

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 188**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/02** (2006.01)  
**C07D 237/20** (2006.01)  
**C07D 279/14** (2006.01)  
**C07K 7/02** (2006.01)  
**C07D 295/192** (2006.01)  
**C07D 295/185** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/GB2010/002024**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051692**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10784830 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2496596**

54 Título: **Péptidos terapéuticos**

30 Prioridad:

**02.11.2009 GB 0919194**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**LYTIX BIOPHARMA AS (100.0%)  
Tromsø Science Park, P.O. Box 6447  
9294 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**STRØM, MORTEN;  
HANSEN, TERKEL;  
HAVELKOVA, MARTINA y  
TØRFOSS, VERONIKA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 621 188 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Péptidos terapéuticos

5 La presente invención se refiere a aminoácidos, péptidos y peptidomiméticos modificados y su uso como agentes citolíticos, estos agentes citolíticos encuentran utilidad particular como agentes antimicrobianos y antitumorales.

10 Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes se han convertido en una preocupación importante para la sociedad en los últimos 20-25 años. Esto es especialmente un problema en los hospitales donde las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) y *Staphylococcus epidermidis* resistente a la metilicina (MRSE) pueden dar como resultado lesiones graves, hospitalización prolongada y muerte, especialmente entre los pacientes inmunodeprimidos. La vancomicina fue una vez un fármaco de último recurso, pero los informes de los hospitales de todo el mundo muestran que el uso poco frecuente de la vancomicina ya no es el caso.

15 Así como las especies Gram-positivas anteriores, los médicos también están notificando problemas con especies Gram-negativas multirresistentes incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Será muy deseable si una única molécula de antibiótico mostrase actividad contra un amplio espectro de bacterias, incluyendo tanto especies Gram-positivas como Gram-negativas.

20 Ha habido un proyecto entre las mayores compañías farmacéuticas para desarrollar clases novedosas de compuestos antimicrobianos, aparentemente debido a los enormes costes de desarrollo y la duración relativamente limitada del tratamiento del paciente en comparación con el tratamiento de enfermedades crónicas. Sin embargo, la necesidad de agentes antimicrobianos novedosos es urgente y en Estados Unidos las muertes causadas por infecciones adquiridas en hospitales están actualmente sustituyendo a la mortalidad relacionada con el VIH.

25 Una clase prometedora de agentes antimicrobianos son los péptidos antimicrobianos catiónicos (AMP), también conocidos como péptidos de defensa del huésped. Los AMP tienen un modo de acción único dirigiéndose a las membranas internas y/o externas de las bacterias de una manera no específica del receptor. El mecanismo detallado de interrupción de la por los AMP todavía no se entiende completamente, y se han propuesto diversos modelos para explicar los efectos observados.

30 Debido a la similitud relativa entre los componentes de membrana de células lipídicas de células tumorales procariontas y eucariotas, también se ha observado una actividad de desestabilización y eventualmente lítica de la membrana selectiva contra células tumorales para estos péptidos antimicrobianos. Para ambos tipos de células diana se ha identificado una clase eficaz de péptidos anfipáticos y moléculas pseudopeptídicas que tienen una carga positiva neta y un grupo o grupos lipófilos. Mientras que para la primera generación de estas moléculas se asumió un modo de acción de formación de poros y típicamente incorporaron diez o más aminoácidos, se ha demostrado más recientemente que moléculas mucho más pequeñas pueden retener niveles terapéuticamente relevantes de actividad y selectividad (Strøm M.B. et al., J. Med. Chem. 2003, 46, 1567-1570).

35 Sin embargo, los objetivos a veces contradictorios de actividad terapéutica, selectividad, toxicidad, estabilidad *in vivo* e *in vitro*, coste de producción y facilidad de administración significan que existe una necesidad constante de desarrollar nuevos fármacos candidatos dentro de esta clase general de moléculas.

40 Los presentes inventores han descubierto utilizando un  $\beta$  aminoácido disustituido se puede generar una nueva clase de molécula citolítica que tiene una actividad altamente prometedora y otras características deseables, incluyendo un amplio espectro de actividad antibacteriana, por ejemplo, actividad tanto contra especies Gram-positivas como Gram-negativas. Preferiblemente, las moléculas son adecuadas para administración oral.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un péptido, peptidomimético o aminoácido (modificado) que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 y que incorpora un  $\beta$  aminoácido disustituido, cada uno de los grupos de sustitución en el  $\beta$  aminoácido, que pueden ser iguales o diferentes, comprende al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno, es lipófilo y tiene al menos un grupo cíclico, uno o más grupos cíclicos dentro de un grupo de sustitución pueden unirse o condensarse a uno o más grupos cíclicos dentro del otro grupo de sustitución y cuando los grupos cíclicos están condensados de esta manera, el número total combinado de átomos diferentes de hidrógeno para los dos grupos de sustitución es de al menos 12 y en los que dicho derivado peptídico, peptidomimético o aminoácido es 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud, para su uso como un agente antimicrobiano citolítico. Los 2 grupos de sustitución en el  $\beta$  aminoácido son preferiblemente iguales.

50 Sin desear quedar ligado a la teoría, parece que la inclusión de un  $\beta$  aminoácido disustituido aumenta la estabilidad de la molécula, y aunque las cargas conformacionales forzadas mejoran la anfipaticidad de la molécula, así como causan un poderoso efecto disruptivo sobre la molécula debido a las interacciones repulsivas de los dos restos lipófilos en el residuo disustituido. Esto da un efecto citolítico que puede ser citotóxico.

La actividad citolítica puede ser una actividad antibacteriana y tal uso médico constituye una realización preferida de la presente invención. Visualizados como alternativa, los péptidos, peptidomiméticos y aminoácidos modificados como se han definido anteriormente (y descritos en más detalle a continuación) son para su uso en el tratamiento de una infección microbiana (particularmente bacteriana).

Los microbios que pueden dirigirse o tratarse incluyen, bacterias (Gram positivas y Gram negativas), hongos, arqueas y protistas. Las bacterias son de particular interés debido a su capacidad para infectar seres humanos y otros animales de maneras nocivas para la salud y mortales.

Las dianas bacterianas preferidas incluyen bacterias Gram positivas, en particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (MRSE). Las especies Gram negativas, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* también pueden tratarse. Las heridas crónicas se infectan a menudo tanto por especies Gram positivas como Gram negativas y el tratamiento de un paciente que tiene o se sospecha que tiene o que desarrolla una infección multipatogénica (por ejemplo, en el sitio de una herida crónica) es un uso preferido de acuerdo con la presente invención

La actividad antimicrobiana también proporciona usos no terapéuticos, por ejemplo, como un desinfectante, y en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso *ex vivo* de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se define y se describe en el presente documento como un agente citolítico.

La lipofilicidad se puede medir por la distribución de una molécula en un sistema bifásico, por ejemplo, líquido-líquido, tal como 1-octanol/agua. Se conoce bien en la técnica que los sustituyentes polares tales como hidroxilo, carboxi, carbonilo, amino y éteres disminuyen el coeficiente de reparto en un sistema bifásico tal como 1-octanol/agua ya que reducen la lipofilicidad; por lo tanto, los grupos de sustitución lipófilos contendrán preferiblemente no más de dos, más preferiblemente uno o ningún grupo polar de este tipo.

Un  $\beta$  aminoácido tiene el grupo amino unido al átomo de carbono  $\beta$ ; los aminoácidos genéticamente modificados son  $\alpha$  aminoácidos en los que el grupo amino está unido al átomo de carbono  $\alpha$ . Esta disposición se alarga en un átomo por  $\beta$  aminoácido incorporando la estructura de un péptido uno o más  $\beta$  aminoácidos. En esta disposición, el átomo de carbono  $\alpha$  y/o  $\beta$  puede estar sustituido. El átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  puede estar disustituido; cuando el átomo de carbono  $\alpha$  está disustituido se produce un  $\beta^{2,2}$  aminoácido, y cuando el átomo de carbono  $\beta$  está disustituido se genera un  $\beta^{3,3}$  aminoácido. Un grupo de sustitución en cada uno de los átomos de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  da como resultado un  $\beta^{2,3}$  aminoácido. Se prefieren los  $\beta^{2,2}$  y  $\beta^{3,3}$  aminoácidos disustituidos para su uso de acuerdo con la invención, siendo especialmente preferidos los  $\beta^{2,2}$  aminoácidos disustituidos.

El  $\beta$  aminoácido está sustituido con dos grupos que incorporan al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno. Preferiblemente uno, más preferiblemente ambos de los grupos de sustitución contienen al menos 8, más preferiblemente al menos 10 átomos diferentes de hidrógeno. Estos grupos son de naturaleza lipófila y aunque pueden ser diferentes, son preferiblemente iguales. Cada uno contiene al menos un grupo cíclico, típicamente un anillo de 6 miembros que puede ser alifático o aromático, preferiblemente aromático, y puede estar sustituido, los grupos de sustitución pueden incluir heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno, azufre o un halógeno, en particular flúor o cloro. Los grupos de sustitución preferidos incluyen grupos alquilo  $C_1$ - $C_4$  (especialmente t-butilo), metoxi, flúor y fluorometilo. Los grupos cíclicos pueden ser homo o heterocíclicos, preferiblemente son un anillo homocíclico de átomos de carbono. Los grupos de sustitución lipófilos preferidos incorporan dos o tres grupos cíclicos, preferiblemente dos grupos cíclicos, que pueden estar conectados o condensados, preferiblemente condensados. Los grupos de sustitución particularmente preferidos comprenden un grupo naftaleno.

Un grupo preferido adicional de grupos de sustitución lipófilos tiene un único grupo cíclico sustituido o sin sustituir, preferiblemente un grupo fenilo o ciclohexilo.

El grupo o grupos cíclicos están separados típicamente de la estructura peptídica (es decir, del átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  del  $\beta$  aminoácido) por una cadena de 1 a 4, preferiblemente de 1 a 3 átomos; estos átomos de unión pueden incluir nitrógeno y/o oxígeno, pero serán típicamente átomos de carbono, preferiblemente los átomos de unión están sustituidos. Estos espaciadores son, por supuesto, parte de los grupos de sustitución como se define en el presente documento.

Cada resto de sustitución del  $\beta$  aminoácido disustituido comprenderá típicamente de 7 a 20 átomos diferentes de hidrógeno, preferiblemente de 7 a 13, más preferiblemente de 8 a 12, mucho más preferiblemente 9-11 átomos diferentes de hidrógeno.

A no ser que sea evidente de otro modo a partir del contexto, la referencia en el presente documento a "aminoácidos" incluye la subunidad equivalente en un peptidomimético. Para fines antimicrobianos, las moléculas preferidas tienen de 1 a 3 aminoácidos. Como se demuestra en los Ejemplos, las moléculas de uso de acuerdo con la invención sólo pueden comprender un único aminoácido, pero éste será un aminoácido "modificado" para satisfacer los requisitos de carga.

5 Los aminoácidos individuales, así como los péptidos y peptidomiméticos incorporarán preferiblemente un extremo C modificado, dando como resultado típicamente el grupo modificador del extremo C la inversión de la carga, es decir, eliminando de la carga negativa del grupo carboxilo y añadiendo una carga positiva, por ejemplo, a través de la presencia de un grupo amino. Esta modificación por sí sola, suponiendo que el extremo N no se modifique, dará a la molécula una carga neta global de +2. Si el extremo C se modifica para dar la inversión de carga o simplemente para retirar la carga negativa del grupo carboxilo, la molécula preferiblemente también contiene uno o más aminoácidos catiónicos. Por lo tanto, la carga global de la molécula puede ser +3, +4 o superior para moléculas más grandes.

10 Los grupos C-terminales adecuados, que son preferiblemente de naturaleza catiónica, tendrán típicamente un tamaño máximo de 15 átomos distintos de hidrógeno. El extremo C se amidifica preferiblemente y el grupo amida puede estar además sustituido para formar una N-alquil o N, N-dialquilamida. Se prefieren grupos amida primaria y secundaria. Los grupos adecuados para sustituir el grupo amida incluyen aminoalquilo, por ejemplo, amino etilo o dimetilaminoetilo; el átomo de nitrógeno del grupo amida pueden formar parte de un grupo cíclico, por ejemplo, pirazolidina, piperidina, imidazolidina y piperazina, siendo preferida la piperazina, estos grupos cíclicos pueden estar sustituidos, por ejemplo, por grupos alquilo o aminoalquilo.

15 Los péptidos para su uso de acuerdo con la invención incorporan preferiblemente uno o más aminoácidos catiónicos, se prefieren lisina, arginina, ornitina e histidina pero puede incorporarse cualquier aminoácido no codificado genéticamente o modificado que lleve una carga positiva a pH 7,0.

20 Los aminoácidos catiónicos no codificados genéticamente y los aminoácidos catiónicos modificados incluyen análogos de lisina, arginina e histidina, tales como homolisina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico y homoarginina, así como trimetilisina y trimetilornitina, ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, ácido 4-amino-1-carbamimidolpiperidina-4-carboxílico y 4-guanidinofenilalanina.

25 Los dipéptidos incorporarán típicamente un aminoácido catiónico y los péptidos más grandes incorporarán usualmente aminoácidos catiónicos adicionales, por lo tanto, un péptido de 4 aminoácidos puede tener 2 o 3 aminoácidos catiónicos.

30 Un grupo preferido de moléculas comprende un  $\beta^{2,2}$  aminoácido disustituido acoplado a un residuo L-arginina amida C-terminal y se prefieren particularmente los dipéptidos que tienen esta disposición.

35 Los péptidos con tres o cuatro aminoácidos tendrán típicamente uno o más aminoácidos lipófilos adicionales, es decir, aminoácidos con un grupo R lipófilo. Típicamente, el grupo R lipófilo tiene al menos uno, preferiblemente dos grupos cíclicos, que pueden condensarse o conectarse. El grupo R lipófilo puede contener heteroátomos tales como O, N o S pero típicamente no hay más de un heteroátomo, preferiblemente es nitrógeno. Este grupo R no tendrá preferiblemente más de 2 grupos polares, más preferiblemente ninguno o uno, mucho más preferiblemente ninguno.

