> y WalK, C) IC<sub>50</sub> B7 para PhoR<sup>S</sup>, PhoR<sup>E</sup> D) IC<sub>50</sub> B13 para PhoR<sup>S</sup>, PhoR<sup>E</sup>. E) IC<sub>50</sub> para B14 PhoR<sup>S</sup>.

20

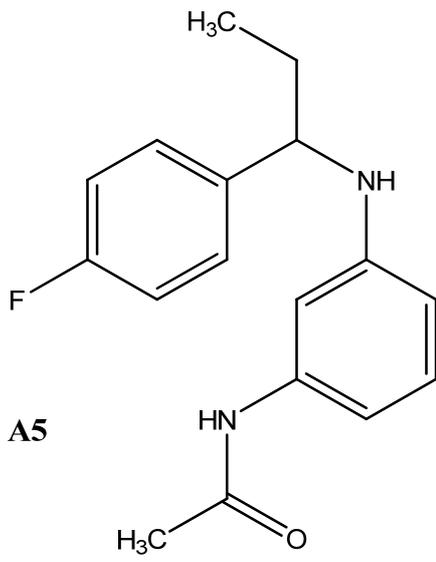
**FIG. 3.** Muestra el PAGE nativo con PhoR<sup>S</sup> y PhoR<sup>E</sup> para los compuestos A5, A6, B7, B13 y B14.

25

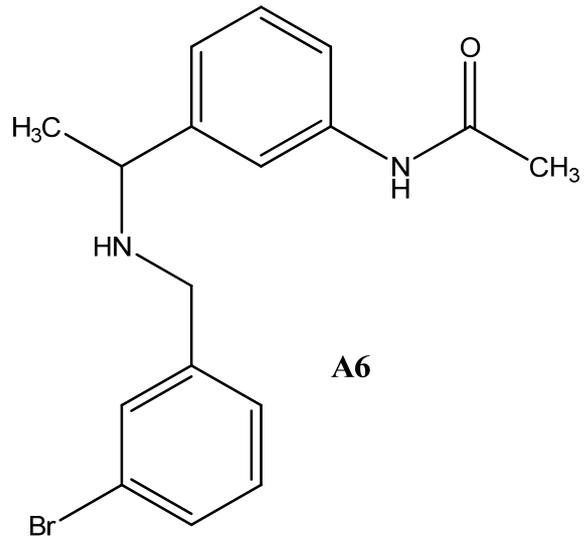
### EJEMPLOS

Los ejemplos se llevaron a cabo con los siguientes compuestos de fórmula (I) o de fórmula (II), que se obtuvieron de bibliotecas químicas:

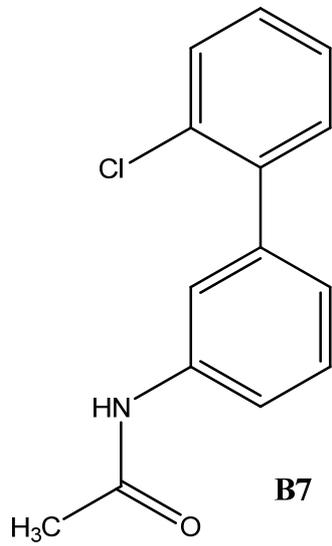
30



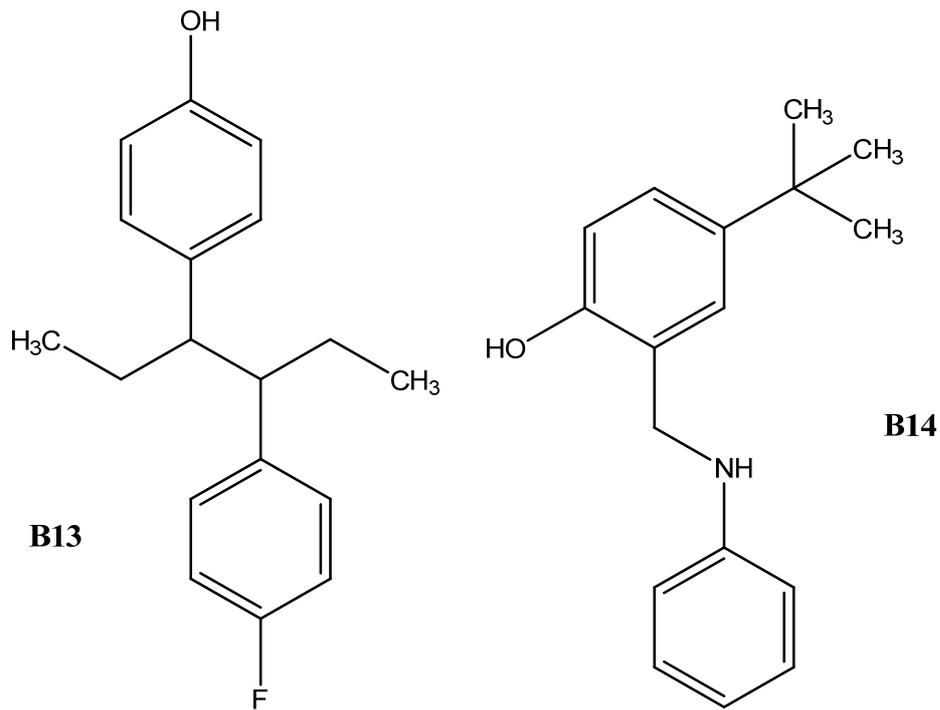
A5



A6



B7



5 **1. Ensayo de inhibición de la actividad quinasa de los compuestos de la invención.**

**A) Clonación**

10 El gen de Walk de *Streptococcus pneumoniae* que codifica la porción catalítica (dominios DHp y CA) del gen Walk (aminoácidos 208-449) fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *S. pneumoniae* CDC3059-06 usando los siguientes cebadores: 5'-3'-aagttctgtttcagggcccgatggagcaggagaaggaagaacgc (SEQ ID 1) y reverso 5'-atggtctagaaagctctagtcttctactcatccac-3' (SEQ ID 2). El producto de PCR se purificó con el kit "PCR product purification" (Macherey-Nagel, Alemania) y se clonó en

15 un vector pOpinF (amablemente proporcionado por Nick Berow, IRB, España) previamente linealizado con los enzimas de restricción KpnI y HindIII (Fischer Scientific, España) y purificado por electroforesis en gel de agarosa. El inserto se clonó en el vector pOpinF con el sistema de clonación In-Fusion HD (Clontech, EE.UU.). Los clones positivos fueron confirmados por PCR para en inserto a partir de las colonias y

20 posterior secuenciación de ADN de los productos de PCR.

