

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 886**

51 Int. Cl.:

C07K 5/09 (2006.01)

C07K 5/11 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/GB2009/002364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10038040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09745077 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2350116**

54 Título: **Tratamiento de biopelículas**

30 Prioridad:

02.10.2008 GB 0818074

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

14.04.2020

73 Titular/es:

**AMICOAT AS (100.0%)
Sykehusvegen 23
9019 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**STENSEN, WENCHE;
LEESON, FREDERICK, ALAN;
ENGQVIST, STIG, OLOV, MAGNUS;
FLÆGSTAD, TROND;
REKDAL, ØYSTEIN y
SVENDSEN, JOHN, SIGURD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 753 886 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

Tratamiento de biopelículas

5 La presente invención se refiere a métodos para tratar infecciones asociadas a biopelículas y para inhibir la formación de biopelículas o eliminar una biopelícula en contextos médicos. En particular, la invención se refiere al uso de péptidos y peptidomiméticos líticos en dichos métodos.

10 En términos generales, una biopelícula es una colección, o comunidad, de microorganismos rodeados por una matriz de polímeros extracelulares (también conocidos en la técnica como glucocálix). Estos polímeros extracelulares son generalmente polisacáridos, especialmente polisacáridos producidos por los propios organismos, pero también pueden contener otros biopolímeros. Una biopelícula generalmente se unirá a una superficie, que puede ser inerte o viva, pero también se ha observado que las biopelículas pueden formarse a partir de microorganismos unidos entre sí o en cualquier superficie de contacto. Tal modo de crecimiento protege a los microorganismos y los hace difíciles de
15 eliminar o erradicar. Las biopelículas provocan importantes problemas comerciales, industriales y médicos, en términos de infecciones, contaminación, obstrucción y deterioro, etc.

Los microorganismos en una comunidad de biopelículas muestran propiedades a nivel celular (fenotipo) que no son compartidas por sus equivalentes planctónicos (de flotación libre). Se cree que estos microorganismos sésiles son profundamente diferentes de las células planctónicas que flotan libremente. También se pueden observar otras diferencias a nivel comunitario y se atribuyen a los efectos de la matriz extracelular. Quizás lo más notable es el fenómeno comúnmente observado de que los microorganismos en un entorno de biopelícula no muestran las mismas susceptibilidades a los agentes antimicrobianos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos y microbicidas, y a defensas inmunitarias del hospedador o mecanismos de aclaramiento. Se cree que esta resistencia se debe al efecto barrera de la matriz extracelular y/o un cambio fenotípico en los microbios mismos. También se cree que los microorganismos en las biopelículas pueden crecer más lentamente y, como resultado, absorben los agentes antimicrobianos más lentamente.
20

La formación de una biopelícula generalmente comienza con la fijación de microorganismos que flotan libremente a una superficie. Estos primeros colonizadores pueden adherirse a la superficie inicialmente a través de fuerzas débiles y reversibles de van der Waals. Si los colonizadores no se separan inmediatamente de la superficie, pueden anclarse de manera más permanente utilizando estructuras de adhesión celular como los pili.
30

Los primeros colonizadores suelen facilitar la llegada de otras células al proporcionar sitios de adhesión más diversos y comenzar a construir la matriz que mantiene unida la biopelícula. Algunas especies no pueden adherirse a una superficie por sí mismas, pero a menudo pueden anclarse a la matriz o directamente a colonizadores anteriores. Durante esta colonización, las células pueden comunicarse mediante la detección de quórum. Una vez que ha comenzado la colonización, la biopelícula puede crecer mediante una combinación de división celular y reclutamiento. La etapa final de la formación de la biopelícula se conoce como desarrollo, y es la etapa en la que se establece la biopelícula y solo puede cambiar de forma y tamaño. Este desarrollo de biopelícula permite que las células se vuelvan más resistentes a los antibióticos. Una biopelícula en la etapa de "desarrollo" puede denominarse una biopelícula "madura".
35
40

Las biopelículas se forman fácilmente sobre las superficies y una colonia microbiana establecida sobre cualquier superficie expuesta al agua (cualquier superficie "húmeda") podría existir como una estructura de biopelícula. Además, ahora es cada vez más evidente y está cada vez más documentado que las biopelículas también pueden formarse en el caso de infecciones microbianas, es decir, dentro o sobre un hospedador infectado. Por lo tanto, la formación de biopelículas también puede producirse sobre una superficie "fisiológica", que está sobre una superficie animada o biótica, o en una superficie sobre o en un organismo hospedador infectado (por ejemplo, un sujeto animal humano o no humano), por ejemplo, en un cuerpo internos o externo o superficie de tejido. Dicha formación de biopelículas (o infección) en los tejidos del cuerpo se cree cada vez más que contribuye a diversas enfermedades infecciosas, incluida, por ejemplo, endocarditis valvular natural (mitral, aórtica, tricúspide, válvulas cardíacas pulmonares), otitis media aguda (oído medio), prostatitis bacteriana crónica (próstata), fibrosis quística (pulmones), neumonía (tracto respiratorio), periodontitis (tejidos que sostienen los dientes; p.ej. encía, ligamento periodontal, hueso alveolar). Los nichos de biopelículas están presentes cuando se implantan dispositivos médicos y la formación de biopelículas en dichos dispositivos implantados ("permanentes") puede conducir a problemas clínicos con infección en dichos sitios, tal como endocarditis de válvula protésica e infección relacionada con el dispositivo, por ejemplo con dispositivos intrauterinos, lentes de contacto, prótesis (por ejemplo, articulaciones protésicas) y en sitios de cateterización, por ejemplo con catéteres venosos o urinarios centrales.
45
50
55

Un problema y riesgo significativos con tales infecciones de biopelículas es que los microorganismos (o más particularmente las microcolonias) pueden desprenderse o separarse de la biopelícula e ingresar a otros tejidos, incluida significativamente la circulación. Tales microorganismos circulantes derivados de biopelículas pueden causar infecciones adicionales y conducir a problemas clínicos significativos, particularmente porque los microorganismos circulantes desprendidos pueden tener todas las características de resistencia de la comunidad parental.
60

Las superficies corporales o tisulares que están muertas o dañadas (por ejemplo, necróticas o inflamadas) son
65

particularmente susceptibles a la infección por biopelículas. Las heridas son susceptibles a la infección y la formación de biopelículas puede producirse en heridas que no sanan en un corto período de tiempo. Las heridas son un entorno ideal para la formación de biopelículas debido a su susceptibilidad a la contaminación y la disponibilidad de sustrato y superficie para la fijación de la biopelícula. De manera problemática, la infección de una herida a menudo retrasa aún más la curación y, por lo tanto, hace que la herida sea más susceptible a la formación de biopelículas y a la infección establecida. Las heridas crónicas en las que se retrasa la curación representan sitios de especial preocupación con respecto a la formación de biopelículas. Una herida crónica se encuentra en un estado inflamatorio, con niveles elevados de citocinas proinflamatorias. El efecto de estas citocinas es producir un enjambre del área con células inmunitarias (neutrófilos y macrófagos). Si este sistema de defensa se retrasa de alguna manera, las bacterias u otros microorganismos tienen tiempo para fijarse a la superficie y entrar en el modo de crecimiento de biopelícula. Cada vez hay más pruebas de que tanto las heridas crónicas como las agudas pueden ser sitios de infección por biopelículas, con evidencia de diversas comunidades o poblaciones microbianas en heridas, particularmente heridas crónicas, incluidas bacterias anaerobias dentro de heridas crónicas. Las infecciones de heridas crónicas comparten dos atributos importantes con otras infecciones por biopelículas: infección persistente que no se aclara por el sistema inmunitario del hospedador incluso en individuos con reacciones inmunitarias innatas y adaptativas saludables, y resistencia a los agentes antimicrobianos tópicos y sistémicos. Por consiguiente, la infección basada en biopelículas es muy difícil de tratar y la contaminación por biopelículas es muy difícil de erradicar.

Las heridas crónicas son un importante problema de salud en todo el mundo y representan una importante pérdida de recursos clínicos. Tres tipos principales de heridas crónicas son las úlceras del pie diabético, las úlceras venosas de las piernas y las úlceras por presión, aunque otras heridas, incluidas las heridas quirúrgicas, pueden volverse crónicas. El cuidado de dicha herida impone enormes costos de material y para el paciente, y por lo tanto, un tratamiento eficaz anti biopelículas, o de hecho cualquier tratamiento que ayude o facilite el tratamiento de las biopelículas, y así acelere o facilite la curación de la herida, tendría un impacto muy significativo.

De manera más específica, las biopelículas desempeñan un papel central en la patogénesis de infecciones graves causadas por *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos (CoNS), a menudo implicados en infecciones de heridas crónicas e infecciones relacionadas con dispositivos médicos.

Las bacterias cultivadas en biopelículas son más tolerantes a los agentes antimicrobianos que sus homólogas planctónicas. Las pruebas de susceptibilidad de las bacterias planctónicas pueden no predecir la resistencia *in vivo* de las infecciones relacionadas con dispositivos a los agentes antimicrobianos.

Por lo tanto, existe la necesidad de agentes que sean antimicrobianos activos y capaces de ejercer su efecto incluso contra los microbios que existen como una biopelícula.

El creciente número de infecciones causadas por aislamientos bacterianos resistentes a los antibióticos convencionales ha llevado a una intensa búsqueda de nuevos antibióticos. Los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAP por sus siglas en inglés) están muy extendidos en la naturaleza y desempeñan un papel importante como parte de la inmunidad innata. En general, los CAP son moléculas bastante grandes que llevan una carga positiva neta y contienen aproximadamente 50 % de restos hidrófobos. Su modo de acción implica la unión a moléculas estructurales cargadas negativamente en la membrana microbiana. Una vez unidos, los CAP forman poros que aumentan la permeabilidad de la membrana celular y finalmente conducen a la lisis celular. También hay evidencia de otros mecanismos antimicrobianos, tal como la interacción con dianas intracelulares y la activación de enzimas autolíticas. Los CAP tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y el desarrollo de resistencia es raro. Las modificaciones de los CAP han dado como resultado el desarrollo de peptidomiméticos antimicrobianos sintéticos extremadamente cortos, llamados SAMP (Haug et al. [2008] J. Med. Chem. 51, 4306-4314). Los SAMP imitan el efecto de los CAP, pero pueden tener propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Beckloff et al. en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [2007] p4125-4132 describen el uso de una molécula pequeña, metafenilén etileno como un activo contra biopelícula, pero esta molécula es estructuralmente muy diferente de las moléculas de uso basadas en péptidos de acuerdo con la presente invención.

Los presentes inventores han descubierto que determinadas moléculas de tipo CAP y SAMP tienen una actividad excepcional como agentes anti biopelículas.