40 El triptófano es un aminoácido lipófilo preferido y los péptidos comprenden preferiblemente de 1 a 3 residuos de triptófano. Los aminoácidos genéticamente codificados adicionales que pueden incorporarse son fenilalanina y tirosina.

45 Los aminoácidos lipófilos pueden no estar genéticamente codificados, incluyendo aminoácidos genéticamente codificados con grupos R modificados.

50 Un peptidomimético se caracteriza típicamente por retener la polaridad, el tamaño tridimensional y la funcionalidad (bioactividad) de su equivalente peptídico, pero en el que los enlaces peptídicos se han reemplazando, a menudo por enlaces más estables. Por "estable" se entiende más resistente a la degradación enzimática por enzimas hidrolíticas. Generalmente, el enlace que reemplaza el enlace amida (sustituto del enlace amida) conserva muchas de las propiedades del enlace amida, por ejemplo, conformación, volumen estérico, carácter electrostático, posibilidad de enlaces de hidrógeno, etc. El capítulo 14 de "Drug Design and Development", Krogsgaard Larsen, Liljefors y Madsen (Eds) 1996, Horwood Acad. Pub proporciona un análisis general de técnicas para el diseño y la síntesis de peptidomiméticos. En el presente caso, cuando la molécula reacciona con una membrana en lugar del sitio activo específico de una enzima, algunos de los problemas descritos de mimetizar exactamente la afinidad y la eficacia o la función del sustrato no son relevantes y un peptidomimético puede prepararse fácilmente en base a una estructura peptídica dada o un motivo de los grupos funcionales requeridos. Los sustitutos de enlace amida adecuados incluyen los siguientes grupos: N-alquilación (Schmidt, R. et al., Int. J. Peptide Protein Res., 1995, 46,47), amida retro-inversa (Chorev, M y Goodman, M., Acc. Chem. Res, 1993, 26, 266), tioamida (Sherman D.B. y Spatola, A.F. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 433), tioéster, fosfonato, cetometileno (Hoffman, R.V. y Kim, H.O. J. Org. Chem., 1995, 60, 5107), hidroximetileno, fluorovinilo (Allmendinger, T. et al., Tetrahedron Lett., 1990, 31, 7297), vinilo, metilenoamino (Sasaki, Y y Abe, J. Chem. Pharm. Bull. 1997 45, 13), metilenotio (Spatola, A.F., Methods Neurosci, 1993, 13, 19), alcano (Lavielle, S. et. al., Int. J. Peptide Protein Res., 1993, 42, 270) y sulfonamido (Luisi, G. et al. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2391).

65

Las moléculas de la presente invención contienen un  $\beta$  aminoácido disustituido y se describen diversas moléculas en los Ejemplos que contienen únicamente un aminoácido adicional, es decir, moléculas que tienen 2 aminoácidos unidos por un enlace amida. Dichas moléculas podrían ser consideradas dipéptidos debido al enlace amida; sin embargo, los enlaces amida en estas moléculas son de hecho no escindibles debido a la disustitución del  $\beta$  aminoácido y como tales, estas moléculas podrían considerarse peptidomiméticos. Para los fines de la presente invención, se considera que dichas moléculas (y moléculas más grandes con más aminoácidos) son péptidos (en lugar de peptidomiméticos), debido a la presencia de un enlace amida. Esto permite una mayor claridad de la nomenclatura sin necesidad de probar si, o hasta qué punto, un enlace amida dado es escindible. En otras palabras, si todos los aminoácidos en una molécula están unidos por enlaces amida, la molécula se considera un péptido, incluso si uno o más de los enlaces amida no es fácilmente escindible.

Los compuestos peptidomiméticos de la presente invención tendrán típicamente subunidades identificables que son aproximadamente equivalentes en tamaño y función a los aminoácidos. Los peptidomiméticos tendrán generalmente grupos equivalentes a los grupos R de aminoácidos y el análisis en el presente documento de los grupos R adecuados y de los grupos modificadores terminales N y C se aplica, *mutatis mutandis*, a compuestos peptidomiméticos.

Como se analiza en el libro de texto mencionado anteriormente, así como el reemplazo de enlaces amida, los peptidomiméticos pueden implicar el reemplazo de restos estructurales más grandes con estructuras di o tripeptidomiméticas y en este caso, pueden usarse restos miméticos que implican el enlace peptídico, tales como miméticos derivados de azoles como sustitutos de dipéptidos. Sin embargo, se prefieren los peptidomiméticos y, por lo tanto, las estructuras peptidomiméticas en las que sólo se han reemplazado los enlaces amida como se ha analizado anteriormente.

Los peptidomiméticos adecuados incluyen péptidos reducidos en los que el enlace amida se ha reducido a una metileno amina por tratamiento con un agente reductor, por ejemplo, borano o un reactivo de hidruro tal como hidruro de litio y aluminio. Tal reducción tiene la ventaja añadida de aumentar la cationicidad global de la molécula.

Otros peptidomiméticos incluyen peptoides formados, por ejemplo, mediante la síntesis por etapas de poliglicinas funcionalizadas con amida. Algunas estructuras peptidomiméticas estarán fácilmente disponibles a partir de sus precursores peptídicos, tales como péptidos que han sido permetilados, algunos métodos se describen por Ostresh, J.M. et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 11138-11142. Las condiciones fuertemente básicas favorecerán la N-metilación sobre O-metilación y darán como resultado la metilación de algunos o todos los átomos de nitrógeno en los enlaces peptídicos y el nitrógeno N-terminal.

Los reemplazos preferidos de los enlaces peptídicos incluyen ésteres, poliaminas y derivados de los mismos, así como alcanos y alquenos sustituidos, particularmente aminometilo y cetometileno. Los peptidomiméticos tendrán preferiblemente extremos N y C que pueden ser modificados como se analiza en el presente documento.

En el presente documento también se describe un método para tratar o prevenir una infección microbiana, preferiblemente una infección bacteriana, cuyo método comprende la administración a un sujeto de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente.

En el presente documento también se describe un método para tratar células tumorales o prevenir o reducir el crecimiento, la propagación del establecimiento, o la metástasis de un tumor, cuyo método comprende la administración a un sujeto de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente.

Como se usa en este documento, el tratamiento de una infección microbiana/bacteriana se referirá preferiblemente a una reducción del número de células microbianas/bacterianas pero también incluyen una actividad de tipo bacteriostática donde el número de células está contenido en números que son menos dañinos para el sujeto que si la infección se hubiera permitido avanzar sin control. La "prevención" incluye la inhibición del crecimiento celular microbiano/bacteriano de tal manera que no se establece una población medible y/o perjudicial en el sujeto tratado

Las células tumorales tratadas pueden estar circulando, pero típicamente serán parte de un tumor sólido; como con las células microbianas, el tratamiento implicará preferentemente la muerte celular a través de la lisis celular. La lisis celular puede dar como resultado la presentación de antígenos de células tumorales y la generación de una inmunidad adquirida que puede prevenir o inhibir el desarrollo de tumores secundarios.

En un aspecto más la presente invención proporciona un producto que comprende (a) un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente, y (b) un agente antimicrobiano adicional como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento o prevención de una infección antimicrobiana.

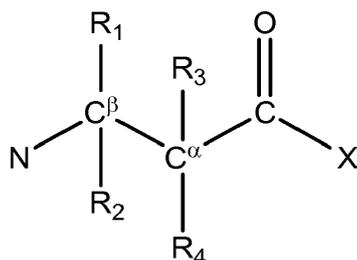
En el presente documento también se describe un producto que comprende (a) un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente, y (b) un agente antitumoral adicional como una

preparación combinada para un uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de células tumorales.

En el presente documento también se describe el uso de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar una infección microbiana, preferiblemente una infección bacteriana.

En el presente documento también se describe el uso de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar células tumorales o prevenir o reducir el crecimiento, la propagación del establecimiento, o la metástasis de un tumor.

Entre la clase de moléculas que se ha descrito anteriormente, existe un grupo novedoso de moléculas altamente eficaces. Estas moléculas son adecuadas para los diversos usos y métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un péptido, peptidomimético o aminoácido (modificado) que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 que incorpora un grupo de fórmula I:



en la que cualesquiera 2 de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno y 2 son grupos de sustitución, que pueden ser iguales o diferentes, comprenden al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno, son lipófilos e incluyen un grupo cíclico, no estando dicho grupo cíclico unido directamente al átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  pero estando opcionalmente unido o condensado a un grupo cíclico en el otro grupo de sustitución, cuando los grupos cíclicos están condensados, el número total combinado de átomos diferentes de hidrógeno para los dos grupos de sustitución es de al menos 12, y en la que X representa O, C, N o S, y en la que dicho derivado peptídico, peptidomimético o aminoácido es de 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud.

Se apreciará que se llega a la cifra mínima de 12 para el total combinado de átomos diferentes de hidrógeno en los dos grupos de  $R_{1-4}$  cuando los grupos cíclicos de cada resto están condensados añadiendo el número mínimo para los grupos sin condensar ( $7 + 7 = 14$ ) y restando 2 porque dos de los átomos diferentes de hidrógeno participan eficazmente en la formación de anillos en cada grupo. Preferiblemente el total combinado de átomos diferentes de hidrógeno en los dos grupos de  $R_{1-4}$  cuando los grupos cíclicos de cada resto están condensados es 14. Pueden verse grupos fusionados y unidos a complejos donde los dos grupos unidos a  $C^\alpha$  o  $C^\beta$  pueden contener más de un par de grupos cíclicos fusionados, con o sin enlaces de unión adicionales entre los grupos de sustitución. Sin embargo, los dos grupos de sustitución preferiblemente no están condensados ni unidos como moléculas en las que estos grupos tienen mayor flexibilidad de movimiento.

El átomo de nitrógeno en el grupo de fórmula (I) no está unido preferiblemente a ningún átomo de los grupos  $R_{1-4}$ , excepto, por supuesto, indirectamente a través de  $C^\beta$  o  $C^\alpha$ . Preferiblemente, los 5 átomos en la estructura anterior (N-  $C^\beta$ -  $C^\alpha$ -C-X) están conectados entre sí únicamente de forma lineal, no cíclica. Se apreciará que X y N en la fórmula (I) tienen sus valencias normales y, por lo tanto, estarán típicamente sustituidos además a medida que se unen a otras partes del compuesto, por ejemplo, aminoácidos adicionales o grupos de protección N- o C-terminales.

Los grupos de sustitución de  $R_{1-4}$  son generalmente de naturaleza lipófila y preferiblemente no llevan carga y preferiblemente no tienen más de dos, más preferiblemente no más de un grupo polar. Uno o ambos de los grupos de sustitución de  $R_{1-4}$  contienen preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9 o 10 átomos diferentes de hidrógeno, por ejemplo 7-13, 7-12, 8-12 o 9-11 átomos diferentes de hidrógeno. Estos dos grupos de sustitución son preferiblemente iguales, aunque sólo sea por facilidad de síntesis. Preferiblemente los dos grupos de sustitución son  $R_1$  y  $R_2$  o  $R_3$  y  $R_4$ , siendo más preferidos  $R_3$  y  $R_4$ .

Como se ha indicado anteriormente, los grupos cíclicos de  $R_{1-4}$  no están unidos directamente al átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  ya que están separados de los mismos por una cadena de 1 a 4, preferiblemente de 1 a 3 átomos; estos átomos de unión pueden incluir nitrógeno y/u oxígeno, pero serán típicamente átomos de carbono, preferiblemente los átomos de unión están sin sustituir. Los restos de separación preferidos se muestran en los Ejemplos y forman parte de los grupos de sustitución de  $R_{1-4}$  como se define en el presente documento.

X puede estar sustituido o sin sustituir y es preferiblemente un átomo de N y preferiblemente sustituido. Cuando X es N puede formar parte de un enlace amida con un aminoácido adicional, como se muestra en las moléculas del Ejemplo 1. Como alternativa, el átomo de N puede estar sustituido, por ejemplo, por un grupo aminoalquilo, por

ejemplo, aminoetilo o aminopropilo o dimetilaminoetilo, dichas moléculas se muestran en el Ejemplo 2. En una alternativa adicional, el átomo de N puede formar parte de un grupo cíclico tal como piperazina, que puede estar sustituido por grupos alquilo o aminoalquilo, de nuevo como se muestra en el Ejemplo 2.

- 5 Los péptidos o peptidomiméticos que incorporan un grupo de fórmula I tendrán preferiblemente un extremo C modificado, que está preferiblemente amidado y se ha descrito anteriormente en relación con las moléculas para su uso como agentes citolíticos antimicrobianos.

10 Los pasos anteriores que definen grupos de sustitución preferidos del  $\beta$  aminoácido se aplican, mutatis mutandis, a los dos grupos de sustitución de R<sub>1-4</sub>. Los péptidos y peptidomiméticos que incorporan un grupo de fórmula I son un subconjunto preferido de las moléculas descritas anteriormente en esta solicitud que sirven para su uso como un agente antimicrobiano citolítico y así, todos los pasos anteriores que definen características preferidas de las moléculas, por ejemplo, su longitud y los otros aminoácidos que contienen, se aplican también a estas moléculas definidas por su incorporación de un grupo de fórmula I, y viceversa. Las moléculas pueden tener 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de longitud. Las moléculas peptidomiméticas incluirán de 1 a 4 subunidades pero estas subunidades serán típicamente unidas por imitadores de enlace amida; las uniones preferidas se han analizado anteriormente e incluyen ésteres y aminometilo y cetometileno.