**B) Expresión y purificación de proteínas**

Las porciones catalíticas (dominios DHp y CA) de *E. coli* phoR (PhoR<sup>E</sup>), *S. aureus* phoR (PhoR<sup>S</sup>) y Walk (Walk) se expresó en la cepa de *E. coli* BL21-CodomPLus RIL (Stratagene) a partir de plásmidos que contienen los genes que codifican para las proteínas correspondientes. La cantidad requerida de medio Luria Broth (LB) suplementado con 0,1 mg/ml de antibiótico se inoculó con un pre-cultivo de una noche (1/50 del volumen de cultivo). En la fase exponencial (OD<sub>600</sub>=0,2 - 0,4) se indujo la expresión de la proteína por la adición de 1 mM IPTG durante 3 a 5 horas a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g durante 25 min a 4°C y los sedimentos se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis (100 mM Tris pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,1 mM PMSF) y se sonicaron a 4°C. Tras la sonicación, los restos celulares y el sobrenadante se separaron por centrifugación a 11000 g durante 60 min a 4 °C. PhoR<sup>S</sup> y PhoR<sup>E</sup> se purificaron del sobrenadante por cromatografía de afinidad y de exclusión molecular usando columnas HisTrap HP y Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Walk se purificó a partir los restos de células que se resuspendieron en tampón de lisis que contenía urea 2 M y se incubó durante la noche a 4°C con rotación. Después de centrifugación a 11000 g, el sobrenadante se inyectó en una columna de cromatografía de afinidad HisTrap HP (GE Healthcare) equilibrada y se lavó con tampón de lisis y se eluyó con el mismo tampón suplementado con 0,5 M de imidazol. Las proteínas se concentraron con filtros de centrifugación AmiconUltra (Millipore), se alícuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

**25 C) Ensayo de actividad quinasas**

Ensayo de actividad quinasa se realizó en tampón de quinasa (Tris HCl 50 mM pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 0,5 mM y DTT 0,1 mM) a 25°C con 0,12 mg/ml (≈4 μM HK) de proteína en 35 μl de volumen. Las reacciones de autofosforilación se iniciaron mediante la adición de ATP a 0,03 a 0,06 mM (concentraciones finales) conteniendo 0,1 μCi/μl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. La reacción de autofosforilación se finalizó a los puntos de tiempo indicados con tampón de muestra de SDS-PAGE 2x suplementado con EDTA 50 mM. La inhibición de la autofosforilación de HKs se determinó mediante la adición de hasta 20 mM de compuesto al ensayo de quinasas. Cuando se comparó

la capacidad inhibidora de los ligandos y la medición de  $IC_{50}$ , la concentración final de DMSO en el ensayo fue 10% (v/v). Se llevaron a cabo en paralelo controles que carecen de ligandos que contenían una concentración igual de DMSO. Las muestras se aplicaron sin calentamiento a geles del 15% (w/v) de poliacrilamida Tris-glicina-  
5 SDS. Después de la electroforesis, se eliminaron la parte inferior de los geles para reducir la señal de fondo del ATP radiomarcado no incorporado. Los geles se secaron sin teñir en un sistema de secado de geles al aire de Bio-Rad (Bio-Rad Gel Air drying system) y la proteína fosforilada se cuantificó por fosfo-imaging empleando un Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (Fuji) y fueron evaluados con el software MultiGauge (Fuji).  
10 El  $IC_{50}$  es la concentración a la que se observó 50% de actividad enzimática residual en comparación con el control negativo, DMSO. Se utilizó Prisma GraphPad para el ajuste de la curva y el análisis estadístico.

#### **D) Inhibición de la actividad de autofosforilación HK por los compuestos**

La actividad inhibidora de los compuestos A5 y A6 sobre la autofosforilación de HKs fue probado inicialmente *in vitro* usando tres diferentes HKs: El HK PhoR altamente extendida en bacterias, seleccionando un representante de Gram negativas (*E. coli*; PhoR<sup>E</sup>), y un representante de Gram positivas (*S. aureus*; PhoR<sup>S</sup>) y la HK de *S. pneumoniae* Walk (Walk) como representante del TCS esencial WalkR, omnipresente entre las bacterias Gram positivas. Como una forma rápida de comparar la capacidad inhibitoria de la autofosforilación de los compuestos seleccionados, los ensayos de actividad quinasa se realizaron a una concentración del compuesto individual elevada (5 mM) y a un único tiempo (30 segundos) (Fig. 1). Los ensayos de quinasa con Walk,  
20 PhoR<sup>E</sup> y PhoR<sup>S</sup> revelaron que los compuestos A5 y A6 tenían una alta actividad inhibidora y eran inhibidores generales de la autofosforilación de HKs (Tabla 1). A5 y A6 inhiben la actividad de autofosforilación HK de una manera dependiente de la dosis, con  $IC_{50}$  en el rango alto micromolar/milimolar (Fig. 2 y Tabla 1). A5 inhibe PhoR<sup>E</sup>, PhoR<sup>S</sup> y Walk con un  $IC_{50} \approx 1000 \mu\text{M}$  y parece que no es soluble en tampón de quinasa en presencia de DMSO al 10% a concentraciones superiores a 1,3 mM (Figura 2 y Tabla 1). A6 inhibe la autofosforilación de PhoR<sup>E</sup>, PhoR<sup>S</sup> y Walk con  $IC_{50}$  de 372  $\mu\text{M}$ , 1141  $\mu\text{M}$  and > 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 2 y Tabla 1).  
30

Para evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos B7, B13 y B14, se midió la  
35 inhibición de la autofosforilación en un solo punto de tiempo (30 segundos) usando

una sola concentración (2 mM) de cada inhibidor posible. PhoR<sup>S</sup> y PhoR<sup>E</sup> fueron utilizados como dianas, ya que estos HKs fueron más fuertemente inhibidos por A5 y A6 en comparación con WalK. B7, B14 y B15 inhiben la autofosforilación PhoR<sup>S</sup> y PhoR<sup>E</sup> en más de un 75% y más de un 40% en comparación con el control negativo, respectivamente (Fig. 1). B7 inhibe la autofosforilación PhoR<sup>E</sup> con un IC<sub>50</sub> en el intervalo micromolar bajo ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) y PhoR<sup>S</sup> en el intervalo mayor micromolar/milimolar (IC<sub>50</sub> PhoR<sup>S</sup>  $\geq 1000 \mu\text{M}$ ) (Fig. 2 y Tabla 1). Las curvas de IC<sub>50</sub> indicaron que B7 no es soluble en concentraciones superiores a 1000 mM en tampón de quinasa en presencia de DMSO al 10% (Fig. 2 y Tabla 1). B13 inhibe PhoR<sup>E</sup> y PhoR<sup>S</sup> con IC<sub>50</sub> PhoR<sup>E</sup> < 100  $\mu\text{M}$  y PhoR<sup>S</sup> = 212  $\mu\text{M}$  y poseen buena solubilidad en tampón de quinasa en presencia de DMSO al 10% (Fig. 2 y Tabla 1). El IC<sub>50</sub> de B14 contra PhoR<sup>E</sup> y PhoR<sup>S</sup> es mayor que 2000  $\mu\text{M}$  y superior a 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 2 y Tabla 1).