La presente invención proporciona un péptido lítico o un peptidomimético lítico, en donde dicho péptido o peptidomimético

- a) tiene una carga neta de al menos más 2;
- b) tiene una longitud de 3 a 5 aminoácidos o es un peptidomimético de tamaño equivalente;
- c) es de naturaleza anfipática, teniendo uno o más grupos lipófilos, comprendiendo uno de dichos grupos lipófilos al menos 7 átomos no de hidrógeno, y en donde

- (i) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 3 aminoácidos de longitud, en donde, en cualquier orden, 2 de dichos aminoácidos son aminoácidos catiónicos, y 1 de dichos aminoácidos es un aminoácido con un

grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, o

(ii) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 4 aminoácidos de longitud, en el que 2 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos son aminoácidos lipófilos, o

(iii) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 5 aminoácidos de longitud, en el que 3 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos son aminoácidos lipófilos o en el que 2 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 3 aminoácidos son aminoácidos lipófilos; y

d) está fijado covalentemente a un dispositivo médico,

para su uso en la prevención de la formación de una biopelícula en dicho dispositivo médico.

La presente invención también proporciona un uso *ex vivo* de un péptido lítico o peptidomimético lítico como se define anteriormente para la prevención de la formación de biopelículas en un dispositivo médico, en donde dicho péptido lítico o peptidomimético lítico está fijado covalentemente a dicho dispositivo médico.

Se exponen determinadas realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

También se divulga en el presente documento un péptido o peptidomimético que:

a) lleva una carga positiva neta;

b) es de 1 a 6, preferentemente al menos 1 o 2 y hasta 4, 5 o 6, por ejemplo, 2 a 5 o 2 a 6 aminoácidos de longitud o un peptidomimético de tamaño equivalente; y

c) es de naturaleza anfipática, teniendo uno o más grupos lipófilos, comprendiendo uno de dichos grupos lipófilos al menos 7 átomos no de hidrógeno;

para su uso en el tratamiento de una infección asociada a biopelículas.

Por "biopelícula" se entiende una comunidad sésil de microorganismos caracterizados por células que están fijadas a un sustrato o superficie de contacto o entre sí, que están embebidas en una matriz de polímeros extracelulares (más específicamente polímeros extracelulares que han producido), y que muestran un fenotipo alterado respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción génica (por ejemplo, en comparación con sus homólogos "no en biopelícula" o flotantes o planctónicos).

Actualmente se aprecia la prevalencia de biopelículas en infecciones bacterianas que son problemáticas para sujetos animales humanos y no humanos. Están especialmente implicadas en infecciones de heridas crónicas e infecciones relacionadas con dispositivos médicos. De este modo, se divulgan en el presente documento los péptidos y peptidomiméticos definidos en el presente documento para su uso en el tratamiento de una biopelícula asociada con una infección de herida crónica o una biopelícula asociada con una infección relacionada con un dispositivo médico.

Como alternativa a lo visto, también se divulga en el presente documento el uso de un péptido o peptidomimético como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una infección asociada a una biopelícula.

También se divulga en el presente documento un método para tratar una infección asociada a una biopelícula en un sujeto que comprende administrarle un péptido o peptidomimético como se define en el presente documento.

Una "infección asociada a una biopelícula" es una infección microbiana de un sujeto donde se sabe o se sospecha que los microbios están presentes como una biopelícula. Por lo general, será una infección donde la existencia de una biopelícula es importante para la afección clínica, por ejemplo, para el diagnóstico o pronóstico, para el régimen de tratamiento, para la gravedad de la infección, para la duración de la infección hasta para el punto de tratamiento o para el futuro previsto. Tratamiento incluye tratamiento profiláctico y abarca una reducción en el tamaño de la biopelícula, una reducción en el número de microorganismos vivos dentro de la biopelícula y prevención o reducción en la tendencia de los microorganismos dentro de la biopelícula a liberarse y formar nuevas colonias de biopelícula. El tratamiento incluye una mejora, observada por el médico o el paciente, en uno o más de los síntomas asociados con la infección.

El tamaño, estructura, integridad y número de microbios en una biopelícula pueden analizarse mediante cualquier método conveniente. Por ejemplo, con frecuencia se utiliza microscopía electrónica de exploración y transmisión para evaluar el tamaño, integridad y estructura de una biopelícula. El análisis de la biopelícula se describe en los Ejemplos a continuación en el presente documento.

Las biopelículas que pueden tratarse de acuerdo con la invención no están limitadas en términos de los microorganismos que contienen, las moléculas líticas descritas en el presente documento se dirigen a las membranas celulares y, por lo tanto, tienen una actividad completamente no específica. Por consiguiente, la biopelícula puede comprender cualquier clase, género o especie de microorganismo, es decir, cualquier microorganismo que pueda

formar una biopelícula. Dichos microorganismos generalmente incluyen bacterias, que incluye cualquier género o especie de bacterias. Por consiguiente, las bacterias pueden ser gram positivas o gram negativas, o no responden a la prueba gram. Pueden ser aerobias o anaerobias. Las bacterias pueden ser patógenas o no patógenas.

- 5 La biopelícula puede comprender bacterias Gram positivas, *Pseudomonas aeruginosa* y/u hongos. Las biopelículas que comprenden o consisten en bacterias Gram positivas son dianas preferidas.

Las biopelículas que comprenden *Staphylococcus* son dianas preferidas, siendo especialmente preferidas las biopelículas que comprenden *S. haemolyticus*.

- 10 Las biopelículas también pueden contener hongos, algas y otros organismos como los protozoos parásitos. Las biopelículas de colonias mixtas son conocidas y tratables de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

- 15 Los dispositivos médicos son una clase particular de superficie sobre la cual se puede formar una biopelícula y representan la diana terapéutica de acuerdo con la presente invención.

- 20 Esto puede incluir cualquier tipo de tubo, incluidos catéteres (por ejemplo, catéteres venosos y urinarios centrales), dispositivos protésicos, por ejemplo, válvulas cardíacas, articulaciones artificiales, dientes postizos, coronas dentales, fundas dentales e implantes de tejidos blandos). Se incluye cualquier tipo de dispositivo médico implantable (o "permanente") (por ejemplo, stents, dispositivos intrauterinos, marcapasos, tubos de intubación, prótesis o dispositivos protésicos, tubos o catéteres). Un dispositivo médico "permanente" puede incluir un dispositivo en el que cualquier parte del mismo está contenida dentro del cuerpo, es decir, el dispositivo puede ser total o parcialmente permanente.

- 25 En las divulgaciones específicas del presente documento, los péptidos y peptidomiméticos se pueden usar en el tratamiento de endocarditis valvular natural, otitis media aguda, prostatitis bacterianas crónicas, neumonía, placa dental, periodontitis, infecciones por biopelículas en enfermedades respiratorias, que pueden incluir fibrosis quística. En realizaciones específicas de la invención, los péptidos y peptidomiméticos pueden usarse en el tratamiento de infecciones relacionadas con dispositivos asociadas con dispositivos médicos implantables o protésicos, p.ej.,
30 endocarditis valvular protésica o infección de tubos o catéteres o articulaciones artificiales o reemplazos de tejidos.

- Las heridas pueden ser agudas o crónicas. Las heridas agudas son heridas que proceden de manera ordenada a través de las tres etapas reconocidas del proceso de curación (es decir, la etapa inflamatoria, la etapa proliferativa y la etapa de remodelación) sin un curso de tiempo prolongado. Sin embargo, las heridas crónicas, son aquellas que no completan la secuencia ordenada de eventos bioquímicos porque la herida se ha estancado en una de las etapas de curación. Visto alternativamente, una herida crónica es una herida que no ha cicatrizado en al menos 40 días, preferentemente al menos 50 días, más preferentemente al menos 60 días, lo más preferentemente al menos 70 días.

- 40 La herida a tratar puede ser una rotura o erosión del tejido, por ejemplo, causada por una incisión quirúrgica o un trauma, por ejemplo, trauma mecánico, térmico, eléctrico, químico o por radiación; una lesión que se forma espontáneamente, como una úlcera de la piel (por ejemplo una úlcera venosa, diabética o de presión); una ampolla (por ejemplo, una ampolla de fricción o térmica o una ampolla causada por una infección patógena como la varicela); una fisura anal o una úlcera bucal.

- 45 El tratamiento de heridas crónicas representa una divulgación particularmente preferida.

- Aunque las biopelículas actualmente son más ampliamente reconocidas como contribuyentes a afecciones médicas, también están implicadas en problemas no médicos causados por la colonización microbiana de las superficies. Esta puede ser, por ejemplo, en entornos domésticos, industriales, de investigación u hospitales donde las superficies
50 deben mantenerse libres de contaminación bacteriana.

- Como se indica anteriormente, la biopelícula puede estar presente en una superficie. La superficie no está limitada e incluye cualquier superficie en la que pueda producirse un microorganismo, particularmente, como se indica anteriormente, una superficie expuesta al agua o la humedad. La superficie puede ser biótica o abiótica, y las superficies inanimadas (o abióticas) incluyen cualquier superficie que pueda estar expuesta a contacto microbiano o contaminación. Por lo tanto, superficies particulares se encuentran en maquinaria, especialmente maquinaria industrial, o cualquier superficie expuesta a un entorno acuático (por ejemplo, equipos marinos, barcos o embarcaciones o sus partes o componentes), o cualquier superficie expuesta a cualquier parte del entorno, por ejemplo tuberías o en edificios. Dichas superficies inanimadas expuestas al contacto o contaminación microbiana incluyen en particular cualquier parte de: maquinaria o equipo de procesamiento, preparación, almacenamiento o distribución de alimentos o bebidas, aparatos de aire acondicionado, maquinaria industrial, p.ej., en plantas de procesamiento químico o biotecnológico, tanques de almacenamiento y equipos médicos o quirúrgicos. Cualquier aparato o equipo para portar, transportar o suministrar materiales, que puedan estar expuestos al agua o la humedad es susceptible a la formación de biopelículas. Dichas superficies incluirán particularmente tuberías (término que se usa ampliamente en el presente documento para incluir cualquier conducto o tubo). Las superficies inanimadas o abióticas representativas incluyen, pero sin limitación, equipos o superficies de procesamiento, almacenamiento, dispensación o preparación de

5 alimentos, depósitos, transportadores, suelos, desagües, refrigeradores, congeladores, superficies de equipos, paredes, válvulas, correas, tuberías, conductos de aire acondicionado, aparatos de enfriamiento, tubos de dispensación de alimentos o bebidas, intercambiadores de calor, cascos de embarcaciones o cualquier parte de la estructura de una embarcación que esté expuesta al agua, líneas de agua dentales, conductos de perforación de petróleo, lentes de contacto y estuches de almacenamiento.

10 También se divulga en el presente documento un método para inhibir la formación de biopelículas o eliminar una biopelícula que comprende poner en contacto dicha biopelícula con un péptido o peptidomimético como se define en el presente documento. Dicha biopelícula puede estar en cualquiera de las superficies descritas anteriormente.