20 Los Ejemplos del presente documento muestran el motivo estructural de la presente invención en forma de di-péptidos (Ejemplo 1) y aminoácidos modificados individuales y hepta-péptidos (Ejemplos 2 y 4). Las moléculas de los Ejemplos que son de 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud representan moléculas preferidas de, y de uso en, la presente invención.

25 Los péptidos, peptidomiméticos y aminoácidos de la invención pueden estar en forma de sal, ser cíclicos o esterificados, así como los derivados amidados preferidos analizados anteriormente.

30 Una clase preferida de moléculas de, y de uso en, la presente invención son derivados de  $\beta$ , preferiblemente, derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido que tienen un único  $\beta^{2,2}$ -aminoácido que incorpora dos cadenas laterales lipófilas como se ha definido anteriormente, estando el  $\beta$ -aminoácido di-sustituido flanqueado por dos grupos catiónicos. Como se ha descrito previamente, los dos grupos de sustitución son preferiblemente iguales, incluyen un grupo cíclico de 6 miembros, y al menos 8, preferiblemente al menos 10 átomos diferentes de hidrógeno. Estas moléculas son particularmente adecuadas como agentes antimicrobianos, y son adecuadas para administración oral.

35 Las moléculas descritas en el presente documento pueden sintetizarse de cualquier forma conveniente. Generalmente, los grupos reactivos presentes (por ejemplo amino, tiol y/o carboxilo) se protegerán durante la síntesis global. Por lo tanto, la etapa final en la síntesis será la desprotección de un derivado protegido de la invención. También se describen métodos de síntesis de compuestos. Por ejemplo, se describe un método para sintetizar un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 que incorpora un grupo de fórmula I como se define en el presente documento, cuyo método incluye la eliminación de un grupo protector de dicho péptido, peptidomimético o aminoácido modificado.

En la construcción del péptido, en principio se puede iniciar tanto en el extremo C como en el extremo N, aunque se prefiere el procedimiento de inicio del extremo C.

45 Los métodos de síntesis de péptidos se conocen bien en la técnica, pero para la presente invención puede ser particularmente conveniente realizar la síntesis sobre un soporte en fase sólida, siendo bien conocidos dichos soportes en la técnica.

50 Se conoce una amplia selección de grupos protectores para aminoácidos y los grupos protectores de amina adecuados pueden incluir carbobenciloxi (también designado Z) t-butoxicarbonilo (también designado Boc), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenceno sulfonilo (Mtr) y 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (también designado Fmoc). Se apreciará que cuando el péptido se construye a partir del extremo C-terminal, estará presente un grupo protector amina en el grupo  $\alpha$ -amino de cada nuevo residuo añadido y tendrá que ser eliminado selectivamente antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

55 Los grupos protectores carboxilo que pueden emplearse, por ejemplo, incluyen grupos éster fácilmente escindidos tales como grupos bencilo (Bzl), p-nitrobencilo (ONb), o t-butilo (OtBu), así como los grupos de acoplamiento sobre soportes sólidos, por ejemplo, la amida de Rink unida a poliestireno.

60 Los grupos protectores de tiol incluyen p-metoxibencilo (Mob), tritilo (Trt) y acetamidometilo (Acm).

65 Los péptidos preferidos de la invención pueden prepararse convenientemente usando el grupo protector t-butiloxicarbonilo (Boc) para las cadenas laterales amina de Lys, Orn, Dab y Dap, así como para la protección del nitrógeno indol de los residuos de triptófano. Puede usarse Fmoc para la protección de los grupos alfa-amino. Para los péptidos que contienen Arg, pueden usarse 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurane-5-sulfonilo para la protección de la cadena lateral guanidina.

Existe una amplia gama de procedimientos para eliminar los grupos protectores de amina y carboxilo. Sin embargo, éstas deben ser consistentes con la estrategia sintética empleada. Los grupos protectores de cadena lateral deben ser estables a las condiciones utilizadas para eliminar el grupo protector  $\alpha$ -amino temporal antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

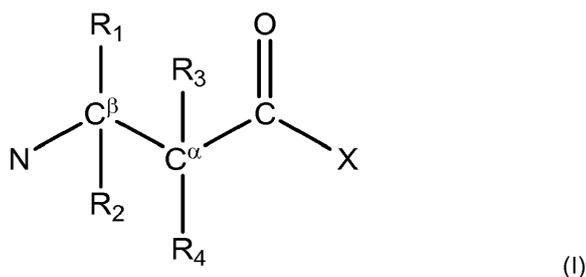
5 Los grupos protectores de amina tales como Boc y grupos protectores de carboxilo tales como tBu pueden eliminarse simultáneamente por tratamiento con ácido, por ejemplo, con ácido trifluoroacético. Los grupos protectores de tiol tales como Trt se pueden eliminar selectivamente usando un agente de oxidación, tal como yodo.

10 Las referencias y técnicas para sintetizar compuestos peptidomiméticos se han proporcionado anteriormente y se conocen por el experto en la técnica.

15 Las formulaciones que comprenden uno o más compuestos de la invención en mezcla con un diluyente, vehículo o excipiente adecuado constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichas formulaciones pueden ser, entre otros, para fines farmacéuticos (incluyendo veterinarios) y, por lo tanto, un diluyente, vehículo o excipiente adecuado serán preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Se conocen por el experto en la técnica diluyentes, excipientes y vehículos adecuados.

20 Las moléculas que incorporan un grupo de fórmula (I) como se describe en el presente documento son de naturaleza citolítica y son de utilidad particular como agentes antimicrobianos, por ejemplo, antibacterianos o antifúngicos, siendo preferidos los usos antibacterianos. La especificidad de las moléculas también las hace adecuadas como agentes antitumorales. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un péptido, peptidomimético o aminoácido (modificado) que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 que incorpora un grupo de fórmula I:

25



30 en la que cualesquiera 2 de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno y 2 son grupos de sustitución, que pueden ser iguales o diferentes, comprenden al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno, son lipófilos e incluyen un grupo cíclico, no estando unido dicho grupo cíclico directamente al átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  pero estando opcionalmente unido o condensado a un grupo cíclico en el otro grupo de sustitución, cuando los grupos cíclicos están condensados, el número total combinado de átomos diferentes de hidrógeno para los dos grupos de sustitución es de al menos 12, y en la que X representa O, C, N o S, y en la que dicho derivado peptídico, peptidomimético o aminoácido es de 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud para su uso en terapia; preferiblemente para su uso como un agente terapéutico citolítico. Preferiblemente, los usos son como agentes antimicrobianos, especialmente antibacterianos, o como agentes antitumorales.

40 También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir una infección microbiana, preferiblemente una infección bacteriana, cuyo método comprende la administración a un sujeto de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente.

45 También se describe en el presente documento un método para tratar células tumorales o prevenir o reducir el crecimiento, la propagación del establecimiento, o la metástasis de un tumor, cuyo método comprende la administración a un sujeto de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente.

50 También se describe en el presente documento el uso de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar una infección microbiana, preferiblemente una infección bacteriana.

55 También se describe en el presente documento el uso de un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar células tumorales o prevenir o reducir el crecimiento, la propagación del establecimiento, o la metástasis de un tumor.

La infección microbiana puede ser o puede ser sospechosa de ser una infección multipatógena, y el tratamiento de dichas infecciones (por ejemplo, en el sitio de una herida crónica), por ejemplo de infecciones que comprenden especies bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas, representan dianas preferidas de acuerdo con la

presente invención.

5 La cantidad administrada debe ser eficaz para matar la totalidad o una proporción de las células diana o para prevenir o reducir su velocidad de multiplicación, o para inhibir la metástasis o para disminuir de otro modo el efecto perjudicial del tumor en el paciente. El médico o paciente debe observar mejoría en uno o más de los parámetros o síntomas asociados con el tumor. La administración también puede ser profiláctica. El paciente típicamente será un paciente humano, pero también se pueden tratar animales no humanos, tales como animales domésticos o ganado.

10 A diferencia de la mayoría de los agentes que tienen dianas de proteína, las moléculas de la presente invención que incorporan un grupo de fórmula I pueden dirigirse a una amplia diversidad de cánceres. Las dianas de cáncer preferidas incluyen linfomas, leucemias, neuroblastomas y glioblastomas (por ejemplo, del cerebro), carcinomas y adenocarcinomas (particularmente de la mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, próstata y piel) y melanomas.

15 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden presentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral, tópica, nasal, parenteral, intravenosa, intratumoral, rectal o regional (por ejemplo, perfusión de extremidad aislada). La administración es típicamente por vía parenteral, preferiblemente por inyección subcutánea, intramuscular, intracapsular, intraespinal, intratumoral o intravenosa.

20 Los compuestos activos definidos en el presente documento pueden presentarse en las formas farmacológicas convencionales de administración, tales como comprimidos, comprimidos revestidos, pulverizaciones nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida. Pueden emplearse excipientes farmacéuticos convencionales, así como los métodos usuales de producción, para la preparación de estas formas.

25 También pueden usarse sistemas de vehículo específicos de órganos.

30 Las soluciones de inyección pueden, por ejemplo, producirse de manera convencional, tal como mediante la adición de agentes de conservación, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores, tales como EDTA. Después, las soluciones se envasan en viales de inyección o ampollas.

35 Las formulaciones preferidas son aquellas en las que los péptidos se disuelven en una solución salina. Dichas formulaciones son adecuadas para su uso en métodos de administración preferidos, especialmente administración local, es decir, intratumoral, por ejemplo, por inyección o por perfusión/infusión de una extremidad, región u órgano aislados de manera preferida (incluyendo aislamiento parcial).

40 Las unidades de dosificación que contienen las moléculas activas contienen preferiblemente 0,1-10 mg, por ejemplo, 1-5 mg del agente antitumoral. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente otros principios activos, incluyendo otros agentes citotóxicos, tales como otros péptidos antitumorales. Otros principios activos pueden incluir diferentes tipos de citocinas, por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF, CSF y factores de crecimiento, inmunomoduladores, productos quimioterapéuticos, por ejemplo, cisplatino o anticuerpos o vacunas contra el cáncer.

45 Al emplear sistemáticamente dichas composiciones, la molécula activa está presente en una cantidad para conseguir un nivel en suero de la molécula bioactiva de al menos aproximadamente 5  $\mu\text{g/ml}$ . En general, el nivel en suero no necesita exceder de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Un nivel en suero preferido es de aproximadamente 100  $\mu\text{g/ml}$ . Dichos niveles en suero pueden lograrse incorporando la molécula bioactiva en una composición a administrar sistemáticamente a una dosis de 1 a aproximadamente 10 mg/kg. En general, no es necesario administrar la molécula o moléculas a una dosis que exceda de 100 mg/kg.

50 En un aspecto más, la presente invención proporciona un producto que comprende (a) un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 y que incorpora un grupo de fórmula (I) como se define en el presente documento, y (b) un agente antimicrobiano adicional como una preparación combinada para un uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento o la prevención de una infección antimicrobiana.

55 También se describe en el presente documento un producto que comprende (a) un péptido, peptidomimético o aminoácido modificado que tiene una carga positiva neta de al menos +2 y que incorpora un grupo de fórmula (I) como se define en el presente documento y (b) un agente antitumoral adicional como una preparación combinada para un uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de células tumorales.

60 Los compuestos de la invención y compuestos adecuados para los métodos y usos de la invención incluyen formas de sal y las sales farmacéuticamente aceptables apropiadas para los péptidos y moléculas similares se conocen bien por los expertos en la técnica.

65

La invención se describe además en los siguientes Ejemplos, que incluye algunas moléculas de referencia fuera del alcance de la presente invención, y con referencia a las figuras, en las que:

La figura 1 muestra los compuestos 4a-n del Ejemplo 1.

La figura 2 muestra una descripción esquemática de la síntesis de los compuestos 4a-n como se describe en el Ejemplo 1.

La figura 3 muestra los compuestos 4a-d, 5a-d, 6a-d y 7a-d del Ejemplo 4.

La figura 4 muestra una descripción esquemática de la síntesis de los compuestos del Ejemplo 4. a) NaOMe (1 equiv.), R-Br (1 equiv.), realizado dos veces, 78 °C s: MeOH. b) Ra/Ni, H<sub>2</sub>(g), 45 °C, 5 días, s: MeOH que contiene ácido acético al 2 %. c) TEA, pH 8, Boc<sub>2</sub>O (1,2 equiv.), t.a., 18 h, s: H<sub>2</sub>O:dioxano (1:5). d) LiOH (6 equiv.), 18 h, 100 °C, s: H<sub>2</sub>O:dioxano (1:3). e) DIPEA (3 equiv.), TFFH (1,5 equiv.), t.a., 2 h, después adición de la amina deseada (2 equiv.), hasta 7 días, s: DMF. f) TFA:TIS:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5), t.a., 2 h, s: DCM. Todos derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido se aislaron como sus sales di-trifluoroacetato.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Una serie de moléculas basadas en el armazón de un ácido propiónico 3-amino-2,2-disustituido (β<sup>2,2</sup>-aminoácido) acquiral lipófilo acoplado a un residuo L-arginina amida C-terminal se generaron y se ensayaron para determinar su actividad antimicrobiana. Estos di-péptidos tienen las funcionalidades de cadena lateral de un tri-péptido debido al derivado de β<sup>2,2</sup>-aminoácido. Se exploró una amplia gama de sustituyentes lipófilos del derivado de β<sup>2,2</sup>-aminoácido como se muestra en la figura 1. Se presenta una descripción de la síntesis de los compuestos 4a-n en la figura 2.