**Tabla 1:** IC<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados

IC50 [mM]			
Nombre	PhoR <sup>S</sup>	PhoR <sup>E</sup>	WalK
<b>A5</b>	≈ 1	≈ 1	>1
<b>A6</b>	1,14	0,37	>1
<b>B7</b>	≈ 1	≈ 0,1	ND
<b>B13</b>	0,212	0,016	ND
<b>B14</b>	1,48	> 2	ND
ND: No determinado			

## **2. Ensayo de la actividad antibacteriana de los compuestos de la invención.**

20

### **A) Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas utilizadas para las pruebas de sensibilidad antibacteriana se enumeran en la Tabla 2. La cepa *Escherichia coli* uropatógena CFT 073, el *S. aureus* DSM 20231, el *S. epidermidis* DSM 20044 se obtuvieron de la Colección Alemana de

25

microrganismos y cultivos celulares (DSMZ). Las cepas *S. aureus* 25293, *S. epidermidis* RP62A y RP62A/1, *E. coli* 25276, *Klebsiella pneumoniae* 700603, y *Pseudomonas aeruginosa* 27853 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Seis aislados clínicos de MRSA (127/08, 145/08, 274/08, V4180, S908, and T4/6) se obtuvieron de las heridas de los pacientes ingresados en el hospital Tawam (Al Ain, Emiratos Árabes Unidos). La caracterización de las cepas como MRSA por tipificación multilocus de secuencias (MLST), tipificación cromosómica del casete estafilocócico (SCCmec), la tipificación del gen regulador accesorio (*agr*), la tipificación de la proteína A de *Staphylococcus* (*spa*), y el portar un gen de toxina ha sido descrito anteriormente. Las cepas de MRSA eran resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos probados y a un rango de antibióticos no- $\beta$ -lactámicos.

Tres aislados de *S. epidermidis* (T7/3, T6/19, and T37/8) se obtuvieron de las heridas de los pacientes ingresados en el hospital Tawam (Al Ain, Emiratos Árabes Unidos). La cepa productora de biofilm *Staphylococcus epidermidis* RP62A produce un polisacárido intercelular de adhesión que protege a estas bacterias de los componentes del sistema inmune innato humano. La secuencia de su genoma completo se encuentra en el GenBank: NC002976. *S. epidermidis* RP62A/1 es una variante estable de RP62A que no es productora de biofilm.

Cinco cepas independientes bien caracterizadas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* (NM8, NM35, NM75, NM109 y NM124) y tres cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (B32/1, B5/5, and B6/2) se incluyeron en el estudio. Estas cepas fueron aisladas en cuatro diferentes hospitales de Abu Dabi, Emiratos Árabes Unidos y sus linajes clonales y susceptibilidades antibióticas se han descrito anteriormente.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas empleadas en los test de susceptibilidad

<b>Cepa</b>	<b>Fuente</b>	<b>Resistencia</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	DSMZ	Cepa control
<i>Staphylococcus aureus</i> 25293	ATCC	Cepa control
<i>Staphylococcus aureus</i> 274/08	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos, Ka, Ne, C, E
<i>Staphylococcus aureus</i> V4180	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos, A, G, Ka, Ne, S, Sxt, Tet, C, Rif, E, Cl
<i>Staphylococcus aureus</i> T4/6	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos, Ka, Ne, C, E, Cl
<i>Staphylococcus aureus</i> 145/08	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos, Ka, Ne, S, Tet, Fu
<i>Staphylococcus aureus</i> 127/08	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos
<i>Staphylococcus aureus</i> S908	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	$\beta$ -lactámicos, C, E, Cl
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 20044	DSMZ	Cepa control
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A (productora de biofilm)	ATCC	Cepa control
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A/1(no productora de biofilm)	ATCC	Cepa control
<i>Staphylococcus epidermidis</i> T7/3	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> T37/8	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> T61/9	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	

<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39		Cepa control
<i>Streptococcus pneumoniae</i> DP1004		Cepa control
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 [		Cepa control
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	ATCC	Cepa control
<i>Streptococcus suis</i> 3881/ S10 [	CVI, Lelystad	
<i>Acinetobacter baumannii</i> NM109	Hospitals in Abu Dhabi Emirate, UAE	Todos los antibióticos usados normalmente para tratar infecciones de <i>Acinetobacter</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> NM124	Hospitals in Abu Dhabi Emirate, UAE	Todos los antibióticos usados normalmente para tratar infecciones de <i>Acinetobacter</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> NM8	Hospitals in Abu Dhabi Emirate, UAE	Todos los antibióticos usados normalmente para tratar infecciones de <i>Acinetobacter</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> NM35	Hospitals in Abu Dhabi Emirate, UAE	Todos los antibióticos usados normalmente para tratar infecciones de <i>Acinetobacter</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> NM75	Hospitals in Abu Dhabi Emirate, UAE	Todos los antibióticos usados normalmente para tratar infecciones de <i>Acinetobacter</i>
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> B5/5	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	meropenem
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> B6/2	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	meropenem
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> B32/1	Tawam Hospital, Al Ain, UAE	meropenem
<i>Escherichia coli</i> CFT 073	ATCC	Cepa control
<i>Escherichia coli</i> 25276	ATCC	Cepa control
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	ATCC	Cepa control
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	ATCC	Cepa control

**B) Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos**

Las cepas se propagaron utilizando procedimientos microbiológicos estándar; *S. pneumoniae* se cultivó en caldo de Todd Hewitt suplementado con 0,5% de extracto de levadura y 200 Unidades/ml de catalasa y *S. suis* se cultivó en caldo de Todd Hewitt.

Para todos los microorganismos ensayados excepto *S. pneumoniae*, las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) se determinaron como se ha descrito anteriormente en la literatura, siguiendo un método de doble dilución estándar. Las MICs se registran como la concentración más baja del compuesto en la que no se observó crecimiento visible. Después de sembrar las diluciones alrededor del MIC, se registró el MBC (*Minimal Bactericidal Concentrations*) como la concentración más baja del compuesto a la que no se formaron colonias después de 24 horas de incubación a 37°C. Para *S. pneumoniae*, los MICs se determinaron mediante la adaptación del método de doble dilución estándar de este microorganismo (uso de THY con 200 U/ml de catalasa y monitoreo continuo de crecimiento) a condiciones anaeróbicas. Las MBC para *S. pneumoniae* se determinaron mediante inoculación de 10 µl de cada pocillo que no muestran el crecimiento bacteriano visible en placas de medio Todd Hewitt con 0,5% de extracto de levadura 3% de agar sangre. Después de 24 h de incubación a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>, la primera dilución donde crecieron tres colonias o menos se anotó como el MBC, tal como se describe por el CLSI se utilizó para el inóculo de inicio 1 x 10<sup>5</sup> CFU / ml.