La expresión "poner en contacto" abarca cualquier medio de suministrar el péptido o peptidomimético a la biopelícula, ya sea directa o indirectamente, y por lo tanto, cualquier medio de aplicar el péptido o mimético a la biopelícula o exponer la biopelícula al péptido o mimético, p.ej., aplicando el péptido o mimético directamente a la biopelícula.

15 El péptido o peptidomimético tendrá ventajosamente una carga neta de al menos más 2 o más 3.

Determinados péptidos descritos en el presente documento tienen de 2 a 4 aminoácidos de longitud, lo más preferentemente 3 aminoácidos de longitud.

20 Los peptidomiméticos preferidos tienen un tamaño equivalente y, cuando se describen características preferidas de los péptidos, tales características son, *mutatis mutandis*, características preferidas de los peptidomiméticos.

25 Las moléculas tendrán preferentemente un grupo lipófilo que tiene al menos 9, 10, 11 o 12 átomos no de hidrógeno. Cuando una molécula incorpora un grupo lipófilo de solo 7 u 8 átomos no de hidrógeno, la molécula preferentemente incluirá un grupo lipófilo adicional de al menos 3, generalmente, al menos 6 átomos no de hidrógeno.

30 El grupo lipófilo más grande generalmente será un grupo R de aminoácido pero puede estar presente como parte de una modificación N o preferentemente C terminal. Los aminoácidos codificados genéticamente adecuados que proporcionan dicho grupo lipófilo son fenilalanina (7 átomos no de hidrógeno), triptófano (10 átomos no de hidrógeno) y tirosina (8 átomos no de hidrógeno). De aquí en adelante en el presente documento cuando se hace referencia a aminoácidos, se pueden usar abreviaturas de aminoácidos de una letra convencionales o códigos de aminoácidos de tres letras convencionales.

35 Por lo general, uno de los grupos lipófilos incluirá un grupo cíclico que puede ser aromático; se prefiere un grupo lipófilo que tenga 2 grupos cíclicos, que pueden estar o no fusionados. El grupo lipófilo puede contener heteroátomos tales como O, N, S o F pero generalmente no hay más de un heteroátomo, preferentemente este es nitrógeno. El grupo lipófilo preferentemente no tendrá más de 2 grupos polares, más preferentemente ninguno o uno, lo más preferentemente ninguno.

40 Los aminoácidos no genéticos preferidos que proporcionan dicho grupo lipófilo son tributil triptófano (Tbt), bifenilalanina o difenilalanina o un derivado de bifenilalanina como Bip (4-(2-naftilo)), Bip (4-(1-Naftilo)), Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) o Bip (4-T-Bu) o Phe (4-(2'-naftilo)), Phe (4-(1'-naftilo)), Phe (4-n-butilfenilo), Phe (4-4'-bifenilo) o Phe (4'-t-butilfenilo).

45 Los péptidos comprenderán generalmente 1,2 o 3 aminoácidos catiónicos, preferentemente 2 aminoácidos catiónicos, preferentemente lisina o arginina pero posiblemente histidina o cualquier aminoácido no codificado o modificado genéticamente que tenga una carga positiva a pH 7,0.

50 Los aminoácidos no codificados genéticamente adecuados y los aminoácidos modificados que pueden proporcionar un aminoácido catiónico incluyen análogos de lisina, arginina e histidina tales como homolisina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico y homoarginina, así como trimetilisina y trimetilcloritina, Ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, ácido 4-amino-1-carbamimidoilpiperidina-4-carboxílico y 4-guanidinofenilalanina.

55 Las moléculas preferidas para su uso de acuerdo con la presente invención son compuestos, preferentemente péptidos, que comprenden 3 restos de aminoácidos, en donde, en cualquier orden, 2 de dichos restos de aminoácidos son aminoácidos catiónicos, preferentemente lisina o arginina, pero pueden ser histidina o cualquier aminoácido no codificado o modificado genéticamente que tenga una carga positiva a pH 7,0, y 1 de dichos aminoácidos es un aminoácido con un gran grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más, por ejemplo, 2 o 3, grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, estos grupos cíclicos comprenderán generalmente 5 o 6 átomos no de hidrógeno, preferentemente 6 átomos no de hidrógeno. En el caso de anillos fusionados, por supuesto, pueden compartirse los átomos no de hidrógeno.

65 Estos compuestos preferidos pueden ser de 3 aminoácidos de longitud, es decir, un tripéptido. Sin embargo, también se incluyen compuestos que tienen hasta 4 o 5 aminoácidos de longitud. Los compuestos que tienen más de 3 aminoácidos de longitud pueden comprender aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del tripéptido. Como alternativa, o además, los compuestos que tienen más de 3 aminoácidos de longitud pueden comprender los

aminoácidos del tripéptido descrito anteriormente separados en secuencia lineal por uno o más aminoácidos adicionales.

5 Cuando los compuestos tienen más de 3 aminoácidos de longitud, los aminoácidos adicionales son aminoácidos catiónicos o lipófilos. Un péptido de 4 aminoácidos de longitud generalmente comprenderá 2 aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos lipófilos; un péptido de 5 aminoácidos de longitud comprenderá generalmente 3 aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos lipófilos o 2 aminoácidos catiónicos y 3 aminoácidos lipófilos. Un grupo preferido de compuestos de más de 3 aminoácidos de longitud tiene fenilalanina como su aminoácido C-terminal.

10 Los compuestos de uso en la presente invención están fijados covalentemente a un dispositivo médico para evitar la formación de una biopelícula sobre el mismo. En el contexto de la presente divulgación, las expresiones "soporte sólido" y "superficie" son intercambiables.

15 En el presente documento se divulga un soporte sólido al que se ha fijado un compuesto como se describe en el presente documento de uso de acuerdo con la presente divulgación. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, las superficies descritas anteriormente. Las superficies en las que se pueden formar biopelículas incluyen dispositivos médicos, envases, transportadores o conductos que transportan agua u otros fluidos, etc. Los dispositivos médicos son una clase particular de superficie sobre la cual se puede formar una biopelícula y representan la superficie sobre la cual se fijan los compuestos de uso en la presente invención de acuerdo con la presente invención.

20 La expresión "dispositivos médicos" incluye cualquier tipo de tubo, incluidos catéteres (por ejemplo, catéteres venosos y urinarios centrales), dispositivos protésicos, por ejemplo, válvulas cardíacas, articulaciones artificiales, dientes postizos, coronas dentales, fundas dentales e implantes de tejidos blandos). Se incluye cualquier tipo de dispositivo médico implantable (o "permanente") (por ejemplo, stents, dispositivos intrauterinos, marcapasos, tubos de intubación, prótesis o dispositivos protésicos, tubos o catéteres). Un dispositivo médico "permanente" puede incluir un dispositivo en el que cualquier parte del mismo está contenida dentro del cuerpo, es decir, el dispositivo puede ser total o parcialmente permanente.

30 Los compuestos de uso en la presente divulgación se pueden fijar a soportes sólidos por cualquier medio conocido en la técnica. Los compuestos pueden estar fijados directa o indirectamente al soporte sólido, es decir, pueden estar fijados por un grupo de enlace. Los compuestos pueden estar fijados directamente al soporte sólido aunque, tal como se analiza más adelante, puede ser necesaria la modificación de los compuestos para permitir la unión. De acuerdo con la presente invención, los compuestos están fijados covalentemente a un dispositivo médico. Por tanto, opcionalmente, los compuestos de uso en la presente invención comprenden un grupo químico que permite la unión covalente a dicho dispositivo médico.

35 Como alternativa, los compuestos se modifican para permitir la unión covalente a dicho dispositivo médico.

40 El término "modificado" o "modificación" incluye el reemplazo de un grupo químico de un compuesto de uso en la presente invención por un grupo químico que permite la unión covalente a dicho soporte. El término también incluye la sustitución adicional de un grupo químico existente con un grupo químico que permite la unión covalente a dicho soporte. El término también incluye el escenario donde, en lugar de reemplazar o sustituir adicionalmente un grupo químico de un compuesto preexistente de uso en la presente invención, el compuesto está diseñado para comprender dicho grupo químico que permite la unión covalente a dicho soporte sólido, y se prepara de esta forma.

45 La naturaleza exacta del grupo químico que permite la unión covalente al soporte dependerá de la naturaleza química de la superficie deseada a la que se une el compuesto. Análogamente, la superficie del soporte sólido puede modificarse para permitir la unión. Una variedad de grupos químicos adecuados son bien conocidos en la técnica y el experto en la materia determinaría fácilmente los grupos apropiados para la unión. Únicamente a modo de ejemplo, los grupos químicos que permiten la unión covalente a las superficies pueden ser grupos que contienen heteroátomos, incluidos grupos que contienen oxígeno tales como grupos carboxilo, grupos que contienen nitrógeno tales como grupos amida y grupos que contienen azufre tales como grupos tiol. Los enlaces covalentes que pueden existir entre los compuestos de uso en la invención y los soportes deseados incluyen, pero sin limitación, enlaces éter, éster amida, amina, sulfuro, tioéter y tioéster. Por consiguiente, por ejemplo, puede haberse formado un enlace éster a partir de un resto de alcohol en el soporte y un resto de ácido carboxílico dentro del compuesto de uso en la invención o viceversa.

50 Como alternativa, la unión covalente del compuesto de uso en la invención a las superficies se puede lograr a través de conexiones que no implican heteroátomos, por ejemplo utilizando grupos alqueno o vinilo, en donde el grupo alqueno o vinilo está dentro del compuesto de uso en la invención y el otro grupo necesario está en una superficie deseada. Las reacciones de cicloadición también se pueden usar para unir covalentemente los compuestos de uso en la invención a una superficie deseada.

60 Preferentemente, dicha unión covalente está entre el extremo C del compuesto y el dispositivo médico. Por consiguiente, preferentemente, el compuesto contiene o se modifica para contener en su extremo C un grupo químico que permite la unión covalente al dispositivo médico.

65 Opcionalmente, la modificación es la incorporación en el extremo C de uno o más grupos lipófilos que contienen un grupo químico que permite la unión covalente a dicho dispositivo médico. Por ejemplo el grupo lipófilo, en la forma en

que se fija, puede seleccionarse del grupo que consiste en $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}-$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ y $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$, y el más preferente es $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}-$ o $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$. Los grupos carboxilo de estos grupos permiten la unión covalente del compuesto a un dispositivo médico.

5 Las moléculas preferidas son las definidas en el documento WO 01/66147.

Un grupo de moléculas especialmente preferidas se describe en el documento GB 0724951.9.