### Reactivos y métodos analíticos

Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN se registraron en espectrómetros Varian 400 o 600 MHz. Los espectrómetros de masas se obtuvieron en un Micromass Quattro LC (Micromass, Manchester, Reino Unido). Los espectros de alta resolución se obtuvieron en un Waters Micromass LCT Premier (Micromass, Manchester, Reino Unido). Los compuestos y disolventes disponibles en el mercado se adquirieron en Sigma-Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Se realizó una RP-HPLC preparativa en un sistema Waters equipado con una columna RP BondaPak C18 125 Å, 10 µm, 25 x 100 mm, y se eluyó con acetonitrilo y agua, conteniendo ambos TFA al 0,1 %. Se realizó un análisis por HPLC analítica en un Waters 2695 HPLC equipado con una columna RP-HPLC Delta Pak C18, 100 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm Waters y se analizó a una longitud de onda 214 nm con un detector PDA que incluía longitudes de onda de 210 a 310 nm. Todos los compuestos se prepararon usando carruseles de reacción paralelos de Radleys®.

### Procedimiento general para dialquilación de cianoacetato de metilo (GP1) 1 a-n.

Se disolvió metóxido sódico (20 mmol) en metanol (0,2 M) y se añadió cianoacetato de metilo (20 mmol). Después de 5 min de agitación a t.a., se añadió el bromuro de bencilo deseado (20 mmol) y la solución se calentó a reflujo. Después de 15 min, la solución se enfrió a t.a. Se añadió una segunda porción de metóxido sódico (20 mmol) y después de 5 min de agitación a t.a., se añadió la segunda porción del bromuro de bencilo deseado (20 mmol) una vez más seguido de 15 min de reflujo. El volumen de la mezcla de reacción se redujo a aproximadamente 1/3 al vacío y se extrajo con agua/acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. El producto se usó en la siguiente síntesis sin purificación adicional.

### Procedimiento general para la reducción de nitrilos en aminas con Ra/Ni y siguiendo una protección Boc(GP2) 2a-n.

Se lavó 3 veces Ra/Ni (aproximadamente 2 ml/g de nitrilo) con metanol en una atmósfera de argón antes de añadir el nitrilo deseado (3,5 mmol) disuelto en metanol (0,1 M) junto con ácido acético (aproximadamente 1 ml/g de nitrilo). La mezcla de reacción se hidrogenó a 45 °C durante 5 días a una presión de H<sub>2</sub> de 1 bar. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite para retirar el Ra/Ni antes de su evaporación a sequedad. El éster metílico β<sup>2,2</sup>-aminoácido en bruto (0,35 mmol) se disolvió en una mezcla 5:1 de 1,4-dioxano y agua (~0,35 M) y el pH se ajustó a 8 con TEA, y se añadió Boc<sub>2</sub>O (0,42 mmol) disuelto en la menor cantidad de 1,4-dioxano posible. La solución se agitó a t.a. durante aproximadamente 18 h antes de acidificarse a pH 2-3 con ácido cítrico al 10 % y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. El producto se usó en la siguiente síntesis sin purificación adicional.

### Procedimiento general para la hidrólisis del éster (GP3) 3a-n.

El éster metílico β<sup>2,2</sup>-aminoácido Boc-prottegido (0,35 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1 de 1,4-dioxano y agua (1,17 mM) y se añadió hidróxido de litio (2,1 mmol) disuelto en la menor cantidad de agua posible. La mezcla de

reacción se agitó a la temperatura de reflujo en una atmósfera de N<sub>2</sub> durante 18 h antes de reducir el volumen a aproximadamente 1/5 al vacío. A la mezcla de reacción se le añadió (10 ml) y el pH se ajustó gota a gota a 1-2 con HCl 0,1 M. Esta solución acuosa se extrajo 3 veces con un volumen igual de acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. El producto se usó en la siguiente síntesis sin purificación adicional.

#### 5 Procedimiento general para el acoplamiento de L-arginina de $\beta^{2,2}$ -aminoácidos Boc-protectados (GP4) 4a-n.

10 El  $\beta^{2,2}$ -aminoácido Boc-protectado (0,2 mmol) se disolvió en DMF (0,02 M) y se añadió DIPEA (0,6 mmol) junto con TFFH (0,2 mmol). El aminoácido se preactivó durante 2 h antes de añadir H-Arg-NH<sub>2</sub> x 2 HCl (0,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 7 días antes de diluirse con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. El producto Boc-protectado en bruto se desprotectó disolviéndolo en DCM (~0,4 M) y añadiendo un volumen equivalente de TFA:TIS:Agua (95:2,5:2,5). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h antes de evaporarse a sequedad. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC preparativa. La pureza de los péptidos se comprobó por RP-HPLC analíticas antes de la evaporación de la solución a sequedad, y el residuo se disolvió de nuevo en agua y se liofilizó. Todos los compuestos poseían una pureza por encima del 95 %.

#### Ensayo celular

20 El ensayo antimicrobiano se realizó por TosLab A/S (Tromsø, Noruega). Cada compuesto se diluyó en 1 mg/ml en agua y se ensayó por duplicado en 200, 100, 50, 35, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5  $\mu$ g/ml, excepto 4n que se ensayó en 50, 35, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5  $\mu$ g/ml debido a problemas de solubilidad. Todos los compuestos ensayados eran sales di TFA.

25 Las cepas bacterias se cultivaron en agua peptonada Bacto al 2 % hasta que se consiguió un crecimiento exponencial. La MIC se determinó mediante incubación durante una noche en agua peptonada Bacto al 1 % a 37 °C. Se usó una concentración bacteriana de  $2 \times 10^6$  ufc/ml. Se usó un control negativo (sin péptido) como un control positivo (Gentamicina) para todas las cepas bacterianas. El crecimiento o no crecimiento se determinó por la turbidez de los pocillos. La MBC se determinó poniendo en placas en agar todas las concentraciones en y por encima del valor MIC, con incubación a 37 °C durante una noche y determinando el crecimiento o falta de crecimiento.

30 Todos los compuestos que mostraban valores MIC menores de 50  $\mu$ g/ml se ensayaron de nuevo usando el mismo procedimiento.

35 Los valores de MIC u MBC se muestran en las Tablas 1A y B.

40 El ensayo hemolítico frente a eritrocitos humanos se realizó por Lytix Biopharma A/S (Tromsø, Noruega). Cada compuesto se ensayó a partir de una concentración de 1 mg/ml e inferior, excepto 4k y 4n que se ensayó únicamente hasta 0,5 mg/ml debido a problemas de solubilidad. Se recogieron 8 ml de sangre de donantes masculinos sanos adultos. La sangre se dividió de forma equivalente y se distribuyó en un tubo de ensayo que contenía EDTA disponible en el mercado (BD vacutainer, 7,2 mg de K<sub>2</sub> EDTA) y en un vial de reacción de 10 ml que contenía 40  $\mu$ l de una solución de heparina (1000 U/ml en cloruro sódico al 0,9 %). Después de 30 minutos, se determinó el hematocrito de la sangre tratada con EDTA. La sangre heparinizada se centrifugó durante 10 minutos a 45 1500 rpm y el sobrenadante se eliminó. Posteriormente, los RBC se lavaron tres veces con PBS precalentado, y se diluyeron a hematocrito al 10 %. Los compuestos disueltos en PBS (concentración de 1  $\mu$ g/ml a 1000  $\mu$ g/ml) y los eritrocitos se incubaron en agitación a 37 °C durante una hora. Se incluyeron un control positivo con una concentración final de Triton X-100 al 0,1 % y un control negativo que contenía tampón PBS puro. Las muestras se centrifugaron (4000 rpm) durante 5 minutos y la absorción del sobrenadante se midió a 405 nm. Los valores dados en la Tabla 1A corresponden a la hemólisis al 50 %.

#### Estabilidad frente a $\alpha$ -quimotripsina

55 El ensayo de la estabilidad frente a  $\alpha$ -quimotripsina se realizó disolviendo los compuestos deseados en 1 mg/ml en agua. Se disolvió  $\alpha$ -quimotripsina en 0,1 mg/ml en HCl 1 mM que contenía CaCl<sub>2</sub> 2 mM. La digestión enzimática se realizó en TRIS HCl 100 mM que contenía CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La concentración enzimática final fue de 2  $\mu$ g/ml, y la concentración peptídica final fue de 100  $\mu$ g/ml. El volumen total fue de 0,5 ml.

60 Se recogieron 15  $\mu$ l de muestras en 0, 15, 30, 60, 120 y 240 min además de las muestras de 24 y 48 horas. A las muestras se les añadió un estándar externo (clorhidrato de atenolol) y 100  $\mu$ l de ácido acético al 10 % para terminar la digestión antes de que se diluyera en 1 ml con agua.

65 Para cada ensayo se realizó un control negativo sin enzima para garantizar que la degradación se debía a la actividad enzimática y no a otros factores. Se usó succinil-ala-ala-pro-phe-para nitroanilina como control positivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## Resultados

Tabla 1A. Concentración inhibitoria mínima (MIC) contra *S. aureus*, MRSA, MRSE y *E. coli* y valores de CE50 contra RBC humanos para dipéptidos antimicrobianos preparados en el estudio.

Compuesto	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>	MIC <sup>a</sup> (µM) MRSA <sup>d</sup>	MRSE <sup>e</sup>	<i>E. coli</i> <sup>f</sup>	CE <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µM) RBC <sup>g</sup>
4a	-	-	-	-	-
4b	150	150	75	-	-
4c	7,2	7,2	7,2	144	-
4d	-	-	-	-	n.e.
4e	147	147	74	-	-
4f	49	49	35	-	-
4g	6,6	5,0	6,6	266	470
4h	147	74	74	-	-
4i	12,7	3,2	12,7	254	n.e.
4j	10,2	6,8	6,8	136	386
4k	6,5	3,3	5,0	46	-
4l	60	49	35	-	-
4m	259	259	129	-	-
4n	2,9	2,1	10,1	5,7	99

<sup>a</sup> La mayor concentración ensayada fue de 200 µg/ml.

<sup>b</sup> La mayor concentración ensayada fue de 1000 µg/ml.

<sup>c</sup> *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923),

<sup>d</sup> *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591),

<sup>e</sup> *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (ATCC 27626),

<sup>f</sup> *Escherichia coli* (ATTC 25922) y

<sup>g</sup> glóbulos rojos humanos. La notación "-" representa ninguna actividad detectable (MIC o CE50) dentro del intervalo de concentración ensayado. n.e: no ensayado.

5

Tabla 1B. Concentración bactericida mínima (MBC) contra *S. aureus*, MRSA, MRSE y *E. coli*. Las cepas son las mismas que para los representados en la Tabla 1A anterior.

Compuesto	<i>S. aureus</i> <sup>a</sup>	MBC <sup>e</sup> (µM) MRSA <sup>b</sup>	MRSE <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> <sup>d</sup>
4a	>360	>360	>360	>360
4b	301	150	75	>301
4c	7,2	7,2	7,2	289
4d	>307	>307	>307	>307
4e	147	147	74	>294
4f	49	49	49	>282
4g	6,6	5,3	6,6	266
4h	147	110	110	>294
4i	12,7	6,3	12,7	>254
4j	6,8	6,8	6,8	136
4k	6,5	6,5	5,2	46
4l	49	49	21	>282
4m	>259	259	129	>259
4n	4,6	4,6	3,4	5,7

10 Se investigó una selección de seis compuestos (4c, 4g, 4h, 4i, 4k y 4m) para determinar la estabilidad proteolítica contra la α-quimotripsina. Los resultados revelaron que no pudo detectarse degradación para ninguno de los compuestos durante un periodo de 48 horas. También se encontró que todos los compuestos de ensayo están químicamente estables en soluciones acuosas a pH 7,4 durante al menos 48 horas.

15 Los resultados demostraron una fuerte correlación entre la potencia antimicrobiana y la lipofilicidad global de los compuestos preparados. Esto puede ilustrarse por una comparación entre la potencia de los compuestos frente a *S. aureus* y su tiempo de retención (Tr) en una columna RP-HPLC C18, que demostró la afinidad de los compuestos para la fase estacionaria hidrófoba de la columna (resultados no mostrados).

20 La actividad hemolítica de los compuestos preparados se usó como una medición de la toxicidad, y con la excepción de los compuestos 4g, 4j y 4n, los compuestos no eran hemolíticos dentro del intervalo de concentración ensayado (<1000 µg/ml). La actividad hemolítica más alta se mostró por el compuesto 4n, pero la concentración CE<sub>50</sub> fue no obstante de diez a casi 50 veces más alta que los valores MI tanto contra las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Cabe destacar que los compuestos 4j y 4k, que mostraron una potencia antimicrobiana similar, eran bastante diferentes con respecto a la actividad hemolítica. Esto indica que la actividad hemolítica y la potencia antimicrobiana no se determinaron por las mismas propiedades estructurales exactas.

25

Ejemplo 2

Se prepararon y se ensayaron moléculas adicionales de la invención para determinar tanto la actividad antibacteriana como anticancerosa.

5

Materiales y métodosCepas bacterianas

10

*Staphylococcus aureus* (ATTC 25923)

*Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (ATCC 33591)

15

*Staphylococcus epidermidis* resistente a la metilina (ATCC 27626)

*Escherichia coli* (ATTC 25922)

20

Líneas celulares de cáncer

A20 o MethA

Células para los estudios de toxicidad usados

MRC-5 y RBC humanos

25

Las concentraciones más altas ensayadas en los diversos ensayos fueron

Ensayos antimicrobianos: 200 µg/ml

Ensayos anticancerosos: 500 µg/ml

Ensayo MRC-5: 500 µg/ml

Ensayo de RBC: 1000 µg/ml

30

Se usó ChemDraw Ultra versión 11.0 para calcular las propiedades fisicoquímicas Log P, tPSA y CLogP.

Síntesis de moléculas

35

Hinchazón de la resina: La resina MBHA de amida de Rink (0,64 mmol/g de carga) se hinchó en 7 ml de DMF durante 1 hora antes de lavarse cinco veces con 7 ml de DMF.

