

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 698**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2015 PCT/FR2015/050727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2015 E 15718519 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3119799**

54 Título: **Compuestos antimicrobianos**

30 Prioridad:

21.03.2014 FR 1452424

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy L'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, ROSALEEN JOY;
BEDERNJAK, ALEXANDRE F.;
CELLIER, MARIE;
NG, KENG TIONG;
ORENGA, SYLVAIN;
PERRY, JOHN D. y
VÁRADI, LINDA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 670 698 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

Compuestos antimicrobianos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos antimicrobianos, nuevos medios de reacción que los comprenden, así como sus utilidades. En particular, los nuevos compuestos según la invención se muestran eficaces contra microorganismos multirresistentes a los antimicrobianos y concretamente contra bacterias multirresistentes a los antibacterianos convencionales.

Estado de la técnica

10 El aumento de los microorganismos que presentan resistencias múltiples a los agentes antimicrobianos clásicos (por ejemplo a los antibacterianos) necesita regularmente el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos dotados de modos de acción de un nuevo tipo. Una falta preocupante de nuevos antimicrobianos, concretamente respecto al tratamiento de las bacterias gram negativas multirresistentes, como las que producen carbapenemasas, se muestra particularmente preocupante. Lo que es más, estos microorganismos multirresistentes son susceptibles de dar lugar a diagnósticos erróneos, que generan resultados falsos positivos cuando dichos microorganismos multirresistentes
15 están presentes en medios de reacción llamados «específicos» de otros microorganismos, induciendo de este modo problemas graves en términos de especificidad de detección.

Las técnicas de diagnóstico microbiológico se basan también ampliamente en etapas de cultivo para aislar los microorganismos de interés. Cuando se utilizan para buscar patógenos potencialmente presentes en pequeña cantidad en una flora microbiana comensal abundante, es necesario utilizar medios de cultivo selectivos. Estos
20 medios se basan concretamente en la utilización de inhibidores específicos que actúan sobre las principales especies de la flora comensal sin inhibir el crecimiento de los patógenos buscados.

A finales de los años 1970, se desarrollaron los «peptidomiméticos» por sus propiedades antibacterianas. Estos estaban normalmente constituidos por una parte «activa» antibacteriana unida mediante enlace covalente a uno o varios aminoácidos destinados a facilitar la absorción de estos «peptidomiméticos» por medio del sistema de transporte de péptidos microbianos. Una escisión hidrolítica intracelular (debida a una actividad aminopeptidasa) liberaba entonces la parte activa antibacteriana en el interior de las bacterias de interés para una interacción con su diana. A modo de «peptidomimético», se puede citar alafosfalina (ácido L-analil-L-1-aminoetilfosfónico; identificador CAS: 60668-24-8), desarrollada por la compañía Roche a finales de los años 1970. La absorción bacteriana de la alafosfalina se describe en la bibliografía como siendo realizada por medio de LL-dipéptido permeasas. Una vez en el interior de las bacterias diana, la parte activa antibacteriana, en este caso fosfalina (ácido L-1-aminoetilfosfónico), se hidroliza (más exactamente «se libera» del residuo de alanina por hidrólisis del enlace peptídico que lo une a dicho residuo de alanina), a continuación se une a la alanina racemasa, impidiendo de este modo la síntesis de D-alanina, ingrediente esencial para la biosíntesis del peptidoglicano [1]. Se ha descrito que la alafosfalina posee un amplio espectro de actividad antibacteriana [2], a la vez in vitro e in vivo, frente a ciertos microorganismos aerobios Gram positivos (Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, pero ni los estreptococos del Grupo A ni los del Grupo B como S. agalactiae, ni Streptococcus pneumoniae), bacterias anaerobias (Bacteroides sp. y Clostridium perfringens, pero no Clostridium difficile) y numerosas especies de bacilos Gram negativos, pero no Pseudomonas o Acinetobacter.
35

La utilización de alafosfalina también se ha descrito en la solicitud de patente WO 02/22785 y en la patente EP-B-1325024 como agente selectivo para el desarrollo de un medio de cultivo selectivo que permita el aislamiento de microorganismos que pertenecen a la familia Salmonella spp.
40

Sin embargo, desde 1984, Gibson y col. [3] demuestran que la alafosfalina se mostraba inactiva contra numerosas cepas bacterianas debido a la elevada frecuencia de cepas resistentes.

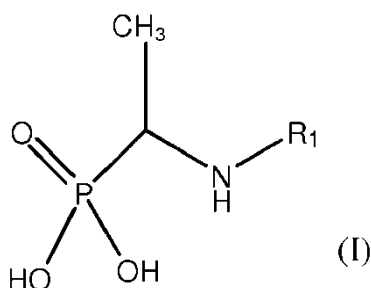
Otros antibacterianos sintéticos desarrollados en los años 1980 aprovechaban una vía de administración y/o un modo de acción similares. Por ejemplo, Cheung y col. [4] estudiaron la actividad antibacteriana de varios dipéptidos halogenados, entre los cuales L-β-cloroanalil-L-β-cloroalanina. La β-cloroalanina, liberada por hidrólisis, parece interactuar con cierto número de sistemas enzimáticos, entre los cuales alanina racemasa, y parecía presentar también un amplio espectro de actividad antibacteriana [5]. En el marco de una tentativa de optimización de los sustratos de Cheung y col. [4], el residuo β-CI-L-Alanina (β-CI-L-Ala) se incorporó en diversos di- y tripéptidos [5]. No obstante, no solamente ninguno de los péptidos obtenidos de este modo permitió mejorar, de manera significativa, la actividad antibacteriana del compuesto L-β-cloroanalil-L-β-cloroalanina, sino que los autores de esta publicación concluyeron que los di- y tri-péptidos que comprenden un residuo L-alanilo estaban despojados de actividad antibacteriana, concretamente en lo que concierne a los microorganismos Gram negativos. Los autores de esta publicación han deducido de ello que la ausencia de actividad antibacteriana observada en lo que concierne a los residuos di- y tri-péptidos que comprenden un residuo L-alanilo podía correlacionarse con la propiedad de la L-alanina de proteger la alanina racemasa de las bacterias Gram negativas contra los residuos β-CI-L-Ala. En otras palabras, parece haber competencia entre el residuo β-CI-L-Ala y el residuo L-alanilo con respecto a alanina racemasa.
55

Siempre con vistas a la optimización, Atherton y col. [6] intentaron combinar, en una misma molécula, alafosfalina por un lado, y β -cloro-L-alanina (β -Cl-L-ala), por otro. Sin embargo, esta tentativa terminó fracasando, en la medida en que esta molécula híbrida no presentaba actividad antibacteriana, a pesar de las propiedades antibacterianas conocidas de la β -cloroalanina [7]. Atherton y col., concluyeron que este resultado estaba relacionado con la incapacidad de las L,L dipéptido permeasas para transportar eficazmente este compuesto en las bacterias.

En el momento en que la que la resistencia a los antimicrobianos clásicos/convencionales aumenta, un objetivo consiste, por lo tanto, en desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos, tanto en el plano de la terapia humana o animal, como en el plano del diagnóstico in vitro que emplea estos nuevos agentes antimicrobianos como agentes selectivos. Esta tarea es tanto más ardua dado que, tal como se ha indicado anteriormente (véase las publicaciones [5] y [6]), las modificaciones y otras combinaciones de compuestos antimicrobianos existentes son susceptibles de conllevar una disminución - incluso una pérdida total - de su actividad antimicrobiana.

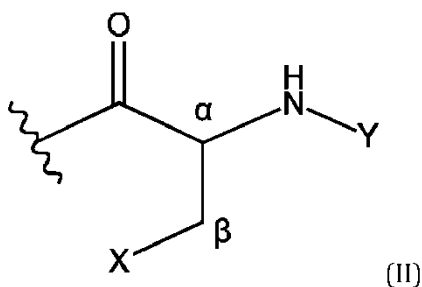
Exposición de la invención

La solicitante ha descubierto, de manera sorprendente, que el objetivo previsto anteriormente se alcanzaba mediante los compuestos de fórmula general (I):



así como sus sales, derivados y análogos, preferiblemente sus sales en la que R1 representa:

- una parte peptídica P1 que consiste en una secuencia lineal de uno a cinco residuos de aminoácido; comprendiendo dicha parte peptídica P1 al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, o
- una parte peptídica P2, estando dicha parte peptídica P2 representada por la fórmula general (II) siguiente:

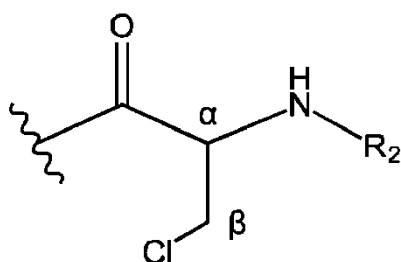


en la que X representa un átomo de hidrógeno o de cloro, y

Y representa un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a cuatro residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, y/o al menos un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, y/o al menos un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina, y en la que cuando X representa un átomo de hidrógeno, Y es tal como se ha definido anteriormente con la excepción de un átomo de hidrógeno o de un residuo de alanina, ya esté este residuo de alanina en posición N-terminal («al final de la cadena») o esté unido a otro residuo de aminoácido por un enlace peptídico (entre la función amina en α de dicho residuo de alanina y la función ácido carboxílico en α del otro residuo de aminoácido).

Por supuesto, como indica la terminología utilizada, y en particular la expresión «parte peptídica», una secuencia lineal constituida por una pluralidad de residuos de aminoácido significa que la pluralidad de residuos de aminoácido están unidos entre sí por enlaces peptídicos. Como se conoce bien en bioquímica, un enlace peptídico es un enlace covalente que se establece entre la función carboxilo portada por el carbono en α de un aminoácido («función carboxilo en α ») y la función amina portada por el carbono en α de aminoácido siguiente en la cadena peptídica («función amina en α »). Este enlace peptídico corresponde a una función amida.

Preferiblemente, R1 está representado por la fórmula general (III):



(III)

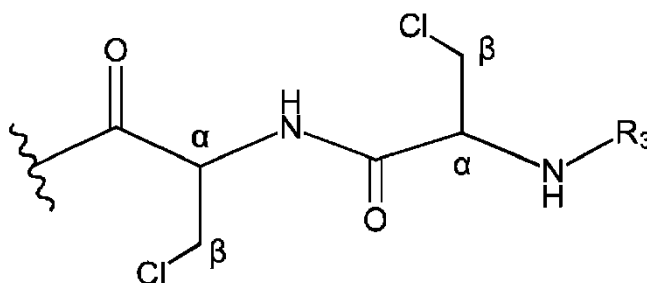
5 en la que R2 es un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a cuatro residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, y/o al menos un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, y/o al menos un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina.

Por definición, cuando R2 es un átomo de hidrógeno, R1 es una parte peptídica que consta de un solo residuo de aminoácido, a saber un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina.

10 Tal como se ha indicado anteriormente, y según una realización preferida, cuando R2 es una secuencia lineal de uno a cuatro residuos de aminoácido, ésta comprende al menos un residuo de β -cloroalanina (preferiblemente β -cloro-L-alanina), y/o al menos un residuo de norvalina (preferiblemente de L-norvalina), y/o al menos un residuo de metionina (preferiblemente de L-metionina). Ventajosamente, el antedicho residuo de β -cloroalanina (preferiblemente β -cloro-L-alanina), de norvalina (preferiblemente de L-norvalina) o de metionina (preferiblemente de L-metionina) está unido directamente por un enlace peptídico al residuo de β -cloro-L-alanina representado en la fórmula general (III) (estableciéndose dicho enlace peptídico entre la función ácido carboxílico en α de dicho residuo de β -cloroalanina, de norvalina o de metionina y la función amina representada en la fórmula general (III)).

Según una realización particular, R2 consiste en un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina o en un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina.

Según una realización preferida, R1 está representado por la fórmula general (IV):



(IV)

20 en la que R3 es un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a tres residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina.

De acuerdo con las convenciones de redacción vigentes en química (concretamente en materia de fórmulas topológicas), el símbolo llamado «en onda» o «en zigzag»

25 ξ , representado en las fórmulas (II), (III) y (IV) anteriormente, esquematiza el enlace del grupo R1 al resto del compuesto de fórmula general (I) (mediante el establecimiento de un enlace peptídico).

Por definición, cuando R3 es un átomo de hidrógeno, R1 es una parte peptídica que consta únicamente de dos residuos de aminoácido idénticos, a saber dos residuos de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, unidos entre sí por un enlace peptídico. El motivo constituido de este modo se denomina « β -cloroanilil- β -cloroalanina».

30 Según una realización particular, R3 comprende un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, o un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina. Ventajosamente, dicho residuo de norvalina (preferiblemente de L-norvalina) o de metionina (preferiblemente de L-metionina) está unido directamente por un enlace peptídico (entre la función ácido carboxílico en α de dicho residuo de norvalina o de metionina y la función amina NH-R3 del residuo β -cloroanilil- β -cloroalanina representado en la fórmula general (IV)) al residuo β -cloroanilil- β -cloroalanina (preferiblemente al residuo β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina) representado en la fórmula general (IV). Como es bien conocido por el experto en la materia, la formación de este enlace peptídico se obtiene mediante una reacción de

- condensación entre la función amina primaria del motivo β -cloroanilil- β -cloroalanina (preferiblemente de β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina) y la función ácido carboxílico de la norvalina (preferiblemente de L-norvalina) o de la metionina (preferiblemente de L-metionina), para formar un enlace peptídico entre dicho motivo β -cloroanilil- β -cloroalanina y dicha norvalina (preferiblemente L-norvalina) o dicha metionina (preferiblemente L-metionina). Según una realización particular, R3 consiste en un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, o un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina.
- Preferiblemente, dicha parte peptídica R1 del compuesto de fórmula general (I) consiste en una sucesión lineal de dos a tres, preferiblemente de dos, residuos de aminoácido; estando estos residuos de aminoácido unidos entre sí por enlaces peptídicos, tal como se ha explicado anteriormente.
- De manera general, dicho o dichos residuos de aminoácido se seleccionan entre glicina, sarcosina y las formas L y D, preferiblemente L, de los residuos de β -cloroalanina, de alanina, de arginina, de asparagina, de ácido aspártico, de cisteína, de ácido glutámico, de ácido gamma-glutámico, de glutamina, de histidina, de isoleucina, de leucina, de lisina, de metionina, de norvalina, de fenilalanina, de prolina, de ácido piroglutámico, de serina, de treonina, de triptófano, de tirosina y de valina. Ventajosamente, dicho o dichos residuos de aminoácido se seleccionan entre las formas L y D, preferiblemente L, de los residuos de β -cloroalanina, de alanina, de metionina, de norvalina y de valina.
- Según otra realización, el compuesto antimicrobiano según la invención está definido por la fórmula general (I) prevista anteriormente, en la que R1 representa dicha parte peptídica P2 y en la que X representa un átomo de hidrógeno. Ventajosamente, en esta otra realización, Y es un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, sarcosina, las formas L y D, preferiblemente L, de los residuos de β -cloroalanina, de arginina, de asparagina, de ácido aspártico, de cisteína, de ácido glutámico, de ácido gamma-glutámico, de glutamina, de histidina, de isoleucina, de leucina, de lisina, de metionina, de norvalina, de fenilalanina, de prolina, de ácido piroglutámico, de serina, de treonina, de triptófano, de tirosina y de valina; ventajosamente Y es un residuo de aminoácido seleccionado entre las formas L y D, preferiblemente L, de residuos de metionina y de norvalina.
- Según una realización particularmente preferida, el compuesto antimicrobiano según la invención consiste en:
- ácido β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o
 - ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o
 - ácido L-norvalinil- β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-norvalinil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o
 - ácido L-metionil- β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-metionil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o
 - ácido L-norvalinil-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-norvalinil-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o
 - ácido L-metionil-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-metionil-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico; consistiendo ventajosamente dicho compuesto antimicrobiano en ácido β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico.
- Ventajosamente, el compuesto antimicrobiano según la invención consiste en ácido β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, o una mezcla de los dos.
- Según una realización preferida de la invención, la función amina N-terminal del compuesto antimicrobiano según la invención está protegida por un grupo protector tal como un grupo terciobutilcarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo o benciloxicarbonilo.
- La presente invención también se refiere a un medio de reacción que comprende al menos un compuesto antimicrobiano tal como se ha definido anteriormente, estando dicho compuesto presente en una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l.
- Según una realización preferida, dicho medio de reacción es un medio que permite la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana, preferiblemente de al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico, en el que dicho al menos un compuesto es al menos un agente selectivo que permite inhibir la supervivencia y/o el crecimiento del o

de los microorganismos no diana para favorecer la supervivencia y/o el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana.

5 Ventajosamente, dicho medio de reacción es un medio de cultivo que comprende al menos un nutriente que permite el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana, en el que dicho al menos un agente selectivo permite inhibir el crecimiento del o de los microorganismos no diana para favorecer el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana.

Preferiblemente, dicho medio de reacción comprende, además, un sustrato enzimático específico de una actividad enzimática de dicho al menos un microorganismo diana.

Preferiblemente, dicho medio de reacción comprende al menos un agente selectivo que consiste en:

- 10 – ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente a una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l, o
- 15 – ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente a una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l, o
- una mezcla de los dos.

Según una realización ventajosa, dicho medio de reacción permite la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana (microorganismo de interés), siendo dicho al menos un microorganismo diana:

- 20 – al menos un microorganismo diana Gram negativo que pertenece al género Salmonella, por ejemplo que pertenece a la especie Salmonella enterica, al serotipo Salmonella typhimurium o al serotipo Salmonella enteridis, al género Acinetobacter, por ejemplo a la especie Acinetobacter baumannii, al género Burkholderia, por ejemplo a la especie Burkholderia cepacia, al género Pseudomonas, por ejemplo a la especie Pseudomonas aeruginosa; perteneciendo ventajosamente dicho al menos un microorganismo diana Gram negativo al género Salmonella; o
- 25 – al menos un microorganismo diana Gram positivo, que pertenece al género Listeria, por ejemplo que pertenece a la especie Listeria monocytogenes, o al género Streptococcus, por ejemplo Streptococcus agalactiae y/o Streptococcus pneumoniae y/o Streptococcus pyogenes; perteneciendo ventajosamente dicho al menos un microorganismo diana Gram positivo al género Listeria.

30 Según una realización ventajosa, dicho medio de reacción permite la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana que pertenece al género Salmonella.

Según una realización particularmente ventajosa, dicho medio de reacción permite la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana que pertenece al género Salmonella, comprendiendo dicho medio:

- 35 – al menos un agente nutritivo, tal como peptonas, por ejemplo de origen porcino o bovino, a una concentración comprendida entre 0,2 y 30,0 g/l,
- opcionalmente un tampón,
- al menos un marcador cromógeno, tal como un sustrato enzimático de esterasa y/o un sustrato enzimático de alfa-galactosidasa, a una concentración comprendida entre 0,05 y 15,0 g/l,
- 40 – agar a una concentración comprendida entre 9,0 y 28,0 g/l, y
- al menos un agente selectivo tal como se define en una de las reivindicaciones 12 a 16, preferiblemente a una concentración comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l.

45 Ventajosamente, dicho medio de reacción comprende una mezcla de al menos un sustrato enzimático de esterasa y/o de al menos un sustrato enzimático de alfa-galactosidasa. Puede comprender además un sustrato enzimático de glucosidasa (ventajosamente de β -glucosidasa) y/o un sustrato enzimático de galactosidasa. Según una realización preferida, dicho medio de reacción comprende al menos un sustrato enzimático de esterasa o al menos un sustrato enzimático de alfa-galactosidasa, en asociación con al menos un sustrato enzimático de β -glucosidasa. Según una realización particularmente preferida, dicho medio de reacción comprende al menos un sustrato enzimático de esterasa en asociación con un sustrato enzimático de β -glucosidasa.

50

Un ejemplo de medio de reacción de este tipo se ilustra a continuación, en la tabla 2 (véase el ejemplo 3.1 más adelante).

Preferiblemente, dicho o dichos microorganismos no diana están comprendidos en el grupo constituido por:

- 5 – géneros de la familia de las Enterobacteriaceae, tales como el género *Enterobacter* (por ejemplo *Enterobacter cloacae*) y/o el género *Escherichia* (por ejemplo *Escherichia coli*) y/o el género *Klebsiella* (por ejemplo *Klebsiella pneumoniae*) y/o el género *Serratia* (por ejemplo *Serratia marcescens*) y/o el género *Yersinia* (por ejemplo *Yersinia enterocolitica*), y/o
- el género *Enterococcus* (por ejemplo *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*), y/o
- el género *Staphylococcus* (por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* y/o *Staphylococcus aureus*)

10 preferiblemente el o los microorganismos no diana son resistentes a al menos un antibacteriano convencional.

Las bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae (enterobacterias), como por ejemplo *E. coli*, son bacterias Gram negativas que se encuentran frecuentemente en las muestras biológicas, incluyendo en mezcla con bacterias diana Gram negativas, tales como las bacterias del género *Salmonella*. Estas enterobacterias crecen fácilmente en el medio de cultivo y pueden enmascarar de este modo dichas bacterias diana Gram negativas (también denominadas bacterias Gram negativas de interés). En la medida en que los compuestos antimicrobianos según la presente invención inhiben, de manera selectiva y a baja concentración, ciertas enterobacterias con respecto a las bacterias diana Gram negativas (tales como las bacterias del género *Salmonella*), dichos agentes antimicrobianos según la invención están particularmente adaptadas para la preparación de medios de reacción destinados a la detección y/o la identificación y/o el recuento de bacterias diana Gram negativas tales como las bacterias del género *Salmonella*. De lo anterior resulta que los compuestos antimicrobianos según la invención están particularmente recomendados para la preparación de medios de reacción que pretenden la detección y/o la identificación y/o el recuento de las bacterias del género *Salmonella*.

Por otro lado, los enterococos y concretamente los que pertenecen a la especie *Enterococcus faecalis* son bacterias Gram positivas que se encuentran frecuentemente en las muestras biológicas, incluyendo en mezcla con otras bacterias Gram positivas. Estos enterococos crecen fácilmente sobre/en los medios de cultivo y pueden, en consecuencia, enmascarar bacterias diana Gram positivas (bacterias Gram positivas de interés) tales como bacterias del género *Listeria* (por ejemplo que pertenecen a la especie *Listeria monocytogenes*), bacterias de la especie *Staphylococcus aureus*, bacterias del género *Streptococcus* (entre las cuales *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus pyogenes*). En la medida en que los compuestos antimicrobianos según la invención inhiben, de manera selectiva y a baja concentración, los antedichos enterococos con respecto a las bacterias diana Gram positivas (tales como bacterias del género *Listeria*), dichos compuestos antimicrobianos según la invención son particularmente apropiados para la preparación de medios de reacción destinados a la detección y/o la identificación y/o el recuento de bacterias diana Gram positivas, tales como las mencionadas anteriormente.

Otro objeto de la invención se refiere a la utilización in vitro de un medio de reacción para detectar y/o identificar y/o contar al menos un microorganismo diana, preferiblemente al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación y/o de recuento de al menos un microorganismo diana, preferiblemente de al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) sembrar el medio de reacción tal como se ha definido anteriormente con dicha muestra,
- b) si fuera necesario, incubar el conjunto durante un lapso de tiempo suficiente para permitir la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana,
- c) identificar las colonias formadas por dicho al menos un microorganismo diana.

45 La invención también se refiere al compuesto antimicrobiano, tal como se ha definido anteriormente, para su utilización como medicamento de uso humano o veterinario.

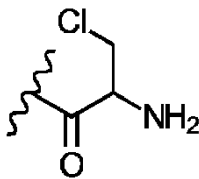
Otro objeto de la invención se refiere a la utilización del compuesto tal como se ha definido anteriormente para su utilización como medicamento en el tratamiento de infecciones microbianas, preferiblemente de infecciones bacterianas, humanas o veterinarias.

50 Según una realización preferida, los compuestos de fórmula (I), así como sus sales, derivados y análogos (en particular sus sales), son particularmente eficaces contra las bacterias que presentan resistencias múltiples (también denominados multirresistentes) a los antibióticos convencionales (concretamente a los antibióticos clásicos), a concentraciones que varían de 0,002 a 1024,0 mg/l preferiblemente de 0,003 a 32,0 mg/l, preferiblemente de 0,2 a

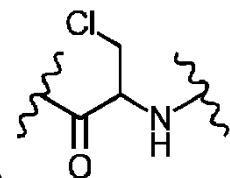
8,0 mg/l, ventajosamente de 0,2 a 2,0 mg/l.

De este modo, la presente invención se refiere a nuevos compuestos antimicrobianos, preferiblemente antibacterianos (por ejemplo antibióticos bactericidas o antibióticos bacteriostáticos), que permiten tratar las infecciones microbianas, y preferiblemente bacterianas, difíciles de tratar utilizando agentes antibacterianos convencionales tales como antibióticos clásicos, a saber utilizados comúnmente para tratar dichas infecciones.