10 Así, las moléculas preferidas para su uso de acuerdo con la presente invención son compuestos, preferentemente péptidos, de fórmula (I)



15 en donde, en cualquier orden, 2 de dichos restos de AA(aminoácidos) son aminoácidos catiónicos, preferentemente lisina o arginina, pero pueden ser histidina o cualquier aminoácido no genéticamente codificado o modificado que tenga una carga positiva a pH 7,0, y 1 de dichos AA es un aminoácido con un gran grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más, por ejemplo, 2 o 3, grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, estos grupos cíclicos comprenderán generalmente 5 o 6 átomos no de hidrógeno, preferentemente 6 átomos no de hidrógeno;

20 X es un átomo de N, que puede estar sustituido, pero preferentemente no, por un grupo alquilo o arilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ramificado o no ramificado, por ejemplo, metilo, etilo o fenilo, y este grupo puede incorporar hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O y S;

Y representa un grupo seleccionado de $-\text{R}_a\text{-R}_b-$, $-\text{R}_a\text{-R}_b\text{-R}_b-$ y $-\text{R}_b\text{-R}_b\text{-R}_a-$ en donde R_a es C, O, S, N o F, preferentemente C y

25 R_b es C; cada uno de los R_a y R_b puede estar sustituido por, por ejemplo, grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ o grupos carboxilo, o puede estar no sustituido, preferentemente Y es $-\text{R}_a\text{-R}_b-$ (en donde R_a es preferentemente C) y preferentemente este grupo no está sustituido, cuando Y es $-\text{R}_a\text{-R}_b\text{-R}_b-$ o $\text{R}_b\text{-R}_b\text{-R}_a-$ entonces preferentemente uno o más de R_a y R_b está sustituido; y

30 Z es un grupo que comprende de 1 a 3 grupos cíclicos, cada uno de 5 o 6 átomos no de hidrógeno (preferentemente) átomos de C), 2 o más de los grupos cíclicos pueden fusionarse; uno o más de los anillos pueden estar sustituidos y estas sustituciones pueden, pero generalmente no incluirán grupos polares, los grupos sustituyentes adecuados incluyen halógenos, preferentemente flúor y grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$; el resto Z incorpora un máximo de 15 átomos no de hidrógeno, preferentemente 5 -12, lo más preferentemente es fenilo; el enlace entre Y y Z es un enlace covalente entre R_a o R_b de Y y un átomo no de hidrógeno de uno de los grupos cíclicos de Z.

35 En una realización particularmente preferida los compuestos, preferentemente péptidos, son de fórmula (II)



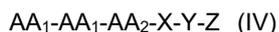
40 en la que:

AA_1 es un aminoácido catiónico, preferentemente lisina o arginina pero puede ser histidina o cualquier aminoácido no genéticamente codificado o modificado que tenga una carga positiva a pH 7,0;

45 AA_2 es un aminoácido con un gran grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más, por ejemplo, 2 o 3, grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, estos grupos cíclicos comprenderán generalmente 5 o 6 átomos no de hidrógeno, preferentemente 6 átomos no de hidrógeno;

y
X, Y y Z son como se definen anteriormente.

50 Otros compuestos útiles incluyen compuestos de fórmulas (III) y (IV):



55 en la que AA_1 , AA_2 , X, Y y Z son como se definen anteriormente.

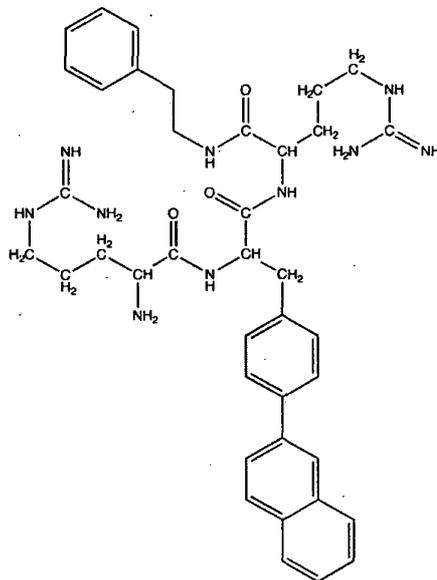
60 De entre los compuestos anteriores, se prefieren determinados. En particular, compuestos en donde el aminoácido con un gran grupo R lipófilo, convenientemente denominado en el presente documento AA_2 , es tributil triptófano (Tbt) o un derivado de bifenilalanina tal como Bip (4- (2-naftilo)), Bip (4-(1-Naftilo)), Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) o Bip (4-T-Bu), siendo Bip (4-(2-Naftilo)) y Tbt los más preferidos. Otro grupo preferido de compuestos son aquellos en donde Y es $-\text{R}_a\text{-R}_b-$ como se define anteriormente, preferentemente en donde R_a y R_b no están sustituidos, lo más preferentemente en donde R_a y R_b son ambos átomos de carbono.

65 Un grupo preferido adicional de compuestos son aquellos en los que $-\text{X-Y-Z}$ juntos es el grupo $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$.

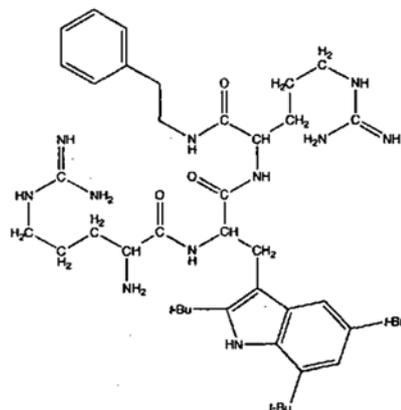
Los compuestos incluyen todas las formas enantioméricas, aminoácidos D y L y enantiómeros resultantes de centros quirales dentro de los grupos de aminoácidos R y restos Y o Z.

Los compuestos especialmente preferidos son los siguientes:

5



Compuesto 1



Compuesto 2

10

Un grupo adicional de moléculas preferidas para su uso de acuerdo con la invención son compuestos, preferentemente péptidos, de fórmula (V)

15



20

en donde, en cualquier orden, 2 de dichos restos de AA(aminoácidos) son aminoácidos catiónicos, preferentemente lisina o arginina, pero pueden ser histidina o cualquier aminoácido no genéticamente codificado o modificado que tenga una carga positiva a pH 7,0, y 1 de dichos AA es un aminoácido con un gran grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más, por ejemplo, 2 o 3, grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, estos grupos cíclicos comprenderán generalmente 5 o 6 átomos no de hidrógeno, preferentemente 6 átomos no de hidrógeno;

25

R₁ es un átomo de N, que puede estar sustituido, pero preferentemente no, por un grupo alquilo o arilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, por ejemplo, metilo, etilo o fenilo, y este grupo puede incorporar hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O, S y F, siendo F el menos preferido;

30

R₂ es un resto alifático que tiene 2-20 átomos no de hidrógeno, preferentemente estos son átomos de carbono pero se pueden incorporar átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre, preferentemente R₂ comprende 3-10, lo más preferente 3-6 átomos no de hidrógeno y el resto puede ser lineal, ramificado o cíclico. Si el grupo R₂ comprende un grupo cíclico, este se une preferentemente directamente al átomo de nitrógeno de R₁.

Los compuestos preferidos incorporan un grupo R₂ que es lineal o ramificado, en particular un grupo alquilo lineal o ramificado que incluye etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo e isómeros del mismo, hexilo e isómeros del mismo, propilo, isopropilo, son especialmente preferidos butilo e isobutilo.

- 5 De los grupos R₂ que comprenden un grupo cíclico, son preferidas las moléculas en las que R₂ es ciclohexilo o ciclopentilo.

- 10 Los aminoácidos no codificados genéticamente adecuados y los aminoácidos modificados que pueden proporcionar un aminoácido catiónico incluyen análogos de lisina, arginina e histidina tales como homolisina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico y homoarginina, así como trimetilisina y trimetilcloritina, Ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, ácido 4-amino-1-carbamimidopiperidina-4-carboxílico y 4-guanidinofenilalanina.

- 15 El gran grupo lipófilo puede contener heteroátomos tales como O, N, S o F pero generalmente no hay más de un heteroátomo, preferentemente este es nitrógeno. Este grupo R preferentemente no tendrá más de 2 grupos polares, más preferentemente ninguno o uno, lo más preferentemente ninguno.

En una realización particularmente preferida los compuestos, preferentemente péptidos, son de fórmula (VI)

- 20 AA₁-AA₂-AA₁-R₁-R₂ (VI)

en la que:

- 25 AA₁ es un aminoácido catiónico, preferentemente lisina o arginina pero puede ser histidina o cualquier aminoácido no genéticamente codificado o modificado que tenga una carga positiva a pH 7,0;
AA₂ es un aminoácido con un gran grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más, por ejemplo, 2 o 3, grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, estos grupos cíclicos comprenderán generalmente 5 o 6 átomos no de hidrógeno, preferentemente 6 átomos no de hidrógeno; y R₁ y R₂ son como se definen anteriormente.

- 30 Otros compuestos útiles incluyen compuestos de fórmulas (VII) y (VIII):



- 35 AA₁-AA₁-AA₂-R₁-R₂ (VIII)

en la que AA₁, AA₂, R₁ y R₂ son como se definen anteriormente.

- 40 De entre los compuestos anteriores, se prefieren determinados. En particular, compuestos en donde el aminoácido con un gran grupo R lipófilo, convenientemente denominado en el presente documento AA₂, es tributil triptófano (Tbt) o un derivado de bifenilalanina tal como Phe (4-(2-naftilo)), Phe (4-(1'-naftilo)), Phe (4'-n-butilfenilo), Phe (4-4'-bifenilo) o Phe (4'-t-butilfenilo); siendo Phe(4-(2-Naftilo)) y Tbt los más preferidos.

- 45 Un grupo preferido adicional de compuestos son aquellos en los que -R₁-R₂ juntos se seleccionan del grupo -NH-CH(CH₃)₂, -NH(CH₂)₅CH₃, -NH(CH₂)₃CH₃, -NH(CH₂)₂CH₃, -NHCH₂CH(CH₃)₂, -NHciclohexilo y -NHciclopentilo, los más preferidos son los compuestos en los que -R₁-R₂ es el grupo -NHCH(CH₃)₂ o -NH(CH₂)₅CH₃.

- 50 Los compuestos incluyen todas las formas enantioméricas, tanto aminoácidos D como L y enantiómeros resultantes de centros quirales dentro de los grupos de aminoácidos R y R₂.

Los compuestos especialmente preferidos son los compuestos en la tabla a continuación, especialmente los Compuestos 1 y 2, en donde los compuestos son de fórmula VI, VII u VIII, preferentemente de fórmula VI, particularmente de fórmula Arg-AA₂-Arg-R₁-R₂.