40

Eliminación de Fmoc: En los tubos de reacción se añadieron 7 ml de piperidina al 20 % en DMF y la suspensión se agitó durante 10 min antes de eliminar la solución. Este procedimiento se repitió dos veces con agitación de 1 min antes de lavar la resina cinco veces con 7 ml de DMF.

45

Acoplamiento de aminoácidos a la resina desprotegida: Se disolvieron Fmoc-Lys(Boc)-OH o Fmoc-Trp(Boc)-OH (4 equiv.), HOBt hidrato (4 equiv.) y HBTU (3,92 equiv.) en 5 ml de DMF, se añadió DIPEA (8 equiv.) y la mezcla se dejó preactivar durante 15 minutos antes de añadirse a la resina. Después de agitar durante 1 hora, la mezcla de acoplamiento se eliminó y la resina se lavó cinco veces con 7 ml de DMF.

50

Acoplamiento del β-aminoácido a la resina desprotegida: Se disolvieron Fmoc-β-aa-OH (2 equiv.) y TFFH (1,96 equiv.) en 5 ml de DMF, se añadió DIPEA (8 equiv.) y la mezcla se dejó preactivar durante 15 minutos antes de que se añadiera a la resina. Después de agitar durante 48 horas, la mezcla de acoplamiento se eliminó y la resina se lavó cinco veces con 7 ml de DMF.

55

Acoplamiento del aminoácido después del β-aminoácido a la resina desprotegida: Se disolvieron Fmoc-Trp(Boc)-OH (4 equiv.) y TFFH (3,92 equiv.) en 5 ml de DMF, se añadió DIPEA (8 equiv.) y la mezcla se dejó preactivar durante 15 minutos antes de que se añadiera a la resina. Después de agitar durante 24 horas, la mezcla de acoplamiento se eliminó y la resina se lavó cinco veces con 7 ml de DMF.

60

Después del último acoplamiento, la resina se lavó cinco veces con DCM antes de que se dejara secar al aire durante una noche.

65

Escisión de la resina y eliminación de Boc: En los tubos de reacción se añadieron 10 ml de 95:2,5:2,5 de TFA:TIS:agua y la suspensión se agitó durante 2 horas antes de recoger la solución peptídica. Este procedimiento se repitió dos veces con agitación de 10 minutos. Las soluciones peptídicas recogidas se evaporaron a sequedad a presión reducida, se precipitaron con éter dietílico y se lavaron con éter dietílico. Los péptidos se purificaron por HPLC y se liofilizaron.

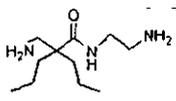
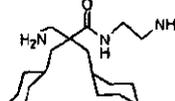
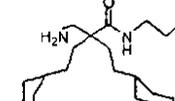
Ensayo celular

En el Ejemplo 1 se describen metodologías adecuadas.

5 Resultados

Tabla 2

Potencia biológica de derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido 1,2-diamino etano. (Todos los valores se dan en  $\mu\text{g/ml}$ ).

			
	1	2	3
Nombre IUPAC	N-(2-aminoetil)-2-(aminometil)-2-propil-pentanamida Log P: 0,53 tPSA: 81,14 CLogP: 1,24	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(ciclohexilmetil)propanamida Log P: 2,7 tPSA: 81,14 CLogP: 4,424	N-(2-aminoetil)-2-(aminometil)-4-ciclohexil-2-(2-ciclohexiletil)butanamida Log P: 3,54 tPSA: 81,14 CLogP: 5,482
Fórmula Pm	$\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 215,1998 Peso molecular: 215,3357	$\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 323,2937 Peso molecular: 323,5166	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 351,3250 Peso molecular: 351,5697
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	>200	200	7,5/10
MRSA	> 200	100	5/15
MRSE	>200	35	2,5/5
<i>E. coli</i>	>200	>200	15/10
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )			
A20	n.e.	n.e.	<3,35/<3,35/1,7
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	n.e.	18,5	<10/<10
RBC (CE <sub>50</sub> )	n.e.	>1000	62*
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	n.e.	n.e.	(<5,9)
RBC/A20	n.e.	n.e.	36,5

\*baja solubilidad en el medio de ensayo.

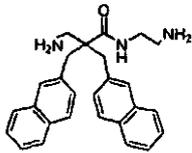
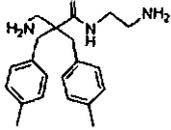
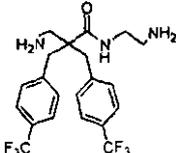
n.e. = no ensayado

Tabla 2. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

	4	5	6
Nombre IUPAC	3-amino-N-(2-(aminoetil)-2,2-dibencil-propanamida Log P: 2,08 tPSA: 81,14 CLogP: 2,11	N-(2-aminoetil)-2-(aminometil)-2-fenetil-4-fenilbutanamida Log P: 2,91 tPSA: 81,14 CLogP: 3,018	N-(2-aminoetil)-2-(aminometil)-5-fenil-2-(3-fenilpropil)pentanamida Log P: 3,75 tPSA: 81,14 CLogP: 4,076
Fórmula Pm	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 311,1998 Peso molecular: 311,4213	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 339,2311 Peso molecular: 339,4745	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 367,2624 Peso molecular: 367,5276
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	>200	100	35/50
MRSA	>200	100	35
MRSE	>200	50	15
<i>E. coli</i>	>200	>200	200
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )			
A20	68,6	n.e.	8,3
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	261	21,5	35
RBC (CE <sub>50</sub> )	>1000	>1000	820
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	3,8	n.e.	4,2
RBC/A20	n.e.	n.e.	98,8

n.e. = no ensayado

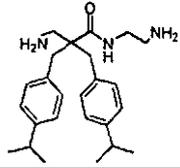
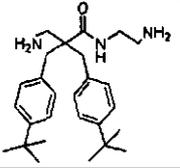
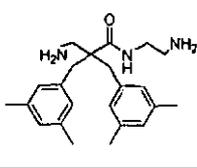
Tabla 2. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

			
	7	8	9
Nombre IUPAC	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(naftalen-2-ilmetil)propanamida LogP: 4,07 tPSA: 81,14 CLogP: 4,458	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(4-metilbencil)propanamida Log P: 3,05 tPSA: 81,14 CLogP: 3,108	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(4-(trifluorometil)bencil)propanamida Log P: 3,92 tPSA: 81,14 CLogP: 3,876
Fórmula Pm	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 411,2311 Peso molecular: 411,5387	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 339,2311 Peso molecular: 339,4745	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 447,1745 Peso molecular: 447,4172
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	2,5/5	200	10
MRSA	5	100	5
MRSE	2,5/5	100	10
<i>E. coli</i>	15	>200	35
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )			
A20	<3,35/0,7*	n.e.	<5/1,0*
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	13,5/14	26/44	<10/12
RBC (CE <sub>50</sub> )	292*	>1000	287
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	19,3-20	n.e.	10-12
RBC/A20	417	n.e.	287

\*Baja solubilidad en el medio de ensayo.

n.e. = no ensayado

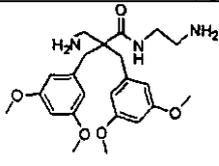
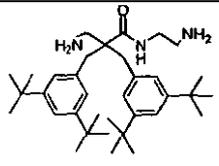
Tabla 2. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

			
	10	11	12
Nombre IUPAC	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(4-isopropilbencil)propanamida Log P: 4,55 tPSA: 81,14 CLogP: 4,964	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(4-terc-butilbencil)propanamida Log P: 5,49 tPSA: 81,14 CLogP: 5,762	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(3,5-dimetilbencil)propanamida Log P: 4,02 tPSA: 81,14 CLogP: 4,106
Fórmula Pm	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 395,2937 Peso molecular: 395,5808	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 423,3250 Peso molecular: 423,6339	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 367,2624 Peso molecular: 367,5276
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	5/10	2,5	35
MRSA	5/10	2,5	35
MRSE	5/10 5	2,5	5/10
<i>E. coli</i>	12,5/35	5	50/100
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )			
A20	<5/<5/1,4*	<5/<1,65/ <1,65/ 1,1	<5/<10/<10
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	<6,67/<6,67	4	10
RBC (CE <sub>50</sub> )	47	12*	n.e.
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	(<4,8)	3,6	(>2 )
RBC/A20	33,6	10,9	n.e.

\*Baja solubilidad en el medio de ensayo.

n.e. = no ensayado

Tabla 2. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

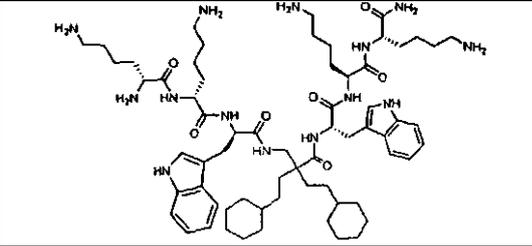
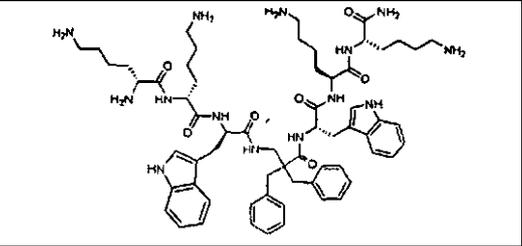
		
	13	14
Nombre IUPAC	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(3,5-dimetoxi-bencil)propanamida Log P: 1,57 tPSA: 118,06 CLogP: 2,126	3-amino-N-(2-aminoetil)-2,2-bis(3,5-di-terc-butilbencil)propanamida Log P: 8,89 tPSA: 81,14 ClogP: 9,414
Fórmula Pm	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Masa exacta: 431,2420 Peso molecular: 431,5252	C <sub>35</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 535,4502 Peso molecular: 535,8466
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	200	3,75/5
MRSA	200	2,5
MRSE	100	2,5/5
<i>E. coli</i>	200	> 5/>20
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	62,5/68	7,5/8,5
RBC (CE <sub>50</sub> )	>1000	>62,5 <sup>2*</sup>
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.

\*Baja solubilidad en el medio de ensayo.

2\* Concentración más alta ensayada debido a una solubilidad del agua reducida.

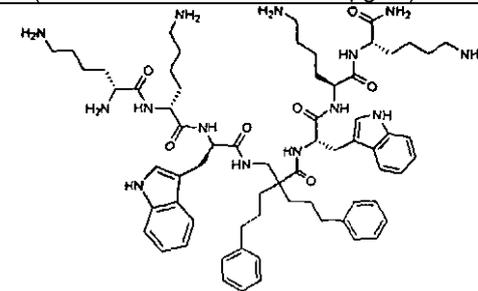
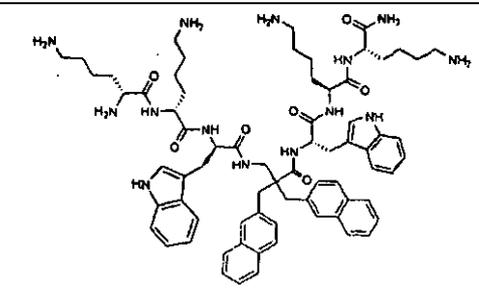
n.e. = no ensayado

Tabla 3. Potencia biológica de hepta-β-péptidos. (Todos los valores se dan en µg/ml).

		
	15	16
Nombre IUPAC	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoil-6,6-bis(2-ciclohexiletil)-1-(1H-indol-3-il)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-6,6-dibencil-15-carbamoil-1-(1H-indol-3-il)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida
Fórmula Pm	C <sub>65</sub> H <sub>104</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1192,8212 Peso molecular: 1193,6109	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1152,6960 Peso molecular: 1153,4624
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	n.e.	n.e.
MRSA	n.e.	n.e.
MRSE	n.e.	n.e.
<i>E. coli</i>	n.e.	n.e.
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	15,0	263
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	45,7	>500
RBC (CE <sub>50</sub> )	n.e.	n.e.
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	3,0	(>1,9)
RBC/A20	n.e.	n.e.

n.e. = no ensayado

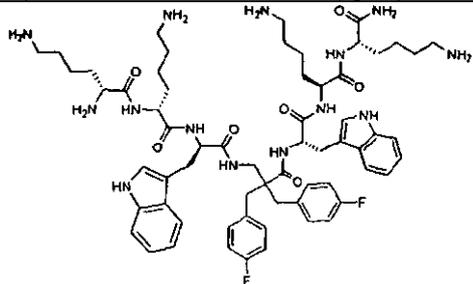
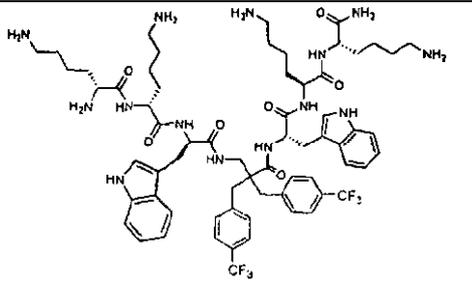
Tabla 3. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

		
	17	18
Nombre IUPAC	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoyl-1-(1H-indol-3-il)-3,7,10,13-tetraoxo-6,6-bis(3-fenilpropil)-4,8,11,14-tetraazonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoyl-1-(1H-indol-3-il)-6,6-bis(naftalen-2-ilmetil)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida
Fórmula Pm	C <sub>67</sub> H <sub>96</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1208,7586 Peso molecular: 1209,5687	C <sub>71</sub> H <sub>92</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1252,7273 Peso molecular: 1253,5798
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	n.e.	n.e.
MRSA	n.e.	n.e.
MRSE	n.e.	n.e.
<i>E. coli</i>	n.e.	n.e.
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	26,5/40 *	24
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	241/221 *	103
RBC (CE <sub>50</sub> )	n.e.	n.e.
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	9,1/5,5 *	4,3
RBC/A20	n.e.	n.e.

\*Los dos conjuntos paralelos se deben a dos cribados individuales (y un promedio de tres paralelos en cada cribado).