Por «residuo de aminoácido», se entiende, en el sentido de la presente invención, el resto de un aminoácido de interés después de que éste haya establecido al menos un enlace peptídico con al menos otro aminoácido. Por ejemplo, si se examina la fórmula general (IV) prevista anteriormente, parece que la molécula representada por la fórmula general (III) está unida a un residuo de β -cloroalanina, unido a su vez al sustituyente R3; teniendo dicho residuo de β -cloroalanina, por sí mismo, por lo tanto la fórmula siguiente:



i) , cuando R3 es un átomo de hidrógeno, o



ii) , cuando R3 es una secuencia (cadena) lineal de uno a tres residuos de aminoácido; en cuyo caso dicho residuo de β -cloroalanina está unido a otro residuo de aminoácido debido al establecimiento de un enlace peptídico entre la función amina en α del residuo de β -cloroalanina y la función ácido carboxílico en α del otro residuo de aminoácido.

Por supuesto, el mismo razonamiento se aplica por analogía a la definición de los residuos de aminoácido diferentes de un residuo de alanina.

Por «compuesto antimicrobiano», se entiende un compuesto activo contra los microorganismos, a saber destinado a luchar contra estos últimos. Según una realización preferida, este compuesto antimicrobiano es un compuesto antibacteriano, a saber activo contra las bacterias (y destinado a luchar contra estas últimas). En la presente invención, el compuesto antibacteriano puede ser un antibiótico bactericida, a saber que destruye bacterias o un antibiótico bacteriostático, a saber que bloquea el crecimiento bacteriano; en otras palabras que impide la multiplicación de las bacterias sin matarlas necesariamente. Cabe destacar que un antibiótico puede ser bacteriostático a dosis baja y bactericida a una dosis más elevada.

Según otra realización, el «compuesto antimicrobiano», puede consistir en un compuesto «antifúngico». Por «compuesto antifúngico», se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o de ralentizar el crecimiento de una levadura o de un moho. A título indicativo, se puede citar concretamente anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, cicloheximida. Preferiblemente, cuando se utiliza al menos un agente antifúngico, este último se utiliza a concentraciones conocidas por el experto en la materia para obtener el efecto pretendido.

Por «medio de reacción», se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o la supervivencia y/o el crecimiento de los microorganismos. Este medio de reacción puede servir únicamente como medio de revelación, o bien servir como medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos puede efectuarse antes de la siembra y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye también el medio de cultivo. El medio de reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por «medio semisólido», se entiende, por ejemplo, un medio gelificado. El agar es el agente gelificante tradicional utilizado en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar otros agentes gelificantes como por ejemplo gelita, gelatina, agarosa así como otros gelificantes naturales o artificiales. Ciertos números de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa Trypcase-soja, la gelosa MacConkey, la gelosa Mueller Hinton o de forma más general las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press). El medio de reacción según la invención puede comprender además eventuales aditivos como por ejemplo aminoácidos, peptonas (en una concentración apropiada y conocida por el experto en la materia para no correr el riesgo de anular el efecto inhibitorio de los compuestos antimicrobianos objeto de la presente invención), uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, aminoácidos, nucleótidos, minerales, vitaminas, uno o varios agentes selectivos, tampones, uno o varios agentes gelificantes, etc. Dicho medio de reacción también puede comprender un colorante. A título indicativo, se puede citar, como colorante, azul de Evans, rojo neutro, sangre de cordero, sangre de caballo, un opacificante tal como óxido de titanio, nitroanilina, verde malaquita, verde brillante, uno o varios indicadores metabólicos, uno o varios reguladores metabólicos, etc. Este medio de reacción puede, por ejemplo, presentarse en forma líquida, a saber de gel listo para usar, es decir listo para la siembra en tubo, matraz o

en placa Petri.

El experto en la materia también puede utilizar una bi-placa, que permite comparar fácilmente dos medios, que comprenden diferentes sustratos o diferentes mezclas selectivas, en las que se habrá depositado una misma muestra biológica. El medio de reacción puede comprender uno o varios agentes selectivos.

- 5 Por «agente selectivo», se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o de ralentizar el crecimiento de un microorganismo llamado «no diana», a saber diferente del o de los microorganismos diana. Sin ser limitante, una concentración comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l, está particularmente adaptada a la presente invención. De manera general, se indica una concentración de agente selectivo comprendida entre 0,01 mg/l y 5,0 g/l.
- 10 Por «detección», se entiende la detección a simple vista o con ayuda de un aparato óptico de la existencia de un crecimiento de los microorganismos diana (preferiblemente bacterias diana). Cuando el medio de reacción a partir del cual se desea detectar los microorganismos diana comprende un sustrato cromógeno o fluorógeno, la detección puede efectuarse con ayuda de un aparato óptico para los sustratos fluorógenos, a simple vista o con ayuda de un aparato óptico para los sustratos cromógenos.
- 15 Por «recuento de al menos un microorganismo diana», se entiende el hecho de contabilizar/cuantificar el número de microorganismos diana, por ejemplo el número de colonias bacterianas cuando el microorganismo diana es una bacteria.

20 Por «muestra», se entiende una pequeña parte o pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis. La muestra puede ser de origen industrial, bien, según una lista no exhaustiva, una toma de aire, una toma de agua, una toma efectuada sobre una superficie, una pieza o un producto manufacturado, un producto de origen alimentario. Entre las muestras de origen alimentario, se pueden citar de forma no exhaustiva una muestra de productos lácteos (yogures, quesos...), de carne, de pescado, de huevos, de frutas, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de frutas, gaseosa, etc.). Estas muestras de origen alimentario pueden provenir también de salsas o de platos elaborados. Una muestra alimentaria puede proceder finalmente de una alimentación destinada a los animales, tal como concretamente harinas animales o vegetales. La muestra puede ser de origen biológico, animal, vegetal o humano. Puede corresponder entonces a una toma de fluido biológico (sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, secreción orgánica, heces,...), una toma externa (piel, nariz, garganta, perineo, recto, vagina,...) o tisular o células aisladas. Esta toma puede utilizarse tal cual o, previamente al análisis, sufrir una preparación de tipo enriquecimiento, extracción, concentración, purificación, según métodos conocidos por el experto en la materia.

25

30

El control microbiológico corresponde al análisis de una muestra con el fin de detectar y/o contar microorganismos sospechosos/susceptibles de estar presentes en dicha muestra.

35 A título de nutriente que permite el crecimiento de al menos un microorganismo diana sobre el medio de reacción o en el medio de reacción según la invención, se pueden citar concretamente aminoácidos, peptonas (en una concentración apropiada y conocida por el experto en la materia para no correr el riesgo de anular el efecto inhibidor de los compuestos antimicrobianos objeto de la presente invención), hidratos de carbono, nucleótidos, minerales y vitaminas.

40 Cuando el medio de reacción según la invención comprende además un sustrato enzimático específico de una actividad enzimática de al menos un microorganismo diana, se utiliza preferiblemente un sustrato cromógeno y/o fluorógeno.

45 Por «sustrato cromógeno y/o fluorógeno», se entiende un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos diana/buscados gracias a una señal detectable directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede estar unido a una parte que hace las veces de marcador, fluorescente o de colores [8]. Para una detección indirecta, el medio de reacción según la invención puede constar además de un indicador de pH, sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el metabolismo de los microorganismos diana. Dicho indicador de pH puede ser un cromógeno o un fluoróforo. Se citará, como ejemplo de cromóforo, bromocresol púrpura, azul de bromotimol, rojo neutro, azul de anilina, azul de bromocresol.

Los sustratos enzimáticos cromógenos utilizables en la presente invención pueden ser de diferentes naturalezas.

50 En primer lugar, conviene mencionar los sustratos a base de indoxilo y sus derivados que, después de la hidrólisis y en presencia de oxígeno, producen un precipitado que varía del azul al rosa. Estos sustratos a base de indoxilo y sus derivados son particularmente preferidos en la presente invención debido a su empleo relativamente fácil y a su buena sensibilidad en el marco de la detección y/o del recuento de bacterias. Sus aplicaciones se refieren esencialmente a las actividades enzimáticas de tipo osidasas, esterases, lipasas y fosfatasas (siendo la fosfatasa una actividad esterasa de ácido fosfórico). Bien adaptadas a una utilización sobre soporte sólido o semisólido (filtro, gelosa, gel de electroforesis, etc.), lo están menos a una utilización en medio líquido (formación de un precipitado).

55

Ciertos derivados de indoxilo de tipo Aldol® que representan sustratos enzimáticos de interés en la presente invención, en la medida en que la aparición de un precipitado de colores no necesita ninguna adición (oxígeno, sales de metales, etc.). La utilización de dichos sustratos enzimáticos puede mostrarse, por lo tanto, particularmente ventajosa en el marco de una siembra en la masa de las bacterias. Estos derivados de indoxilo de tipo Aldol® son

- 5 derivados de indoxilo (1H-indolil-3-ilo) particulares, a saber sustratos a base de indoxilo conjugados en la amina cíclica (N-arilados), tal como se divulgan en la solicitud de patente PCT publicada con la referencia WO 2010/128120 (a nombre de Biosynth® AG [CH]). Estos sustratos enzimáticos pueden obtenerse de la compañía Biosynth® AG, y en particular, se pueden pedir mediante el sitio de internet de la compañía Biosynth® AG, a saber: <http://www.biosynth.com>.
- 10 En segundo lugar, existen sustratos enzimáticos a base de hidroxiquinolina, de dihidroxiantraquinona, de catecol, de dihidroxiflavona o de esculetina y sus derivados que, en presencia de sales de hierro, producen un precipitado coloré. También en ese caso, sus aplicaciones se refieren esencialmente a actividades enzimáticas de tipo osidasas, esterazas y fosfatasa.

- 15 En tercer lugar, se pueden mencionar los sustratos enzimáticos a base de nitrofenol y nitroanilina y derivados, los cuales dan como resultado la formación de un compuesto de color amarillo. Estos permiten detectar actividades osidasas, esterazas y fosfatasa en el caso de sustratos a base de nitrofenol y actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de nitroanilina. No obstante, en el caso de la detección de actividades peptidasas, la nitroanilina liberada es tóxica para las bacterias que se desea identificar o caracterizar, lo que puede mostrarse perjudicial para análisis en curso o posteriores. Por otro lado, generalmente están poco adaptados a una utilización sobre un soporte
- 20 sólido y mejor adaptadas a una utilización en medio líquido. Además, el color (amarillo) está poco contrastado en los medios biológicos (lo que influye sobre la sensibilidad de detección de los ensayos microbiológicos correspondientes).

- 25 En cuarto lugar, existen sustratos enzimáticos a base de naftol y naftilamina y sus derivados. En este caso, la reacción enzima-sustrato se efectúa en dos tiempos, el naftol o naftilamina liberada por la actividad enzimática sufre un "azo-coupling" en presencia de una sal de diazonio que se añade en el momento de la revelación, que conduce a la formación de un compuesto insoluble de colores. Permiten detectar las actividades osidasas y esterazas por medio del naftol y las actividades peptidasas por medio de la naftilamina. La reacción de "azo-coupling" se efectúa en un medio a menudo químicamente agresivo, tóxico para las bacterias y que hace a la muestra inutilizable para otros análisis, además las naftilaminas son cancerígenas.

- 30 Entre los sustratos enzimáticos fluorógenos utilizables en la presente invención, se pueden citar concretamente los derivados de coumarina, de fluoresceína, de rodamina, de fenoxazina y de hidroxiflavona, o también los sustratos enzimáticos ELF®97 o sus derivados.

- 35 Según una realización preferida, cuando el medio de reacción según la invención en el que los compuestos antimicrobianos según la invención se utilizan como agente selectivo para dirigirse específicamente a una bacteria Gram negativa (Gram-), tal como la que pertenece al género Salmonella, dicho medio de reacción también puede comprender al menos un sistema selectivo anti Gram positivo (anti Gram+) y/o antifúngico. Los sistemas selectivos anti Gram+ y/o antifúngicos son bien conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se pueden citar tensioactivos, glucopéptidos, anfotericina, azoles, cristal violeta (lista no exhaustiva) a concentraciones conocidas por el experto en la materia para obtener el efecto esperado, a saber la eliminación de las bacterias Gram positivas.
- 40 Por analogía, cuando el medio de reacción según la invención utiliza al menos un nuevo compuesto antimicrobiano como agente selectivo de al menos una bacteria Gram positiva (Gram+), tal como una bacteria de la especie Staphylococcus aureus, se puede utilizar al menos un sistema selectivo anti Gram- y/o antifúngico, bien conocido por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se puede citar aztreonam, polimixinas, ácido nalidíxico.

- 45 Cuando es necesaria una incubación para permitir el crecimiento de los microorganismos diana/buscados, se incuba el medio de reacción según la invención sembrado con la muestra biológica a ensayar. Por «incubar», se entiende llevar y mantener entre 1 y 48 horas, preferiblemente entre 4 y 24 horas, más preferiblemente entre 16 y 24 horas, a una temperatura apropiada, generalmente comprendida entre 20 °C y 50 °C, preferiblemente entre 30 y 45 °C.

Por «al menos un microorganismo diana», se entiende, en el sentido de la presente invención, al menos un microorganismo que se desea detectar y/o identificar y/o contar.

- 50 A la inversa, por «microorganismos no diana», se entiende microorganismos que no se desea detectar y/o identificar y/o contar y que no presentan interés en la medida en que no se desea detectarles y/o identificarles y/o contarles. Es primordial librarse de este o estos microorganismos no diana en la medida en que estos son susceptibles de inducir resultados falsos positivos y, por lo tanto, de afectar a la especificidad de la detección y/o de la identificación y/o del recuento de dicho al menos un microorganismo diana.

55 **Breve descripción de los dibujos y de las figuras**

La figura 1 presenta la estructura de los seis compuestos antimicrobianos A-F cuyo poder inhibitorio frente a los principales grupos de bacterias se evalúa en el ejemplo 2 más adelante (estando los nuevos compuestos antimicrobianos según la invención ilustrados por las estructuras C y E; refiriéndose las estructuras A, B, D y F a los

compuestos de la técnica anterior).

La figura 2 presenta la estructura de otros cuatro compuestos antimicrobianos según la invención, a saber los compuestos G-J.

5 La figura 3, por su parte, ilustra las diferentes etapas de un procedimiento de síntesis para la preparación de ácido β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico 18 (representado por la estructura C en la figura 1) y de ácido β -cloro-L-analil- β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico 24 (para la estructura representada por la estructura E en la figura 1).

La figura 4 presenta, de manera esquemática, el procedimiento de síntesis de otro compuesto antimicrobiano según la presente invención, a saber el compuesto L-Norvalinil-L- β -cloroanalil-D/L-fosfalina 37 (compuesto G en la figura 2).

10 La figura 5 ilustra las diferentes etapas de síntesis de un intermedio de reacción que permite la obtención del compuesto L-Norvalinil-L- β -cloroanalil-D/L-fosfalina 37, a saber el éster O-bencílico de β -cloro-L-alanina 32 (a partir de tBoc-L-serina 41).

La figura 6, por su parte, representa las diferentes etapas de síntesis de otro intermedio de reacción que permite la obtención del compuesto L-Norvalinil-L- β -cloroanalil-D/L-fosfalina 37, a saber el éster dietílico de D/L-fosfalina 35.

15 Descripción detallada de la invención

Los ejemplos a continuación permitirán comprender mejor la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos se dan solamente a título ilustrativo.

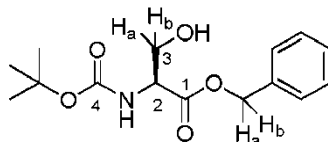
Ejemplo 1: Procedimiento de síntesis de los compuestos antimicrobianos C y E según la invención (figura 1)

1.1 Generalidades

20 La síntesis de los compuestos de la técnica anterior representados por las fórmulas A, B, D y F en la figura 1 es bien conocida por el experto en la materia. El procedimiento de síntesis de los nuevos compuestos antimicrobianos según la invención se ilustra a continuación, para los compuestos representados por las fórmulas C y E en la figura 1. Este procedimiento de síntesis se esquematiza además en la figura 3. Los reactivos y condiciones utilizados en el marco de este procedimiento de síntesis son los siguientes:

25 i) bromuro de bencilo, DBU, benceno; ii) Cl_3CCN , PPh_3 , DCM, N_2 , t.a.; iii) H_2 , 10 % Pd/C, MeOH; iv) PFP, DCC, EtOAc; v) DCC, DCM, DMF; vi) HBr, AcOH, y a continuación óxido de propileno. Los espectros RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Ultrashield 300 (a 300 MHz para los espectros ^1H y a 75 MHz para los espectros ^{13}C). Los desplazamientos químicos se indican en ppm aguas abajo del tetrametilsilano, utilizando el cloroformo residual ($\delta=7,26$ en ^1H RMN) o el pico del medio del triplete de carbono de CDCl_3 ($\delta=77,23$ en ^{13}C RMN) como patrón
30 interno. Los puntos de fusión se obtuvieron por medio de un microscopio con placa calefactora Reichart-Kofler y no son corregidos. Los espectros infrarrojos se registraron con ayuda de un instrumento PerkinElmer Spectrum BX FT-IR. Los espectros de masa a baja resolución se registraron en un analizador Bruker Esquire 3000plus utilizando una fuente de electrovaporización en modo ion positivo. Los espectros de masa a alta resolución se obtuvieron en un instrumento LTQ Orbitrap XL en modo de ionización con nanopulverización. Los análisis elementales se efectuaron
35 con ayuda de un Exeter Analytical CE-440 Elemental Analyzer. Todos los reactivos y disolventes disponibles en el mercado se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar, Fisher Scientific y Fluka y se utilizaron sin ninguna purificación suplementaria. La cromatografía en capa fina se efectuó en placas de gel de sílice Merck (60F-254).

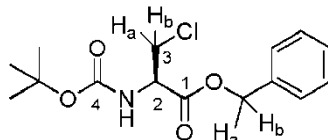
1.2 Preparación del éster bencílico de tBoc-L-serina 12



40 Se disolvió tBoc-serina 11 (16,60 g, 81,0 mmol) en benceno (250 ml) y se añadió DBU (18,90 g, 21,6 ml, 124,0 mmol). A la mezcla de reacción agitada, se le añadió gota a gota bromuro de bencilo (21,25 g, 15 ml, 124,0 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante una noche, la reacción se neutralizó con una solución 1 M de HCl (150 ml). El benceno se eliminó a presión reducida y el residuo se recuperó en acetato de etilo. La solución se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , y a continuación el
45 disolvente se eliminó al vacío para dar el producto en bruto. Después de la cromatografía en columna (50 % de éter de petróleo, 50 % de acetato de etilo), se obtuvo éster bencílico de tBoc-serina 12 en forma de sólido blanco (16,90 g, 57,0 mmol, 71 %); punto de fusión 61-63 °C (punto de fusión de la bibliografía 69-70 °C [16]); [Descubierto: C, 60,63; H, 7,16; N, 4,64. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ requiere C, 61,00; H, 7,17; N, 4,74 %]; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3417, 3356 (NH y OH), 1756 (C=O, éster), 1667 (C=O, carbamato), 1523 (amida II); ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1,44 (9H, s, C(CH₃)₃), 2,24 (1H, sa, OH), 3,91 (1H, d sa, J=11,1 Hz, CHa-3), 3,98 (1H, d sa, J=11,1 Hz, CHb-3), 4,41 (1H, sa, CH-2), 5,19 (1H,
50

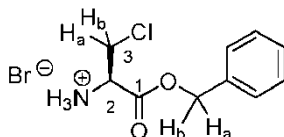
d, J=12,3 Hz, COOCHa), 5,24 (1H, d, J=12,3 Hz, COOCHb), 5,44 (1H, sa, NH), 7,35-7,37 (5H, m, 5 x CHAR); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δC 27,9 (CH₃, C(CH₃)₃), 55,6 (CH, C-2), 63,3 (CH₂), 67,1 (CH₂), 80,1 (cuat., C(CH₃)₃), 127,8 (2 x CHAR), 128,1 (CHAR), 128,3 (2 x CHAR), 134,9 (cuat., CAr), 153,0 (cuat., C=O), 170,3 (cuat., C=O); MS (ESI) m/z 318,3 (MNa⁺).

5 1.3 Preparación del éster bencilico de tBoc-β-cloro-L-alanina 13



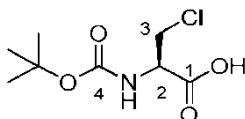
A una solución de éster bencilico de tBoc-serina 12 (15,58 g, 52,8 mmol) en diclorometano (200 ml), bajo nitrógeno, se le añadió tricloro-acetonitrilo (15,16 g, 10,5 ml, 105,0 mmol), seguido de 10 minutos de agitación a temperatura ambiente. Se disolvió trifenilfosfina (27,54 g, 105,0 mmol) en diclorometano (150 ml) bajo nitrógeno y se añadió gota a gota esta solución a la mezcla de reacción agitada. Después de la agitación a temperatura ambiente durante una noche, la reacción se neutralizó con solución saturada de cloruro de sodio (250 ml); después de la separación, la capa orgánica se extrajo con solución saturada de cloruro de sodio (3x 100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el producto en bruto. Una purificación por cromatografía en columna (70 % de éter de petróleo, 30 % de acetato de etilo) dio el producto 13 en forma de sólido blanco (14,94 g, 47,6 mmol, 90 %); punto de fusión 54-57 °C; [Descubierto: C, 57,53; H, 6,49; N, 4,38. C₁₅H₂₀ClNO₄ requiere C, 57,42; H, 6,42; N, 4,46 %]; ν_{max}/cm⁻¹ 3364 (NH), 1725 (C=O, éster), 1680 (C=O, carbamato), 1518 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δH 1,45 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,84 (1H, dd, J=3,3 y 11,4 Hz, CHa-3), 4,00 (1H, dd, J=3,3 y 11,4 Hz, CHb-3), 4,74 (1H, m, CH-2), 5,22 (1H, d, J=12,3 Hz, COOCHa), 5,27 (1H, d, J=12,3 Hz, COOCHb), 5,43 (1H, d, J=7,2 Hz, NH), 7,36 (5H, m, 5 x CHAR); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δC 28,3 (CH₃, C(CH₃)₃), 45,5 (CH₂, C-3), 54,6 (CH, C-2), 67,8 (COOCH₂), 80,5 (cuat., C(CH₃)₃), 128,3 (CH), 128,6 (2 x CH), 128,6 (2 x CH), 134,9 (cuat., CAr), 155,0 (cuat., C=O), 169,0 (cuat., C=O); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₅H₂₁NO₄Cl)⁺314,1154, descubierto 314,1159.

1.4 Preparación del éster bencilico de β-cloro-L-alanina HBr 14



Se disolvió éster bencilico de tBoc-β-cloro-L-alanina 13 (1,40 g, 4,46 mmol) en una cantidad mínima de ácido acético (5 ml), a continuación se añadió HBr en AcOH (33 % m/m) (5,53 ml, 30,7 mmol de HBr) y se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se neutralizó con éter dietílico (200 ml) y la solución se guardó en un congelador durante una noche. Durante el reposo, un sólido blanco precipitó, el cual se recogió por filtración, y se lavó con éter dietílico frío para dar el producto 14 (1,10 g, 3,6 mmol, 81 %); punto de fusión 131-134 °C; [Descubierto: C, 40,56; H, 4,51; N, 4,68. C₁₀H₁₃BrClNO₂ requiere C, 40,77; H, 4,45; N, 4,75 %]; ν_{max}/cm⁻¹ 2950, 2875, 2846 (sa NH₃⁺), 1750 (C=O, éster), 1489, 1228, 1208 (C-O); ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δH 4,17 (1H, dd, J=3,3 y 12,6 Hz, CHa-3), 4,31 (1H, dd, J=3,3 y 12,6 Hz, CHb-3), 4,81 (1H, m, CH-2), 5,31 (1H, d, J=12,3 Hz, COOCHa), 5,39 (1H, d, J=12,3 Hz, COOCHb), 7,55 (5H, m, 5 x CHAR); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δC 41,8 (CH₂, C-3), 53,9 (CH, C-2), 69,2 (COOCH₂), 128,7 (2 x CH), 128,9 (2 x CH), 129,1 (CH), 134,5 (cuat., CAr), 167,0 (cuat., C=O); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₀H₁₃ClNO₂)⁺ 214,0629, descubierto 214,0630.

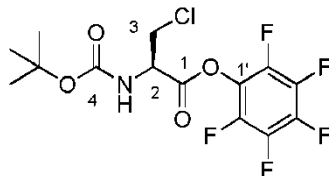
1.5 Preparación del compuesto tBoc-β-cloro-L-alanina 15



Se disolvió éster bencilico de tBoc-β-cloro-L-alanina 13 (1,57 g, 5,0 mmol) en metanol (50 ml) y se añadió paladio al 10 % sobre carbón (0,16 g) en acetato de etilo (20 ml). La reacción se agitó a una presión de 1,5 bares de H₂ durante una noche. El catalizador se eliminó por filtración a través de un tapón de Celite y se lavó con metanol (200 ml). Después de la eliminación del metanol a presión reducida, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (95 % de diclorometano, 5 % de metanol) para dar el producto 15 en forma de sólido blanco (0,99 g, 4,4 mmol, 88 %); punto de fusión 119-123 °C (punto de fusión de la bibliografía 123-125 °C (13)); ν_{max}/cm⁻¹ 3434 (NH), 2975 (OH), 1752 (C=O), 1734 (C=O), 1677, 1521 (amida II), 1370, 1212; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δH 1,47 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,90 (1H, dd, J=2,7 y 11,1 Hz, CHa-3), 4,05 (1H, d, J=11,1 Hz, CHb-3), 4,78 (1H, m, CH-2), 5,47 (1H, d, J=6,3 Hz, NH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δC 28,3 (CH₃, C(CH₃)₃), 45,2 (CH₂, C-3), 54,3 (CH, C-2), 80,9 (cuat.,

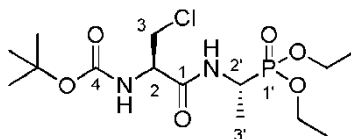
C(CH₃)₃, 155,3 (cuat., C=O, C-4), 173,2 (cuat., C=O, C-1); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₈H₁₃NO₄Cl)-222,0539, descubierto 222,0541.