Compuesto	AA ₂	R ₁ R ₂
1	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NHCH(CH ₃) ₂
(continuación)		
Compuesto	AA ₂	R ₁ R ₂
2	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NH(CH ₂) ₅ CH ₃
3	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NH(CH ₂) ₃ CH ₃
4	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NH(CH ₂) ₂ CH ₃
5	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NH(CH ₂) ₁₅ CH ₃
6	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂
7	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NHciclohexilo
8	2,5,7-tri- <i>terc</i> -butil triptófano	NHciclopentilo

9	Phe (4-4'-bifenilo)	NHCH(CH ₃) ₂
10	Phe (4-4'-bifenilo)	NH(CH ₂) ₅ CH ₃
11	Phe (4-(2'-Naftilo))	NHCH(CH ₃) ₂
12	Phe (4-(2'-Naftilo))	NH(CH ₂) ₅ CH ₃

Se analiza en términos generales anteriormente cómo el motivo preferido de 3 aminoácidos, 2 catiónicos y 1 lipófilo, puede expandirse o extenderse a péptidos o peptidomiméticos más largos. Los compuestos preferidos de fórmulas (I) a (VIII) pueden expandirse o extenderse de la manera descrita, especialmente a péptidos de 4 o 5 aminoácidos y estos representan un grupo preferido adicional de compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención.

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

Los compuestos peptidomiméticos para su uso de acuerdo con la presente invención tendrán generalmente subunidades identificables que son aproximadamente equivalentes en tamaño y función a los aminoácidos, preferentemente a los aminoácidos catiónicos y lipófilos. El término "aminoácido" se puede usar convenientemente en el presente documento para referirse a la subunidad equivalente de un compuesto peptidomimético. Además, los peptidomiméticos pueden tener grupos equivalentes a los grupos R de aminoácidos y el análisis en el presente documento de grupos R adecuados y de grupos modificadores N y C terminales se aplica, *mutatis mutandis*, a compuestos peptidomiméticos.

Como se analiza en el libro de texto mencionado anteriormente, así como el reemplazo de enlaces amida, los peptidomiméticos pueden implicar el reemplazo de restos estructurales más grandes con estructuras de di o tripeptidomiméticos y, en este caso, los restos miméticos que implican el enlace peptídico, tales como los miméticos derivados de azol pueden usarse como reemplazos de dipéptidos.

Sin embargo, se prefieren los péptidos peptidomiméticos y, por lo tanto, las cadenas principales de peptidomiméticos en las que solo se han reemplazado los enlaces amida como se analiza anteriormente.

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

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

Las cadenas principales de peptidomiméticos preferidas incluyen poliésteres, poliaminas y derivados de los mismos, así como alcanos y alquenos sustituidos. Los peptidomiméticos preferentemente tendrán extremos N y C que pueden modificarse como se analiza en el presente documento.

Los aminoácidos β y γ , así como los aminoácidos α , se incluyen dentro del término "aminoácidos", al igual que las glicinas N-sustituidas. Los compuestos para su uso de acuerdo con la invención incluyen péptidos beta y depsipéptidos.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes y Figuras, en los que:

La Figura 1 muestra la estructura química de los SAMP utilizados en este estudio. Estructura 1 es la estructura del Compuesto A: donde R= iPr, Compuesto B: donde R = (CH₂)₂Ph y Compuesto C: donde R=n-C₆H₁₃.

5 La Figura 2 muestra la cuantificación de biomasa con Cristal Violeta (CV) (panel superior) y la cuantificación de la actividad metabólica con Alamar Blue(AB) (panel inferior) en una biopelícula de 24 h de edad con 6 cepas estafilocócicas diferentes. Se puede ver una correlación clara entre CV y AB.

10 La Figura 3 (A-D) son gráficos que muestran el efecto del tratamiento de 24 h con rifampicina (A), linezolid (B), tetraciclina (C) y vancomicina (D) en biopelículas de 24 h de edad de 6 cepas estafilocócicas diferentes. Para cada cepa, las barras representan de izquierda a derecha: control negativo, control positivo, tratamiento con concentración de antibióticos (vancomicina, linezolid, tetraciclina) de 5 mg/l, 50 mg/l y 500 mg/l. Para la rifampicina, las concentraciones fueron 0,01 mg/l, 0,1 mg/l y 1 mg/l. Los valores son medias de tres experimentos ± DE. * significa una fuerte supresión de la actividad metabólica. ** significa supresión completa de la actividad metabólica.

15 La Figura 4 (A-C) son gráficos que muestran el efecto del tratamiento de 24 h con 3 SAMP diferentes (compuestos A, B y C, respectivamente) en una biopelícula de 24 h de edad de 6 cepas estafilocócicas diferentes. Para cada cepa, las barras representan de izquierda a derecha, control negativo, control positivo, tratamiento con SAMP en concentración de 5 mg/l, 50 mg/l y 500 mg/l. Los valores son medias de tres experimentos ± DE. * significa una fuerte supresión de la actividad metabólica. ** significa supresión completa de la actividad metabólica.

20 La Figura 5 son fotos que muestran una biopelícula de *S. haemolyticus* 51-07 de 48 h de edad cultivada en discos de tapa deslizante. Las biopelículas se tiñeron con tinción LIVE/DEAD y se investigaron con microscopía de exploración láser confocal. Biopelícula no tratada (A); biopelícula tratada durante 24 h con 50 mg/l de vancomicina (B); 500 mg/l de vancomicina (C); 50 mg/l de tetraciclina (D); 500 mg/l de tetraciclina (E); 50 mg/l de Compuesto 1 (F) y 500 mg/l de Compuesto 1 (G).

25 La Figura 6 es una fotomicrografía de A) Una partícula de poliestireno HL aminometilado sin recubrimiento, B) Una partícula de poliestireno HL aminometilado sin recubrimiento después de 24 horas de incubación con *Staphylococcus epidermidis*, C) Una partícula de Arginil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-arginil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*, D) Una partícula de Arginil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-arginil-aminoheptanoil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*, E) Una partícula de Arginil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-arginil-fenilalanil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*, F) Una partícula de Arginil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-arginil-fenilalanil-aminoheptanoil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*.

Ejemplo 1

30 Materiales y métodos

Productos Químicos de Síntesis de Péptidos

35 Los aminoácidos protegidos Boc-Arg-OH y Boc-4-fenil-Phe se adquirieron de Bachem AG, mientras que Boc-4-yodofenilalanina se adquirió de Aldrich. La isopropilamina, propilamina, hexilamina, butilamina, hexadecilamina, isobutilamina, ciclohexilamina y ciclopentilamina que forman el extremo C del péptido se adquirieron de Fluka. La Diisopropiletilamina (DIPEA), 1-hidroxibenzotriazol (1-HOBt), hexafluorofosfato de clorotripirrolidinofosfonio (PyCloP) y hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N' tetrametiluronio (HBTU) se adquirieron de Fluka. El ácido 4-n-aminobutírico, ácido 4-n-butilfenilborónico, ácido 4-bifenilborónico, ácido 2-naptilborónico, tri-orto-tolilfosfina, bromuro de bencilo y el acetato de paladio se adquirieron de Aldrich. Los disolventes se adquirieron de Merck, Riedel-de Haën o Aldrich.

Preparación de aminoácidos

40 Preparación de Boc-2,5,7-tri-*terc*-butiltriptofan-OH: Se agita una mezcla de H₂N-Trp-OH (1,8 g, 8,8 mmol), t-BuOH (4,7 g, 63,4 mmol) en ácido trifluoroacético (19 ml) a 70 °C durante 3 horas. El volumen de la solución translúcida de color marrón medio resultante se reduce en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se tritura mediante la adición de 60 ml de NaHCO₃ al 7 % (en peso) gota a gota. El sólido granular gris/blanco obtenido se recupera luego por filtración al vacío y se seca al vacío a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto se aísla por cristalización a partir de una mezcla casi hirviendo de etanol en agua al 40 %. Los volúmenes generalmente son de aproximadamente 20 ml por gramo de producto en bruto.

55 Una primera cristalización en bruto produce un producto aislado de un 80 - 83 % de pureza (HPLC) con respecto a todas las otras sustancias en la muestra y aproximadamente un 94-95 % de pureza con respecto a los análogos conocidos de TBT. Los rendimientos en esta etapa están en el intervalo del 60 al 65 %.

Bencilación de Boc-4-yodofenilalanina. La Boc-4-yodofenilalanina (1 equivalente) se disolvió en metanol en agua al 90 % y se neutralizó mediante la adición de carbonato de cesio hasta un pH alcalino débil (determinado por papel de tornasol). El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, y el agua restante en la sal de cesio de Boc-4-yodofenilalanina se redujo adicionalmente por destilación azeotrópica repetida con tolueno. La sal seca resultante se disolvió en dimetilformamida (DMF), se añadió bromuro de bencilo (1,2 equivalentes) y la mezcla resultante se agitó durante 6 - 8 h. Al final de la reacción, se eliminó la DMF a presión reducida y se formó un aceite que contenía el compuesto del título. Este aceite se disolvió en acetato de etilo y la solución resultante se lavó con volúmenes iguales de solución de ácido cítrico (tres veces), solución de bicarbonato de sodio y salmuera. El compuesto del título se aisló como un aceite de color amarillo pálido con un rendimiento del 85 % por cromatografía ultrarrápida usando diclorometano:acetato de etilo (95:5) como eluyente. La Boc-4-yodofenilalanina de bencilo cristalina se pudo obtener por recristalización en n-heptano.

Procedimiento general para acoplamiento de Suzuki: Se añadió Boc-4-yodofenilalanina de bencilo (1 equivalente), ácido arilborónico (1,5 equivalentes), carbonato de sodio (2 equivalentes), acetato de paladio (0,05 equivalentes) y tri-orto-tolilfosfina (0,1 equivalentes) a una mezcla desgasificada de dimetoxietano (6 ml/mmol de Boc-4-yodofenilalanina de bencilo) y agua (1 ml/mmol de Boc-4-yodofenilalanina de bencilo). La mezcla de reacción se mantuvo en argón y se calentó a 80 °C durante 4-6 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtra a través de un elemento de filtro corto de gel de sílice y carbonato de sodio. La torta de filtro se lavó adicionalmente con acetato de etilo. Los filtrados se combinaron y los disolventes se eliminaron a presión reducida. Los productos se aislaron por cromatografía ultrarrápida utilizando mezclas de acetato de etilo y n-hexano como eluyente.

Preparación de Boc-Phe(4-4'-bifenil)-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61 % a partir de ácido 4-bifenil-borónico usando el procedimiento general para los acoplamiento de Suzuki. Boc-Phe (4-4'-bifenil) -OBn se aisló por recristalización del producto en bruto a partir de n-heptano.

Preparación de Boc-Phe(4-(2'-Naftil)-OBn: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 68 % a partir de ácido 2-naftil-borónico usando el procedimiento general para los acoplamiento de Suzuki. Boc-Phe (4-(2'-Naftil)-OBn se aisló por recristalización del producto en bruto a partir de n-heptano.