**C) Actividad antibacteriana de los compuestos en las cepas de referencia de laboratorio**

Para evaluar el efecto antibacteriano de los compuestos sus concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) y las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) se determinaron para algunas cepas bacterianas de referencia de laboratorio Gram positivas (*S. aureus* DSM 20231 y *S. epidermidis* DSM 20044) y Gram negativas (*E. coli* UCF 073). A5 y A6 fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano a altas concentraciones de compuesto lo que coincide con su baja actividad inhibitoria sobre las HKs (Tabla 3). El crecimiento de *S. epidermidis* fue inhibido por A5 y A6, mientras que el crecimiento de *E. coli* sólo fue inhibido por A6, en todos los casos con una

modesta MICs de 500 µg/ml que están en línea con la baja afinidad por HK sugerido por el IC<sub>50</sub> medido (Tabla 1 y Tabla 3). Ambos compuestos son bacteriostáticos contra las tres cepas bacterianas en el intervalo de concentración ensayado (MBC > 500 µg/ml). B7 era bacteriostática para *S. aureus* DSM 20231 con un MIC de 250 µg/ml (Tabla 3). B13 fue bactericida para *S. aureus* DSM 20231 y *S. epidermidis* DSM 20044 con el MIC de 8 y 1 µg/ml, respectivamente, y MBC de 33 y µg/ml, respectivamente (Tabla 3). Además B14 era bactericida para *S. aureus* DSM 20231 y *S. epidermidis* DSM 20044 con una MIC y MBC de µg/ml (Tabla 3).

10 **Tabla 3.** Efecto antibacteriano de los compuestos contra cepas de referencia de laboratorio

Nombre	MIC [µg/ml]			
	<i>S. aureus</i> DSM 20231	<i>S. epidermidis</i> DSM 20044	<i>E. coli</i> CFT 073	<i>S. pneumoniae</i>
A5	>500	500 <sup>§</sup>	>500	
A6	>500	500 <sup>§</sup>	500 <sup>§</sup>	
B7	250 <sup>#</sup>	>500	>500	
B13	8 <sup>¥</sup>	1 <sup>¥</sup>	>500	
B14	500 <sup>¶</sup>	500 <sup>¶</sup>	>500	

<sup>§</sup> MBC > 500 µg/ml

<sup>#</sup> B7 *S. aureus* MBC > 500 µg/ml

<sup>¥</sup> B13 MBC *S. aureus* 31 µg/ml; B13 MBC *S. epidermidis* 8 µg/ml

15 <sup>¶</sup> B14 MBC *S. aureus* y B14 MBC *S. epidermidis* 500 µg/ml

#### D) La actividad antibacteriana de los compuestos en los aislados clínicos de bacterias resistentes a múltiples fármacos

20

Los compuestos B7, B13 y B14 se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de cepas resistentes a la metilina bien caracterizadas en aislamientos clínicos de *S. aureus* (MRSA) y aislados clínicos de *S. epidermidis*, así como cepas de referencia de *S. pneumoniae* y *S. suis* y cepas adicionales de referencia de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Dado que B7, B13 y B14 se esperaba que

25

inhibieran la autofosforilación de múltiples HKs, incluyendo HKs de especies Gram-negativas, también fueron probados sus efectos antibacterianos contra aislados clínicos resistentes a múltiples fármacos de los importantes patógenos *A. baumannii* y *S. maltophilia* y en contra de cepas de referencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 2 y Tabla 4). B7 inhibió el crecimiento de dos de las seis cepas MRSA testadas *in vitro* con MICs  $\geq 250$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lo cual era comparable a las MICs para las cepas de referencia de *S. aureus* 25293 y DSM 202231. Las otras cuatro cepas MRSA no fueron susceptibles a B7. Como era de esperar a partir de los resultados de los ensayos antibacterianos con cepas de referencia de laboratorio, el compuesto B7 no tuvo ningún efecto inhibitor sobre el aislado clínico de *S. epidermidis* DSM 20044 y no se probó con las otras cepas de *S. epidermidis* (Tabla 3 y Tabla 4). B7 inhibe el crecimiento de todas las cepas probadas de *S. pneumoniae* con un MIC de 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que era similar a las MICs para las cepas de referencia de *S. aureus*. B7 no inhibió el crecimiento de la cepa de *S. suis* en el intervalo de concentración ensayado ( $\leq 500$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Tabla 4).

B13 inhibió el crecimiento de todas las cepas de MRSA probadas con el MIC entre 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que fue comparable a la MIC para las cepas de referencia de *S. aureus*. B13 también inhibió el crecimiento de los aislados clínicos de *S. epidermidis* con un MIC entre 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que es similar a las MIC para la cepa formadora de biofilm *S. epidermidis* RP62A y no formadora de biofilm *S. epidermidis* RP62A/1. Al igual que B7, B13 inhibió el crecimiento de las cepas de *S. pneumoniae* con el MIC de 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  comparable a las MICs contra las otras cepas bacterianas Gram positivas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. suis* (Tabla 4).

B14 inhibe el crecimiento de MRSA con una MIC de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que era comparable a la MIC para las cepas de referencia de *S. aureus*. B14 inhibe el crecimiento de todas las cepas de *S. epidermidis*, excepto la cepa RP62A, con MICs en el rango de 250 a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . B14 no era activo frente a cepas de *S. pneumoniae* pero inhibió el crecimiento de la *S. suis* S10 con el MIC de 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Tabla 4)

A pesar de que los inhibidores de HK seleccionados, B7, B13 y B14, inhiben PhoR<sup>E</sup> y sus homólogos están presentes en muchas especies Gram negativas, sólo B14 inhibe el crecimiento de la cepa Gram negativa *A. baumannii* y *S. maltophilia* y la MIC era relativamente alta en comparación a la de los patógenos Gram-positivos ( $\geq 250$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

a 500 µg/ml). Ninguno de los inhibidores seleccionados inhibe el crecimiento de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* a la concentración más alta ensayada (MIC > 500 µg/ml) (Tabla 4).