1.6 Preparación del éster de pentafluorofenol de tBoc-β-cloro-L-alanina 16



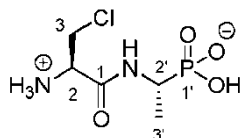
- 5 Se disolvieron tBoc-β-cloro-L-alanina 15 (1,16 g, 5,2 mmol) y pentafluorofenol (0,95 g, 5,7 mmol) en acetato de etilo (25 ml) y se enfriaron en un baño de hielo. Se añadió dicitclohexilcarbodiimida (1,05 g, 5,7 mmol) y la solución se agitó durante 3 horas. El subproducto de urea precipitado se eliminó por filtración. El residuo se concentró a presión reducida y todo precipitado suplementario se eliminó por filtración. El acetato de etilo restante se eliminó por evaporación. El aceite obtenido de este modo se trituró con éter de petróleo para dar el producto 16 en forma de sólido blanco (3,35 g, 8,6 mmol, 69 %) que se recogió por filtración; punto de fusión 128-131 °C; [Descubierto: C, 43,53; H, 3,49; N, 3,63. C₁₄H₁₃ClF₅NO₄ requiere C, 43,15; H, 3,36; N, 3,59 %]; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3367 (NH), 1780 (C=O), 1681 (C=O), 1518 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 1,48 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,94 (1H, dd, J=3,6 y 11,4 Hz, CHa-3), 3,96 (1H, dd, J=3,6 y 11,4 Hz, CHb-3), 5,10 (1H, t sa, J=3,6 Hz, CH-2), 5,46 (1H, d, J=7,5 Hz, NH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 28,25 (CH₃, C(CH₃)₃), 44,78 (CH₂, C-3), 54,55 (CH, C-2), 81,26 (cuat., C(CH₃)₃), 118,94 (m, C-Far), 154,74 (cuat., C-1'), 154,79 (cuat., C=O, C-4), 166,77 (cuat., C=O, C-1); ¹⁹F RMN (282 MHz, CDCl₃) δ F -161,67 (2F, t, J=19,8 Hz, CF-3' y 5'), -156,73 (1F, t, J=23,1 Hz, CF-4'), -151,63 (2F, d, J=18,9 Hz, CF-2' y 6'); MS (ESI) m/z 388,8 (M-H)-.

1.7 Preparación del éster dietílico de tBoc-β-cloro-L-anilil-L-fosfalina 17



- 20 Se disolvió éster dietílico de L-fosfalina (1,10 g, 6,1 mmol) en DCM seco (50 ml) y se enfriaron en un baño de hielo. Se añadió, por partes, éster de tBoc-β-cloro-alanilpentafluorofenol 16 (2,37 g, 6,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la finalización. La reacción se neutralizó con agua (150 ml), a continuación se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (50 % de éter de petróleo, 50 % de acetato de etilo hasta el 90 % de acetato de etilo, 10 % de metanol) para dar el producto 17 en forma de sólido blanco (1,45 g, 3,8 mmol, 62 %); punto de fusión 80-83 °C; [Descubierto: C, 43,46; H, 7,27; N, 7,21. C₁₄H₂₈ClN₂O₆P requiere C, 43,47; H, 7,30; N, 7,24 %]; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3303, 3215, 3065, 2978 (NH), 1716 (C=O), 1667 (C=O), 1555, 1518 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 1,25-1,42 (9H, m, 3 x CH₃), 1,46 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,73 (1H, dd, J=4,2 y 11,1 Hz, CHa-3), 4,00 (1H, dd, J=4,2 y 11,1 Hz, CHb-3), 4,07-4,18 (4H, m, 2 x OCH₂), 4,39-4,54 (2H, m, CH-2 y 2'), 5,35 (1H, d, J=8,4 Hz, NH), 6,77 (1H, d, J=8,7 Hz, NH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 15,8 (CH₃, C-3'), 16,3-16,5 (2 x CH₃, m, CH₃CH₂O), 28,2 (3 x CH₃, C(CH₃)₃), 40,3 (CH), 42,4 (CH), 44,9 (CH₂, C-3), 62,6 (CH₂, d, J=6,75 Hz, OCH₂CH₃), 62,9 (CH₂, d, J=6,6 Hz, OCH₂CH₃), 80,8 (cuat., C(CH₃)₃), 155,0 (cuat., C=O), 168,3 (cuat., C=O); ³¹P RMN (121,5 MHz, CDCl₃) δ P 24,6 (m); MS (ESI) m/z 387,3 (MH⁺), 409,3 (MNa⁺), 385,1 (M⁻).

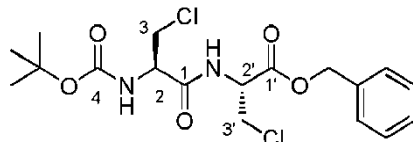
1.8 Obtención del compuesto β-cloro-L-anilil-L-fosfalina 18 (compuesto C en la figura 1)



- 35 Se agitó éster dietílico de tBoc-β-cloro-L-anilil-L-fosfalina 17 (1,33 g, 3,4 mmol) en un 33 % m/m de HBr en ácido acético (17 ml) durante 24 h. La mezcla de reacción se vertió en éter dietílico (200 ml) y se colocó en el congelador (-15 °C) durante una noche. El éter dietílico se decantó y el precipitado residual se recuperó en una cantidad mínima de metanol (aproximadamente 10 ml). A continuación, se añadió óxido de propileno en gran exceso (aproximadamente 250 ml). El precipitado higroscópico se filtró y se recristalizó a partir de agua y de acetona para dar el producto 18 en forma de sólido blanco (0,99 g, 3,2 mmol, 93 %); punto de fusión 210-212 °C; [Descubierto: C, 25,80; H, 5,21; N, 12,04. C₅H₁₂ClN₂O₄P requiere C, 26,04; H, 5,25; N, 12,15 %] $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3258 (sa NH), 3100, 2930 (sa) (OH), 1654 (C=O), 1565, 1514 (amida II), 1038; ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ H 1,30 (3H, dd, J=7,2 y 15 Hz, CH₃-3'), 3,97-4,11 (3H, m, CH₂-3 y CH-2'), 4,39 (1H, m, CH-2); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δ C 15,2 (CH₃, C-3'), 42,6 (CH₂, C-3), 44,2 (CH, d, J=147,9 Hz, C-2'), 54,2 (CH, C-2), 165,6 (cuat., C=O, C-1); ³¹P RMN (121,5 MHz, CDCl₃)

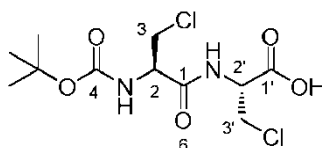
δ P 18,6 (m); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₅H₁₁N₂O₄P₃Cl)- 229,0150, descubierto 229,0154.

1.9 Preparación de éster bencílico de tBoc- β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina 19



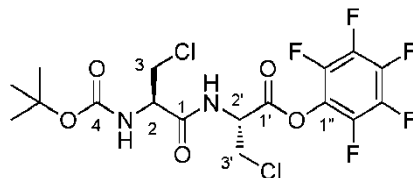
5 Se disolvió bromohidrato de éster bencílico de β -cloro-L-alanina 14 (1,13 g, 3,9 mmol) en DMF (30 ml) y se añadió a una solución de éster de pentafluorofenol de tBoc- β -cloro-L-alanina 16 (1,50 g, 3,9 mmol) en diclorometano (10 ml) a 0 °C. A esta solución, se le añadió gota a gota diisopropiletilamina (0,50 g, 0,66 ml, 3,9 mmol). La mezcla obtenida de este modo se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y a continuación se calentó a 35 °C, y el avance de la reacción se supervisó por TLC (80 % de éter de petróleo, 20 % de acetato de etilo). Una vez terminada la reacción, se neutralizó con una solución 1 M de HCl (50 ml) y la capa orgánica se lavó con agua (100 ml) y solución saturada de cloruro de sodio (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evaporó al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con gradiente (del 80 % de éter de petróleo, 20 % de acetato de etilo; al 50 % de éter de petróleo, 50 % de acetato de etilo) para dar el producto 19 en forma de sólido blanco (1,16 g, 2,8 mmol, 70 %); punto de fusión 89-91 °C; [Descubierto: C, 51,83; H, 5,78; N, 6,78. C₁₈H₂₄Cl₂N₂O₅ requiere C, 51,56; H, 5,77; N, 6,68 %]; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3336 (NH), 3321 (NH), 1739 (C=O), 1655 (m, C=O), 1508 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 1,48 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,73 (1H, dd, J=4,8 y 11,1 Hz, CH), 3,89-4,06 (3H, m, 3 x CH), 4,55 (1H, sa, CH), 4,98 (1H, m, CH), 5,24 (2H, m, COOCH₂), 5,35 (1H, sa, NH), 7,25 (1H, sa, NH), 7,37 (5H, s sa, 5 x CHAr); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 28,24 (CH₃, C(CH₃)₃), 33,90 (CH₂Ph), 44,5 (CH), 44,60 (CH₂), 53,61 (CH), 68,13 (CH₂), 81,37 (cuat., C(CH₃)₃), 128,22 (CHAr), 128,41 (CHAr), 128,69 (CHAr), 134,71 (cuat.), 168,19 (2 x cuat., C=O), 168,90 (cuat., C=O); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₈H₂₅N₂O₅Cl₂)⁺419,1135, descubierto 419,1139.

1.10 Preparación del compuesto tBoc- β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina 20



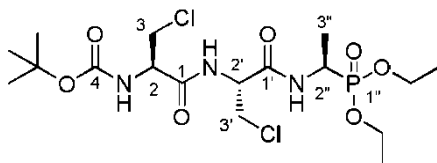
25 Se disolvió éster bencílico de tBoc- β -cloro-L-alanina- β -cloro-L-alanina 19 (1,00 g, 2,4 mmol) en metanol (50 ml) y se añadió paladio al 10 % sobre carbón (0,10 g) en acetato de etilo (20 ml). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de H₂ (1,8 bares) durante 24 h, y a continuación se filtró a través de un tapón de Celite y se lavó con metanol (200 ml). Los disolventes se eliminaron al vacío y, después de la purificación por cromatografía en columna (95 % de DCM, 5 % de metanol), se obtuvo durante una trituración con éter de petróleo el producto 20 en forma de sólido blanco (0,52 g, 1,6 mmol, 66 %); punto de fusión 72-74 °C; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3320 (NH), 2978 (NH), 1724 (C=O), 1665 (C=O), 1530 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ H 1,39 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,67 (1H, dd, J=8,4 y 11,1 Hz, CH), 3,79-3,95 (3H, m, CH₂ y CH), 4,36 (1H, sa, CH), 4,61-4,67 (1H, m, CH), 7,16 (1H, d, J=8,1 Hz, NH), 8,38 (1H, d, J=7,5 Hz, NH); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₁H₁₇Cl₂N₂O₅)⁻ 327,0520, descubierto 327,0517;

1.11 Preparación del éster de pentafluorofenol de tBoc- β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina 22



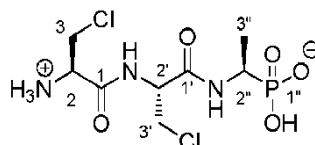
35 Se disolvió tBoc- β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina 20 (0,48 g, 1,46 mmol) en acetato de etilo (50 ml) y se enfriaron en un baño de hielo, seguido por la adición de pentafluorofenol (0,29 g, 1,56 mmol) y de dicitlohexilcarbodiimida (0,33 g, 1,61 mmol). La solución se agitó a 0 °C durante 2 horas y la urea precipitada se eliminó por filtración. El residuo se concentró al vacío y cualquier nueva precipitación también se eliminó por filtración. El acetato de etilo se eliminó al vacío y el aceite obtenido de este modo se trituró con éter de petróleo para dar el producto 22 en forma de sólido blanco (0,65 g, 1,3 mmol, 89 %), que se recogió por filtración y se llevó a la etapa siguiente sin otra purificación; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3334 (NH), 3006, 2970, 2939 (NH), 1787 (C=O), 1688 (C=O), 1664 (C=O), 1514 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 1,46 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,76 (1H, dd, J=4,7 y 11,3 Hz, CHa), 3,98 (1H, dd, J=3,5 y 11,7 Hz, CHc), 4,06 (1H, dd, J=4,4 y 11,3 Hz, CHb), 4,16 (1H, dd, J=3,2 y 11,7 Hz, CHd), 4,53 (1H, sa, CH), 5,32-5,37 (2H, m, CH y NH), 7,31 (1H, d, J=7,1 Hz, NH);

1.12 Preparación del éster dietílico de tBoc-β-cloro-L-analil-β-cloro-L-analil-L-fosfalina 23



Se disolvió éster de pentafluorofenol de tBoc-β-cloro-L-analil-β-cloro-L-alanina 22 (0,95 g, 1,9 mmol) y 1-aminoetilfosfonato de dietilo 3 (0,32 g, 1,9 mmol) en diclorometano (25 ml) a 0 °C, a continuación se agitó a temperatura ambiente hasta la finalización de la reacción, seguido por una TLC. Después de la extracción con agua (100 ml), la capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida. El sólido en bruto se purificó por cromatografía en columna (97 % de DCM, 3 % de MeOH) para dar el producto 23 en forma de sólido blanco (0,62 g, 1,3 mmol, 66 %); punto de fusión 154,6-155,9 °C; $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$ 3291, 3265, 2962, 2848 (NH), 1680 (C=O), 1639 (C=O), 1523 (amida II); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δH 1,35-1,41 (9H, m, 3 x CH₃), 1,48 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,73-3,80 (2H, m, CHa-3 y CHa-3'), 4,01-4,2 (6H, m, CHb-3, CHb-3' y 2 x OCH₂), 4,43-4,54 (2H, m, CH-2'' y CH-2), 4,79-4,84 (1H, m, CH-2'), 5,38 (1H, d, J=6,9 Hz, NH), 7,05 (1H, d, J=9,0 Hz, NH), 7,19 (1H, d, J=7,8 Hz, NH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δC 15,7 (CH₃, C-3'), 16,6 (CH₃, OCH₂CH₃), 16,7 (CH₃, OCH₂CH₃), 28,4 (3 x CH₃, C(CH₃)₃), 40,7 (CH), 44,5 (CH₂), 44,6 (CH₂), 49,4 (CH), 54,1 (CH), 62,8 (CH₂, d, J=15,5 Hz, OCH₂CH₃), 63,1 (CH₂, d, J=15,7 Hz, OCH₂CH₃), 81,6 (cuat., C(CH₃)₃), 156,9 (cuat., C=O), 168,9 (cuat., C=O), 177,3 (cuat., C=O); MS m/z 514,3, 515,2, 516,2 (MNa⁺); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₇H₃₃N₂O₇P₃Cl₂)⁺ 492,1428, descubierto 492,1422.

1.13 Obtención de la β-cloro-L-analil-β-cloro-L-analil-L-fosfalina 24 (compuesto E en la figura 1)



Se disolvió éster dietílico de tBoc-β-cloro-L-analil-β-cloro-L-analil-L-fosfalina 23 (0,36 g, 0,7 mmol) en ácido acético (5 ml) y se añadió HBr en AcOH (33 % m/m (4 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche, a continuación la reacción se neutralizó con éster dietílico (200 ml). Después de reposar en el congelador (-15 °C) durante 4 h, el aceite pardo obtenido de este modo se separó por decantación del éster dietílico. El producto en bruto se lavó a continuación con éster dietílico frío (5x 50 ml). El residuo se recuperó en metanol (3 ml) y, con la adición de óxido de propileno (150 ml), se formó un precipitado blanco. La capa líquida se decantó y el residuo se trituró con éster dietílico frío (5x 30 ml) para dar el producto 24 en forma de sólido blanco (0,18 g, 0,4 mmol, 59 %); punto de fusión 157-159 °C; $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$ 3285, 3258 (sa NH), 1646 (sa) (C=O), 1539 (amida ancha II), 1152, 1044; ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δH 1,37 (3H, dd, J=7,2 y 15,3 Hz, CH₃-3''), 3,98-4,2 (5H, m, CH₂-3 y CH₂-3' y CH), 4,62 (1H, t, J=4,8 Hz, CH), 4,87-4,90 (1H, m, CH); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δC 15,4 (CH₃, C-3''), 42,4 (CH₂), 43,4 (CH₂), 45,1 (CH, C-2''), 53,8 (CH), 55,1 (CH), 166,8 (cuat., C=O), 168,9 (cuat., C=O); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₈H₁₅N₃O₅P₃Cl₂)⁻ 336,0102, descubierto 336,0096.

Ejemplo 2: Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos antimicrobianos C y E sintetizados según el ejemplo 1

2.1 Introducción

Este ejemplo 2 presenta los resultados de un estudio que pretende:

- evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos según la invención, tal como los sintetizados en el ejemplo 1, a saber los compuestos C y E tal como se representan en la figura 1, y
- poner en perspectiva esta actividad antibacteriana con la obtenida por tres peptidomiméticos de la técnica anterior, a saber los compuestos A, B y D de la figura 1 y la fosfomicina (compuesto F).

La actividad antibacteriana de los cinco compuestos A-E se evaluó con una amplia colección de 297 bacterias que incluían una predominancia de cepas multirresistentes incluyendo enterobacterias productoras de carbapenemasa (n= 128), estafilococos áureos resistentes a meticilina (n= 37) y los enterococos resistentes a los glucopéptidos (n= 43). La fosfomicina, un antibiótico presente naturalmente que también contiene un grupo ácido fosfónico (F) se incluyó con fines de comparación.

Para recordatorio, los compuestos A-F son los siguientes:

- 45 A: ácido L-analil-L-1-aminoetilfosfónico (alafosfalina);

B: ácido L-anilil-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico (di-alanil fosfalina);

C: ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico (β -Cl-alafofalina);

D: β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-alanina (β -Cl-Ala- β -Cl-Ala);

E: ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico (β -Cl-Ala- β -Cl-alafofalina);

5 F: fosfonato de [(2R,3S)-3-metiloxiran-2-il] disódico (fosfomicina).

2.2 Materiales y métodos

Agentes antibacterianos y medios. La fosfomicina, la alafosfalina, la glucosa-6-fosfato y todos los ingredientes del medio gelosado sin antagonista se adquirieron de Sigma Chemical Company, Poole, Reino Unido. El medio gelosado IsoSensitest se adquirió de Oxoid, Basingstoke, Reino Unido.

10 **Aislados bacterianos.** Las enterobacterias (n = 197) se obtuvieron de diversas fuentes internacionales y todas poseían β -lactamasas que se definieron a nivel molecular por laboratorios de referencia y/o expertos reconocidos en el campo. Estos incluían *Citrobacter freundii* (n = 5), otras especies de *Citrobacter* (n = 4), *Enterobacter aerogenes* (n = 1), *Enterobacter cloacae* (n = 27), *Escherichia coli* (n = 53), *Klebsiella oxytoca* (n = 5), *Klebsiella pneumoniae* (n = 87), *Kluyveraspp* (n = 1), *Proteus mirabilis* (n = 8), *Providencia rettgeri* (n = 2), *Salmonella spp* (n = 3) y *Serratia marcescens* (n = 1). Entre estos 197 aislados, había 128 (65 %) productores de carbapenemasa, incluyendo; 87 con NDM-1, 9 con IMP, 11 con KPC, 14 con OXA-48 y 7 con VIM. La mayor parte de los productores de carbapenemasa produjeron conjuntamente β -lactamasas de amplio espectro (BLAE) o cefalosporinas (AmpC β -lactamasas), pero éstas no están documentadas en aras de la claridad. Entre los aislados restantes, 47 poseían BLAE (20 con CTX-M, 19 con un tipo SHV, y 8 con un tipo TEM) y 22 poseían AmpC (3 con ACC-1, 6 con un tipo CMY, 6 con DHA-1, 3 con un tipo FOX y 4 con un tipo LAT).

Una colección de 50 aislados de estafilococos áureos incluía 36 cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) frecuentemente encontrados en Europa, incluyendo cepas aisladas en Bélgica, en Finlandia, en Francia, en Alemania, y en el Reino Unido. Otra cepa de SARM, NCTC 11939, se incluyó como control, así como un control sensible a la meticilina (NCTC 6571). Otros doce aislados de estafilococos áureos sensibles a meticilina (SASM) recientemente recuperadas de cultivos sanguíneos también se incluyeron. Finalmente, 50 aislados de enterococos incluían dos cepas de control (*Enterococcus faecalis* NCTC 755 y *Enterococcus faecium* NCTC 7171) y 48 aislados que provienen de muestras clínicas obtenidas de al menos tres hospitales diferentes. Los aislados clínicos incluían *E. faecalis* (n = 10), *E. faecium* (n = 33), *Enterococcus casseliflavus* (n = 3), *Enterococcus gallinarum* (n = 2). Entre los 50 aislados, 43 eran resistentes a la vancomicina, como se demuestra por el valor de CMI y la confirmación de los genes de resistencia por PCR.

35 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitoras (CMI). Todas las CMI se determinaron utilizando un procedimiento de dilución en gelosa [16]. Esto necesitó la utilización de un medio sin antagonista definido (sin peptona), preparado de la manera descrita anteriormente con la inclusión del 2 % de sangre de caballo lisada con saponina, 25,0 μ g/ml de NAD y 25,0 μ g/ml de hemina [17]. Los compuestos ensayados se disolvieron en agua desionizada estéril y se incorporaron en el medio gelosado a un intervalo de concentración de 0,0031 a 8,0 μ g/ml (0,016 a 32 μ g/ml para las bacterias gram positivas). Todos los aislados se prepararon a una densidad equivalente a 0,5 unidades McFarland en agua desionizada estéril con ayuda de un densitómetro (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/ml), y a continuación se diluyeron a 1 por 15. Una alícuota de 1 μ l de cada suspensión diluida se colocó a continuación en placas con un inoculador multipunto para dar la inoculación final recomendada de 10000 UFC/punto (o «spot» en lengua inglesa) [16]. Las CMI de la fosfomicina se determinaron mediante el mismo procedimiento, si es que no se utilizó el medio IsoSensitest (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) completado con 25,0 μ g/ml de glucosa-6-fosfato (Sigma, Poole, Reino Unido) y un intervalo extendido de concentraciones de fosfomicina. Todas las placas (incluyendo los controles sin antimicrobiano) se incubaron 22 horas a 37 °C. Todos los ensayos se realizaron en al menos dos duplicados independientes para examinar la reproducibilidad.

45 2.3 Resultados

Las concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) 50 y 90 de los cinco compuestos A-E se calcularon y se presentan en la tabla 1 más adelante. Estos valores corresponden respectivamente a la menor concentración de antibiótico suficiente para inhibir in vitro el 50 y el 90 % del crecimiento de una cepa de bacterias, respectivamente CMI50 y CMI90.

50 Más exactamente, la tabla 1 más adelante indica las CMI de los seis antimicrobianos frente a los principales grupos de bacterias ensayadas. La alafosfalina presentó una buena actividad frente a la mayor parte de los aislados de enterobacterias, aunque diferentes especies hayan mostrado diferentes grados de sensibilidad. Se observó una fuerte actividad frente a 53 aislados de *E. coli*, de los cuales 35 aislados (66 %) eran productores de carbapenemasa. La CMI90 para *E. coli* era de 0,25 μ g/ml y el crecimiento de todos los aislados fue inhibido por 2 μ g/ml. Se descubrió que la actividad de la alafosfalina era aproximadamente cuatro veces más elevada que la de la fosfomicina.

Aunque la actividad antibacteriana de la alafosfalina frente a *E. coli* sea satisfactoria, tal como se ha indicado anteriormente, la actividad de la β -Cl-alafosfalina frente a *E. coli* ha demostrado ser al menos dos veces la de la alafosfalina y al menos ocho veces más elevada que la de la fosfomicina. La CMI90 era de 0,125 μ g/ml y todos los aislados vieron su crecimiento inhibido por 0,5 μ g/ml.

- 5 *K. pneumoniae* fue menos sensible a todos los compuestos ensayados cuando se compara con *E. coli*, aunque estaban presentes numerosos aislados de CMI relativamente bajas. Por ejemplo, el 87 % de los aislados de *K. pneumoniae* fueron inhibidos por 8 μ g/ml de alafosfalina y el 93 % fueron inhibidos por 8 μ g/ml de β -Cl-alafosfalina.