Procedimiento general para la desesterificación de ésteres de bencilo: El éster bencilo se disuelve en DMF y se hidrogena durante 2 días a presión ambiente usando Pd al 10% sobre carbono como catalizador. Al final de la reacción, el catalizador se elimina por filtración y el disolvente se elimina a presión reducida. Los ácidos libres se aíslan por recristalización en éter dietílico.

Preparación de Boc-Phe(4-4'-bifenil)-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61 % a partir de Boc-Phe(4-4'-bifenil)-OBn usando el procedimiento general para desesterificación.

Preparación de Boc-Phe(4-(2'-Naftil)-OH: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 68 % a partir de Boc-Phe(4-(2'-Naftil)-OBn usando el procedimiento general para desesterificación.

Procedimiento general para la síntesis de péptidos en fase de Solución usando HBTU. Los péptidos se prepararon en solución mediante acoplamiento de aminoácidos por etapas usando la estrategia de protección con Boc de acuerdo con el siguiente procedimiento general. Se disolvieron la parte del péptido C-terminal con un grupo amino libre (1 eq) y el aminoácido protegido con Boc (1,05 eq) y 1-hidroxibenzotriazol (1-HOBt) (1,8 eq) en DMF (2-4 ml/mmol de componente amino) antes de la adición de diisopropiletilamina (DIPEA) (4,8 eq). La mezcla se enfrió en hielo y se añadió hexafluorofosfato de O- (benzotriazol-1-il) -N,N,N',N' tetrametiluronio (HBTU) (1,2 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1-2 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico, bicarbonato de sodio y salmuera. El disolvente se eliminó al vacío y el grupo protector Boc del péptido resultante se desprotegió en la oscuridad usando TFA al 95 % o cloruro de acetilo en metanol anhidro.

Formación de amida en fase de solución usando PyCloP. Síntesis de Boc-Arg-N(CH₂Ph)₂. Una solución de Boc-Arg-OH (1eq), NH(CH₂Ph)₂ (1,1 eq) y PyCloP (1 eq) en DCM seco (filtrado a través de alúmina) (2 ml) y DMF (1 ml). La solución se enfrió en hielo y se añadió DIPEA (2 eq) con agitación. La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó y se volvió a disolver en acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico, bicarbonato de sodio y salmuera. El disolvente se eliminó al vacío y el grupo protector Boc del péptido resultante se desprotegió en la oscuridad usando TFA al 95 %.

Purificación y análisis de péptidos. Los péptidos se purificaron usando HPLC de fase inversa en una columna Delta-Pak C₁₈ (Waters) (100 Å, 15 µm, 25 x 100 mm) con una mezcla de agua y acetonitrilo (conteniendo ambos TFA al 0,1 %) como eluyente. Los péptidos se analizaron mediante RP-HPLC utilizando una columna Delta-Pak (Waters) C₁₈ (100 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm) y espectrometría de masas por electronebulización de iones positivos en un espectrómetro de masas cuadrupolar VG Quattro (VG Instruments Inc., Altringham, RU).

Cepas Bacterianas y condiciones de crecimiento

Las seis cepas estafilocócicas (2 *S. epidermidis*, 2 *S. haemolyticus* and 2 *S. aureus*) utilizadas en este estudio se

seleccionaron en función de su capacidad de formación de biopelículas previamente conocida (Tabla 1).

Las bacterias se cultivaron durante la noche a 37 °C en caldo Mueller-Hinton II ajustado con cationes (MHIIB).

Tabla 1. Cepas de bacterias usadas en este estudio; susceptibilidad a antibióticos y SAMP y perfil de la biopelícula.

Cepa	Origen	RIF	VAN	TET	LZD	GEN	OXA	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Ica ^d	Biopelícula densidad óptica
SH ^a TUH 51-03	Cultivo de sangre	< 0,016	4	1	0,5	64	>256	8	4	4	+	0,37
SH TUH 51-07	Cultivo de sangre	0,016	2	0,5	0,5	64	>256	8	4	4	+	0,77
SE ^b TUH 08-16	Cultivo de sangre	0,016	2	2	2	256	16	4	2	2	+	0,63
SE RP62AATCC 35984	Cultivo de sangre	< 0,016	4	0,5	1	8	8	8	4	4	+	1,33
SA ^c PIA 9	Fluido de articulación	< 0,016	2	0,5	2	1	1	8	2	4	+	3,20
SA PIA90	Fluido de articulación	0,016	2	0,5	1	0,5	1	8	2	2	+	0,40

^a SH; *Staphylococcus haemolyticus*

^b SE; *Staphylococcus epidermidis*

^c SA; *Staphylococcus aureus*

^d Ica; Detección por PCR de *icaD* como marcador del operón

Antibióticos, SAMP y pruebas de susceptibilidad en condiciones de crecimiento planctónico

Se determinaron las CIM de oxacilina, gentamicina, tetraciclina, vancomicina y linezolidina usando E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) y CIM de rifampicina usando el ensayo de microdilución en caldo. Los puntos de interrupción se interpretaron de acuerdo con los criterios EUCAST. Se seleccionaron 3 SAMP diferentes (Compuestos A, B y C; Lytix Biopharma, Tromsø, Noruega - véase Figura 1) basados en actividades antimicrobianas previamente conocidas, y se determinaron sus CIM exactas con un ensayo de microdilución en caldo. Los 3 SAMP son tripéptidos con dos restos de arginina que proporcionan sus restos catiónicos (Figura 1). La masa lipófila es proporcionada por un derivado de triptófano modificado. La diferencia entre los compuestos es el tamaño de la modificación C-terminal; el Compuesto A tiene la más pequeña y el Compuesto B tiene la modificación C-terminal más grande (Figura 1). Los pesos moleculares de los SAMP están en el intervalo de 700 - 800 Dalton.

Formación de biopelículas y cuantificación de la actividad contra las biopelículas

Se indujo la formación de biopelículas en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Nunc Surface, NUNC, Roskilde, Dinamarca). En primer lugar, los cultivos durante la noche se diluyeron 1:100 en MHIIB (*S. epidermidis* y *S. haemolyticus*) o en caldo de soja triptico (TSB) con glucosa al 5 % y NaCl al 5 % (*S. aureus*). Se añadieron doscientos µl de esta suspensión bacteriana (10^7 ufc/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Después de 24 h, los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las bacterias planctónicas. El procedimiento de lavado se evaluó midiendo la actividad metabólica del PBS con el método Alamar blue, que se describe en detalle a continuación. Las extracciones de ADN y PCR para *icaD*, como un marcador para el operón *ica*, se llevaron a cabo como se indica anteriormente (de Silva et al., J. Clin. Microbiol. [2002] 40: 382-388).

Las biopelículas lavadas se sometieron a tratamiento con antibióticos o SAMP a diferentes concentraciones. Las soluciones madre de la tetraciclina (Sigma Aldrich), vancomicina (Alpharma) y linezolidina (Pfizer) se diluyeron en MHIIB a 5 mg/l, 50 mg/l y 500 mg/l y la rifampicina (Sigma Aldrich) se diluyó en MHIIB a 0,01 mg/l, 0,1 mg/l y 1 mg/l. Las sales de trifluoroacetato de los SAMP se disolvieron en agua estéril y se diluyeron a 5 mg/l, 50 mg/l y 500 mg/l en MHIIB. Se añadieron 200 µl de antibióticos o SAMP, en diferentes concentraciones, a cada pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los controles positivos fueron biopelículas no tratadas, únicamente se añadieron 200 µl de MHIIB. Los controles negativos fueron solo 200 µl de MHIIB, sin bacterias añadidas.

Se cuantificó la actividad metabólica de la biopelícula con un método ligeramente modificado previamente descrito por Pettit et al. en *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:2612-7. En resumen, los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Después se añadieron 250 µl de MHIIB con Alamar blue al 5 % (AB; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a cada pocillo. AB es un indicador redox que emite fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química. El grado de reducción es un reflejo de la viabilidad de las células bacterianas. Tras 1 h de incubación (37 °C, la absorbancia se registró a 570 y 600 nm utilizando el lector de microplacas sintonizable Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Todos los ensayos se realizaron 3 veces con 8 en paralelo. El valor más alto y más bajo de cada ejecución se excluyó de los análisis, y se promediaron los 18 valores restantes.

El método de biopelícula que cuantifica la actividad metabólica se comparó con un método convencional de cuantificación semicuantitativa de biomasa en placas de microtitulación de 96 pocillos. Para estos experimentos, se dejaron crecer biopelículas de 24 h de las 6 cepas estafilocócicas y se analizó la actividad metabólica con AB, tal como se describe anteriormente. La cuantificación de biomasa en las biopelículas de 24 h se realizó mediante tinción de la biopelícula con cristal violeta (CV). Después de la tinción, se añadió etanol:acetona (70:30) a cada pocillo para disolver el cristal violeta restante a lo largo de las paredes de los pocillos. La densidad óptica (DO) se registró después a 570 nm utilizando un espectrofotómetro.

Captura de imágenes de biopelículas

Se usaron alícuotas de un ml de cultivo durante la noche diluido con MHIIB para cultivar la biopelícula de *S. haemolyticus* TUH 51-07 sobre cubreobjetos de plástico (Thermanox, cellculture treated on one side, NUNC, Roskilde, Dinamarca) en placas de 24 pocillos (Falcon 3047, Becton Dickinson, NJ, EE. UU.) durante 24 h. Los cubreobjetos se lavaron después cuidadosamente con PBS, se trasladaron a una nueva placa y se trataron durante 24 h con tetraciclina 50 mg/l y 500 mg/l, vancomicina 50 mg/l y 500 mg/l, o Compuesto A 50 mg/l y 500 mg/l. Los cubreobjetos se lavaron nuevamente con NaCl al 9 % y se tiñeron con un kit LIVE/DEAD (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción contiene SYTO 9 (verde fluorescente) y yoduro de propidio (PI; rojo fluorescente), ambos unidos a ADN. Cuando se usa solo, el SYTO 9 generalmente tiñe todas las bacterias en una población; tanto aquellas con membranas intactas como aquellas con membranas dañadas. Por el contrario, PI penetra solo en las bacterias con membranas dañadas, causando una reducción en la fluorescencia verde del tinte SYTO 9 cuando ambos colorantes están presentes. Se examinaron las biopelículas tratadas y no tratadas con un microscopio confocal de exploración láser (CLSM por sus siglas en inglés) Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania). Las imágenes se obtuvieron usando una lente de inmersión en agua 63X 1,2 NA HCX PL APO. Para la detección de SYTO9 (canal verde), se utilizó la línea de 488 nm del láser de argón y un ancho de banda de detección de 495-515 nm. Para la detección de PI (canal rojo), se utilizó la línea de 561 nm y un ancho de

banda de detección de 615-660 nm. Las dos señales fluorescentes se recogieron secuencialmente a 400 Hz. El análisis y la exportación de imágenes se realizaron en Leica LAS AF versión 1.8.2.