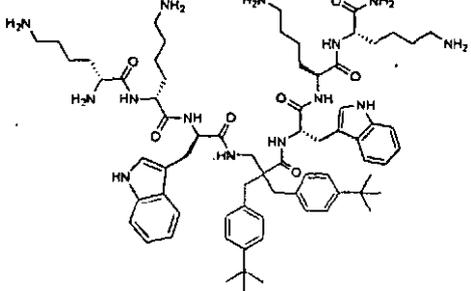
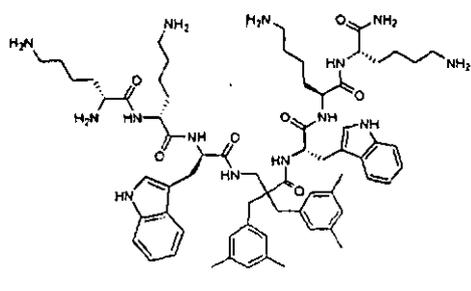
n.e. = no ensayado

Tabla 3. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

		
	19	20
Nombre IUPAC	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-yl)methyl)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoyl-6,6-bis(4-fluorobencil)-1-(1H-indol-3-yl)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazanodecan-2-yl)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-yl)methyl)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoyl-1-(1H-indol-3-yl)-3,7,10,13-tetraoxo-6,6-bis(4-(trifluorometil)bencil)-4,8,11,14-tetraazanodecan-2-yl)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida
Fórmula Pm	C <sub>63</sub> H <sub>86</sub> F <sub>2</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1188,6772 Peso molecular: 1189,4433	C <sub>65</sub> H <sub>86</sub> F <sub>6</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1288,6708 Peso molecular: 1289,4584
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	n.e.	n.e.
MRSA	n.e.	n.e.
MRSE	n.e.	n.e.
<i>E. coli</i>	n.e.	n.e.
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	197	37
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	>500	260
RBC (CE <sub>50</sub> )	n.e.	n.e.
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	(>2,5)	7,0
RBC/A20	n.e.	n.e.

n.e. = no ensayado

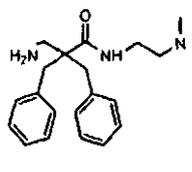
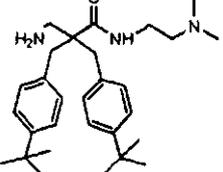
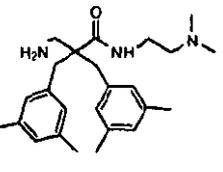
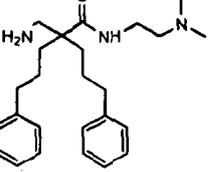
Tabla 3. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

		
	21	22
Nombre IUPAC	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-6,6-bis(4-terc-butilbencil)-15-carbamoil-1-(1H-indol-3-il)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazanonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida	(R)-N-((2R,9S,12S,15S)-9-((1H-indol-3-il)metil)-19-amino-12-(4-aminobutil)-15-carbamoil-6,6-bis(3,5-dimetilbencil)-1-(1H-indol-3-il)-3,7,10,13-tetraoxo-4,8,11,14-tetraazanonadecan-2-il)-6-amino-2-((R)-2,6-diaminohexanamido)hexanamida
Fórmula Pm	C <sub>71</sub> H <sub>104</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1264,8212 Peso molecular: 1265,6751	C <sub>67</sub> H <sub>96</sub> N <sub>14</sub> O <sub>7</sub> Masa exacta: 1208,7586 Peso molecular: 1209,5687
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	n.e.	n.e.
MRSA	n.e.	n.e.
MRSE	n.e.	n.e.
<i>E. coli</i>	n.e.	n.e.
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	14,5/17,5 *	32/40 *
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	42/55,2 *	237/205 *
RBC (CE <sub>50</sub> )	n.e.	n.e.
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	2,9/3,2 *	7,4/5,1 *
RBC/A20	n.e.	n.e.

\* Los dos conjuntos de resultados se deben a dos cribados individuales (y un promedio de tres paralelos en cada cribado)

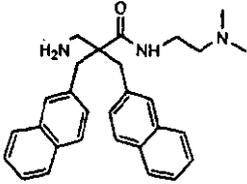
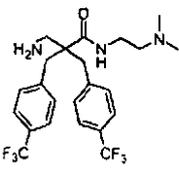
n.e. = no ensayado

Tabla 4. Potencia biológica de derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido dimetilamino-etilo. (Todos los valores se dan en  $\mu\text{g/ml}$ ).

				
	23	24	25	26
Nombre IUPAC	3-amino-2,2-dibencil-N-(2-(dimetilamino)etil)-propanamida Log P: 2,97 tPSA: 58,36 CLogP: 3,0078	3-amino-2,2-bis(4-terc-butilbencil)-N-(2-(dimetilamino)etil)-propanamida Log P: 6,38 tPSA: 58,36 CLogP: 6,6598	3-amino-N-(2-(dimetilamino)etil)-2,2-bis(3,5-dimetilbencil)-propanamida Log P: 4,92 tPSA: 58,36 CLogP: 5,0038	2-(aminometil)-N-(2-(dimetil-amino)etil)-5-fenil-2-(3-fenil-propil)-pentanamida Log P: 4,64 tPSA: 58,36 CLogP: 4,9738
Fórmula Pm	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 339,2311 Peso molecular: 339,4745	$\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 451,3563 Peso molecular: 451,6871	$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 395,2937 Peso molecular: 395,5808	$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 395,2937 Peso molecular: 395,5808
Potencia antimicrobiana (MIC)				
<i>S. aureus</i>	>100	5	100	35
MRSA	>100	5	50	35
MRSE	>100	2,5	10	35
<i>E. coli</i>	>100	5	50	100
Potencia anticancerosa ( $\text{CI}_{50}$ )				
A20	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad				
MRC-5	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
RBC ( $\text{CE}_{50}$ )	>1000	185	820	316
Selectividad anticancerosa				
MRC-5/A20	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

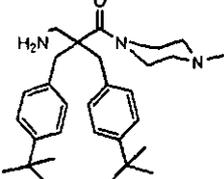
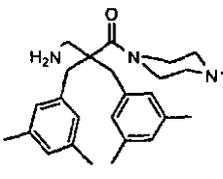
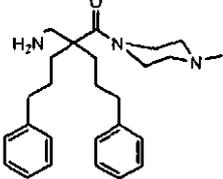
n.e. = no ensayado

Tabla 4. Continuación (Todos los valores se dan en  $\mu\text{g/ml}$ ).

		
	27	28
Nombre IUPAC	3-amino-N-(2-(dimetilamino)etil)-2,2-bis(naftalen-2-ilmetil)propanamida Log P: 4,97 tPSA: 58,36 CLogP: 5,3558	3-amino-N-(2-(dimetilamino)etil)-2,2-bis(4-(trifluorometil)bencil)-propanamida Log P: 4,82 tPSA: 58,36 CLogP: 4,7738
Fórmula Pm	$\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 439,2624 Peso molecular: 439,5918	$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 475,2058 Peso molecular: 475,4704
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	5	10
MRSA	5	5
MRSE	5	15
<i>E. coli</i>	15	35
Potencia anticancerosa ( $\text{CI}_{50}$ )		
A20	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	n.e.	n.e.
RBC ( $\text{CE}_{50}$ )	145	329
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.

n.e. = no ensayado

Tabla 5. Potencia biológica de derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido N-metil piperazina. (Todos los valores se dan en  $\mu\text{g/ml}$ ).

			
	29	30	31
Nombre IUPAC	3-amino-2,2-bis(4-terc-butilbencil)-1-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-ona Log P: 6,37 tPSA: 49,57 CLogP: 7,0724	3-amino-2,2-bis(3,5-dimetilbencil)-1-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-ona Log P: 4,91 tPSA: 49,57 CLogP: 5,4164	2-(aminometil)-1-(4-metilpiperazin-1-il)-5-fenil-2-(3-fenilpropil)pentan-1-ona Log P: 4,63 tPSA: 49,57 CLogP: 5,3864
Fórmula Pm	$\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 463,36 Peso molecular: 463,70	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 407,29 Peso molecular: 407,59	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}$ Masa exacta: 407,29 Peso molecular: 407,59
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	10	>200	200
MRSA	10	200	200
MRSE	5	35	200
<i>E. coli</i>	10	200	200
Potencia anticancerosa ( $\text{CI}_{50}$ )			
A20	n.e.	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	n.e.	n.e.	n.e.
RBC ( $\text{CE}_{50}$ )	241	>1000	>1000
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	n.e.	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.	n.e.

n.e. = no ensayado

Tabla 5. Continuación (Todos los valores se dan en µg/ml).

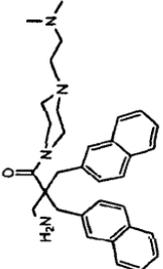
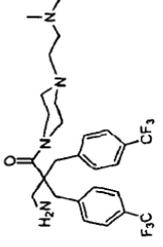
	32	33
Nombre IUPAC	3-amino-1-(4-metilpiperazin-1-il)-2,2-bis(naftalen-2-ilmetil)propan-1-ona Log P: 4,96 tPSA: 49,57 CLogP: 5,7684	3-amino-1-(4-metilpiperazin-1-il)-2,2-bis(4-(trifluorometil)bencil)propan-1-ona Log P: 4,81 tPSA: 49,57 CLogP: 5,1864
Fórmula Pm	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 451,26 Peso molecular: 451,60	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O Masa exacta: 487,21 Peso molecular: 487,48
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	10	35
MRSA	5	10
MRSE	10	50
<i>E. coli</i>	15	50
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )		
A20	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	n.e.	n.e.
RBC (CE <sub>50</sub> )	225	376
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.

n.e. = no ensayado

Tabla 6. Potencia biológica de derivados de derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido N,N-dim etilamino-etil-piperazina. (Todos los valores se dan en  $\mu\text{g/ml}$ ).

	34	35	36
Nombre IUPAC	3-amino-2,2-bis(4-terc-butilbencil)-1-(4-(2-dimetilamino)etil)piperazin-1-il)propan-1-ona Log P: 6,37 tPSA: 52,81 CLogP: 7,4475 $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}$ Masa exacta: 520,41 Peso molecular: 520,79	3-amino-1-(4-(2-(dim etilamino)etil)piperazin-1-il)-2,2-bis(3,5-dim etilbencil)propan-1-ona Log P: 4,91 tPSA: 52,81 CLogP: 5,7915 $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}$ Masa exacta: 464,35 Peso molecular: 464,69	2-(aminometil)-1-(4-(2-(dim etilamino)etil)piperazin-1-il)-5-fenil-2-(3-fenilpropil)pentan-1-ona Log P: 4,63 tPSA: 52,81 CLogP: 5,7615 $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}$ Masa exacta: 464,35 Peso molecular: 464,69
Fórmula Pm	$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}$	$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}$	$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}$
Potencia antimicrobiana (MIC)			
<i>S. aureus</i>	10	50	200
MRSA	10	50	50
MRSE	10	35	50
<i>E. coli</i>	10	100	200
Potencia anticancerosa (CI <sub>50</sub> )			
A20	n.e.	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.	n.e.
Toxicidad			
MRC-5	n.e.	n.e.	n.e.
RBC (CE <sub>50</sub> )	252	n.e.	>1000
Selectividad anticancerosa			
MRC-5/A20	n.e.	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.	n.e.
n.e. = no ensayado			

Tabla 7. Continuación. ( Todos los valores se dan en u.g/ml).

	 <p style="text-align: center;">37</p>	 <p style="text-align: center;">38</p>
Nombre IUPAC	3-amino-1-(4-(2-(dimetilamino)etil)piperazin-1-il)-2,2-bis(naftalen-2-ilmetil)propan-1-ona Log P: 4,96 IPSA: 52,81 CLogP: 6,1435  $C_{33}H_{40}N_4O$ Masa exacta: 508,3202 Peso molecular: 508,6969	3-amino-1-(4-(2-(dimetilamino)etil)piperazin-1-il)-2,2-bis(4-(trifluorometil)encil)propan-1-ona Log P: 4,81 IPSA: 52,81 CLogP: 5,5615  $C_{27}H_{34}F_6N_4O$ Masa exacta: 544,2637 Peso molecular: 544,5755
Fórmula Pm	$C_{33}H_{40}N_4O$ Masa exacta: 508,3202 Peso molecular: 508,6969	$C_{27}H_{34}F_6N_4O$ Masa exacta: 544,2637 Peso molecular: 544,5755
Potencia antimicrobiana (MIC)		
<i>S. aureus</i>	15	35
MRSA	2,5	5
MRSE	10	50
<i>E. coli</i>	35	100
Potencia anticancerosa (Cl <sub>50</sub> )		
A20	n.e.	n.e.
MethA	n.e.	n.e.
Toxicidad		
MRC-5	n.e.	n.e.
RBC (CE <sub>50</sub> )	301	862
Selectividad anticancerosa		
MRC-5/A20	n.e.	n.e.
RBC/A20	n.e.	n.e.
n.e. = no ensayado		

Ejemplo 3

El compuesto 7 descrito en el Ejemplo 2 se cribó frente a dos líneas celulares normales y nueve líneas celulares de cáncer.

5 Todas las líneas celulares eran de origen humano. La solución madre del compuesto 7 se disolvió en medio de ensayo que contenía DMSO al 10 %. Se realizaron tres experimentos paralelos contra cada línea celular.

10 Los resultados anteriores para el compuesto 7 contra las células de cáncer A20 dan una  $CI_{50}$  de 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , y frente a la  $CE_{50}$  de RBC de 292  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 2). Los ensayos anteriores del compuesto 7 frente a las células MRC-5 dieron una  $CI_{50}$  de 13,5 y 14  $\mu\text{g/ml}$  mientras que el cribado del panel dio una  $CI_{50}$  de 8,21  $\mu\text{g/ml}$ .

Tabla 8 - Resultados del cribado del panel del compuesto 7 frente a dos líneas celulares normales (MRC-5 y HUV-EC-C) y nueve líneas celulares cancerosas.