- 10 Todos los aislados de *E. cloacae* (n = 27) fueron inhibidos por 4 μ g/ml de alafosfalina, que normalmente fue 32 veces más activa que la fosfomicina frente a esta especie. Como anteriormente, la β -Cl-alafosfalina ha demostrado ser el compuesto más activo con todos los aislados inhibidos por 1 μ g/ml. Las otras especies de enterobacterias están excluidas de la tabla 1, ya que había menos de 10 aislados ensayados.

- 15 Para los taxones *Citrobacter* (n = 9), *E. aerogenes* (n = 1), *Kluyvera* sp. (n = 1), y *S. marcescens* (n = 1), todos los aislados fueron sensibles a ≤ 4 μ g/ml de alafosfalina y ≤ 2 μ g/ml de β -Cl-alafosfalina. Uno de los cinco aislados de *K. oxytoca* requirió una CMI >8 μ g/ml de alafosfalina, pero todos fueron inhibidos por ≤ 2 μ g/ml de β -Cl-alafosfalina, demostrando una vez más la actividad antibacteriana muy satisfactoria de esta última.

Ocho aislados de *P. mirabilis* y dos aislados de *P. rettgeri* requirieron CMI ≥ 8 μ g/ml para todos los agentes ensayados (incluyendo la fosfomicina).

Tres aislados de *Salmonella* mostraron CMI $\geq 8,0$ μ g/ml para alafosfalina pero solamente de 2,0 a 4,0 μ g/ml para β -Cl-alafosfalina.

- 20 La β -alafosfalina y la β -Cl-Ala- β -Cl-Ala tuvieron la mayor actividad frente a estafilococos áureos, pero hubo una ligera diferencia global entre los cinco antimicrobianos peptídicos. El 90% de los aislados de SARM, que provienen de diversas fuentes geográficas, fueron inhibidos por 8,0 μ g/ml de alafosfalina y todos los aislados fueron inhibidos por 2,0 μ g/ml de β -Cl-alafosfalina, demostrando, una vez más, una actividad antibacteriana superior a la de la alafosfalina.

- 25 Frente a los enterococos, la observación más visible fue la actividad elevada de la di-alanilfosfalina, para la cual las CMI fueron (de media) 16 veces más bajas que las de la alafosfalina y, en ciertos casos, 256 veces más bajas. Entre los 34 aislados de *E. faecium* (incluyendo 31 aislados resistentes a la vancomicina), todos fueron inhibidos por 32 μ g/ml de alafosfalina o 4 μ g/ml de di-alanilfosfalina. En cualquier caso, entre los enterococos, la actividad antibacteriana de la β -Cl-Ala- β -Cl-alafosfalina (compuesto según la invención) se ha mostrado superior a la de la alafosfalina.
- 30

2.4 Conclusión

- 35 Como se ha mostrado en este estudio, los compuestos antimicrobianos según la presente invención, y concretamente la β -Cl-alafosfalina, presentan una actividad antibacteriana *in vitro* interesante (muy frecuentemente superior a la de la alafosfalina) frente a la mayor parte de las bacterias y concretamente de las bacterias multirresistentes. De este modo, a modo de ejemplo, la CMI50 y la CMI90 de la alafosfalina para los EPC fueron respectivamente de 1 μ g/ml y 4 μ g/ml, mientras que el fosfonopéptido según la invención, la β -Cl-alafosfalina, presentó uno de los valores de 0,5 μ g/ml y 2 μ g/ml. La alafosfalina solo fue moderadamente activa frente a SARM presentando una CMI90 de 8 μ g/ml, mientras que la β -Cl-alafosfalina fue más activa con una CMI90 de 2 μ g/ml.

- 40 Con respecto a la alafosfalina, la β -Cl-Ala- β -Cl-alafosfalina permite una ganancia de inhibición diana en ciertas especies. Esto puede ser muy útil para inhibir una especie sin alterar el resto de la flora microbiana, por ejemplo inhibición de *E. coli* sin inhibir las otras enterobacterias o de *E. faecalis* sin inhibir *E. faecium*. Esto se vuelve particularmente ventajoso para aislar específicamente una especie inhibiendo las otras bacterias, por ejemplo para buscar *S. aureus*.

ES 2 670 698 T3

Organismo (número ensayado) y agente antimicrobiano	Concentración (µg/ml)			
	CMI modal (la CMI más frecuente)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo
<u>Enterobacteriaceae (197)</u>				
Alafosfalina	2	2	> 8	≤0,031 - >8
Di-alanilfosfalina	> 8	8	> 8	≤0,031 - >8
β-CI-Alafosfalina	1	0,5	8	≤0,031 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	2 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	4	2	> 8	≤0,031 - >8
Fosfomicina	4	4	<32	0,125 - >32
<u>E. coli (53)</u>				
Alafosfalina	0,063	0,125	0,25	≤0,031 - 2
Di-alanilfosfalina	0,25	0,5	2	≤0,031 - >8
β-CI-Alafosfalina	0,063	0,063	0,125	≤0,031 - 0,5
β-CI-Ala-β-CI-Ala	8	8	>8	2 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	0,25	0,25	1	≤0,031 - 1
Fosfomicina	0,5	0,5	1	0,125 - 8
<u>K. pneumoniae (87)</u>				
Alafosfalina	2	2	> 8	0,25 - >8
Di-alanilfosfalina	> 8	> 8	> 8	0,5 - >8
β-CI-Alafosfalina	1	1	8	0,125 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	8 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	4	4	> 8	0,5 - >8
Fosfomicina	4	8	> 32	2 - >32
<u>E. cloacae (27)</u>				
Alafosfalina	1	1	1	0,125 - 4
Di-alanilfosfalina	4	> 8	> 8	0,25 - >8
β-CI-Alafosfalina	0,5	0,5	0,5	0,063 - 1
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	8 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	1	1	4	0,25 - 8
Fosfomicina	16	16	32	4 - >32
<u>EPC (128)</u>				
Alafosfalina	2	1	4	≤0,031 - >8
Di-alanilfosfalina	> 8	8	> 8	0,063 - >8
β-CI-Alafosfalina	1	0,5	2	≤0,031 - >8

Organismo (número ensayado) y agente antimicrobiano	Concentración (µg/ml)			
	CMI modal (la CMI más frecuente)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	2 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafofalina	4	2	8	≤0,031 - >8
Fosfomicina	16	4	32	0,125 - >32
<u>BLAE (47)</u>				
Alafofalina	2	2	> 8	≤0,031 - >8
Di-alanilfofalina	> 8	8	> 8	≤0,031 - >8
β-CI-Alafofalina	0,063	0,5	> 8	0,031 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	2 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafofalina	> 8	4	> 8	0,063 - >8
Fosfomicina	> 32	8	> 32	0,125 - >32
AmpC (22)				
Alafofalina	> 8	4	> 8	0,063 - >8
Di-alanilfofalina	> 8	> 8	> 8	0,063 - >8
β-CI-Alafofalina	> 8	2	> 8	≤0,031 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Ala	> 8	> 8	> 8	8 - >8
β-CI-Ala-β-CI-Alafofalina	> 8	8	> 8	0,25 - >8
Fosfomicina	32	8	> 32	0,125->32
Todos los <i>S. aureus</i> (50)				
Alafofalina	4	4	8	0,125 - 16
Di-alanilfofalina	4	8	16	0,5 - 32
β-CI-Alafofalina	2	1	2	0,125 - 4
β-CI-Ala-β-CI-Ala	2	2	4	0,125 - 16
β-CI-Ala-β-CI-Alafofalina	16	16	16	2 - 16
Fosfomicina	8	4	16	0,5 - >32
SARM (37)				
Alafofalina	4	4	8	0,125 - 16
Di-alanilfofalina	4	8	16	0,5 - 32
β-CI-Alafofalina	2	2	2	0,125 - 2
β-CI-Ala-β-CI-Ala	2	2	4	0,125 - 16
β-CI-Ala-β-CI-Alafofalina	16	16	16	2 - 16
Fosfomicina	8	4	16	0,5 - >32
SASM (13)				
Alafofalina	4	4	8	0,25 - 16

Organismo (número ensayado) y agente antimicrobiano	Concentración (µg/ml)			
	CMI modal (la CMI más frecuente)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo
Di-alanilfosfalina	16	8	16	0,5 - 32
β-CI-Alafosfalina	1	1	2	0,5 - 4
β-CI-Ala-β-CI-Ala	1	1	2	0,5 - 2
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	16	16	16	4 - 16
Fosfomicina	4	4	16	2 - 16
Todos los Enterococos (50)				
Alafosfalina	8	16	> 32	4 - >32
Di-alanilfosfalina	0,5	0,5	2	≤0,016 - >32
β-CI-Alafosfalina	8	8	16	2 - >32
β-CI-Ala-β-CI-Ala	16	16	32	2 - 16
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	8	8	16	0,125 - >32
Fosfomicina	> 32	> 32	> 32	16 - >32
<i>E. faecalis</i> (11)				
Alafosfalina	8	8	32	4 - >32
Di-alanilfosfalina	0,031	0,063	0,5	≤0,016 - >32
β-CI-Alafosfalina	8	8	16	4 - >32
β-CI-Ala-β-CI-Ala	8	8	16	4 - 16
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	0,25	0,25	4	0,125 - >32
Fosfomicina	32	32	> 32	32 - >32
<i>E. faecium</i> (34)				
Alafosfalina	16	16	16	4 - 32
Di-alanilfosfalina	0,5	0,5	2	≤0,016 - 4
β-CI-Alafosfalina	4	4	8	2 - 32
β-CI-Ala-β-CI-Ala	16	16	32	2 - >32
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	8	8	8	0,125 - >32
Fosfomicina	> 32	> 32	> 32	16 - >32
ERG (43)				
Alafosfalina	16	16	> 32	4 - >32
Di-alanilfosfalina	0,5	0,5	> 32	≤0,016 - >32
β-CI-Alafosfalina	4	8	16	2 - >32
β-CI-Ala-β-CI-Ala	16	16	> 32	4 - >32
β-CI-Ala-β-CI-Alafosfalina	8	8	16	0,125 - >32
Fosfomicina	> 32	> 32	> 32	32 - >32

Tabla 1: Concentraciones inhibitoras mínimas de diversos agentes antimicrobianos frente a grupos de bacterias, incluyendo aislados dotados de mecanismos de resistencia definidos. **Abreviaturas:** EPC: Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasa; BLAE: Enterobacteriaceae con una β -lactamasa de amplio espectro; SARM: Staphylococcus aureus resistentes a meticilina; SASM: Staphylococcus aureus sensibles a meticilina; ERG: enterococos resistentes a glucopéptidos.

5

Ejemplo 3: Medio de reacción según la invención para la detección de bacterias del género Salmonella

3.1 Composición del medio

El presente ejemplo 3 tiene por objetivo comparar la especificidad de detección de un medio de reacción según la invención, destinado a detectar las bacterias del género Salmonella, a saber el medio «chromID Salmonella modificado» con respecto a un medio de detección de referencia para estas mismas bacterias, a saber el medio «chromID Salmonella».

10

Las composiciones respectivas del medio de reacción según la presente invención y del medio de reacción de referencia se presentan a continuación, en la tabla 2.

Medio chromID Salmonella modificado=beta		Medio chromID Salmonella = IDSalm	
	g/l		g/l
Peptonas	6,25 g	Peptonas	6,25 g
Glucosa	0,5	Glucosa	0,5
Sales biliares	1,5	Sales biliares	1,5
NaCl	5,0	NaCl	5,0
Tampón	0,2	Tampón	0,2
Agar	14,0	Agar	14,0
Mezcla cromógena	9,6	Mezcla cromógena	9,6
β -Cl-Alafosfalina	0,002		

15 **Tabla 2:** Composiciones del medio de reacción según la invención y del medio de referencia

3.2 Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3 más adelante:

Referencia #	Bacteria	IDSalm		beta	
		Crecimiento	Color	Crecimiento	Color
	<i>Salmonella montevideo</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella seftenberg</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella meleagridis</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
NCTC 12023	<i>Salmonella typhimurium</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella berta</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella stanley</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
NCTC 6676	<i>Salmonella enteritidis</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella simsborg</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella lexington</i>	++	++ Malva	++	++ Malva

Referencia #	Bacteria	IDSalm		beta	
		Crecimiento	Color	Crecimiento	Color
	<i>Salmonella limete</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella corvalis</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella haifa</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella zanzibar</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella indiana</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella javiana</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
NCTC 11304	<i>Salmonella indiana</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella oranienburg</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
NCTC 4840	<i>Salmonella poona</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella tennessee</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella emek</i>	++	++ Malva	++	+ Malva
	<i>Salmonella virohrady</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella java</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella augustenborg</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella alachia</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella panama</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella virchow</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella paratyphi</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella orthmarschen</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella vilvorde</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
	<i>Salmonella gallinarium</i>	+	+/- Malva	+	+/- Malva
NCTC 8385	<i>Salmonella typhi</i>	++	+ Malva	+	-
NCTC 9528	<i>K. pneumoniae</i>	++	++ Azul	++	++ Azul
NCTC 11936	<i>E. cloacae</i>	++	+ Azul	++	+ Azul
NCTC 10322	<i>S. marcescens</i>	++	++ Azul	++	++ Azul
NCTC 10662	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
NCTC	<i>S. maltophilia</i>	+/-	-	+/-	-
NCTC 19606	<i>A. baumannii</i>	++	++ Malva	++	++ Malva
NCTC 7475	<i>P. rettgeri</i>	-	-	-	-
WILD 462213	<i>M. morgani</i>	++	-	++	-
69052	<i>Escherichia coli</i>	++	-	++	-
68957	<i>Escherichia coli</i>	++	-	++	-
68958	<i>Escherichia coli</i>	++	+/- Azul	++	-

Referencia #	Bacteria	IDSalm		beta	
		Crecimiento	Color	Crecimiento	Color
68805	Escherichia coli	++	+/- Azul	+	-
69367	Escherichia coli	+	+/- Azul	+	-
69371	Escherichia coli	++	-	++	-
69035	Escherichia coli	++	Tr. Azul	++	-
69051	Escherichia coli	+	+/- Azul	+	-
69017	Escherichia coli	++	-	++	-
69148	Escherichia coli	-	-	-	-
68880	Escherichia coli	++	-	++	-
68886	Escherichia coli	++	-	++	-
69102	Escherichia coli	++	-	++	-
69157	Escherichia coli	1 colonia	-	+/-	-
69285	Escherichia coli	2 colonias	-	+/-	-
69130	Escherichia coli	++	-	++	-
69134	Escherichia coli	++	-	++	-
69135	Escherichia coli	+	-	+	-
69174	Escherichia coli	-	-	-	-
69176	Escherichia coli	+/-	+/- Azul	+/-	-

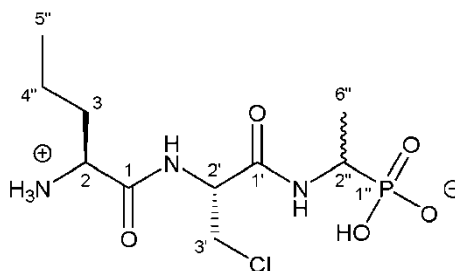
Tabla 3: Resultados

3.3 Conclusión

- 5 La adición de β -Cl-Alafosfalina al medio chromID Salmonella permite inhibir selectivamente las actividades osidasas de las cepas de Escherichia coli. En la medida en que se muestra más fácil detectar de una a varias colonias malvas en medio de colonias incoloras que en medio de colonias azules, cuando una cepa de salmonella está presente a baja concentración en mezcla con una o varias cepas de Escherichia coli, se vuelve por consiguiente significativamente más fácil detectarla en el medio de reacción de la presente invención.

10 Ejemplo 4: Procedimiento de síntesis del compuesto antimicrobiano G según la invención (figura 2): L-Norvalinil- β -cloro-L-analil-D/L-fosfalina

La L-Norvalinil- β -cloro-L-analil-D/L-fosfalina (L-Nva- β -Cl-L-Ala-D/L-fosfalina) está representada por la fórmula siguiente:

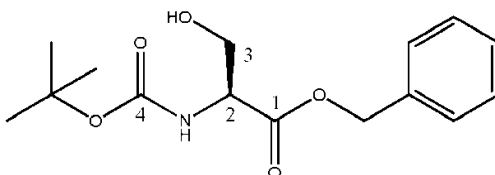


- 15 La síntesis de este compuesto antimicrobiano se detalla a continuación. El procedimiento de síntesis correspondiente se ilustra además en la figura 4.

Tal como se representa en la figura 4, el compuesto mencionado anteriormente según la invención se sintetizó a partir de tBoc-L-norvalina (disponible en el mercado), de éster O-bencílico de β-cloro-L-alanina (cuya síntesis se representa en la figura 5) y de éster dietílico de D/L-fosfalina (cuya síntesis se representa en la figura 6).

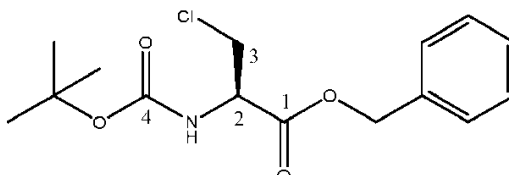
5 4.1 Síntesis del intermedio de reacción éster O-bencílico de β-cloro-L-alanina 32 a partir del compuesto tBoc-L-serina 41 (como se ilustra en la figura 5).

4.1.1 Síntesis de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxiopropanoato de (S)-bencilo (éster O-bencílico de tBoc-L-serina) 43 [9]



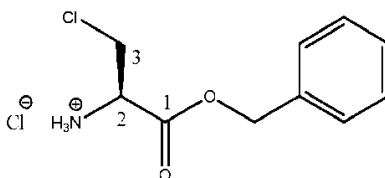
10 Se disolvió tBoc-L-serina (disponible en el mercado) **41** (30 mmol, 6,16 g) en benceno seco (100 ml), al que se le añadió a continuación 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (36 mmol, 5,5 ml) y bromuro de bencilo **42** (36 mmol, 4,4 ml). La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente bajo nitrógeno, y el disolvente se eliminó más tarde a presión reducida para dar un residuo líquido blanco roto. Se añadió acetato de etilo (200 ml), el contenido del matraz se ultrasonizó, a continuación se lavó con una solución 1 M de HCl (2 x 50 ml), una solución acuosa al 10 % peso/volumen de K₂CO₃ (2 x 50 ml) y solución saturada de cloruro de sodio (2 x 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna [nafta/acetato de etilo (1:1)] para dar el producto **43** en forma de sólido blanco (8,05 g, 27,3 mmol, 91 %); p.f. 61 - 66 °C (p.f. lit. [10] 59 - 60 °C); [α]_D²⁰ -18,5° (c 1,0, CH₃OH); ν_{max}/cm⁻¹ 3419 (NH), 3361 (OH), 2978 (CH), 1758 (C=O), 1668 (C=O), 1524 (flexión NH), 1155 (C-O), 1068 (C-O); ¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ_H 1,38 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,68 (2H, t, J=6,0 Hz, CH₂OH), 4,10-4,16 (1H, m, CH-2), 4,91 (1H, t, J=6,0 Hz, OH), 5,10 (1H, d, J=12,0 Hz, OCH₂aAr), 5,17 (1H, d, J=12,0 Hz, OCH₂bAr), 6,97 (1H, d, J=9,0 Hz, NH), 7,32-7,38 (5H, m, 5 x CHAr); ¹³C RMN (75 MHz, DMSO) δ_C 28,6 (C(CH₃)₃), 57,0 (CH-2), 61,8 (CH₂-3), 66,2 (OCH₂Ar), 78,8 (C(CH₃)₃), 128,0 (CHAr), 128,4 (CHAr), 128,8 (CHAr), 136,5 (CHAr cuat), 155,8 (C-4, cuat), 171,4 (C-1, cuat).

4.1.2 Síntesis de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-cloropropanoato de (R)-bencilo (éster O-bencílico de tBoc-β-cloro-L-alanina) 44 [11]



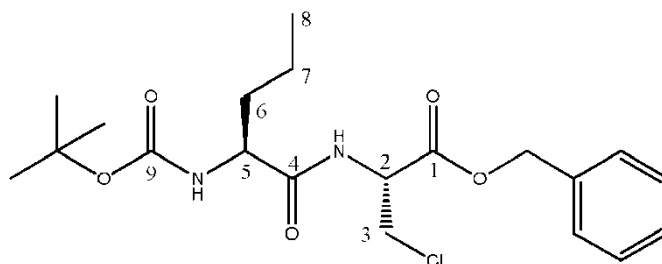
25 El (2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxiopropanoato de (S)-bencilo 43 (25 mmol, 7,39 g), obtenido en la etapa 4.1.1 más arriba, se disolvió en DCM seco (100 ml) y a continuación se añadió tricloro-acetonitrilo (50 mmol, 5,0 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A esta solución, se le añadió lentamente trifenilfosfina (50 mmol, 13,15 g) en DCM seco (50 ml). La solución obtenida de este modo se agitó durante una noche a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió solución saturada de cloruro de sodio (100 ml) para detener la reacción. Después de la separación, la capa orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (3 x 60 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar un residuo líquido naranja. El residuo se purificó por cromatografía en columna [nafta/acetato de etilo (7:3)] para dar el producto 44 en forma de sólido blanco roto (7,41 g, 23,6 mmol, 95 %); p.f. 53 - 58 °C; [α]_D²² -23,0° (c 1,0, CH₃OH); ν_{max}/cm⁻¹ 3365 (NH), 2917 (CH), 1727 (C=O), 1679 (C=O), 1522 (flexión NH), 1181 (C-O), 1158 (C-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ_H 1,45 (9H, s, C(CH₃)₃), 3,85 (1H, dd, J=12,0 Hz, 3,0 Hz, CH₂a-3), 3,99 (1H, dd, J=12,0 Hz, 3,0 Hz, CH₂b-3), 4,74 (1H, m, CH-2), 5,20 (1H, d, J=12,0 Hz, OCH₂aAr), 5,25 (1H, d, J=12,0 Hz, OCH₂bAr), 5,44 (1H, d, J=6,0 Hz, NH), 7,33-7,38 (5H, m, 5 x CHAr); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ_C 27,3 (C(CH₃)₃), 44,5 (CH₂-3), 53,5 (CH-2), 66,8 (OCH₂Ar), 79,5 (C(CH₃)₃), 127,3 (CHAr), 127,6 (CHAr), 127,6 (CHAr), 133,9 (CHAr cuat), 154,0 (C-4, cuat), 168,0 (C-1, cuat); CHN [Descubierto: C, 57,71; H, 6,46; N, 4,18. C₁₅H₂₀ClNO₄ requiere C, 57,42; H, 6,42; N, 4,46 %].

4.1.3 Síntesis de cloruro de (R)-1-(benciloxi)-3-cloro-loxopropan-2-aminio (hidrocloruro de β-cloro-L-alanina) 32



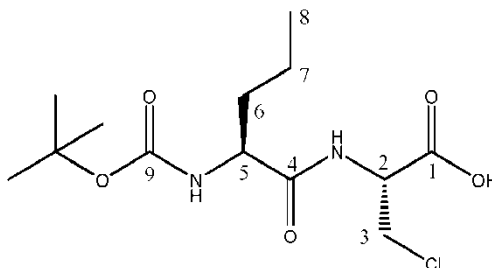
El compuesto **44** (10 mmol, 3,14 g), obtenido en la etapa 4.1.2. más arriba, se disolvió en una solución 2 M de HCl en éter (200 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido obtenido de este modo se filtró y se lavó con éter dietílico para dar el producto **32** en forma de sólido blanco (2,36 g, 9,5 mmol, 95 %); p.f. 145 °C (secundario); $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2848 (CH), 1749 (C=O), 1593 (Ar C-C), 1490 (Ar C-C), 1231 (C-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO) δ_{H} 4,16 (1H, dd, $J=12,0$ Hz, 3,0 Hz, CH2a-3), 4,22 (1H, dd, $J=12,0$ Hz, 3,0 Hz, CH2b-3), 4,77 (1H, t, $J=3,0$ Hz, CH-2), 5,26 (1H, d, $J=12,0$ Hz, OCH2aAr), 5,31 (1H, d, $J=15,0$ Hz, OCH2bAr), 7,33-7,46 (5H, m, 5 x CHAr), 9,09 (3H, sa, NH3+); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO) δ_{C} 43,3 (CH2-3), 53,5 (CH-2), 68,0 (OCH2Ar), 128,6 (CHAr), 128,8 (CHAr), 128,9 (CHAr), 135,4 (CHAr cuat), 167,0 (C-1, cuat); CHN [Descubierto: C, 47,16; H, 5,43; N, 5,43. C₁₀H₁₃Cl₂NO₂·0,2H₂O requiere C, 47,34; H, 5,32; N, 5,52 %].