Análisis estadísticos y evaluaciones

5 El porcentaje de reducción de AB se calculó de acuerdo con la fórmula del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U.). Se calcularon las medias y las desviaciones estándares (DE) de todas las mediciones repetidas. La correlación de dos colas de Pearson entre el método AB y el método CV (Figura 2) se calculó en datos promediados de las 6 cepas estafilocócicas. El análisis estadístico se realizó con SPSS para el software de Windows versión 14.0.

10 Se presentaron los valores porcentuales en bruto de la reducción AB, incluido el control positivo y negativo (Figuras 3 y 4). Se definieron dos niveles de supresión antimicrobiana de la actividad metabólica. Se obtuvo una *fuerte* supresión si un agente, después de ajustar el control negativo, a una determinada concentración provocó una reducción $\geq 75\%$ de AB en comparación con el control positivo. Se obtuvo una supresión *completa* si un agente a una determinada concentración provocó una reducción de AB \leq valor de control negativo + 2DE.

Resultados

20 La Tabla 1 anterior resume las CIM de los antibióticos y los SAMP. Las 6 cepas fueron susceptibles a vancomicina, linezolid, rifampicina, vancomicina y tetraciclina. Las dos cepas de *S. aureus* fueron susceptibles a gentamicina y oxacilina, mientras que las otras cuatro cepas estafilocócicas fueron resistentes a estos agentes. Las CIM para los SAMP fueron en general más altos que las CIM para los antibióticos.

25 Hubo una fuerte correlación ($R\ 0,939$, $p = 0,002$) entre la biomasa cuantificada por tinción con CV y la actividad metabólica de la biopelícula cuantificada por la reducción de AB en la biopelícula de 24 h (Figura 2). Hubo una actividad metabólica insignificante en el PBS después del lavado, lo que indica una eliminación casi completa de las bacterias planctónicas de los pocillos (datos no mostrados).

30 Las Figuras 3 y 4 muestran el porcentaje de reducción de AB en biopelícula no tratada y tratada. Con pocas excepciones, los antibióticos probados redujeron la actividad metabólica de todas las cepas en concentraciones alrededor de la CIM. Con concentraciones de antibióticos más altas, aproximadamente 10-20 x CIM, todos los antibióticos provocaron una fuerte supresión de la actividad metabólica, excepto en *S. aureus* PIA9. Sin embargo, solo la tetraciclina fue capaz de causar una supresión completa de la actividad metabólica en una cepa (*S. aureus* PIA 90). Ninguno de los antibióticos provocó una reducción de AB $\geq 50\%$ en la biopelícula de *S. aureus* PIA9. Esta cepa parecía crear una biopelícula completamente resistente a la vancomicina.

40 Los Compuestos A, B y C provocaron una supresión fuerte o completa de la actividad metabólica en todas las biopelículas a concentraciones de 50 mg/l, excepto en *S. aureus* PIA 9. En algunas cepas, incluso una concentración de 5 mg/l fue suficiente para provocar la supresión completa.

45 La Figura 5 muestra imágenes de microscopía confocal de una biopelícula de *S. haemolyticus* TUH 51-07 usando tinción LIVE/DEAD. Como cabía esperar, la biopelícula no tratada mostró células verdes con membranas celulares intactas. En la biopelícula sometida a tratamiento con el Compuesto A en una concentración de 50 mg/l y especialmente 500 mg/l, casi todas las células se tiñeron de rojo, lo que indica bacterias muertas. En la biopelícula sometida a tratamiento con 500 mg/l de tetraciclina, una parte significativa de las células aún está verde, lo que indica bacterias vivas con membrana celular intacta. El tratamiento de la biopelícula con vancomicina (Figura 5d) a una concentración alrededor de los valores máximos obtenidos en la práctica clínica (50 mg/l) mostró predominantemente células verdes (organismos vivos).

50 Todos los SAMP probados fueron claramente más eficaces en la reducción de la actividad metabólica en las biopelículas estafilocócicas a bajas concentraciones en comparación con los antibióticos, a pesar de que generalmente tenían CIM más altas en condiciones de crecimiento planctónico. En condiciones de crecimiento planctónico, todas las cepas utilizadas en este estudio fueron sensibles a vancomicina, linezolid, rifampicina y tetraciclina. La actividad antimicrobiana deficiente de la vancomicina en las biopelículas estafilocócicas se ha indicado anteriormente. En el estudio de los presentes inventores, la vancomicina a 50 mg/l ejerció una fuerte supresión de la actividad metabólica sobre las biopelículas maduras de 4 de las 6 cepas analizadas. Aun así, CLSM confirmó que la mayoría de las bacterias no se inactivaron por esta concentración. En general, los antibióticos rara vez pudieron causar una supresión completa de la actividad metabólica. Por el contrario, Los SAMP fueron capaces de suprimir la actividad metabólica por completo, lo que indica una inactivación eficaz. Las imágenes obtenidas por el CLSM respaldaron aún más este hallazgo. El tratamiento con 500 mg/l de Compuesto A provocó daño a la membrana de todas las células, lo que indica lisis celular en la biopelícula de *S. haemolyticus*. Las biopelículas tratadas con 500 mg/l de tetraciclina todavía contenían un número significativo de células vivas, según lo registrado por la tinción LIVE/DEAD, a pesar de que apenas hubo actividad metabólica medible en el ensayo de la biopelícula correspondiente.

65

Ejemplo 2

Modificación peptídica de la superficie de partículas de poliestireno Preparación de Partículas Recubiertas

- 5 1. A un reactor peptídico de 20 ml se añadieron 560 mg (0,5 mmoles) de partículas HL de poliestireno aminometiladas (malla 100-200, 0,90 mmoles/g de sustitución) que después se lavaron 2 x 10 min con 8 ml de DCM. Después se añadieron 8 ml adicionales de DCM y se permitió que las partículas se hincharan durante 1 hora antes de que se drenase el reactor antes del primer acoplamiento.
- 10 2. A 8 ml de DMF se añadieron 3 equivalentes de aminoácido Boc y 683 mg (3,6 equivalentes) de reactivo de acoplamiento O-(benzotriazol-1-il) -N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU). Inmediatamente antes de la transferencia de la mezcla al reactor, se añadieron 0,855 ml (10 equivalentes) de N-etildiisopropilamina (DIPEA) y la mezcla se transfirió a la reacción en una porción. El reactor se agitó después moderadamente mientras la reacción se dejó que se ejecutara durante la noche a temperatura ambiente.
- 15 3. Las partículas se lavaron después 3 x 15 min con 8 ml de DMF y 2 x 10 min con 8 ml de DCM.
4. En este punto, se extrajo una pequeña muestra del reactor y se sometió a la prueba de Kaiser para determinar si quedaba alguna amina no acoplada.
- 20 5. Si la prueba de Kaiser daba un resultado positivo, el procedimiento se repetía desde e incluyendo el punto 2 con el mismo aminoácido. En el caso de que la prueba fuera negativa (no quedaba amina no acoplada), se añadieron 8 ml de TFA/DCM (1:1) al reactor para eliminar el grupo Boc del aminoácido recién acoplado y el reactor se agitó moderadamente durante 1 hora.
- 25 6. Las partículas se lavaron después 3 x 15 min con 8 ml de DCM y 2 x 10 min con 8 ml de DMF.
7. El procedimiento se repitió desde e incluyendo el punto 2 hasta e incluyendo el punto 6 con el siguiente aminoácido a acoplar.
- 30 8. Cuando la unidad de aminoácidos final ha completado la etapa 5 en el procedimiento descrito anteriormente, las partículas se lavaron 4 x 15 minutos con 8 ml de DCM y se secaron en el reactor en flujo de nitrógeno durante 30 minutos antes de secarse al vacío a temperatura ambiente durante 24 horas. Las partículas se almacenaron después en viales sellados a 4 °C.

35 De la manera descrita anteriormente, las siguientes partículas recubiertas de péptido se prepararon con rendimientos cercanos a los cuantitativos usando los aminoácidos apropiados:

- Argininil- (2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-poliestireno (péptido de acuerdo con la invención)
- 40 Argininil- (2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-aminohexanoil-poliestireno (péptido de acuerdo con la invención)
- Argininil- (2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-fenilalaninil-poliestireno (péptido de acuerdo con la invención)
- 45 Argininil- (2,5,7-tri-*terc*-butil) triptofanil-argininil-fenilalaninil-aminohexanoil-poliestireno (péptido de acuerdo con la invención)

Reducción de la colonización bacteriana de partículas recubiertas en la superficie

50 Las partículas preparadas anteriormente se incubaron con *Staphylococcus epidermidis* durante 24 h. La cantidad de colonización bacteriana sobre la superficie bacteriana se determinó por microscopía de fluorescencia (frecuencia de excitación de 485 nm, frecuencia de emisión de 498 nm) después de la tinción de las bacterias formadoras de biopelículas por Syto9 de acuerdo con los procedimientos convencionales.

55 El efecto sobre la colonización se determinó mediante inspección visual de fotomicrografías de las partículas de poliestireno. La figura 6 muestra la fotomicrografía de:

- A) Una partícula de poliestireno HL aminometilado sin recubrimiento
- B) Una partícula de poliestireno HL aminometilado sin recubrimiento después de 24 horas de incubación con *Staphylococcus epidermidis*
- 60 C) Una partícula de Argininil- 2,5,7-tri-*terc*-butilo)triptofanil-argininil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*
- D) Una partícula de Argininil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-aminohexanoil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*.
- E) Una partícula de Argininil- (2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-fenilalaninil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*
- 65 F) Una partícula de Argininil-(2,5,7-tri-*terc*-butil)triptofanil-argininil-fenilalaninil-aminohexanoil-poliestireno después de 24 h de incubación con *Staphylococcus epidermidis*

La colonización por biopelícula de la partícula de poliestireno en la Figura B) se puede observar fácilmente por la naturaleza esponjosa y peluda de la superficie de la partícula en comparación con la superficie lisa de la partícula de poliestireno en la Figura A). Las Figuras C), D), E) y F) muestran el efecto de los cuatro recubrimientos peptídicos sobre la colonización por *Staphylococcus epidermidis*. El recubrimiento con Arginil- (2,5,7-tri-*terc*-butil) triptofanil-argininil (Figura C)), Arginil- (2,5,7-tri-*terc*-butil) triptofanil-argininil-aminohexanoil (Figura D)), Arginil- (2,5,7-tri-*terc*-butil) triptofanil-argininil-fenilalaninil (Figura E)), y Arginil- (2,5,7-tri-*terc*-butil) triptofanil-argininil-fenilalaninil-aminohexanoil (Figura F)), Se demuestra que cada uno es eficaz para prevenir la formación de biopelículas al impedir la colonización bacteriana.