Línea celular	Órgano	Enfermedad	Tipo celular	THAP164 $CI_{50}$ $\mu\text{g/ml}$
MRC-5s	Pulmón	Normal	Fibroblasto	8,21
HUV-EC-C	Vena umbilical	Normal	Endotelial	3,81
DU-145	Próstata	Carcinoma	Epitelial	15,21
OVCAR-3	Ovario	Adenocarcinoma	Epitelial	18,05
MDA-MB435	Mama	Carcinoma	N/A	6,54
FEMX	Piel	Melanoma	N/A	17,1
UT-SCC-24A	Lengua	Carcinoma escamoso oral	Célula de cáncer oral primario	14,19
UT-SCC-34A	Laringe supraglótica	Carcinoma escamoso oral	Célula de cáncer oral primario	16,18
HT-29	Colon	Adenocarcinoma colorrectal	Epitelial	15,45
Ramos	N/A	Linfoma de Burkitt	Linfocito B	2,61
Kelly	N/A	Neuroblastoma	N/A	3,90

15 Ejemplo 4

Los derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido de la invención se fabricaron y se ensayaron para determinar la actividad antimicrobiana y se investigaron para determinar su idoneidad para administración oral.

20 Síntesis

Los derivados de  $\beta^{2,2}$ -aminoácido (Figura 3) se sintetizaron de acuerdo con las estrategias mostradas en la Figura 4. Para una revisión que incluye un amplio intervalo de métodos para preparar  $\beta$ -amino, véase Abele, S. et al. Eur. J. Org. Chem. [2000] 2000, 1-15. Los  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos Boc-protectados 3a-d se acoplaron a cuatro grupos catiónicos C-terminales diferentes (figura 4). Con el fin de mejorar los rendimientos, se usaron 1,5 equiv. del reactivo de acoplamiento TFFH en la etapa de acoplamiento final, y los  $\beta^{2,2}$ -aminoácidos también se preactivaron durante 2 h con TFFH en lugar de los 10 min estándar. Las reacciones de acoplamiento se siguieron de un análisis espectrométrico de masas y se terminaron mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso. Sin embargo, debido a la impedancia estérica, el tiempo de acoplamiento tuvo que extenderse hasta 7 días para la unión de los grupos catiónicos C-terminales.

30 Procedimiento general para la síntesis de 1a-d.

35 La síntesis se basó en una síntesis notificada anterior de Cronin et al. Anal. Biochem. [1982] 124, 139-149. En resumen, se disolvió metóxido sódico (20 mmol) en metanol para conseguir una concentración aproximada de 0,2 M antes de añadir cianoacetato de metilo (20 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 min a t.a. Se añadió el bromuro de bencilo deseado (20 mmol) y la solución se calentó a reflujo durante 15 min antes de enfriar la solución a t.a., y se añadió una segunda porción de metóxido sódico (20 mmol). Después de 5 min de agitación a t.a., se añadió otra porción del bromuro de bencilo deseado (20 mmol) seguido de 15 min más de reflujo. Se retiraron aproximadamente 2/3 de metanol al vacío antes de diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó a sequedad. El producto 1a-d se usó en la siguiente Síntesis sin purificación adicional.

45 Procedimiento general para la síntesis de 2a-d.

La síntesis se basó en la síntesis notificada anterior de Cronin et al. anteriormente y Bodanszky et al. "The practice of peptide synthesis" Sprinige-Verlag 1994. En resumen, se lavó  $\text{Ra/Ni}$  (típicamente 2 ml) con metanol para retirar el agua antes de añadir el derivado de cianoacetato de metilo deseado (1a-d) (3,5 mmol) junto con ácido acético (típicamente 1 ml) y metanol para producir una concentración final de 1a-d de aproximadamente 0,1 M. La mezcla

50

de reacción se hidrogenó a 45 °C con un condensador de reflujo montado durante 5 días con 1 bar de H<sub>2</sub> antes de retirar el Ra/Ni por filtración y la mezcla de reacción se evaporó a sequedad. El éster metílico β<sup>2,2</sup>-aminoácido en bruto se disolvió en una mezcla 5:1 de 1,4-dioxano y agua (0,35 M) y el pH se ajustó a 8 con TEA antes de añadir Boc<sub>2</sub>O (1,5 equiv.) disuelto en el menor 1,4-dioxano posible, y la solución se agitó a t.a. durante 18 h. La mezcla de reacción se acidificó a pH 4-5 con HCl 0,1 M y se extrajo tres veces con acetato de etilo antes de que se secase la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto en bruto 2a-d se usó en la siguiente síntesis sin purificación adicional.

#### Procedimiento general para la síntesis de 3a-d.

La síntesis se basó en una publicación de Seebach et al. *Helv. Chim. Acta* [1998] 81, 2218-2243. En resumen, el éster metílico β<sup>2,2</sup>-aminoácido Boc-prottegido en bruto 2a-d (0,35 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1 de 1,4-dioxano y agua para conseguir una concentración final de aproximadamente 1,2 mM antes de añadir hidróxido de litio (2,1 mmol) disuelto en la menor cantidad de agua posible. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se dejó durante 18 h antes de reducir el volumen a aproximadamente 1/5 al vacío y el pH se ajustó a 1-2 añadiendo lentamente HCl 0,1 M. La solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo antes de que se secase la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto en bruto 3a-d se usó en la siguiente síntesis sin purificación adicional.

#### Procedimiento general para la síntesis de 4a-d, 5a-d, 6a-d y 7a-d.

La síntesis se basó en el libro de texto de Chan y White, "Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach", Oxford University Press 2000; p. 346. En resumen, el β<sup>2,2</sup>-aminoácido Boc-prottegido (3a-d) (típicamente 0,2 mmol) se disolvió en DMF (0,02 M) y se añadió DIPEA (3 equiv.) junto con TFFH (1 equiv.). Los β<sup>2,2</sup>-aminoácidos se activaron durante 2 h antes de añadir la amina deseada (2 equiv.). Las reacciones se siguieron de MS, y se dejaron reaccionar hasta 7 días antes de diluirse con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a sequedad. Los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido Boc-prottegido se desprottegieron disolviéndolos en DCM, añadiendo un volumen equivalente de TFA:TIS:agua (95:2,5:2,5) y se agitaron a t.a. durante 2 h antes de evaporarse a sequedad. Los productos en bruto se purificaron por RPHPLC preparativa y se liofilizaron. La pureza de los compuestos se comprobó por HPLC analítica con un detector PDA que abarcaba de 210 nm a 310 nm. Todos los compuestos poseían una pureza por encima del 95 %.

#### Actividad antimicrobiana

Cada compuesto se ensayó por duplicado en 200, 100, 50, 35, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 µg/ml. Todos los compuestos ensayados eran sales de ácido di-trifluoroacético.

#### Actividad hemolítica

La fracción de plasma de sangre humana heparinizada se eliminó en primer lugar por centrifugación y tres etapas de lavado adicionales con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) precalentada a 37 °C. Posteriormente, los RBC humanos se diluyeron en hematocrito al 10 % y los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido se disolvieron en PBS proporcionando concentraciones que variaban de 1-1000 µg/ml. Los RBC diluidos se añadieron a las soluciones de compuesto hasta una concentración final de eritrocitos del 1 % v/v. Se incluyeron PBS y Triton X-100, en una concentración final del 0,1 % v/v, como control negativo y positivo. Después de 1 hora de incubación agitada a 37 °C, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min. La liberación de hemoglobina se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 405 nm. La actividad hemolítica se calculó como la relación de muestra tratada con un derivado de β<sup>2,2</sup>-aminoácido y la muestra tratada con tensioactivo de acuerdo con la fórmula:

$$[\%] \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs}[\beta^{2,2} - \text{aminoácido}] - \text{Abs}[\text{Control negativo}]}{\text{Abs}[\text{Control positivo}] - \text{Abs}[\text{Control negativo}]} \times 100$$

Tabla 9. Concentración inhibitoria mínima (MIC en µM) contra MRSA, MRSE, *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*, y actividad hemolítica (CE50 en µM) contra RBC humanos para una serie de pequeños derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido. Un índice terapéutico se calculó dividiendo los valores de RBC de CE50 por los valores MIC contra cada cepa bacteriana.

Entrada	MIC <sup>a</sup>				RBC <sup>h</sup>	Índice terapéutico.				
	MTRSA <sup>c</sup>	MRSE <sup>d</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>e</sup>	<i>E. coli</i> <sup>f</sup>		MRSA	MRSE	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
4a	72	72	289	289	-	172	17	25	8,6	
4b	6,5	65	45	129	1116	120	29	20	8,5	
4c	3,4	14	20	48	409	26	26	26	26	1,3
4d	13	13	13	13	255					
5a	315	315	315	315	-	38	7,5	11	7,5	
5b	14	70	49	70	525	41	20	20	14	
5c	7,4	15	15	22	303	23	48	23	23	1,2
5d	15	7,2	15	15	289	9,1	9,1	9,1	3,2	
6a	56	56	56	160	507	66	22	33	9,4	
6b	7,1	21	14	50	468	16	16	16	5,1	0,4
6c	7,5	7,5	7,5	23	117	37	74	37	37	3,7
6d	7,4	3,7	7,4	7,4	274	23	55	19	4,1	
7a	59	25	71	336	1377	57	28	28	8	
7b	7,4	15	15	52	425	59	117	117	19	8,3
7c	7,8	3,9	3,9	24	457	4,7	4,7	4,7	2,3	0,8
7d	3,8	3,8	3,8	7,7	18					

Las concentraciones más altas ensayadas fueron de <sup>a</sup>200 µg/ml y <sup>b</sup>1000 µg/ml. Todos los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido se aislaron como sus sales di-trifluoroacetato, y las concentraciones molares se calcularon como tal. <sup>c</sup>*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (ATCC 33591), <sup>d</sup>*Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (ATCC 27626), <sup>e</sup>*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), <sup>f</sup>*Escherichia coli* (ATCC 25922), <sup>g</sup>*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y <sup>h</sup>glóbulos rojos humanos. La notación "-" representa ninguna actividad detectable (MIC o CE50) dentro del intervalo de concentración ensayado.

#### Propiedades típicas de fármacos y absorción oral

Usando la aplicación QikProp de Schrödinger que se incluye en el software Maestro de Schrödinger v. 9.1, se evaluó una evaluación de las propiedades típicas de fármacos de los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido con respecto a la *Regla de cinco de Lipinski* junto con una estimación del porcentaje de absorción oral en seres humanos. Las reglas establecen que un fármaco activo oral no debe violar más de uno de los cuatro criterios siguientes; 1) el coeficiente log P de reparto de octanol-agua debe ser inferior a 5, 2) la masa molecular (Pm) no debe exceder 500 daltons, 3) se tolera un máximo de 5 grupos de donantes de unión de hidrógeno (HBD), y 4) allí no debe haber más de 10 grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA). Los resultados se presentan en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Evaluación de las propiedades típicas de fármacos de los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido preparados con respecto a la *Regla de cinco de Lipinski* y el cálculo de la absorción oral potencial en seres humanos.

Comp.	<i>Regla de cinco de Lipinski</i> (mayor valor permitido)				Calc. abs. oral <sup>e</sup> (%)
	Pm <sup>a</sup> (500)	HBD <sup>b</sup> (5)	HBA <sup>c</sup> (10)	Log P <sup>d</sup> (5)	
4a	464,7	1	7	3,8	72
4b	544,6	1	7	4,2	62
4c	508,7	1	7	4,3	63
4d	520,8	1	7	4,8	66
5a	407,6	1	5	3,9	86
5b	487,5	1	5	4,4	88
5c	451,6	1	5	4,3	87
5d	463,7	1	5	5,1	79
6a	395,6	2	4,5	3,8	84
6b	475,5	2	4,5	4,6	89
6c	439,6	2	4,5	4,7	89
6d	451,7	2	4,5	5,3	80
7a	367,5	4	3,5	2,9	73
7b	447,4	4	3,5	3,4	71
7c	411,5	4	3,5	3,4	72
7d	423,6	4	3,5	3,7	73

• Los pesos moleculares se calcularon para derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido no ionizados. Número calculado de grupos donantes de enlaces de hidrógeno (HBD). Número calculado de grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA). Los valores eran promedios sobre varias configuraciones; por lo tanto, los números no enteros. Coeficiente log P de reparto de octanol-agua calculado. <sup>e</sup>Porcentaje calculado de absorción oral en seres humanos. Todas las predicciones se calcularon usando la aplicación QikProp de Schrödinger incluida en el software Maestro de v. 9.1.

Los resultados de los cálculos revelaron que todos los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido cumplieron la *Regla de cinco de Lipinski* ya que ninguno de los compuestos violó más de una de las cuatro reglas. Se violó una única regla en 5 de los 16 derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido preparados, en los que tres de estas violaciones fueron debido a una masa molecular por encima de 500 (4b, 4c, y 4d), mientras que los otros dos se debieron a un valor log P por encima del límite de 5 (5d y 6d).

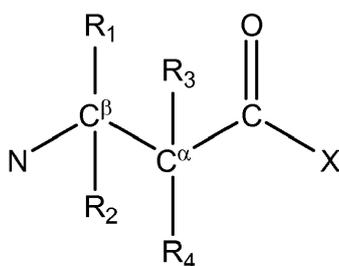
El cálculo del porcentaje de absorción oral en seres humanos mediante el software concluyó que era probable que todos los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido fueran absorbidos bastante bien teniendo una absorción oral calculada en el intervalo del 62 % al 89 %. El porcentaje de absorción oral más alto se calculó para los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido 5a, 5b, 5c, 6b, y 6c, que estaban todos en el intervalo de absorción oral del 86 % - 89 %.