4.2 Síntesis del 2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanamido)-3-cloropropanoato de (R)-bencilo (éster O-bencilico de tBoc-L-Norvalinil- β -cloro-L-alanina) **33**



Se disolvió tBoc-L-Norvalina (disponible en el mercado) **31** (6,0 mmol, 1,31 g) en THF seco (50 ml) y se añadió N-metilmorfolina (6,0 mmol, 0,66 ml). La solución se enfrió a continuación a 0 °C y se le añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (6,0 mmol, 0,78 ml). La mezcla se agitó a 0 °C bajo nitrógeno durante 1 hora. A la solución agitada, se le añadió cloruro de (R)-1-(benciloxi)-3-cloro-loxopropan-2-aminio (sal cloruro de éster bencilico de β -Cl-L-alanina) **32** (5,4 mmol, 1,36 g), obtenido en la etapa 4.1.3 más arriba, en DCM seco (30 ml) neutralizado previamente con N-metilmorfolina (5,4 mmol, 0,59 ml) a 0 °C. La solución obtenida de este modo se agitó durante una noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La solución se filtró y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DCM (60 ml) y se lavó con una solución a 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), a continuación con agua (25 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar un líquido amarillo que se purificó por cromatografía en columna [nafta/acetato de etilo (7:3)] para dar el producto **33** en forma de sólido blanco (1,74 g, 4,2 mmol, 78 %); p.f. 95 - 98 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -25,0° (c 1,0, CH₃OH); $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3327 (NH), 2960 (CH), 1738 (C=O), 1668 (C=O), 1518 (flexión NH), 1169 (C-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 0,92 (3H, t, $J=9,0$ Hz, CH₃-8), 1,35-1,45 (11H, [m, CH₂-7], [s, C(CH₃)₃]), 1,52-1,65 (1H, m, CH₂a-6), 1,75-1,82 (1H, m, CH₂b-6), 3,89 (1H, dd, $J=12,0$ Hz, 3,0 Hz, CH₂a-3), 3,99 (1H, dd, $J=12,0$ Hz, 3,0 Hz, CH₂b-3), 4,11-4,15 (1H, m, CH-5), 4,96-5,00 (2H, [m, CH-2], [m, HNCO₂]), 5,20 (1H, d, $J=12,0$ Hz, OCH₂aAr), 5,25 (1H, d, $J=12,0$ Hz, OCH₂a-Ar), 6,97 (1H, d, $J=6,0$ Hz, HNCO), 7,33-7,37 (5H, m, 5 x CHAr); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 12,7 (CH₃-8), 17,8 (CH₂-7), 27,3 (C(CH₃)₃), 33,4 (CH₂-6), 43,8 (CH₂-3), 52,2 (CH-2), 53,4 (CH-5), 67,0 (OCH₂Ar), 79,3 (C(CH₃)₃), 127,4 (CHAr), 127,6 (CHAr), 127,7 (CHAr), 133,8 (CHAr cuat), 154,5 (C-9, cuat), 167,5 (C-1, cuat), 171,2 (C-4, cuat); CHN [Descubierto: C, 58,49; H, 7,22; N, 6,81. C₂₀H₂₉ClN₂O₅ requiere C, 58,18; H, 7,08; N, 6,78 %]; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₂₀H₃₀ClN₂O₅)⁺413,1838, descubierto MH⁺ 413,1837.

4.3 Síntesis de ácido (R)-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanamido)-3-cloropropanoico (tBoc-L-norvalinil- β -cloro-L-alanina) **34**



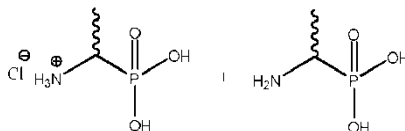
El producto **33**, (1,8 mmol, 0,75 g), obtenido en la etapa 4.2 más arriba, se disolvió en metanol (60 ml) y se le añadió al recipiente bajo presión de acero inoxidable. Se añadió un 10 % de paladio sobre carbón (0,0941 g) y la solución obtenida de este modo se agitó a una presión de H₂ de 3,5 bares a temperatura ambiente durante 72 horas. El catalizador se eliminó por filtración sobre Celite, se lavó con metanol y se concentró al vacío para dar el producto **34** en forma de sólido amarillo claro (0,573 g, 1,78 mmol, 99 %); p.f. 59 - 63 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -12,0° (c 1,0, CH₃OH); $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3313 (NH), 2964 (CH), 1655 (C=O), 1509 (flexión NH), 1161 (C-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 0,87(3H, t, $J=4,2$ Hz, CH₃-8), 1,38 (11H, [m, CH₂-7], [s, C(CH₃)₃]), 1,51-1,62 (1H, m, CH₂a-6), 1,67-1,79 (1H, m, CH₂b-6), 3,91 (2H, m, CH₂-3), 4,19 (1H, m, CH-5), 4,85 (1H, m, CH-2), 5,20 (1H, m, NH carbamato), 6,45 (1H, sa, OH), 7,25 (1H, m, NH amida); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 12,7 (CH₃-8), 17,9 (CH₃-7), 27,3 (C(CH₃)₃), 33,6

(CH2-6), 43,4 (CH-3), 52,4 (CH-2), 53,2 (CH-5), 79,7 (C(CH3)3), 155,1 (C-9, cuat), 170,7 (C-1/4, cuat), 172,0 (C-1/4, cuat); CHN [Descubierto: C, 48,77; H, 7,61; N, 8,22. C13H23ClN2O5 requiere C, 48,37; H, 7,18; N, 8,68 %].

4.4 Síntesis del intermedio de reacción éster dietílico de D/L-fosfalina 35

5 Como se representa en la figura 6, el éster dietílico de D/L-fosfalina 35 se sintetizó a partir de N-feniltio-urea 53, de trifenilfosfita 52 y de acetaldehído 51 en condiciones ácidas, según el procedimiento de Kudzin y Stec [9]. La síntesis de este intermedio de reacción se detalla a continuación.

4.4.1 Síntesis de ácido (β)-(1-aminoetil)fosfónico (D/L-fosfalina) 54 [12]

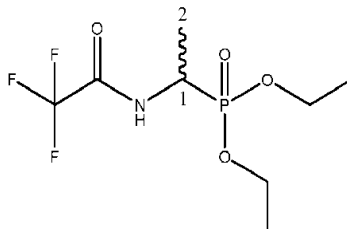


10 Se disolvió N-feniltio-urea 53 (40 mmol, 6,10 g) en ácido acético glacial (20 ml). Se le añadió gota a gota acetaldehído 51 (60 mmol, 3,40 ml), y a continuación se le añadió trifenilfosfita 52 (40 mmol, 11 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 min, a continuación se calentó a reflujo a 85°C durante 1 hora. Se añadió una mezcla de ácido acético glacial (2 ml) y de ácido clorhídrico (37 %, 20 ml) y la reacción se calentó a reflujo durante una noche a 145 °C. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se transfirió y se lavó con etanol en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Una pequeña cantidad de sal hidrócloruro de fosfalina se obtuvo por filtración y el filtrado se concentró al vacío para dar un residuo líquido naranja oscuro. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de etanol (20 ml) y se añadió óxido de propileno (120 ml) para producir un precipitado blanco. El sólido blanco se filtró bajo nitrógeno y se secó en un desecador (sobre pentóxido de fósforo) durante 3 días, lo que vino seguido de una recristalización a partir de agua caliente/etanol para dar el producto zwitteriónico 54 en forma de sólido blanco (4,39 g, 35 mmol, 88 %); p.f. 265 - 268 °C (s) (p.f. lit. [13] 271 - 275 °C); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 2910 (sa OH), 1616 (P-OH), 1532 (flexión NH), 1143 (P=O), 1035 (P-O), 930 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, D2O) δH 1,47 (3H, dd, JP-H=14,9 Hz y JH-H = 7,3 Hz, CH3), 3,40 (1H, m, CH); $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, D2O) δC 13,5 (CH3, d, JP-C =2,7 Hz), 44,7 (CH, d, JP-C =144,2 Hz).

15

20

4.4.2 Síntesis de (1-(2,2,2-trifluoro-acetamido)etil)fosfonato de dietilo 56 [14]

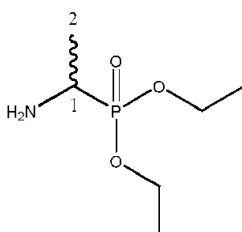


25 Se añadió ácido 1-aminoetilfosfónico 44 (40 mmol, 6,47 g), obtenido en la etapa 4.4.1. más arriba, a una mezcla de ácido trifluoroacético (5 ml) y de anhídrido trifluoroacético (25 ml). La solución se agitó y se calentó a reflujo a 60 °C. Después de 1 hora, la solución se enfrió y se añadió lentamente ortoformiato de trietilo (150 ml). La solución se calentó a reflujo a 110 °C durante 2 horas, a continuación se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó al vacío para dar un sólido pardo. El sólido se redisolvió en DCM y se purificó por cromatografía en columna [DCM/MeOH (9:1)] para dar el producto 56 en forma de sólido blanco roto (11,00 g, 39,6 mmol, 99 %); p.f. 98 - 103 °C (s) (p.f. lit.3 101 - 102 °C); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3202 (NH), 1715 (C=O), 1565 (flexión NH), 1210 (P=O), 1011 (C-F), 968 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl3) δH 1,23 (3H, t, J=6,0 Hz, OCH2CH3-a), 1,28 (3H, t, J=9,0 Hz, OCH2CH3-b), 1,38 (3H, dd, JP-H =15,0 Hz y JH-H = 6,0 Hz, CH3-2), 3,98-4,13 (4H, m, 2 x OCH2CH3), 4,32-4,47 (1H, m, CH-1), 8,11 (1H, d, J=9,0 Hz, NH); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl3) δC 13,7 (CH3-2), 15,2 (OCH2CH3, d, JP-C =2,3 Hz), 15,3 (OCH2CH3, d, JP-C =1,5 Hz), 40,8 (CH-1, d, JP-C =159,0 Hz), 61,8 (OCH2CH3, d, JP-C =6,8 Hz), 62,2 (OCH2CH3, d, JP-C =7,5 Hz), 114,9 (CF3, q, JF-C =285,8 Hz), 156,0 (C=O, q, JF-C =6,0 Hz); $^{31}\text{P-1H}$ desacopRMN (121 MHz, CDCl3) δP 23,0; $^{19}\text{F-1H}$ desacop RMN (282 MHz, CDCl3) δP -75,5.

30

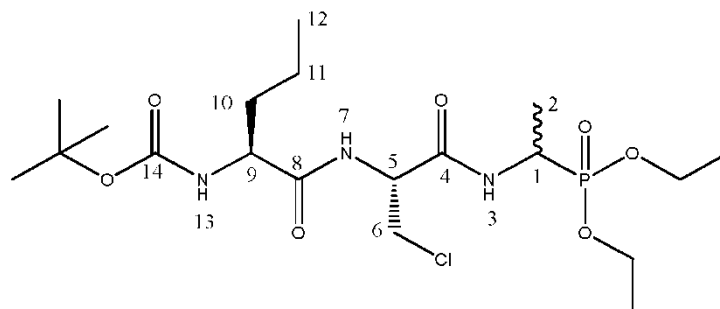
35

4.4.3 Síntesis de (1-aminoetil)fosfonato de (β)-dietilo (éster dietílico de D/L-fosfalina) 35 [15]



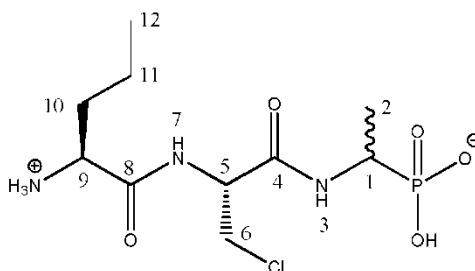
El (1-(2,2,2-trifluoro-acetamido)etil)fosfonato de dietilo **56** (20 mmol, 5,55 g), obtenido en la etapa 4.4.2. más arriba, se disolvió en etanol (200 ml) y se añadió lentamente borohidrato de sodio (200 mmol, 7,57 g). La mezcla obtenida de este modo se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, a continuación se calentó a reflujo (90 °C) durante 3 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar un residuo sólido blanco. El residuo se trató con una solución saturada de NaHCO₃ (96 g/l) (150 ml) y se extrajo en DCM (6 x 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se filtró. El filtrado se concentró al vacío para dar un líquido amarillo claro, y se purificó por cromatografía en columna [DCM/MeOH (9,0:1,0)] para dar el producto **35** en forma de líquido amarillo (2,52 g, 13,9 mmol, 70 %); $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3431 (NH), 2980 (CH), 1215 (P=O), 1020 (P-O), 957 (P-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 1,19-1,30 (9H, [dd, JP-H =17,4 Hz, 7,2 Hz, CH₃-2], [t, J=7,2 Hz, 2 x OCH₂CH₃]), 1,65 (2H, sa, NH₂), 2,99-3,09 (1H, m, CH-1), 4,02-4,14 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 15,5 (OCH₂CH₃-a), 15,6 (OCH₂CH₃-b), 16,3 (CH₃-2), 43,3 (CH-1, d, JP-C =148,5 Hz), 61,1 (OCH₂CH₃-a, d, JP-C =1,5 Hz), 61,2 (OCH₂CH₃-b, d, JP-C =1,5 Hz); ³¹P-¹Hdesacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ P 29,6.

4.5 Síntesis de ((2S)-1-(((2R)-3-cloro-1-(((1-(di-etoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)carbamato de terc-butilo (éster dietílico de tBoc-L-norvalinil- β -cloro-L-analil-D/L-fosfalina) **36**



Ácido (R)-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanamido)-3-cloropropanoico (tBoc-L-norvalinil- β -cloro-L-alanina) **34** (1,8 mmol, 0,58 g), obtenido en la etapa 4.3 más arriba, se disolvió en THF seco (35 ml), a continuación se le añadió N-metilmorfolina (1,9 mmol, 0,21 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se le añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (1,9 mmol, 0,25 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. A la solución agitada, se le añadió 1-aminoetilfosfonato de dietilo (éster dietílico de D/L-fosfalina) **35** (1,8 mmol, 0,33 g) - obtenido en la etapa 4.4.3. más arriba - en THF seco (10 ml) y la solución obtenida de este modo se agitó durante una noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La solución se filtró y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DCM (60 ml) y se lavó con una solución al 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 30 ml), 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (30 ml) y agua (30 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar un residuo líquido amarillo claro. El residuo se purificó por cromatografía en columna [acetato de etilo/metanol (96:4)] para dar el producto **36** en forma de sólido blanco pegajoso (0,45 g, 0,93 mmol, 52 %); p.f. 196 °C (descomposición); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -22,5° (c 1,0, CH₃OH); $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3272 (NH), 2977 (CH), 1709 (C=O), 1644 (flexión NH), 1530 (flexión NH), 1229 (C-O), 1165 (P-O), 1019 (P-O), 972 (P-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 0,86 (3H, t, J=6,0 Hz, CH₃-12), 1,17-1,38 (20H, [m, 2 x OCH₂CH₃], [m, CH₃-2], [s, C(CH₃)₃], [m, CH₂-11]), 1,53-1,59 (1H, m, CH₂a-10), 1,70-1,86 (1H, m, CH₂b-10), 3,69 (1H, dd, J=12,0 Hz, 3,0 Hz, CH₂a-6), 3,91 (1H, dd, J=12,0 Hz, 3,0 Hz, CH₂a-6), 3,97-4,13 (5H, [m, 2 x OCH₂CH₃], [m, CH-9]), 4,35-4,46 (1H, m, CH-1), 4,73-4,79 (1H, m, CH-5), 4,97-5,03 (1H, m, NH-13), 7,00-7,10 (1H, 2 x d, J=9,0 Hz, 9,0 Hz, NH-7, diastereoisómeros L,L,L y L,L,D), 7,23-7,34 (1H, 2 x d, J=9,0 Hz, 9,0 Hz, NH-3, diastereoisómeros L,L,L y L,L,D); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 12,7 (CH₃-12), 14,5 (CH₃-2), 15,3, 15,5 (2 x OCH₂CH₃), 17,9 (CH₂-11), 27,3 (C(CH₃)₃), 33,2 (CH₂-10), 40,4 (d, JP-C=157,5 Hz, CH-1), 43,4 (CH₂-6), 52,7 (CH-5), 61,4, 61,9 (2 x OCH₂CH₃), 79,4 (C(CH₃)₃), 155,0 (C-14, cuat), 166,8 (C-4, cuat), 171,4 (C-8, cuat); ³¹P-¹Hdesacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ P 24,8; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₉H₃₈ClN₃O₇P)⁺ 486,2130, descubierto 486,2124; CHN [Descubierto: C, 46,51; H, 7,76; N, 8,21. C₁₉H₃₇ClN₃O₇P requiere C, 46,96; H, 7,67; N, 8,65 %].

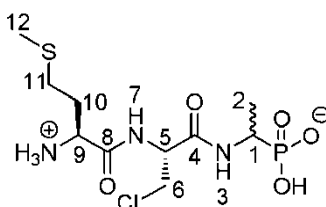
4.6 Síntesis de (1-((R)-2-((S)-2-amoniopentanamido)-3-cloropropanamido)etil)fosfonato de hidrógeno (L-Norvalinil- β -cloro-L-analil-D/L-fosfalina) **37**



5 ((2S)-1-(((2R)-3-cloro-1-((1-(di-etoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)carbamato de terc-butilo (éster dietílico de tBoc-L-norvalinil-β-cloro-L-analil-D/L-fosfalina) **36** (2,0 mmol, 0,99 g), obtenido en la etapa 4.5. más arriba, se disolvió en HBr y ácido acético (33 %) (3,0 ml). La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se le añadió éter dietílico seco (150 ml) y la mezcla se almacenó a -20 °C durante una noche. El disolvente se decantó y el producto en bruto pardo oleoso se trituró con éter dietílico seco (5 x 60 ml). El residuo higroscópico naranja-pardo se disolvió en metanol seco (5 ml), seguido por la adición de óxido de propileno en exceso. La solución se filtró y se lavó con éter dietílico para dar un sólido verde pálido que se filtró más tarde para dar el producto final **37** en forma de sólido verde pálido (0,64 g, 1,94 mmol, 97 %); p.f. 175 °C (secundario) [α]_D²⁵ -2,50° (c 1,0, H₂O+DIEA, 9,9:0,1); ν_{max}/cm⁻¹ 3294 (NH⁺), 2963 (CH), 1668 (C=O), 1645 (C=O), 1538 (flexión NH), 1132 (P-O), 1039 (P-O), 998 (P-O); ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δH 1,01 (3H, t, J=9,0 Hz, CH₃-12), 1,30-1,37 (3H, m, CH₃-2), 1,44-1,54 (2H, m, CH₃-11), 1,90-1,98 (2H, m, CH₂-10), 3,91-4,15 (4H, [m, CH₂-6], [m, CH-9], [m, CH-1]), 4,79 (1H, m, CH-5); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δC 12,9 (CH₃-12), 15,7 (CH₃-2), 17,6 (CH₂-11), 33,0 (CH₂-10), 43,3 (CH₂-6), 53,1 (CH-1, CH-9), 55,0 (CH-5), 170,4 (C-4, C-8, cuat); ³¹P-1Hdesacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δP 18,5; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₀H₂₀CIN₃O₅P)- 328,0835, descubierto 328,0833.

15 **Ejemplo 5: Procedimiento de síntesis del compuesto antimicrobiano H según la invención (figura 2): L-metionil-β-cloro-L-analil-D/L-fosfalina**

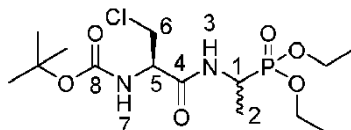
La L-metionil-β-cloro-L-analil-D/L-fosfalina (L-Met- β -Cl-L-Ala-D/L-fosfalina) está representada por la fórmula siguiente:



20 La síntesis de este compuesto antimicrobiano se detalla a continuación.

5.1. Síntesis del intermedio de reacción ((2R)-3-cloro-1-((1-(di-etoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butilo (Éster dietílico de tBoc-β-Cl-L-Ala-D/L-Fos)

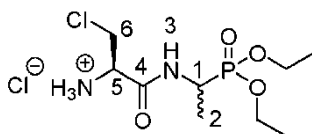
El éster dietílico de tBoc-(3-Cl-L-Ala-D/L-Fos) está representado por la fórmula siguiente:



25 A una suspensión de tBoc-β-Cl-L-Ala-OH (7,8 mmol, 1,74 g) en THF seco (60 ml), se le añadió N-metilmorfolina (7,8 mmol, 0,90 ml) a -5 °C. Se le añadió lentamente cloroformiato de isobutilo (7,8 mmol, 1,00 ml) y la mezcla resultante se agitó a -5 °C durante 1 hora. A la mezcla agitada, se le añadió 1-aminoetilfosfonato de dietilo (8,6 mmol, 1,57 g) en THF seco (20 ml) a -5 °C. La mezcla resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30 minutos, a continuación a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y el disolvente se eliminó al vacío para dar un líquido amarillo pálido, que se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml) y agua (25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron al vacío para dar un líquido amarillo pálido. El líquido se purificó por cromatografía en columna, utilizando el 100 % de DCM, a continuación aumentando progresivamente a 90:10 DCM/MeOH, para dar el producto en forma de jarabe amarillo compuesto por 2 diastereoisómeros, éster dietílico de tBoc-β-Cl-L-Ala-L-Fos y éster dietílico de tBoc-β-Cl-L-Ala-D-Fos (2,70 g, 7,0 mmol, 90 %); ν_{max}/cm⁻¹ 3261 (NH), 1713 (C=O), 1670 (C=O), 1517 (flexión NH), 1225 (P=O), 1164 (P-O), 1020 (P-O), 970 (P-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δH 1,15-1,39 (18H, [s, C(CH₃)₃], [m, CH₃-2], [m, 2 x OCH₂CH₃]), 3,64-3,71 (1H, m, CHa/b-6), 3,89-3,96 (1H, m, CHa/b-6), 4,01-4,12 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃), 4,42-4,49 (2H, [m, CH-1], [m, CH-5]), 5,40 (1H, d, J=3,0 Hz, NH-3 o NH-7-A), 5,43 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-3 o NH-7-A), 7,00 (1H, d, J=9,0 Hz, NH-3 o NH-7-A), 7,07 (1H, d, J=9,0 Hz, NH-3 o NH-7-B); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δC 15,6 (d, JP-C=5,3 Hz, CH₃-2), 16,3 (d, JP-C=2,3 Hz, OCH₂CH₃), 16,5 (d, JP-C=2,3 Hz, OCH₂CH₃), 28,3 (C(CH₃)₃), 41,2 (d, JP-C=157,5 Hz, CH-1-A), 41,3 (d, JP-C=156,8 Hz, CH-1-B), 44,9 (CH₂-6-A), 45,0 (CH₂-6-B), 55,3 (CH-5), 62,5 (d, JP-C=3,0 Hz, OCH₂CH₃-A), 62,6 (d, JP-C=3,8 Hz, OCH₂CH₃-B), 62,9 (d, JP-C=3,0 Hz, OCH₂CH₃-A), 63,0 (d, JP-C=3,0 Hz, OCH₂CH₃-B), 80,7 (C(CH₃)₃), 154,9 (C=O-8), 168,3 (C=O-4); ³¹P-1HdesacopRMN (121 MHz, CDCl₃) δP 24,8.

45 5.2. Síntesis del intermedio de reacción cloruro de (2R)-3-cloro-1-((1-(di-etoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-amino (Hidrocloruro de éster dietílico de β-Cl-L-Ala-D/L-Fos)

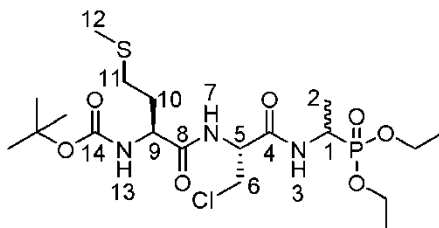
El hidrocloruro de éster dietílico de β-Cl-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



Una solución de éster dietílico de tBoc- β -Cl-L-Ala-D/L-Fos (obtenido en la etapa 5.1. ; 6,7 mmol, 2,59 g) en una solución de HCl 2 M en éter dietílico (100 ml) se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró a continuación y el sólido higroscópico blanco roto se lavó con éter dietílico. El sólido se secó a continuación durante una noche en un desecador que contenía óxido de fósforo (V) y se trituró con nafta para dar el producto en forma de sólido verde pálido compuesto por 2 diastereoisómeros, el hidrocloreto de éster dietílico de β -Cl-L-Ala-L-Fos y el hidrocloreto de éster dietílico de β -Cl-L-Ala-D-Fos (1,51 g, 4,7 mmol, 70 %); p.f. 127 - 131 °C (descomp.); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3204 (NH), 1687 (C=O), 1562 (flexión NH), 1204 (P=O), 1010 (P-O), 961 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ_{H} 1,28 (3H, t, J=6,0 Hz, OCH₂CH₃), 1,29 (3H, t, J=6,0 Hz, OCH₂CH₃), 1,37 (3H, dd, 3JP-H=18,0 Hz, 3JH-H=6,0 Hz, CH₃-2), 3,92-4,04 (2H, m, CH₂-6), 4,07-4,21 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃), 4,38-4,48 (2H, [m, CH-1], [m, CH-5]); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, D₂O) δ_{C} 13,7 (CH₃-2), 14,0 (CH₃-2), 15,7 (OCH₂CH₃), 15,7 (OCH₂CH₃), 41,7 (d, JP-C=158,3 Hz, CH-1), 42,0 (d, JP-C=157,5 Hz, CH-1), 42,4 (CH₂-6), 53,7 (CH-5), 53,8 (CH-5), 64,3 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃), 64,5 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃-B), 165,7 (C=O-4-A), 165,8 (C=O-4-B); $^{31}\text{P-1H}$ desacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ_{P} 26,1.