5 **Tabla 4:** Efecto antibacteriano de los inhibidores de HK seleccionados contra las cepas de referencia (marcadas con \*) y aislados clínicos multi-resistentes

Cepa	MIC (µg/ml)		
	B7	B13	B14
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>			
DSM 20231*	250	8	500
25293*	125	8	125
274/08	250	16	250
V4180	>500	8	250
T4/6	250	8	250
145/08	>500	8	250
127/08	>500	16	250
S908	>500	16	250
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>			
DSM 20044*	>500	1	500
RP62A*	>500	8	>500
RP62A/1*	>500	8	500
T7/3	>500	8	250
T37/8	>500	16	500
T6119	>500	8	500
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>			
DP1004*	128	16	>500
TIGR4*	128	16	>500
ATCC 49619*	128	16	>500
<b><i>Streptococcus suis</i></b>			
3881/ S10	> 500	8	125
<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>			
NM109	>500	>500	250
NM124	>500	>500	250
NM8	>500	>500	500
NM35	>500	>500	500
NM75	>500	>500	500
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>			
B5/5	>500	>500	500
B6/2	>500	>500	500
B32/1	>500	>500	500

### **3. Prueba de actividad no específica de los compuestos de la invención**

#### **A) Análisis de agregación por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo**

5

La agregación de proteínas ha sido descrito como un mecanismo de inhibición no específica de HKs para varios compuestos. Para descartar que los compuestos descritos en la invención median la inhibición HKs por este mecanismo, la capacidad de agregación de los compuestos se analizó utilizando PhoR<sup>E</sup> y PhoR<sup>S</sup> como proteína modelo. PhoR<sup>E</sup> y PhoR<sup>S</sup> (0,12 µg/ml, concentración final) se prepararon en tampón de quinasa. Los compuestos se añadieron a una concentración final de 5 mM o 2 mM de A5 y A6 o B7, B13 y B14, respectivamente. El DMSO se mantuvo en los ensayos a una concentración final de 10% (V/V). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se añadió tampón de carga para electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (Native-PAGE) y las muestras se cargaron en geles Tris-glicina de poliacrilamida al 15% (w/v) y tras correr durante 2 horas a 100V se empleó tinción con azul de Coomassie para la visualización de proteínas. Los ensayos mostraron que A5 y A6 a 5 mM o B7, B13 y B14 en 2 mM no eran capaces de inducir la agregación de PhoR<sup>S</sup> o PhoR<sup>E</sup> (Fig. 3).

10

15

20

#### **B) Ensayo de hemólisis**

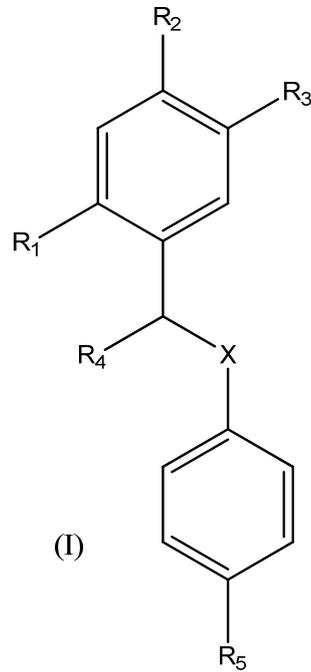
Otro efecto secundario descrito de los inhibidores del TCS publicado anteriormente es el daño de la membrana celular. Para excluir que la actividad antibacteriana de estos compuestos pueda estar mediada por este mecanismo, se testó la actividad hemolítica de B7, B13 y B14. La actividad hemolítica contra eritrocitos humanos tomados de un donante sano se midió mediante la incubación de los eritrocitos con los compuestos hasta concentraciones de 500 µg/ml y el valor LC<sub>50</sub> se registró como la concentración media de compuesto que produce el 50% de hemólisis en tres incubaciones independientes. B7 y B14 no causaron hemólisis a 500 µg/ml (es decir LC<sub>50</sub>> 500 µg/ml). Se observó hemólisis con el compuesto B13 a concentraciones superiores a la MIC (LC<sub>50</sub> 277 µg/ml).

25

30

**REIVINDICACIONES**

1- Uso de un compuesto de formula (I):



5

donde:

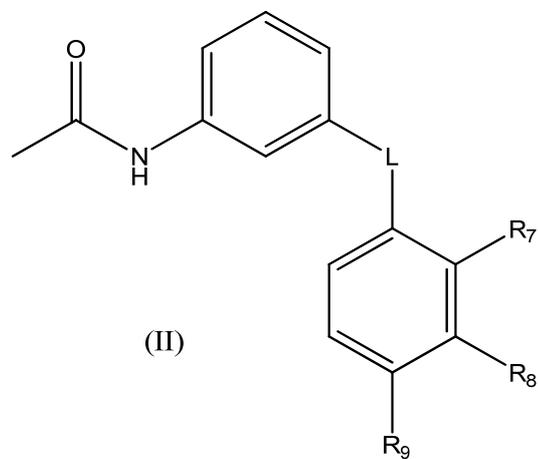
R1 y R2 se seleccionan independientemente de H o OH,

R3 y R4 se seleccionan independientemente de H o alquilo C1-C4,

X se selecciona entre NH o CHR6, siendo R6 alquilo C1-C4 y

10 R5 se selecciona de H o halógeno;

o un compuesto de fórmula (II):



15

donde

L es un enlace sencillo o un grupo  $-(R_{10})_n-NH-R_{11}-$ , siendo n selecciona entre 0 o 1 y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  el mismo o diferente alquileo  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido por un alquilo  $C_1-C_4$ ,

5  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$  se seleccionan independientemente entre H o halógeno,

o cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un antibiótico.

10 2- Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que X es  $CHR_6$ .

3- Uso según la reivindicación anterior, en el que  $R_6$  es etilo.

15 4- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que  $R_1$  y  $R_3$  son H.

5- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que  $R_2$  es OH.

20 6- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que  $R_4$  es etilo.

7- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde  $R_5$  es halógeno.

25 8- Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que X es NH.

9- Uso según la reivindicación anterior, en el que  $R_1$  es OH.

10- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que  $R_2$  y  $R_4$  son H.

30 11- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que  $R_3$  es terc-butilo.

12- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que  $R_5$  es H.

13- Uso de un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 1, en el que L es un enlace sencillo.

5 14- Uso según la reivindicación 13, en el que R<sub>7</sub> es halógeno.

15- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son H.

10 16- Uso de un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 1, en el que L es un grupo -(R<sub>10</sub>)<sub>n</sub>-NH-R<sub>11</sub>-.

17- Uso según la reivindicación 16, en el que n es 0.

15 18- Uso según la reivindicación anterior, en el que R<sub>11</sub> es etilo-metileno.

19- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son H.

20 20- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que R<sub>9</sub> es halógeno.

21- Uso de un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 16, en el que n es 1.

22- Uso según la reivindicación anterior, en el que R<sub>10</sub> es metilo-metileno.

25

23- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, en el que R<sub>11</sub> es metileno.

24- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que R<sub>7</sub> y R<sub>9</sub> son H.

30

25- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que R<sub>8</sub> es halógeno.