#### Permeabilidad

Alentada por los cálculos teóricos, se investigó adicionalmente la permeabilidad de los derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácidos usando un modelo de barrera basado en vesículas de fosfolípidos recientemente establecido (Flaten et al. Eur. J. Pharm. Sci. [2006] 27, 80-90). Se investigaron cuatro derivados de β<sup>2,2</sup>-aminoácido (4c, 5c, 6c y 7c), que mostraron una potencia similar contra MRSA y contra *E. coli*. En base a la clasificación del modelo de absorción, los cuatro compuestos mostraron una permeabilidad equivalente a ser *moderadamente absorbidos* en seres humanos. Para los valores de permeabilidad experimental, el compuesto 5c mostró la permeabilidad más alta seguida de los compuestos 6c, 4c, y 7c.

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 y que incorpora un  $\beta$  aminoácido disustituido, cada uno de los grupos de sustitución en el  $\beta$  aminoácido, que pueden ser iguales o diferentes, comprende al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno, es lipófilo y tiene al menos un grupo cíclico, uno o más grupos cíclicos dentro de un grupo de sustitución pueden estar unidos o condensados a uno o más grupos cíclicos dentro del otro grupo de sustitución y cuando los grupos cíclicos están condensados de esta manera, el número total combinado de átomos diferentes de hidrógeno para los dos grupos de sustitución es de al menos 12, y en los que dicho derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico es de 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud, para su uso como un agente antimicrobiano citolítico.
2. Un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los dos grupos de sustitución son iguales.
3. Un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el  $\beta$  aminoácido es un  $\beta^{2,2}$  o  $\beta^{3,3}$  aminoácido disustituido.
4. Un péptido para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que cada uno de los grupos de sustitución lipófilos comprende un grupo fenilo o ciclohexilo opcionalmente sustituido.
5. Un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichos grupos fenilo o ciclohexilo se separan del átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  del  $\beta$  aminoácido por 1 a 4 átomos de unión.
6. Un péptido para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que cada uno de los grupos de sustitución lipófilos comprende de 8 a 12 átomos diferentes de hidrógeno.
7. Un péptido para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el extremo C del derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico está amidado y opcionalmente sustituido.
8. Un péptido para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido o peptidomimético incorpora un aminoácido catiónico, preferiblemente arginina o lisina.
9. Un uso *ex vivo* de un derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como un agente citolítico.
10. Un derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico que tiene una carga positiva neta de al menos +2 a pH 7,0 que incorpora un grupo de fórmula I:



(I)

- en la que cualesquiera 2 de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno y 2 son grupos de sustitución, que pueden ser iguales o diferentes, comprenden al menos 7 átomos diferentes de hidrógeno, son lipófilos e incluyen un grupo cíclico, no estando dicho grupo cíclico unido directamente al átomo de carbono  $\alpha$  o  $\beta$  sino estando opcionalmente unido o condensado a un grupo cíclico en el otro grupo de sustitución, cuando los grupos cíclicos están condensados, el número total combinado de átomos diferentes de hidrógeno para los dos grupos de sustitución es de al menos 12, y en la que X representa O, C, N o S, y en la que dicho derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico es de 1 a 4 aminoácidos o unidades equivalentes de longitud.
11. Una formulación que comprende una molécula de acuerdo con la reivindicación 10 y un diluyente, vehículo o excipiente.
12. Un derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en terapia.
13. Un producto que comprende (a) un derivado peptídico, peptidomimético o aminoacídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o según la reivindicación 10, y (b) un agente antimicrobiano adicional como una preparación combinada para su uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de una infección microbiana.

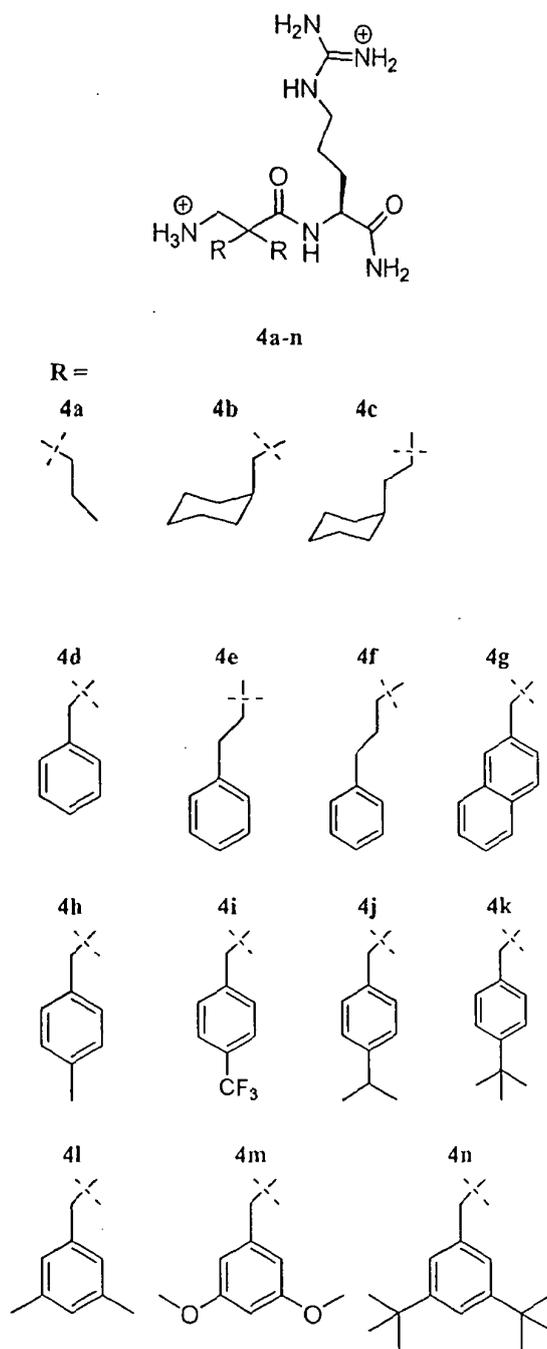


Figura 1

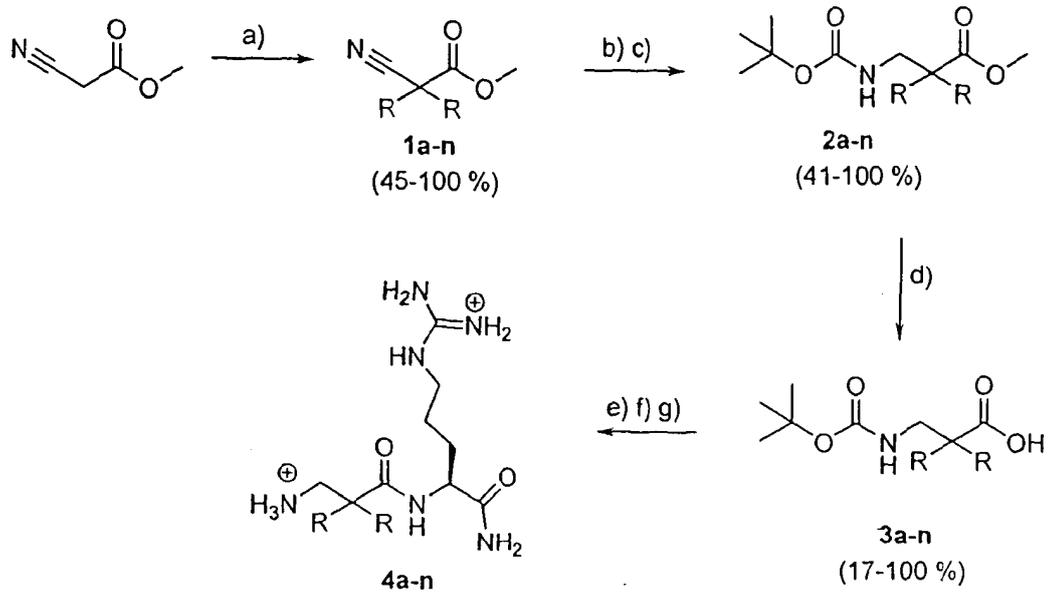


Figura 2

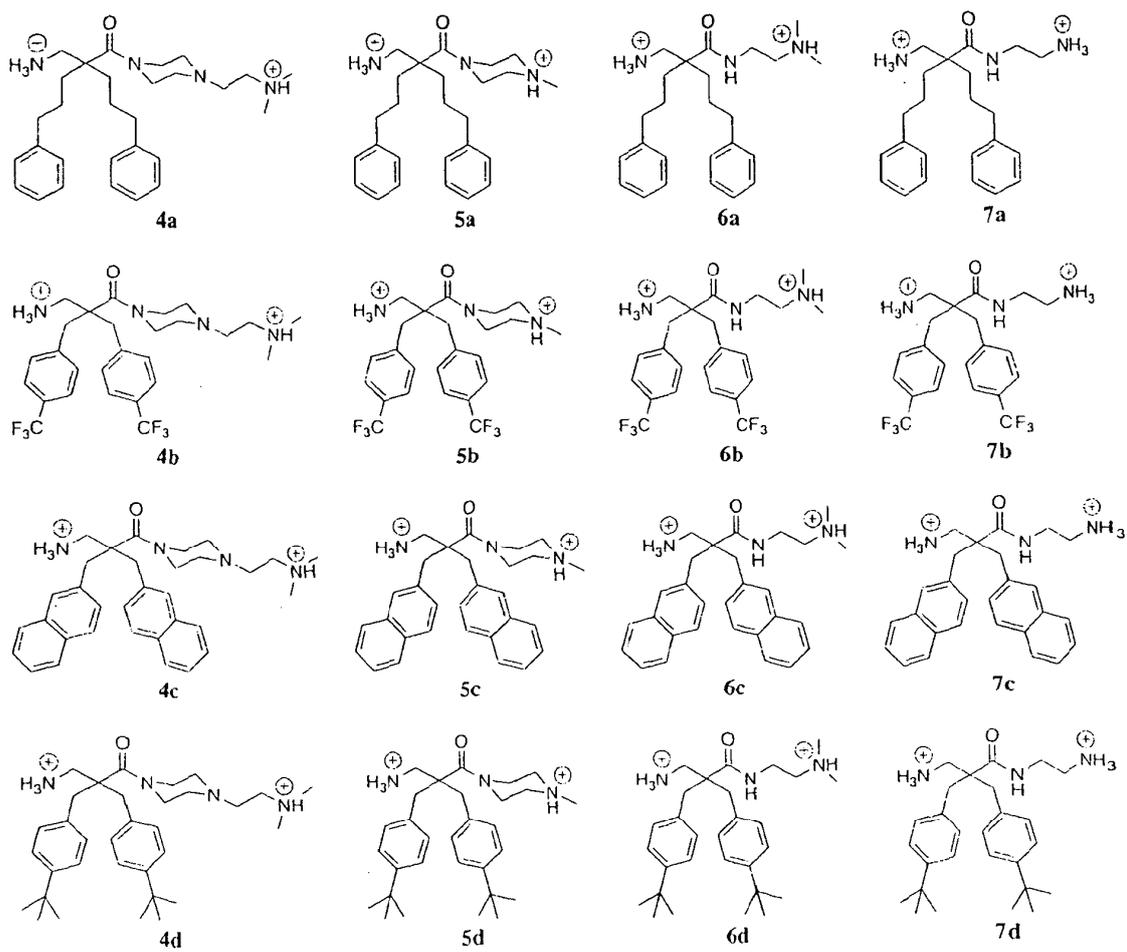


Figura 3

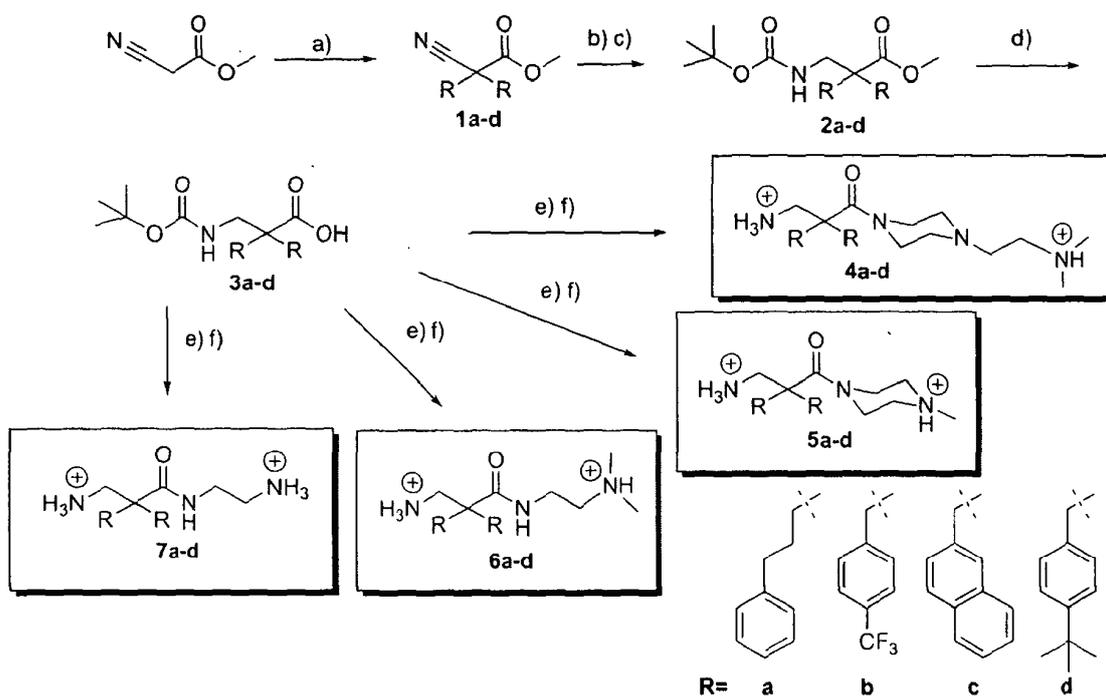


Figura 4