5.3. Síntesis del intermedio de reacción ((2S)-1-(((2R)-3-cloro-1-((1-(dietoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-4-(metiltilio)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (éster dietílico de tBoc-L-Met- β -Cl-L-Ala-D/L-Fos)

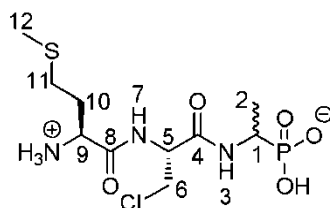
El éster dietílico de tBoc-L-Met- β -Cl-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



A una solución de tBoc-L-Met-OH (3,4 mmol, 0,85 g) en THF seco (60 ml), se le añadió N-metilmorfolina (3,4 mmol, 0,40 ml). La solución se enfrió a -5 °C y se añadió, gota a gota, cloroformiato de isobutilo (3,4 mmol, 0,45 ml). La mezcla se agitó a -5 °C durante 1 hora. A la mezcla agitada, se le añadió, gota a gota, hidrocloreto de éster dietílico de β -Cl-L-Ala-D/L-Fos obtenido en la etapa 5.2. (3,4 mmol, 1,10 g) en DCM seco (20 ml), que se había neutralizado con N-metilmorfolina (3,4 mmol, 0,40 ml) a -5 °C. La mezcla resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30 minutos, y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a continuación y se concentró al vacío, a continuación se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml), agua (25 ml) y solución saturada de cloruro de sodio (30 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío para dar un líquido amarillo, que se purificó por cromatografía en columna [DCM/MeOH (95:5)] para dar un líquido incoloro. Una recristalización a partir de éter dietílico/nafta dio el producto en forma de sólido blanco compuesto por 2 diastereoisómeros, el éster dietílico de tBoc-L-Met- β -Cl-L-Ala-L-Fos y el éster dietílico de tBoc-L-Met- β -Cl-L-Ala-D-Fos (0,88 g, 1,7 mmol, 50 %); p.f. 96 - 99 °C; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3278 (NH), 1709 (C=O), 1639 (C=O), 1523 (flexión NH), 1228 (P=O), 1018 (P-O), 970 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 1,17-1,36 (9H, [m, CH₃-2], [m, 2 x OCH₂CH₃]), 1,38 (9H, s, C(CH₃)₃), 1,87-2,07 (5H, [s, CH₃-12], [m, CH₂-10]), 2,48-2,54 (2H, m, CH₂-11), 3,71 (1H, dd, J=12,0 Hz, 6,0 Hz, CHa/b-6), 3,88 (1H, dd, J=12,0 Hz, 6,0 Hz, CHa/b-6), 3,99-4,13 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃), 4,20 (1H, m, CH-9), 4,37-4,47 (1H, m, CH-1), 4,78-4,84 (1H, m, CH-5), 5,39 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-13-A), 5,41 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-13-B), 7,15 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7-A), 7,24 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7-B), 7,52 (1H, m, NH-3) $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 14,4 (CH₃-2 o CH₃-12), 14,5 (CH₃-2 o CH₃-12), 15,4 (OCH₂CH₃), 15,5 (OCH₂CH₃), 27,3 (C(CH₃)₃), 29,2 (CH₂-11-A), 29,3 (CH₂-11-B), 30,2 (CH₂-10-A), 30,4 (CH₂-10-B), 40,3 (d, JP-C=159,0 Hz, CH-1), 43,5 (CH₂-6-A), 43,7 (CH₂-6-B), 52,7 (CH-5), 53,1 (CH-9), 61,6 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃-A), 61,7 (d, JP-C=6,0 Hz, OCH₂CH₃-B), 62,0 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃-A), 62,1 (d, JP-C=7,5 Hz, OCH₂CH₃-B), 79,6 (C(CH₃)₃), 154,8 (C=O-14), 166,7 (C=O-4-A), 166,8 (C=O-4-B), 170,7 (C=O-8-A), 170,8 (C=O-8-B); $^{31}\text{P-1H}$ desacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ_{P} 24,8; CHN [Descubierto: C, 44,08; H, 7,47; N, 8,18. C₁₉H₃₇ClN₃O₇PS requiere C, 44,06; H, 7,20; N, 8,11 %].

5.4. Síntesis del compuesto antimicrobiano H (figura 2), a saber el compuesto (1-((R)-2-((S)-2-amonio-4-(metiltilio)butanamido)-3-cloropropanamido)etil)fosfonato de hidrógeno (L-Met- β -Cl-L-Ala-D/L-Fos)

El compuesto antimicrobiano L-Met- β -Cl-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



Una solución de éster dietílico de tBoc-L-Met-β-Cl-L-Ala-D/L-Fos obtenido en la etapa 5.3. (1,4 mmol, 0,71 g) en bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial (33 %) (8,0 ml) se agitó durante una noche a temperatura ambiente. A continuación se añadió éter dietílico seco (70 ml) y la mezcla se colocó en un congelador durante una noche. El disolvente se decantó y el producto en bruto se trituró con éter dietílico seco (5 x 50 ml). El producto en bruto parduzco-naranja se disolvió en metanol (5 ml) y se le añadió óxido de propileno en exceso. La mezcla se filtró y se lavó con éter dietílico seco para dar un sólido verde, que se secó en un desecador que contenía óxido de fósforo (V) y se recristalizó a partir de agua caliente/etanol para dar el producto en forma de sólido verde pálido compuesto por 2 diastereoisómeros, L-Met-β-Cl-L-Ala-L-Fos y L-Met-β-Cl-L-Ala-D-Fos (0,17 g, 0,48 mmol, 35 %); p.f. 175 - 179 °C (descomp.); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3264 (NH⁺), 2829 (OH ancho), 1641 (C=O), 1546 (flexión NH), 1149 (P-O), 1041 (P-O), 921 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, D₂O) δ 1,10-1,50 (3H, m, CH₃-2), 2,08-2,32 (5H, [m, CH₃-12], [m, CH₂-10]) 2,61 (2H, CH₂-11), 3,37-4,16 (4H, [m, CH₂-6], [m, CH-1], [m, CH-9]), 4,48 (1H, m, CH-5); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, D₂O) δ 14,0 (CH₃-12), 15,5 (CH₃-2), 28,2 (CH₂-11), 30,0 (CH₂-10), 43,3 (CH₂-6), 44,8 (CH-1), 52,3 (CH-9), 55,0 (CH-5), 169,4 (C=O-4 y C=O-8); $^{31}\text{P-1H}$ desacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 18,7.

Ejemplo 6: Evaluación de la actividad antibacteriana de la L-Norvalinil-(β-cloro-analil-D/L-fosfalina (compuesto G; véase la figura 2) y de la L-Metionil-β-cloro-analil-D/L-fosfalina (compuesto H; véase la figura 2) sintetizadas respectivamente según los ejemplos 4 y 5

6.1. Introducción

Las concentraciones mínimas inhibitoras de los compuestos G y H para 12 cepas de bacterias Gram negativas y 6 cepas de bacterias Gram positivas se determinaron después de 22 horas de incubación utilizando un procedimiento de dilución en gelosa como se describe en el ejemplo 2 (véase concretamente la sección «2.2 Materiales y métodos»).

6.2 Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4 más adelante

Especie	Referencia de la cepa	Concentración mínima inhibitora (CMI) del compuesto G (μg/ml)	Concentración mínima inhibitora (CMI) del compuesto H (μg/ml)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	>8	>8
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416	>8	>8
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 11936	4	4
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 10418	1	0,5
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12241	0,5	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 9528	0,5	0,5
<i>Providencia rettgeri</i>	NCTC 7475	>8	>8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 10662	>8	>8
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC 74	>8	>8
<i>Salmonella enteritidis</i>	NCTC 6676	>8	>8
<i>Serratia marcescens</i>	NCTC 10211	0,5	0,25
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCTC 11176	0,25	0,25

Especie	Referencia de la cepa	Concentración mínima inhibidora (CMI) del compuesto G (µg/ml)	Concentración mínima inhibidora (CMI) del compuesto H (µg/ml)
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 775	0,063	0,032
<i>Enterococcus faecium</i>	NCTC 7171	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994	>8	>8
<i>Staphylococci epidermidis</i>	NCTC 11047	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 6571	4	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	NCTC 11939	>8	>8

Tabla 4: concentraciones mínimas inhibidoras de los compuestos antimicrobianos G y H frente a diferentes especies de bacterias

Según los datos presentados en la tabla 4 más arriba, parece claramente que los compuestos G y H son fuertemente inhibidores frente a las cepas ensayadas de ciertas especies de bacterias Gram negativas y de ciertas especies de bacterias Gram positivas, concretamente en relación con *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, y menos inhibidores con respecto a otras especies de bacterias Gram negativas y Gram positivas, concretamente en lo que respecta a *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*.

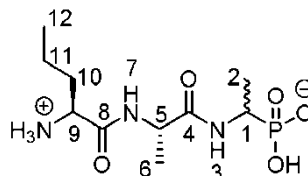
6.3 Conclusión

Las diferencias muy significativas en materia de concentración inhibidora observadas entre diferentes especies de bacterias hacen a los compuestos G y H compuestos particularmente bien adaptados para su incorporación en medios de reacción que permiten la búsqueda y/o el aislamiento selectivos de ciertas especies de bacterias en muestras biológicas, y concretamente la búsqueda selectiva de:

- bacterias Gram negativas (bacterias diana Gram negativas) tales como *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*; o
- bacterias Gram positivas (bacterias diana Gram positivas) tales como *Listeria monocytogenes*.

Ejemplo 7: Procedimiento de síntesis del compuesto antimicrobiano I según la invención (figura 2): L-norvalinil-L-analil-D/L-fosfalina

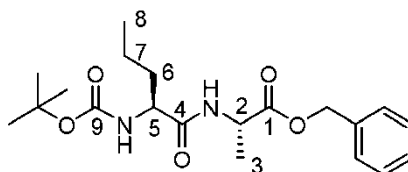
La L-norvalinil-L-analil-D/L-fosfalina (L-Nva-L-Ala-D/L-fosfalina) está representada por la fórmula siguiente:



La síntesis de este compuesto antimicrobiano se detalla a continuación.

7.1. Síntesis del intermedio de reacción 2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)pentanamido)propanoato de (S)-bencilo (tBoc-L-Nva-L-Ala-OBzl)

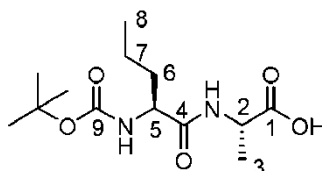
El compuesto tBoc-L-Nva-L-Ala-OBzl está representado por la fórmula siguiente:



A una solución de tBoc-L-Nva-OH (10,0 mmol, 2,17 g) en THF seco (60 ml), se le añadió N-metilmorfolina (15,0 mmol, 1,65 ml). La solución se enfrió a -5 °C y se añadió, gota a gota, cloroformiato de isobutilo (15,0 mmol, 1,95 ml). La mezcla se agitó a -5 °C durante 1 hora. A la mezcla agitada, se le añadió, gota a gota, sal p-toluenosulfonato de éster bencílico de L-alanina (10,0 mmol, 3,52 g) en DCM seco (30 ml), que se había neutralizado con diisopropiletilamina (15,0 mmol, 2,60 ml) a -5 °C. La solución resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30 minutos, y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La solución se filtró y se concentró al vacío, a continuación se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml) y agua (25 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar un líquido higroscópico amarillo, que se purificó por cromatografía en columna [40-60 nafta/acetato de etilo (7:3)] para dar el producto en forma de sólido blanco roto (2,40 g, 6,3 mmol, 63 %); p.f. 60 - 63 °C; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3299 (NH), 1743 (C=O), 1655 (C=O), 1527 (flexión NH), 1245 (C-O), 1162 (C-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 0,83 (3H, t, J=9,0 Hz, CH₃-8), 1,25-1,36 (14H, [d, J=6,0 Hz, CH₃-3], [m, CH₂-7], [s, C(CH₃)₃]), 1,42-1,54 (1H, m, CHa/b-6), 1,64-1,73 (1H, m, CHa/b-6), 4,02 (1H, m, CH-5), 4,54 (1H, pentet, J=6,0 Hz, CH-2), 4,96 (1H, d, J=9,0 Hz, NHCO₂), 5,07 (1H, d, J=12,0 Hz, OCHa/bAr), 5,12 (1H, d, J=12,0 Hz, OCHa/bAr), 6,56 (1H, d, J=6,0 Hz, NHCO), 7,27 (5H, m, 5xCHAR); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 12,7 (CH₃-8), 17,3 (CH₃-3), 17,8 (CH₂-7), 27,3 (C(CH₃)₃), 33,7 (CH₂-6), 47,1 (CH-2), 53,4 (CH-5), 66,1(OCH₂Ar), 79,0 (C(CH₃)₃), 127,1-127,6 (5xCHAR), 134,3 (CHAR cuat.), 154,6 (C=O-9), 170,8 (C=O-4), 171,5 (C=O-1); CHN [Descubierto: C, 63,75; H, 8,37; N, 7,86. C₂₀H₃₀N₂O₅ requiere C, 63,47; H, 7,99; N, 7,40 %]; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₂₀H₃₁N₂O₅)+379,2227, descubierto 379,2222.

7.2. Síntesis del intermedio de reacción ácido (S)-2-((S)-2-(((terc-butoxicarbonil)amino)pentanamido)propanoico (tBoc-L-Nva-L-Ala-OH)

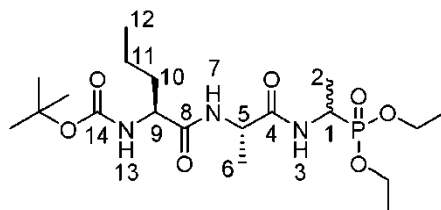
El compuesto tBoc-L-Nva-L-Ala-OH está representado por la fórmula siguiente:



tBoc-L-Nva-L-Ala-OBzl obtenido en la etapa 7.1. (6,0 mmol, 2,27 g) se disolvió en metanol (60 ml) y se hidrogenó en presencia del 5 % de paladio sobre carbón (0,23 g) a una presión de 3,5 bares de H₂ a temperatura ambiente durante una noche. El catalizador se eliminó por filtración por medio de Celite y se lavó con metanol. La solución se concentró al vacío para dar el producto en forma de sólido blanco (1,66 g, 5,7 mmol, 96,0 %); p.f. 53 - 58 °C (descomp.); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3500-2500 (sa, OH), 3300 (NH), 2961 (NH), 1688 (C=O), 1655 (C=O), 1522 (flexión NH), 1245 (C-O), 1164 (C-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ H 0,85 (3H, t, J=9,0 Hz, CH₃-8), 1,27-1,39 (14H, [m, CH₃-3], [m, CH₂-7], [s, C(CH₃)₃]), 1,48-1,53 (1H, m, CHa/b-6), 1,67-1,71 (1H, m, CHa/b-6), 4,10 (1H, m, CH-5), 4,50 (1H, m, CH-2), 5,27 (1H, m, NHCO₂), 6,93 (1H, m, NHCO), 8,87 (1H, sa, OH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ C 13,7 (CH₃-8), 18,0 (CH₃-3), 18,8 (CH₂-7), 28,3 (C(CH₃)₃), 34,5 (CH₂-6), 48,1 (CH-2), 54,3 (CH-5), 80,4 (C(CH₃)₃), 156,0 (C=O-9), 172,5 (C=O-4), 175,5 (C=O-1); CHN [Descubierto: C, 54,18; H, 8,78; N, 9,62. C₁₃H₂₄N₂O₅ requiere C, 54,15; H, 8,39; N, 9,72 %]; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₃H₂₅N₂O₅)+289,1758, descubierto 289,1758.

7.3. Síntesis del intermedio de reacción ((2S)-1-(((2S)-1-((1-(dietoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)carbamato de terc-butilo (Éster dietílico de tBoc-L-Nva-L-Ala-D/L-Fos)

El éster dietílico de tBoc-L-Nva-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:

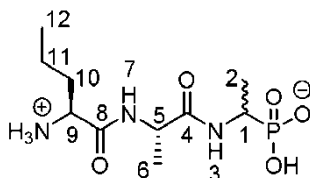


A una solución de tBoc-L-Nva-L-Ala-OH (5,0 mmol, 1,45 g; obtenido a partir de la etapa 7.2.) en THF seco (50 ml), se le añadió a N-metilmorfolina (5,3 mmol, 0,58 ml) a -5 °C. Se le añadió lentamente cloroformiato de isobutilo (5,3 mmol, 0,70 ml) y la mezcla resultante se agitó a -5 °C durante 1 hora. A la mezcla agitada, se le añadió 1-aminoetilfosfonato de dietilo (4,8 mmol, 0,87 g; cuya síntesis se describe en el ejemplo 4.4 y se representa en la figura 6) en THF seco (15 ml) a -5 °C. La mezcla resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30 minutos, y a continuación a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y el disolvente se eliminó al vacío para dar un sólido blanco, que se redisolvió en DCM (50 ml) y se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml) y agua (25 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido blanco, que se purificó por cromatografía en columna con ayuda de un 100 % de DCM, aumentando a 90:10 DCM/metanol, para dar un sólido blanco compuesto

por 2 diastereoisómeros, el éster dietílico de tBoc-L-Nva-L-Ala-L-Fos y el éster dietílico de tBoc-L-Nva-L-Ala-D-Fos (1,70 g, 3,8 mmol, 78 %); p.f. 165 - 168 °C; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3267 (NH), 1708 (C=O), 1638 (C=O), 1537 (flexión NH), 1227 (P=O), 1019 (P-O), 966 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δH 0,85 (3H, t, J=9,0 Hz, CH₃-12), 1,18-1,34 (14H, [m, 2 x CH₂CH₃], [CH₃-2], [m, CH₃-6], [m, CH₂-11]), 1,37 (s, C(CH₃)₃), 1,47-1,54 (1H, m, CHa/b-10), 1,65-1,73 (1H, m, CHa/b-10), 3,98-4,12 (5H, [m, 2 x OCH₂CH₃], [m, CH₃-5 o CH₃-9]), 4,33-4,44 (1H, m, CH-1), 4,48-4,54 (1H, m, CH-5 o CH-9), 5,18-5,23 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7 o NH-13), 5,18-5,23 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7 o NH-13), 6,77-6,88 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7 o NH-13), 6,77-6,88 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7 o NH-13), 7,13-7,24 (1H, d, J=9,0 Hz, 9,0 Hz, NH-3), 7,13-7,24 (1H, d, J=9,0 Hz, 9,0 Hz, NH-3); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δC 12,7 (CH₃-12), 14,5 (CH₃-2, d, JP-C =6,0 Hz), 15,3 (OCH₂CH₃-A), 15,4 (OCH₂CH₃-A), 15,5 (OCH₂CH₃-B), 15,6 (OCH₂CH₃-B), 17,6 (CH₃-6-A), 17,7 (CH₃-6-B), 17,8 (CH₂-11-A), 17,9 (CH₂-11-B), 27,3 (C(CH₃)₃), 33,8 (CH₂-10-A), 33,9 (CH₂-10-B), 39,9 (CH-1-A, d, JP-C=157,5 Hz), 40,0 (CH-1-B, d, JP-C=156,8 Hz), 47,7 (CH-5 o CH-9-A), 47,9 (CH-5 o CH-9-B), 53,5 (CH-5 o CH-9-A), 53,5 (CH-5 o CH-9-B), 61,4-62,0 (2 x OCH₂CH₃-A y B, 4 x d, J=7,5 Hz, 6,8 Hz, 7,5 Hz, 7,5 Hz), 78,9 (C(CH₃)₃), 154,7 (C=O-14), 170,6 (C=O-4 o C=O-8-A), 170,7 (C=O-4 o C=O-8-B), 171,0 (C=O-4 o C=O-8-A), 171,1 (C=O-4 o C=O-8-B); $^{31}\text{P-1H}$ desacop RMN (121 MHz, CDCl_3) δP 24,8; CHN [Descubierto: C, 50,74; H, 8,55; N, 9,51. C₁₉H₃₈N₃O₇P requiere C, 50,54; H, 8,48; N, 9,31 %]; HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₉H₃₉N₃O₇P)+452,2520, descubierto 452,2518.

7.4. Síntesis del compuesto I, a saber del compuesto (1-((S)-2-((S)-2-amoniopentanamido)propanamido)etil)fosfonato de hidrógeno (L-Nva-L-Ala-D/L-Fos)

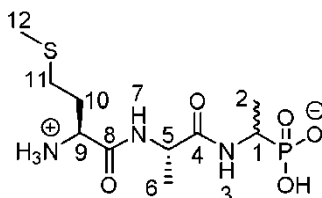
Tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto L-Nva-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



El éster dietílico de tBoc-L-Nva-L-Ala-D/L-Fos obtenido en la etapa 7.3. (1,6 mmol, 0,72 g) se disolvió en ácido acético glacial (30 ml) y se añadió bromuro de hidrógeno/ácido acético (33 %) (25 ml). La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió éter dietílico seco (150 ml) y la mezcla se colocó en un congelador durante una noche. El disolvente se decantó y el producto en bruto se trituró con éter dietílico seco (5 x 100 ml). El producto en bruto amarillento-naranja se disolvió en metanol (5 ml) y se añadió óxido de propileno en exceso. La solución se filtró y se lavó con éter dietílico para dar un sólido verde pálido, que se recrystalizó a partir de agua caliente/acetona para dar el producto en forma de sólido verde pálido compuesto por 2 diastereoisómeros, L-Nva-L-Ala-L-Fos y L-Nva-L-Ala-D-Fos (0,22 g, 0,75 mmol, 47 %); p.f. 200 - 210 °C (descomp.); $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3280 (NH+), 1643 (C=O), 1552 (flexión NH), 1149 (P-O), 1037 (P-O), 922 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, D_2O) δH 0,96 (3H, t, CH₃-12), 1,29 (3H, m, CH₃-6) 1,42-1,40 (5H, [m, CH₃-2], [m, CH₂-11]), 1,88-1,86 (2H, m, CH₂-10), 4,02-4,00 (2H, [m, CH-5], [m, CH-9]), 4,34-4,39 (1H, m, CH-1); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, D_2O) δC 13,4 (CH₃-12), 16,0 (CH₃-2), 17,1 (CH₃-6), 17,2 (CH₃-6), 18,1 (CH₂-11), 33,5 (CH₂-10), 50,7 (d, JP-C=22,5 Hz, CH-1), 53,5 (CH-5 o CH-9), 170,4 (C=O-8), 174,7 (C=O-4); HRMS (ionización por nanopulverización) calculado para (C₁₀H₂₃N₃O₅P)+ 296,1370, descubierto 296,1373; $^{31}\text{P-1H}$ desacop RMN (121 MHz, CDCl_3) δP 18,5; CHN [Descubierto: C, 37,61; H, 7,51; N, 12,91. C₁₀H₂₂N₃O₅P·1,4H₂O requiere C, 37,48; H, 7,80; N, 13,11 %].

Ejemplo 8: Procedimiento de síntesis del compuesto antimicrobiano J (figura 2): L-metionil-L-analil-D/L fosfalina

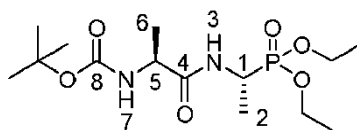
El compuesto L-metionil-L-analil-D/L fosfalina está representado por la fórmula siguiente:



La síntesis de este compuesto antimicrobiano se detalla a continuación.

8.1. Síntesis del intermedio de reacción ((S)-1-(((R)-1-(dietoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butilo (éster dietílico de tBoc-L-Ala-D/L-Fos)

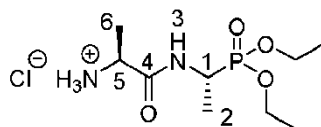
El éster dietílico de tBoc-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



5 A una solución de tBoc-L-Ala-OH (10,0 mmol, 1,90 g) en THF seco (60 ml), se le añadió N-metilmorfolina (15,0 mmol, 1,65 ml) a -5 °C. Cloroformiato de isobutilo (15,0 mmol, 1,95 ml) y la mezcla resultante se agitaron a -5 °C durante 1 hora. A la mezcla agitada, se le añadió 1-aminoetilfosfonato de dietilo (10,0 mmol, 1,84 g) en THF seco (20 ml) a -5 °C. La mezcla resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30 minutos, y a continuación a temperatura ambiente durante una noche. La solución se filtró y se concentró al vacío para dar un jarabe amarillo pálido, que se redisolvió en DCM (60 ml) y se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml) y agua (25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron al vacío para dar un jarabe amarillo pálido, que se purificó por cromatografía en columna, utilizando inicialmente un 100 % de DCM y aumentando a 95:5 DCM/metanol, para dar el producto en forma de sólido blanco roto compuesto por 2 diastereoisómeros, el éster dietílico de tBoc-L-Ala-L-Fos y el éster dietílico de tBoc-L-Ala-D-Fos (2,49 g, 7,1 mmol, 71 %); p.f. 102 - 105 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3280 (NH), 1710 (C=O), 1652 (C=O), 1556 (flexión NH), 1229 (P=O), 1173 (P-O), 1013 (P-O), 973 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ H 1,23-1,44 (21H, [s, C(CH₃)₃], [m, CH₃-2], [m, CH₃-6], [m, 2 x OCH₂CH₃]), 4,06-4,23 (5H, [m, 2 x OCH₂CH₃], [m, CH-5]), 4,40-4,52 (1H, m, CH-1), 5,11-5,15 (1H, 2 x d, J=1,5 Hz, 1,5 Hz, NH-7), 6,70-6,78 (1H, 2 x d, J=2,3 Hz, 2,3 Hz, NH-3); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ C 15,6 (CH₃-2), 16,3 (d, J=3,0 Hz, OCH₂CH₃), 16,4 (d, J=2,3 Hz, OCH₂CH₃), 16,4 (d, J=3,8 Hz, OCH₂CH₃), 16,5 (d, J=1,5 Hz, OCH₂CH₃), 18,4 (CH₃-6), 28,3 (C(CH₃)₃) 40,8 (d, JP-C=156,8 Hz, CH-1), 41,0 (d, JP-C=156,8 Hz, CH-1), 50,0 (CH-5), 62,4-62,8 (4 x d, JP-C=6,8 Hz, 6,8 Hz, 6,8 Hz, 6,8 Hz, 2 x OCH₂CH₃), 80,0 (C(CH₃)₃), 155,2 (C=O-8), 172,1 (C=O-4); CHN [Descubierto: C, 48,22; H, 8,58; N, 7,87. C₁₄H₂₉N₂O₆P requiere C, 47,72; H, 8,30; N, 7,95 %].