35 26- Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en:

- 4- (4- (4-fluorofenil) hexan-3-il) fenol y
- 4-terc-butil-2 - ((fenilamino) metil) fenol

5 27- Uso de un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en:

- N- (3- (1- (4-fluorofenil) propilamino) fenil) acetamida,
- N- (3- (1- (3-bromobencilamino) etil) fenil) acetamida y
- N- (2 '-clorobifenil-3-il) acetamida

10 28- Uso de un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infecciones causadas por bacterias.

15 29- Uso de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que la bacteria se selecciona del género *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter* y *Enterococcus*.

30- Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) según la reivindicación 1.

20

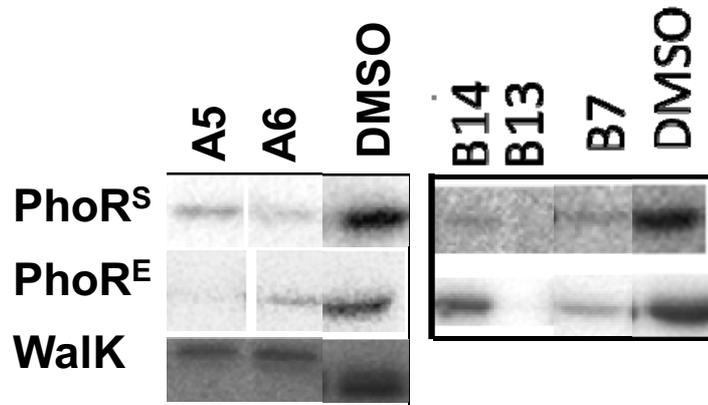
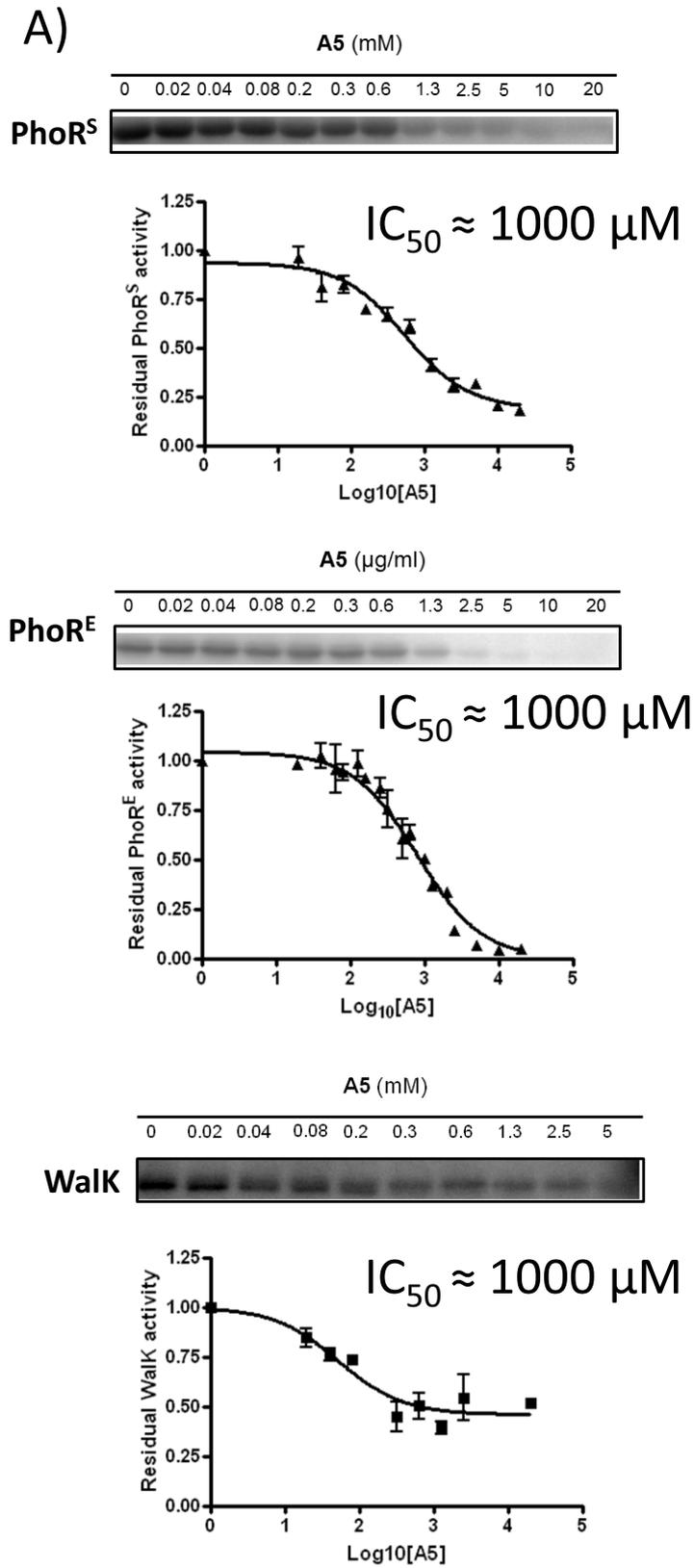