8.2. Síntesis del intermedio de reacción cloruro de (S)-1-(((R)-1-(dietoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-amino (hidrocloruro de éster dietílico de L-Ala-D/L-Fos)

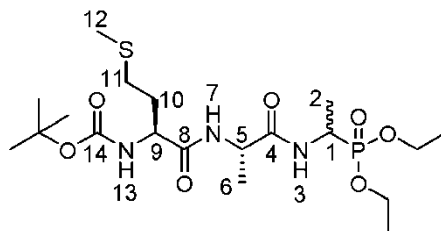
El hidrocloruro de éster dietílico de L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:



25 Una solución de éster dietílico de tBoc-L-Ala-D/L-Fos (obtenido en la etapa 8.1. ; 6,0 mmol, 2,13 g) en HCl 2 M en éter dietílico (100 ml) se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. El sólido resultante se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico seco. El sólido higroscópico blanco roto se secó durante una noche en un desecador que contenía óxido de fósforo (V) y se lavó con nafta para dar el producto en forma de sólido verde pálido compuesto por 2 diastereoisómeros, hidrocloruro de éster dietílico de L-Ala-L-Fos y hidrocloruro de éster dietílico de L-Ala-D-Fos (1,46 g, 5,1 mmol, 84 %); p.f. 102 - 105 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2986 (NH⁺), 1673 (C=O), 1555 (flexión NH), 1017 (P-O), 950 (P-O); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, d_4 -CH₃OH) δ H 1,29-1,44 (9H, [m, 2 x OCH₂CH₃], [m, CH₃-2]), 1,51 (3H, d, J=6,0 Hz, CH₃-6), 3,90-3,98 (1H, m, CH-5), 4,08-4,22 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃), 4,28-4,47 (1H, m, CH-1); ; $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, d_4 -CH₃OH) δ C 13,7 (CH₃-2-B), 14,0 (CH₃-2-B), 15,4 (2 x OCH₂CH₃), 16,3 (CH₃-6), 41,1 (d, JP-C=158,3 Hz, CH-1), 41,4 (d, JP-C=158,3 Hz, CH-1), 48,8 (CH-5), 48,9 (CH-5), 62,7-63,0 (2 x OCH₂CH₃), 169,0 (C=O-4).

8.3. Síntesis del intermedio de reacción ((2S)-1-(((2S)-1-((1-(dietoxifosforil)etil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino-4-(metilitio)-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (éster dietílico de tBoc-L-Met-L-Ala-D/L-Fos)

El compuesto éster dietílico de tBoc-L-Met-L-Ala-D/L-Fos está representado por la fórmula siguiente:

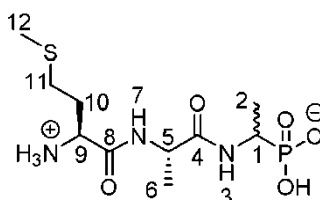


40 A una solución de tBoc-L-Met-OH (3,4 mmol, 0,88 g) en THF seco (50 ml), se le añadió N-metilmorfolina (5,1 mmol, 0,60 ml). La solución se enfrió a -5 °C y se le añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (5,1 mmol, 0,70 ml). La mezcla se agitó a -5 °C durante 1 hora. A la solución agitada, se le añadió gota a gota hidrocloruro de éster dietílico de L-Ala-D/L-Fos obtenido en la etapa 8.2. (3,4 mmol, 0,97 g) en THF seco (15 ml), que se había neutralizado con diisopropiletamina (5,1 mmol, 1,00 ml) a -5 °C. La solución resultante se agitó bajo nitrógeno a -5 °C durante 30

minutos, y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La solución se filtró y se concentró al vacío, a continuación se lavó con un 10 % peso/volumen de ácido cítrico (2 x 25 ml), un 10 % peso/volumen de carbonato de potasio (25 ml) y agua (25 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido amarillo, que se purificó por cromatografía en columna [DCM/MeOH (95:5)] para dar el producto en forma de sólido blanco roto compuesto por 2 diastereoisómeros, éster dietílico de tBoc-L-Met-L-Ala-L-Fos y éster dietílico de tBoc-L-Met-L-Ala-D-Fos (0,53 g, 1,1 mmol, 32 %); p.f. 172 - 176 °C; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3272 (NH), 1708 (C=O), 1637 (C=O), 1530 (flexión NH), 1226 (P=O), 1165 (P-O), 1020 (P-O), 966 (P-O); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} 1,16-1,36 (12H, [m, CH₃-2], [m, CH₃-6], [m, 2 x OCH₂CH₃]), 1,36 (9H, s, C(CH₃)₃), 1,82-2,01 (2H, m, CH₂-10), 2,04 (3H, s, CH₃-12), 2,49 (2H, t, J=9,0 Hz, CH₂-11), 4,00-4,12 (4H, m, 2 x OCH₂CH₃), 4,21 (1H, m, CH-9), 4,33-4,43 (1H, m, CH-1), 4,45-4,53 (1H, m, CH-5), 5,40 (1H, d, J=9,0 Hz, NH-13-A), 5,44 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-13-B), 6,85 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7-A), 6,92 (1H, d, J=6,0 Hz, NH-7-B), 7,07 (1H, d, J=9,0 Hz, NH-3-A), 7,16 (1H, d, J=9,0 Hz, NH-3-B); ; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} 14,3 (CH₃-2-A), 14,3 (CH₃-2-B), 15,4-15,5 (2 x OCH₂CH₃), 17,7 (CH₃-6), 27,3 (C(CH₃)₃), 29,2 (CH₂-11-A), 29,3 (CH₂-11-B), 30,8 (CH₂-10-A), 30,8 (CH₂-10-B), 39,9 (d, JP-C=156,8 Hz, CH-1-A), 40,0 (d, JP-C=156,8 Hz, CH-1-B), 47,9 (CH-5-A), 48,0 (CH-5-B), 52,6 (CH-9), 61,5 (d, JP-C=4,5 Hz, OCH₂CH₃-A), 61,6 (d, JP-C=4,5 Hz, OCH₂CH₃-B), 61,7 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃-A), 61,9 (d, JP-C=6,8 Hz, OCH₂CH₃-B), 79,1 (C(CH₃)₃), 154,6 (C=O-14), 170,3 (C=O-4 o C=O-8-A), 170,4 (C=O-4 o C=O-8-B), 170,5 (C=O-4 o C=O-8-A), 170,6 (C=O-4 o C=O-8-B).

8.4. Síntesis del compuesto J según la invención, a saber el compuesto (1-((S)-2-((S)-2-amonio-4-(metilitio)butanamido)propanamido)etil)fosfonato de hidrógeno (L-metionil-L-analil-D/L fosfalina)

Tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto L-metionil-L-analil-D/L-fosfalina está representado por la fórmula siguiente:



Una solución de éster dietílico de tBoc-L-Met-L-Ala-D/L-Fos (obtenido en la etapa 8.3; 0,9 mmol, 0,43 g) en bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial (33 %) (10 ml) se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió éter dietílico seco (150 ml) y la mezcla se colocó en un congelador durante una noche. El disolvente se decantó y el producto en bruto se trituró con éter dietílico seco (5 x 100 ml). El sólido en bruto naranja parduzco se disolvió en metanol (5 ml), seguido por la adición de óxido de propileno en exceso. La solución se filtró y se lavó con éter dietílico para dar un sólido verde, que se recristalizó a partir de etanol caliente y se secó adicionalmente en un desecador que contenía óxido de fósforo (V) para dar el producto en forma de sólido verde pálido compuesto por 2 diastereoisómeros, L-Met-L-Ala-L-Fos y L-Met-L-Ala-D-Fos (0,13 g, 0,41 mmol, 46 %); p.f. 213 - 217 °C (descomp; $\nu_{\text{max/cm-1}}$ 3263 (NH+), 2834 (OH ancho), 1641 (C=O), 1552 (flexión NH), 1150 (P-O), 1041 (P-O), 919 (P-O) ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ_{H} 1,12-1,29 (3H, m, CH₃-2), 1,38 (3H, d, J=6,0 Hz, CH₃-6), 2,11-2,34 (5H, [s, CH₃-12], [m, CH₂-10]), 2,62 (2H, m, CH₂-11), 3,95-4,11 (2H, [m, CH-1], [m, CH-9]), 4,32-4,46 (1H, m, CH-5); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O) δ_{C} 14,2 (CH₃-12), 15,5 (CH₃-2), 16,6 (CH₃-6), 28,5 (CH₂-11), 29,5 (CH₂-10), 49,9 (CH-1, CH-5 y CH-9), 169,4 (C=O-4 y C=O-8); ³¹P-1Hdesacop RMN (121 MHz, CDCl₃) δ_{P} 20,7.

Ejemplo 9: Evaluación de la actividad antibacteriana de la L-Norvalinil-L-analil-D/L-fosfalina (compuesto I en la figura 2) y de la L-Metionil-L-analil-D/L-fosfalina (compuesto J en la figura 2) sintetizadas respectivamente según los ejemplos 7 y 8.

9.1. Introducción

Como para el ejemplo 6, Las concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) de los compuestos I y J frente a 12 cepas de bacterias Gram negativas y 6 cepas de bacterias Gram positivas se determinaron después de 22 horas de incubación utilizando un procedimiento de dilución en gelosa como se describe en el ejemplo 2 (véase concretamente la sección «2.2 Materiales y métodos).

Las 18 cepas de bacterias ensayadas con los fines del presente ejemplo son idénticas a las ensayadas en el ejemplo 6.

9.2. Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5 más adelante

Especie	Referencia de la cepa	Concentración mínima inhibidora (CMI) del compuesto I (µg/ml)	Concentración mínima inhibidora (CMI) del compuesto J (µg/ml)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	>8	>8
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416	>8	>8
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 11936	>8	>8
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 10418	1	2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12241	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 9528	0,25	0,5
<i>Providencia rettgeri</i>	NCTC 7475	>8	>8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 10662	>8	>8
<i>Salmonella Typhimurium</i>	NCTC 74	>8	>8
<i>Salmonella Enteritidis</i>	NCTC 6676	>8	>8
<i>Serratia marcescens</i>	NCTC 10211	0,25	0,5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCTC 11176	0,125	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 775	0,063	0,125
<i>Enterococcus faecium</i>	NCTC 7171	1	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994	>8	>8
<i>Staphylococci epidermidis</i>	NCTC 11047	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 6571	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	NCTC 11939	>8	>8

Tabla 5: Concentraciones mínimas inhibidoras de los compuestos antimicrobianos I y J frente a diferentes especies de bacterias

- 5 Según los datos presentados en la tabla 5 más arriba, parece claramente que los compuestos I y J son fuertemente inhibidores frente a las cepas ensayadas de ciertas especies de bacterias Gram negativas y de ciertas especies de bacterias Gram positivas, concretamente en relación con *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, y menos inhibidores con respecto a otras especies de bacterias Gram negativas y Gram negativas, concretamente en lo que respecta a *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*.

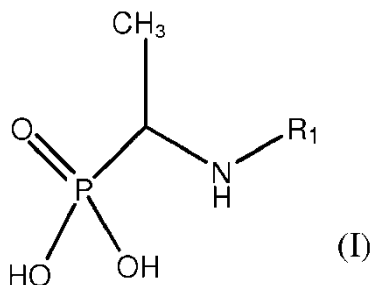
Referencias bibliográficas

- [1] Rao J, Lahiri J, Weis RM, Whitesides GM. 2000. Design, synthesis, and characterization of a high-affinity trivalent system derived from vancomycin and L-Lys-D-Ala-D-Ala. *J. Am. Chem. Soc.* 122:2698-2710.
- 15 [2] Kametani T, Suzuki Y, Kigasawa K, Hiiragi M, Wakisaka K, Sugi H, Tanigawa K, Fukawa K, Irino O, Saita O,

- Yamabe S. 1982. Studies on the synthesis of chemotherapeutics. Parte XIII. Synthesis and biological studies on phosphonopeptides having alkyl-, phenyl-, and heterocyclic substituents. *Heterocycles* 18:295-319.
- [3]** J. Bacteriol. 1984, 160(1), 122-130 Gibson y col
- 5 **[4]** Cheung y col, Chloroalanyl and Propargylglycyl Dipeptides. Suicide Substrate Containing Antibacterials. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 1733-1741
- [5]** Cheung KS, Boisvert W, Lerner SA, Johnston M. 1986. Chloroalanyl antibiotic peptides: antagonism of their antimicrobial effects by L-alanina and L-alanyl peptides in gram-negative bacteria. *J. Med. Chem.* 29:2060-2068.
- 10 **[6]** Atherton y col., Synthesis and Structure-Activity Relationships of Antibacterial Phosphonopeptides Incorporating (1-Aminoethyl)phosphonic Acid and (Aminomethyl)phosphonic Acid, Chemistry Department, Roche Products Limited, 1984
- [7]** Arfin y col., Inhibition of Growth of *Salmonella typhimurium* and of Threonine Deaminase and Transamine B by β -Chloroalanine
- [8]** Orenga y col., 2009; *J. Microbiol. Methods*; 79(2:139-55)
- [9]** Lavielle, S. ; Ling, N. C. ; Saltman, R. ; Guillemn, R. C. *Carbohydrate Research*, 1981, 89(2), 229
- 15 **[10]** Nakata, T. ; Nakatani, M.; Takahashi, M.; Okai, J.; Kawaoka, Y. ; Kouge, K. ; Okai, H. *Bulletin of Chemical Society of Japan*, 1996, 69(4), 1099
- [11]** Tesis doctoral de Varadi, L., Universidad de Sunderland, 2012
- [12]** Kudzin, Z. H. ; Stec, W. J. *Synthesis*, 1978, 469.
- [13]** Boduszek, B.; Soroka, M. *Polish Journal of Chemistry*, 2002, 76(8), 1105
- 20 **[14]** Kudzin, Z. H. ; Luczak, J. *Synthesis*, 1995, 1995(5), 509.
- [15]** Yuan, C. ; Xu, C. ; Zhang, Y. *Tetrahedron*, 2003, 59(32), 6095
- [16]** Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1:5-16.
- 25 **[17]** Atherton FR, Hall MJ, Hassall CH, Lambert RW, Ringrose PS. 1979. Phosphonopeptides as antibacterial agents: rationale, chemistry, and structure-activity relationships. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:677-683.

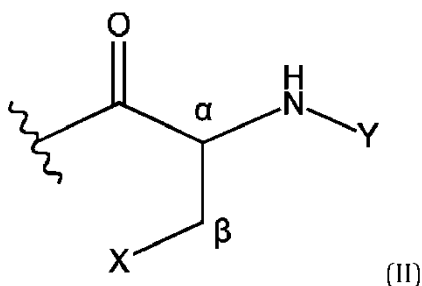
REIVINDICACIONES

1. Compuesto antimicrobiano, así como sus sales, estando dicho compuesto antimicrobiano representado por la fórmula general (I):



5 en la que R1 representa:

- una parte peptídica P1 que consiste en una secuencia lineal de uno a cinco residuos de aminoácido; comprendiendo dicha parte peptídica P1 al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, o
- una parte peptídica P2, estando dicha parte peptídica P2 representada por la fórmula general (II) siguiente:



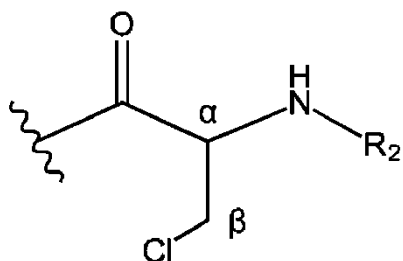
10

en la que X representa un átomo de hidrógeno o de cloro, y

Y representa un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a cuatro residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, y/o al menos un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, y/o al menos un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina, y en la que cuando X representa un átomo de hidrógeno, Y es tal como se ha definido anteriormente con la excepción de un átomo de hidrógeno o de un residuo de alanina en posición N-terminal o unido a otro residuo de aminoácido por un enlace peptídico entre la función amina en α de dicho residuo de alanina y la función ácido carboxílico en α del otro residuo de aminoácido.

15

2. Compuesto antimicrobiano según la reivindicación 1, en el que R1 está representado por la fórmula general (III):



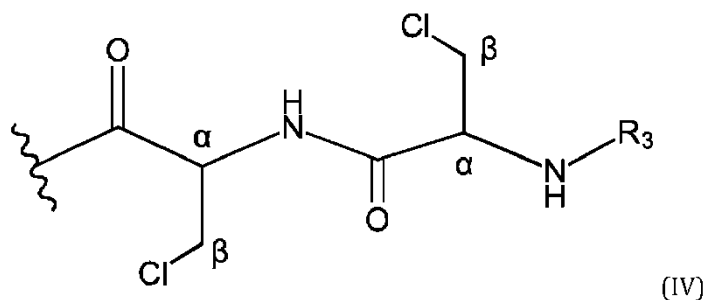
(III)

20

en la que R2 es un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a cuatro residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina, y/o al menos un residuo de norvalina, preferiblemente de L-norvalina, y/o al menos un residuo de metionina, preferiblemente de L-metionina.

25

3. Compuesto antimicrobiano según la reivindicación 1 o 2, en el que R1 está representado por la fórmula general (IV):



en la que R3 es un átomo de hidrógeno o una secuencia lineal de uno a tres residuos de aminoácido, que comprende ventajosamente al menos un residuo de β -cloroalanina, preferiblemente de β -cloro-L-alanina.

5 4. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R1 consiste en una sucesión lineal de dos o tres, preferiblemente de dos, residuos de aminoácido.

10 5. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho o dichos residuos de aminoácido se seleccionan entre glicina, sarcosina y las formas L y D, preferiblemente L, de los residuos de β -cloroalanina, de alanina, de arginina, de asparagina, de ácido aspártico, de cisteína, de ácido glutámico, de ácido gamma-glutámico, de glutamina, de histidina, de isoleucina, de leucina, de lisina, de metionina, de norvalina, de fenilalanina, de prolina, de ácido piroglutámico, de serina, de treonina, de triptófano, de tirosina y de valina.

6. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho o dichos residuos de aminoácido se seleccionan entre las formas L y D, preferiblemente L, de residuos de β -cloroalanina, de alanina, de metionina, de norvalina y de valina.

15 7. Compuesto antimicrobiano según la reivindicación 1, en el que R1 representa dicha parte peptídica P2 en la que X representa un átomo de hidrógeno.

20 8. Compuesto antimicrobiano según la reivindicación 7, en el que Y es un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, sarcosina, las formas L y D, preferiblemente L, de residuos de β -cloroalanina, de arginina, de asparagina, de ácido aspártico, de cisteína, de ácido glutámico, de ácido gamma-glutámico, de glutamina, de histidina, de isoleucina, de leucina, de lisina, de metionina, de norvalina, de fenilalanina, de prolina, de ácido piroglutámico, de serina, de treonina, de triptófano, de tirosina y de valina; ventajosamente Y es un residuo de aminoácido seleccionado entre las formas L y D, preferiblemente L, de residuos de metionina y de norvalina.

9. Compuesto antimicrobiano según la reivindicación 1, consistiendo dicho compuesto antimicrobiano en:

25 - ácido β -cloro-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o

- ácido β -cloro-L-analil- β -cloro-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-analil- β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico y/o

- ácido L-norvalinil- β -cloro-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-norvalinil- β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o

30 - ácido L-metionil- β -cloro-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-metionil- β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o

- ácido L-norvalinil-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-norvalinil-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico, y/o

- ácido L-metionil-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido L-metionil-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico;

35 consiendiendo ventajosamente dicho compuesto antimicrobiano en ácido β -cloro-L-alanil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-analil-L-1 aminoetilfosfónico, y/o ácido, β -cloro-L-analil- β -cloro-L-analil-D/L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente ácido β -cloro-L-analil- β -cloro-L-analil-L-1-aminoetilfosfónico.

40 10. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la función amina N-terminal de dicho compuesto antimicrobiano está protegida por un grupo protector tal como un grupo terciobutilcarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo o benciloxicarbonilo.

11. Medio de reacción que comprende al menos un compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 10, estando preferiblemente dicho al menos un compuesto antimicrobiano presente en una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0

mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l.

5 12. Medio de reacción según la reivindicación 11, siendo dicho medio de reacción un medio que permite la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana, preferiblemente de al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico, en el que dicho al menos un compuesto antimicrobiano es al menos un agente selectivo que permite inhibir la supervivencia y/o el crecimiento del o de los microorganismos no diana para favorecer la supervivencia y/o el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana.

10 13. Medio de reacción según la reivindicación 12, siendo dicho medio de reacción un medio de cultivo que comprende al menos un nutriente que permite el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana, en el que dicho al menos un agente selectivo permite inhibir el crecimiento del o de los microorganismos no diana para favorecer el crecimiento de dicho al menos un microorganismo diana.

14. Medio de reacción según la reivindicación 12 o 13, comprendiendo dicho medio de reacción además un sustrato enzimático específico de una actividad enzimática de dicho al menos un microorganismo diana.

15 15. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que dicho al menos un agente selectivo consiste en:

- ácido β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente a una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l, o

20 - ácido β -cloro-L-anilil- β -cloro-L-anilil-L-1-aminoetilfosfónico, preferiblemente a una concentración final comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l, o

- una mezcla de los dos.

16. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 12 a 15, siendo dicho al menos un microorganismo diana:

25 - al menos un microorganismo diana Gram negativo que pertenece al género *Salmonella*, por ejemplo que pertenece a la especie *Salmonella enterica*, al serotipo *Salmonella typhimurium* o al serotipo *Salmonella enteridis*, al género *Acinetobacter*, por ejemplo a la especie *Acinetobacter baumannii*, al género *Burkholderia*, por ejemplo a la especie *Burkholderia cepacia*, al género *Pseudomonas*, por ejemplo a la especie *Pseudomonas aeruginosa*; perteneciendo ventajosamente dicho al menos un microorganismo diana Gram negativo al género *Salmonella*; o

30 - al menos un microorganismo diana Gram positivo, que pertenece al género *Listeria*, por ejemplo que pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*, o al género *Streptococcus*, por ejemplo *Streptococcus agalactiae* y/o *Streptococcus pneumoniae* y/o *Streptococcus pyogenes*; perteneciendo ventajosamente dicho al menos un microorganismo diana Gram positivo al género *Listeria*.

35 17. Medio de reacción según la reivindicación 16, perteneciendo dicho al menos un microorganismo diana al género *Salmonella* y comprendiendo dicho medio:

- al menos un agente nutritivo, tal como peptonas, por ejemplo de origen porcino o bovino, a una concentración comprendida entre 0,2 y 30,0 g/l,

- opcionalmente un tampón,

40 - al menos un marcador cromógeno, tal como un sustrato enzimático de esterasa y/o un sustrato enzimático de alfa-galactosidasa, a una concentración comprendida entre 0,05 y 15,0 g/l,

- agar a una concentración comprendida entre 9,0 y 28,0 g/l, y

- al menos un agente selectivo tal como se define en una de las reivindicaciones 12 a 16, preferiblemente a una concentración comprendida entre 0,002 y 1024,0 mg/l, preferiblemente entre 0,003 y 32,0 mg/l, ventajosamente entre 0,2 y 8,0 mg/l, de forma preferida entre 0,2 y 2,0 mg/l.

45 18. Medio de reacción según una de las reivindicaciones 12 a 17, en el que el o los microorganismos no diana están comprendidos en el grupo constituido por:

- géneros de la familia de las Enterobacteriaceae, tales como el género *Enterobacter* y/o el género *Escherichia* y/o el género *Klebsiella* y/o el género *Serratia* y/o el género *Yersinia*, y/o

- el género *Enterococcus*, y/o

50 - el género *Staphylococcus*;

preferiblemente el o los microorganismos no diana son resistentes a al menos un antibacteriano convencional.