FIG. 1



**FIG. 2**

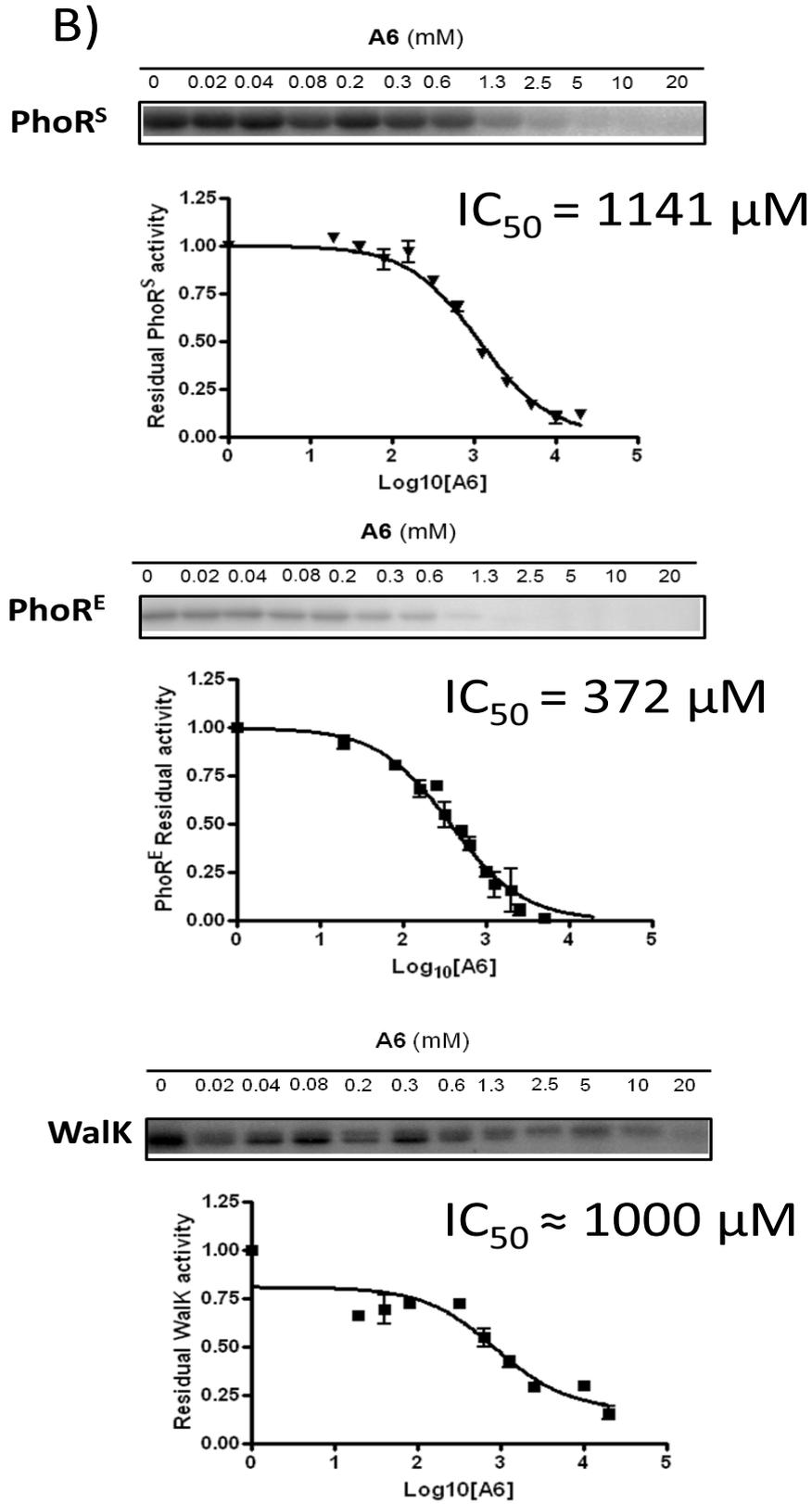


FIG. 2 cont.

C)

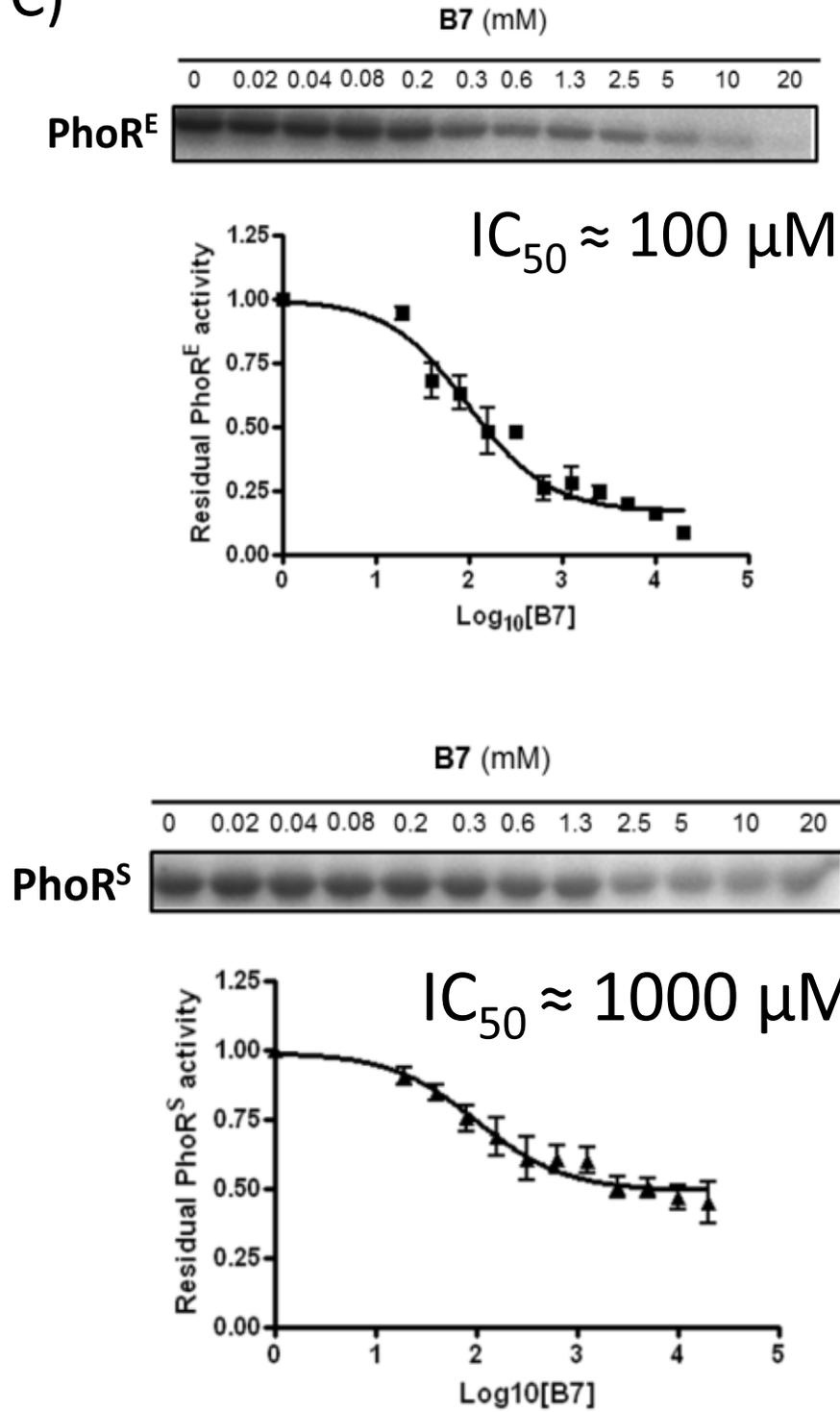


FIG. 2 cont.