5 19. Utilización in vitro de un medio de reacción según una de las reivindicaciones 11 a 18, para detectar y/o identificar y/o contar al menos un microorganismo diana, preferiblemente al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico.

20. Procedimiento de detección y/o de identificación y/o de recuento de al menos un microorganismo diana, preferiblemente de al menos una bacteria diana, en una muestra susceptible de contenerlo, tal como una muestra de origen industrial o de origen clínico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

a) sembrar el medio de reacción según una de las reivindicaciones 11 a 18 con dicha muestra,

10 b) si fuera necesario, incubar el conjunto durante un lapso de tiempo suficiente para permitir la detección y/o la identificación y/o el recuento de al menos un microorganismo diana,

c) identificar las colonias formadas por dicho al menos un microorganismo diana.

21. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización como medicamento de uso humano o veterinario.

15 22. Compuesto antimicrobiano según una de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización como medicamento en el tratamiento de infecciones microbianas, preferiblemente de infecciones bacterianas, humanas o veterinarias.

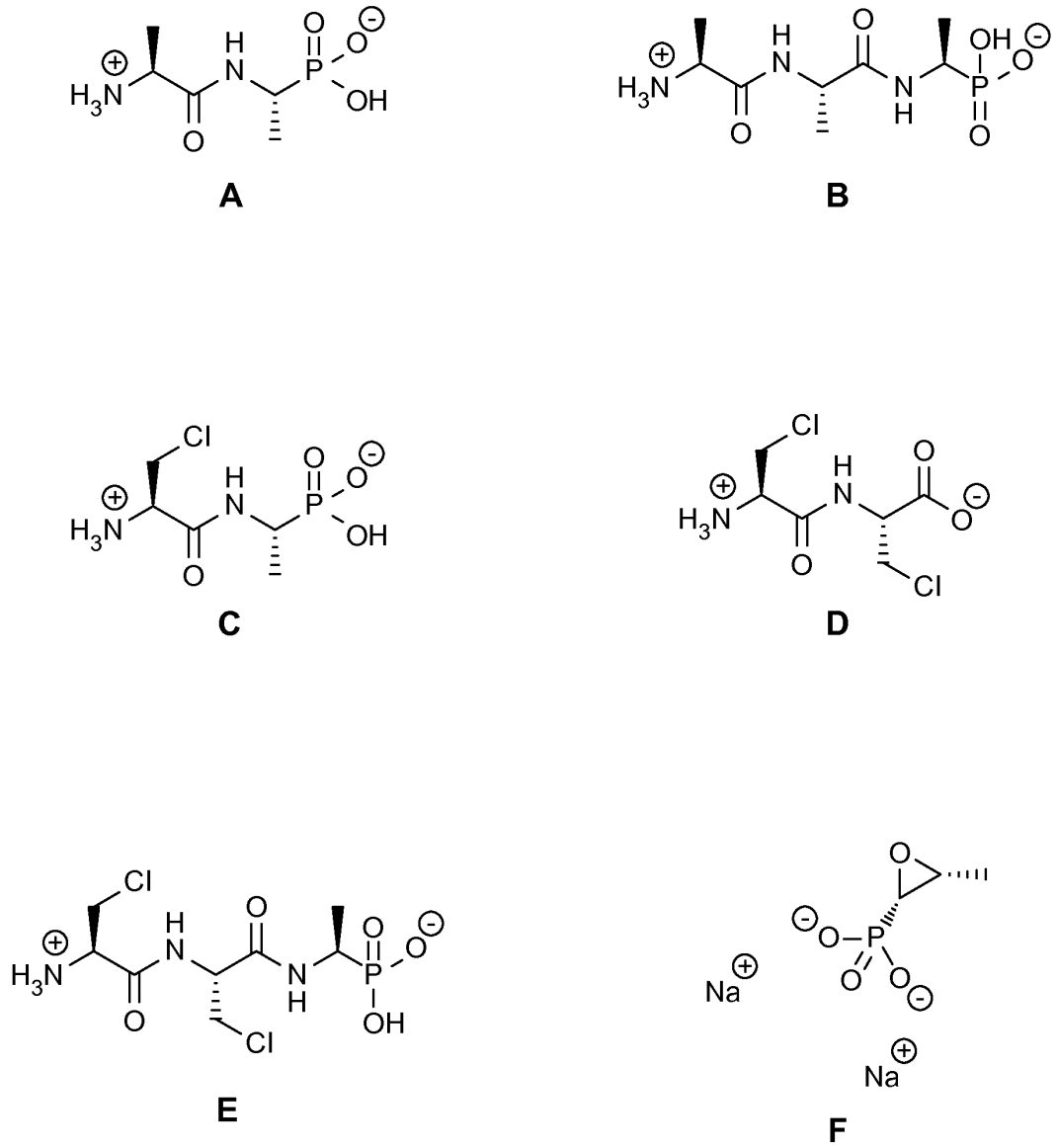
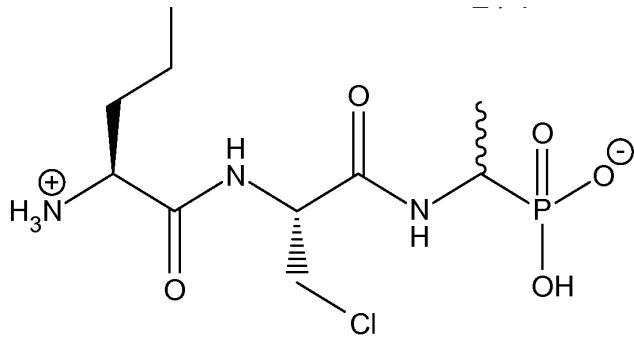
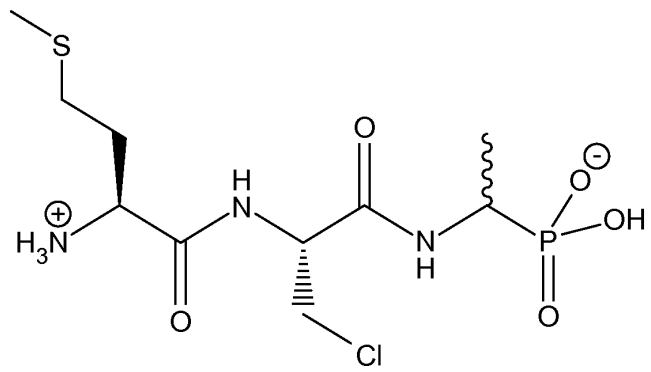


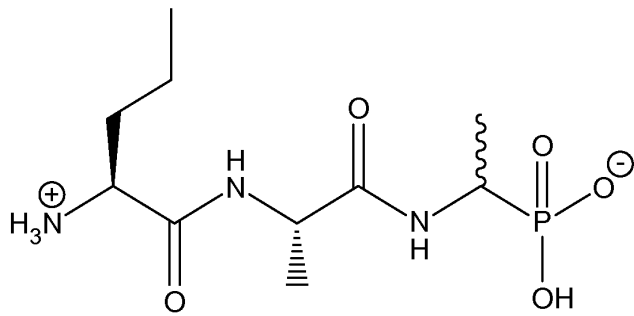
FIG. 1



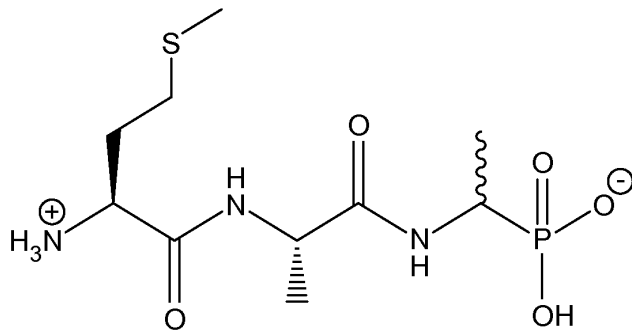
G



H



I



J

FIG. 2

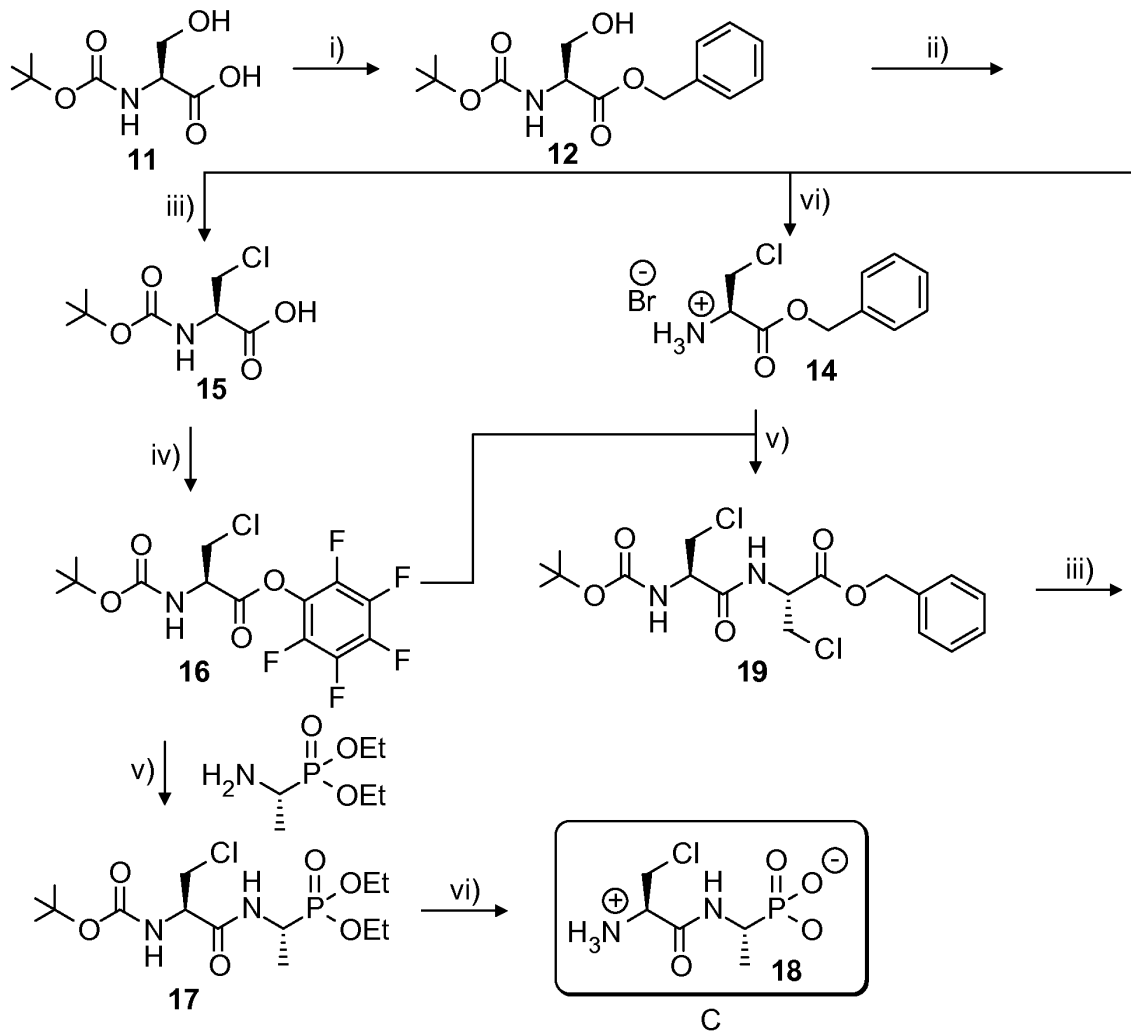


FIG. 3

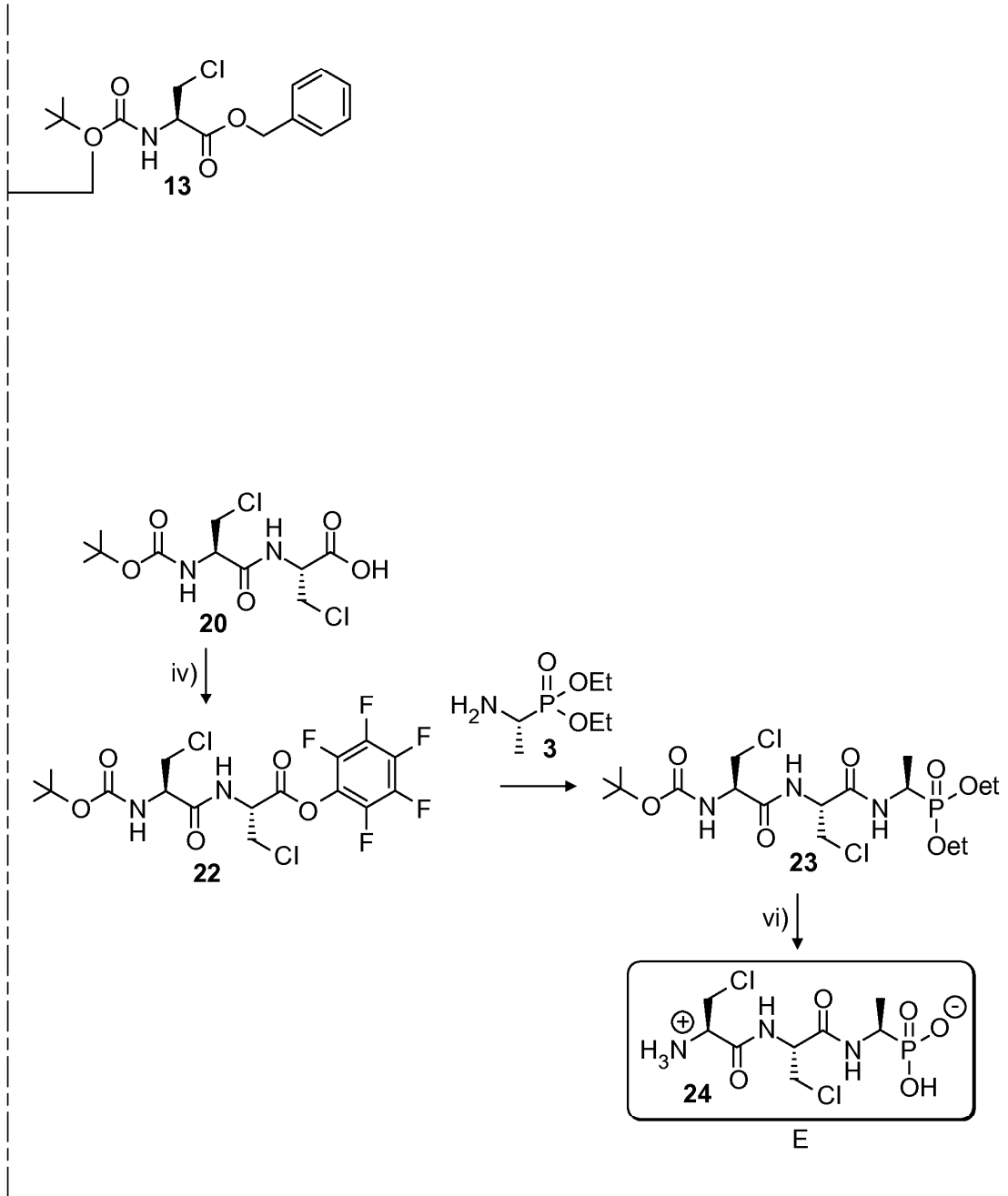


FIG. 3 Continación

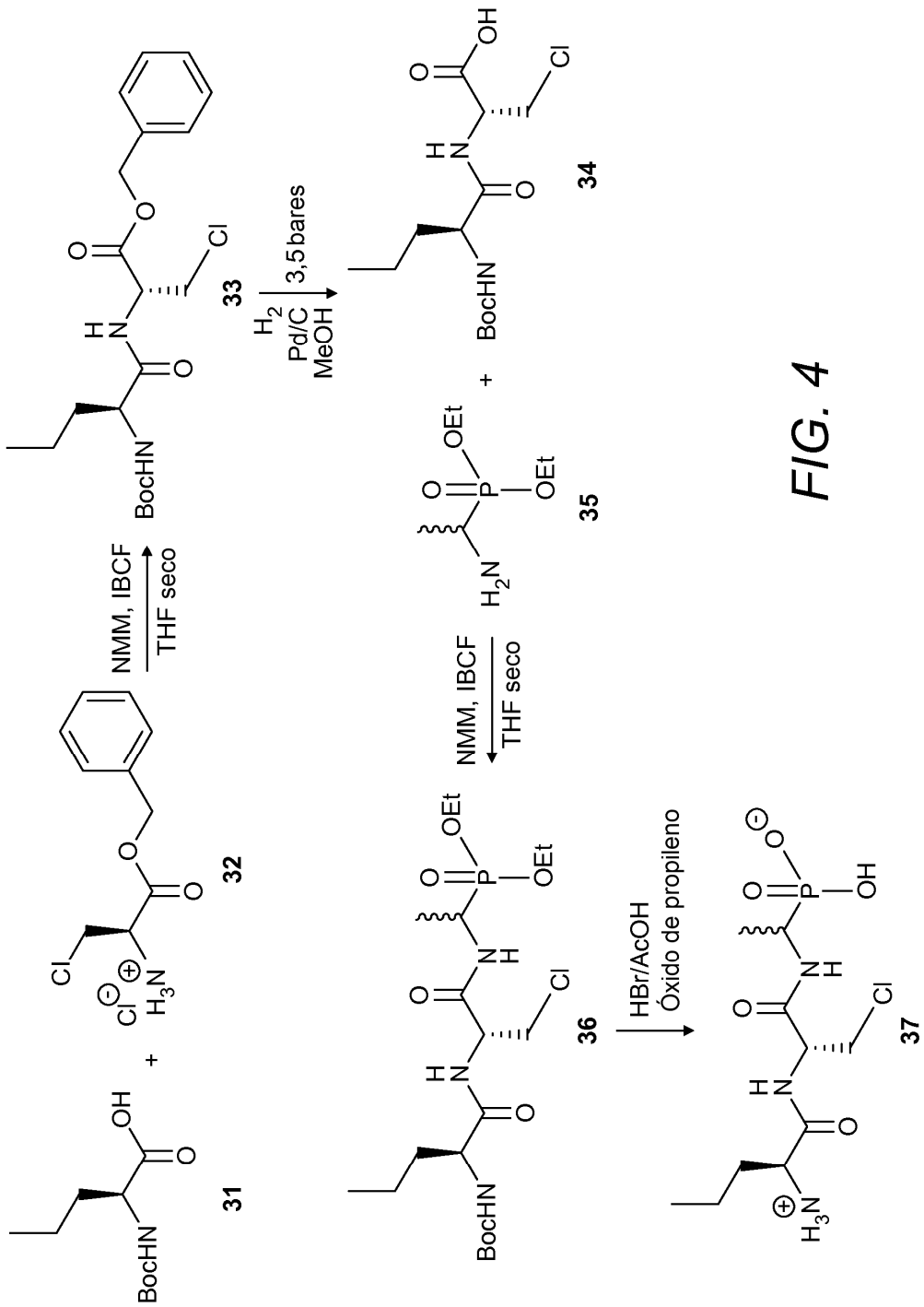


FIG. 4

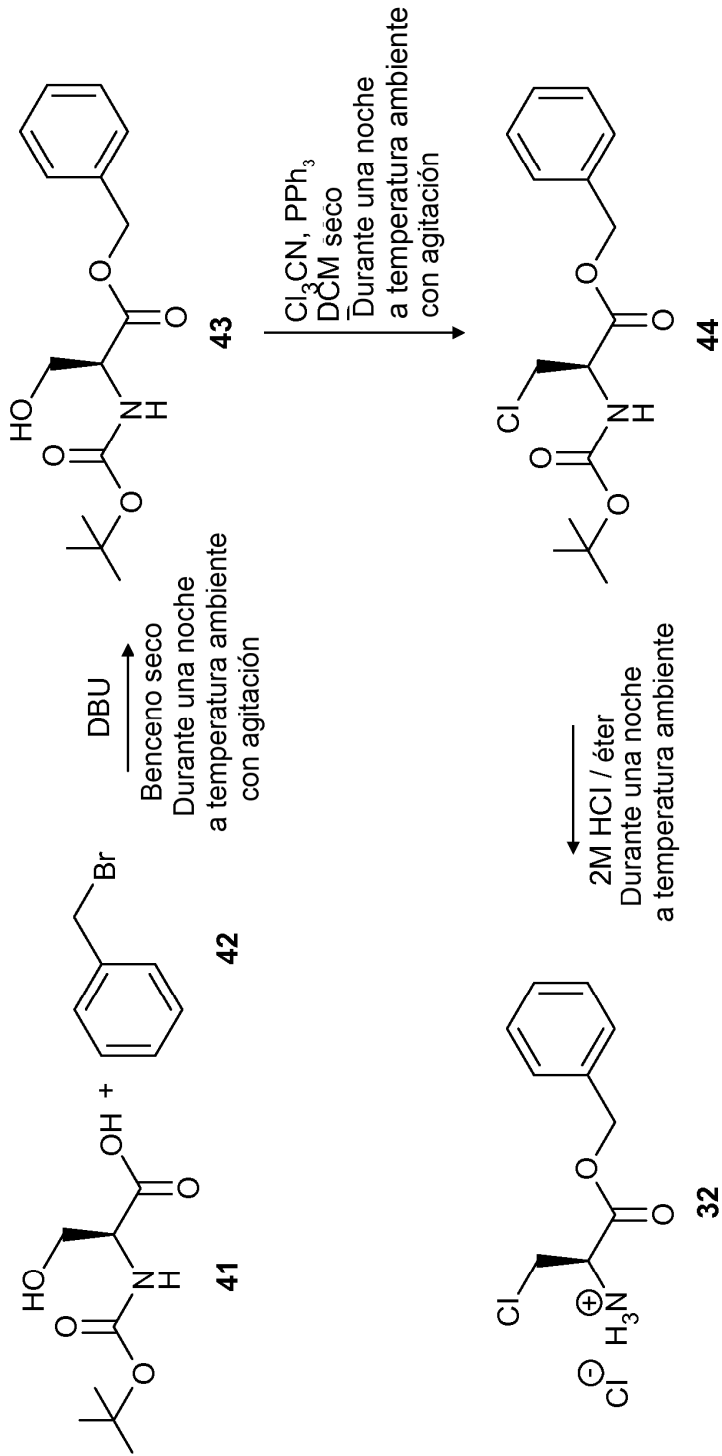


FIG. 5

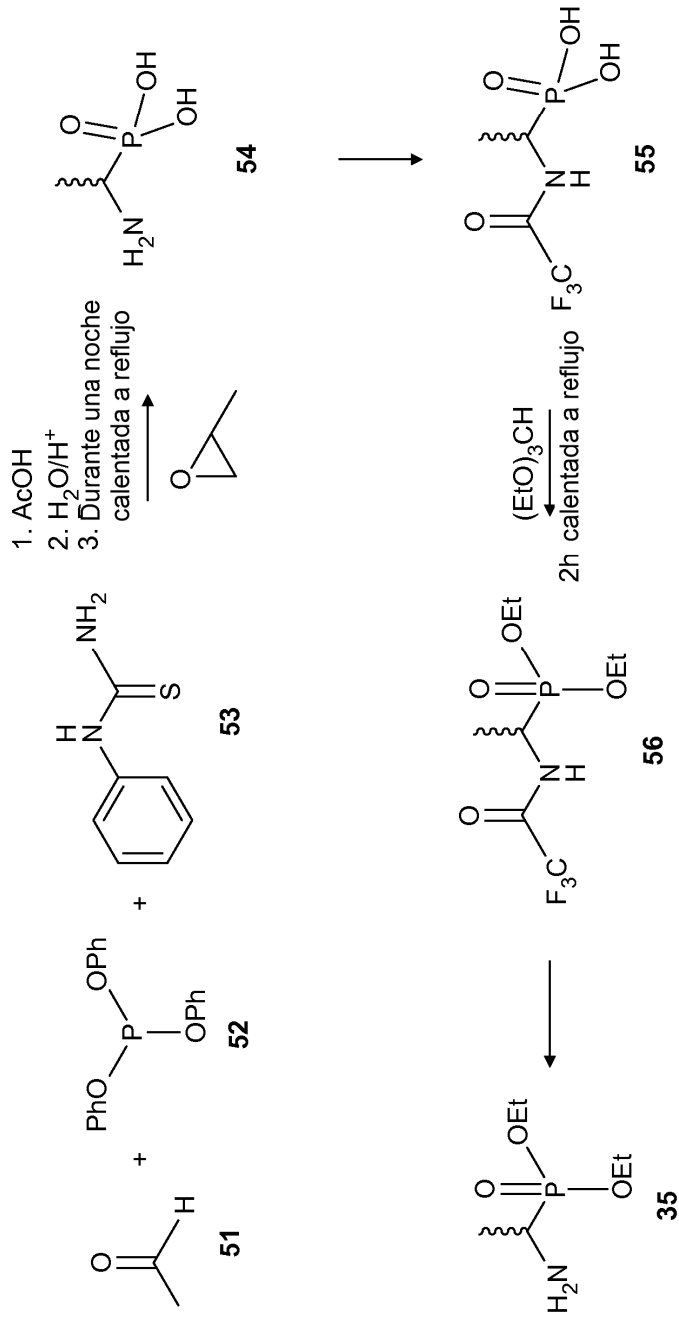


FIG. 6