D)

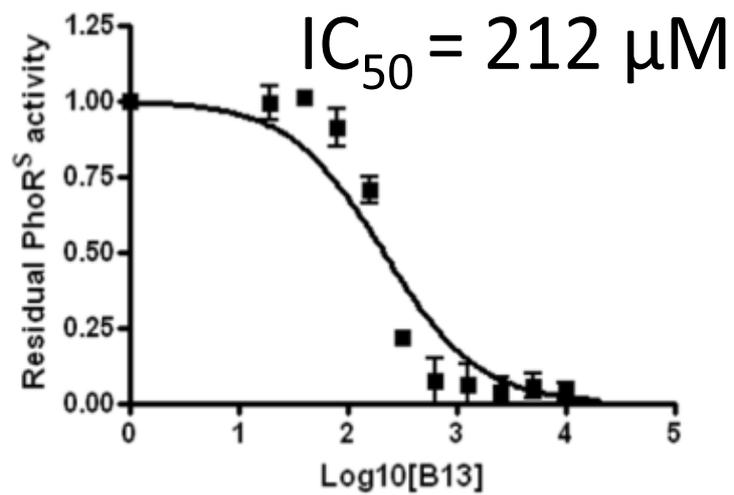
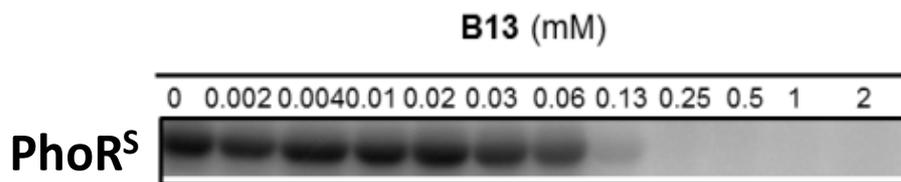
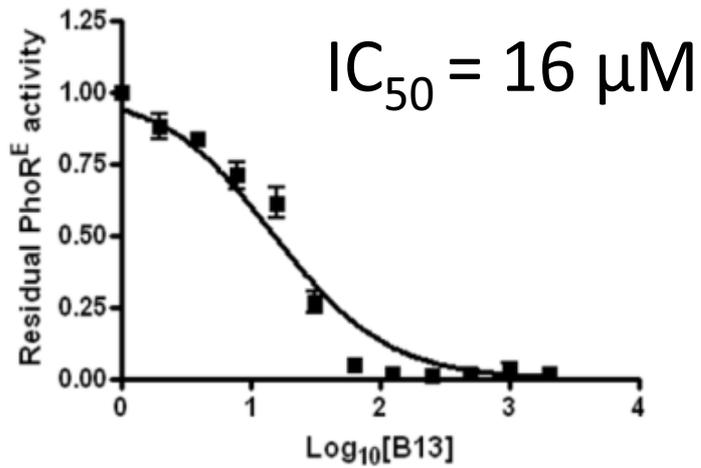
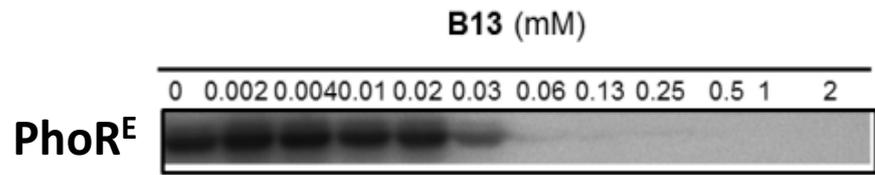


FIG. 2 cont.

E)

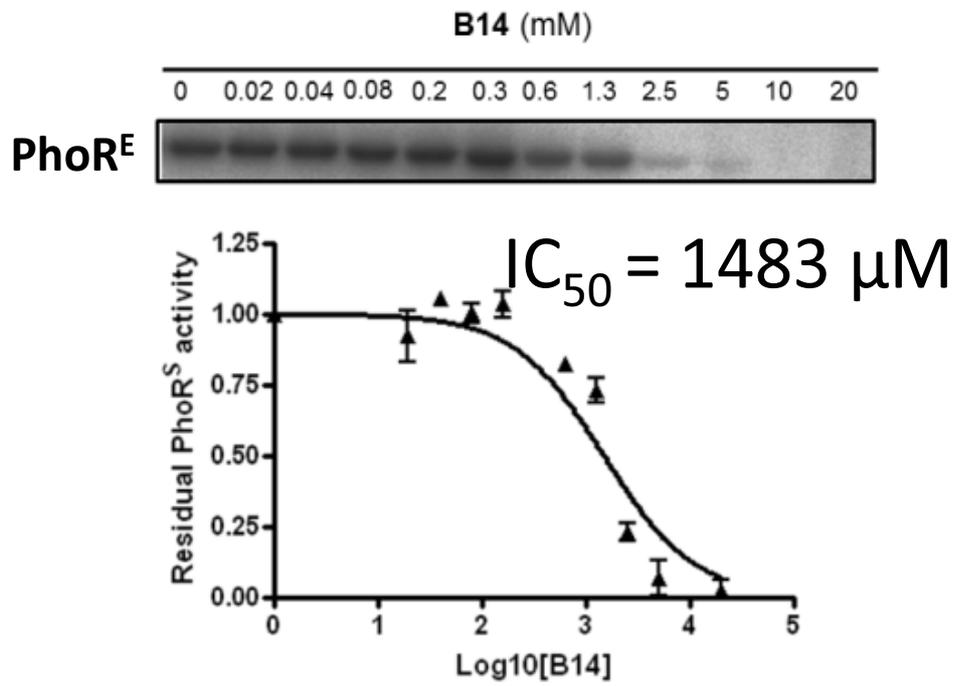


FIG. 2 cont.

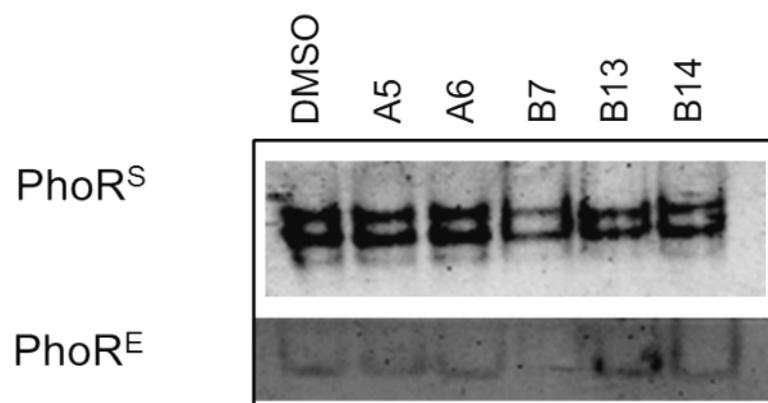


FIG. 3.

# ES 2 569 418 A2

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
WAGENINGEN UNIVERSITEIT  
INHIBOX LIMITED

<120> Inhibidores de la histidina quinasa con actividad antibacteriana

<130> ES1641.1034

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador sentido para la amplificación del gen walk de  
Streptococcus pneumoniae

<400> 1  
aagttctgtt tcagggcccg atggagcagg agaaggaaga acgc 44

<210> 2  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador reverso para la amplificación del gen walk de  
Streptococcus pneumoniae

<400> 2  
atggtctaga aagctctagt cttctacttc atccac 36