Ejemplo 3

Formación de biopelículas y cuantificación de la actividad contra las biopelículas

Se indujo la formación de biopelículas en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Nunc Surface, NUNC). En primer lugar, los cultivos durante la noche se diluyeron 1:100 en MHIIB (*S. epidermidis* y *S. haemolyticus*) o en caldo de soja triptico (TSB) con glucosa al 5 % y NaCl al 5 % (*S. aureus*). Se añadieron 200 µl de esta suspensión bacteriana (10^7 ufc/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Después de 24 h, los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las bacterias planctónicas. El procedimiento de lavado se evaluó cuidadosamente midiendo la actividad metabólica del PBS con el método Alamar blue, que se describe en detalle a continuación.

Las biopelículas lavadas se sometieron a tratamiento con los Compuestos a diferentes concentraciones. Las sales de trifluoroacetato de los compuestos se disolvieron en agua estéril y se diluyeron a 5 mg/l, 50 mg/l y 500 mg/l en MHIIB. Se añadieron 200 µl de Compuestos, en diferentes concentraciones, a cada pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los controles positivos fueron biopelículas no tratadas, únicamente se añadieron 200 µl de MHIIB. Los controles negativos fueron solo 200 µl de MHIIB, sin bacterias añadidas.

La actividad metabólica de la biopelícula se cuantificó con un método ligeramente modificado previamente descrito por Pettit et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 2612-7. En resumen, después de las 24 h de incubación con agentes antimicrobianos, los pocillos se lavaron nuevamente dos veces con PBS y después se añadieron 250 µl de MHIIB con Alamar blue al 5% (AB; Biosource, Camarillo, CA, Estados Unidos). AB es un indicador redox que emite fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química. El grado de reducción es un reflejo de la viabilidad de las células bacterianas. Tras 1 h de incubación (37 °C, la absorbancia se registró a 570 y 600 nm utilizando el lector de microplacas sintonizable Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Todos los ensayos se realizaron 3 veces con 8 en paralelo. El valor más alto y más bajo de cada ejecución se excluyó de los análisis, y se promediaron los 18 valores restantes.

Secuencias peptídicas

Péptido	Secuencia
ME 143	R-Phe(4-(2'-naftil)-R-NH-CH(CH ₃) ₂)
ME 171 B	R-W-W-R-NH-CH ₂ CH ₂ Ph
ME 172	W-R-W-W-R-NH-CH ₂ CH ₂ Ph

Concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre bacterias planctónicas

CMI	ME 172	ME 143	ME 171 B
<i>S.epidermidis</i> 8-16	16 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml
<i>S.epidermidis</i> 42-77	16 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml
<i>S. haemolyticus</i> 51-03	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
<i>S.haemolyticus</i> 51-07	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
<i>S.aureus</i> PIA 9	16 µg/ml	64 µg/ml	128 µg/ml
<i>S.aureus</i> PIA 90	32 µg/ml	64 µg/ml	128 µg/ml

Concentración mínima inhibitoria de biopelículas (CMIB) para ME 172 medida como tasa de supervivencia (%)

CMI	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
<i>S.epidermidis</i> 8-16	100	80	20
<i>S.epidermidis</i> 42-77	100	85	10
<i>S. haemolyticus</i> 51-03	100	6	8
<i>S.haemolyticus</i> 51-07	100	41	12
<i>S.aureus</i> PIA 9	100	100	18
<i>S.aureus</i> PIA 90	100	55	10

Concentración mínima inhibitoria de biopelículas (CMIB) para ME 143 medida como tasa de supervivencia (%)

CMI	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
<i>S.epidermidis</i> 8-16	100	75	6

<i>S.epidermidis</i> 42-77	100	80	12
<i>S. haemolyticus</i> 51-03	100	20	9
<i>S.haemolyticus</i> 51-07	100	12	8
<i>S.aureus</i> PIA 9	100	100	14
<i>S.aureus</i> PIA 90	100	80	7

Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas (CMIB) para ME 171B medida como tasa de supervivencia (%)

CMI	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
<i>S.epidermidis</i> 8-16	100	70	4
<i>S.epidermidis</i> 42-77	100	90	10
<i>S. haemolyticus</i> 51-03	100	8	9
<i>S.haemolyticus</i> 51-07	100	60	12
<i>S.aureus</i> PIA 9	100	100	90
<i>S.aureus</i> PIA 90	100	80	5

5 Los datos anteriores muestran que los péptidos de 3 a 5 restos de longitud son eficaces contra las biopelículas a pesar de que su actividad intrínseca contra las bacterias planctónicas es modesta.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido lítico o peptidomimético lítico, en donde dicho péptido o peptidomimético

5 a) tiene una carga neta de al menos más 2;
 b) tiene una longitud de 3 a 5 aminoácidos o es un peptidomimético de tamaño equivalente;
 c) es de naturaleza anfipática, teniendo uno o más grupos lipófilos, comprendiendo uno de dichos grupos lipófilos al menos 7 átomos no de hidrógeno, y en donde

10 (i) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 3 aminoácidos de longitud, en donde, en cualquier orden, 2 de dichos aminoácidos son aminoácidos catiónicos, y 1 de dichos aminoácidos es un aminoácido con un grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados, o

15 (ii) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 4 aminoácidos de longitud, en el que 2 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos son aminoácidos lipófilos, o

(iii) dicho péptido lítico o peptidomimético lítico tiene 5 aminoácidos de longitud, en el que 3 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 2 aminoácidos son aminoácidos lipófilos o en el que 2 aminoácidos son aminoácidos catiónicos y 3 aminoácidos son aminoácidos lipófilos; y

20 d) está fijado covalentemente a un dispositivo médico,

para su uso en la prevención de la formación de una biopelícula en dicho dispositivo médico.

25 2. Un péptido lítico o peptidomimético lítico para su uso como se reivindica en la parte (i) de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido se selecciona del grupo que comprende tributil triptófano (Tbt) y un derivado de bifenilalanina.

3. Un péptido lítico o peptidomimético lítico para su uso como se reivindica en la parte (ii) o parte (iii) de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido lipófilo se selecciona del grupo que comprende fenilalanina, triptófano, tirosina, tributil triptófano (Tbt), bifenilalanina, difenilalanina y un derivado de bifenilalanina.

30 4. Un péptido lítico o peptidomimético lítico para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicho péptido tiene la fórmula (V)



35 en donde, en cualquier orden, 2 de dichos AA (aminoácidos) son aminoácidos catiónicos 1 de dichos AA es un aminoácido con un grupo R lipófilo, teniendo el grupo R, 14-27 átomos no de hidrógeno y conteniendo 2 o más grupos cíclicos que pueden estar fusionados o conectados;

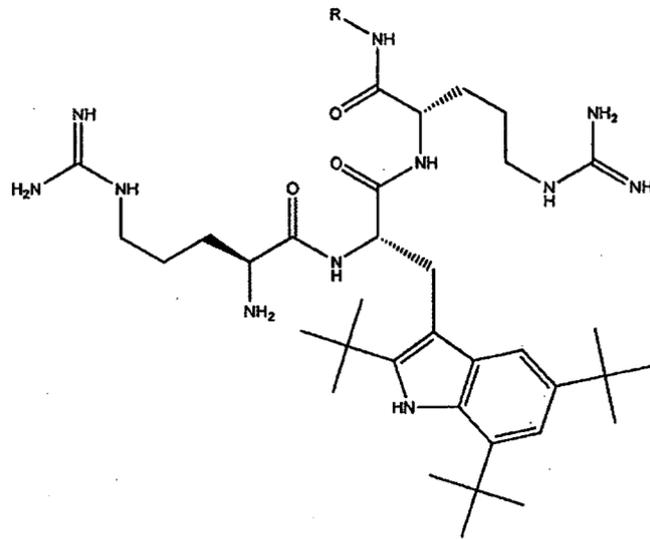
40 R_1 es un átomo de N, que puede estar sustituido por un grupo alquilo o arilo C_1-C_{10} ramificado o no ramificado, grupo que puede incorporar hasta 2 heteroátomos seleccionados de N, O y S; y

R_2 es un resto alifático que tiene 2-20 átomos no de hidrógeno, siendo dicho resto lineal, ramificado o cíclico.

45 5. Un uso *ex vivo* de un péptido lítico o peptidomimético lítico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la prevención de la formación de biopelículas en un dispositivo médico, en donde dicho péptido lítico o peptidomimético lítico está fijado covalentemente a dicho dispositivo médico.

6. El uso de la reivindicación 5 o el péptido lítico o peptidomimético lítico para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha biopelícula comprende bacterias Gram positivas, preferentemente bacterias de *Staphylococcus*, por ejemplo *S. haemolyticus*.

50



Estructura 1

Figura 1

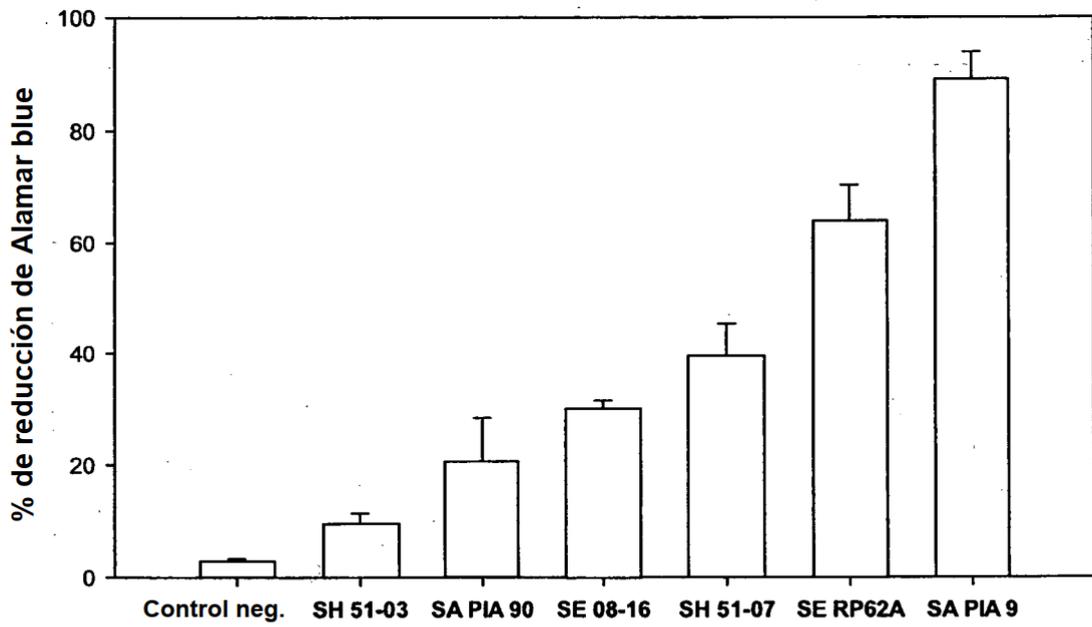
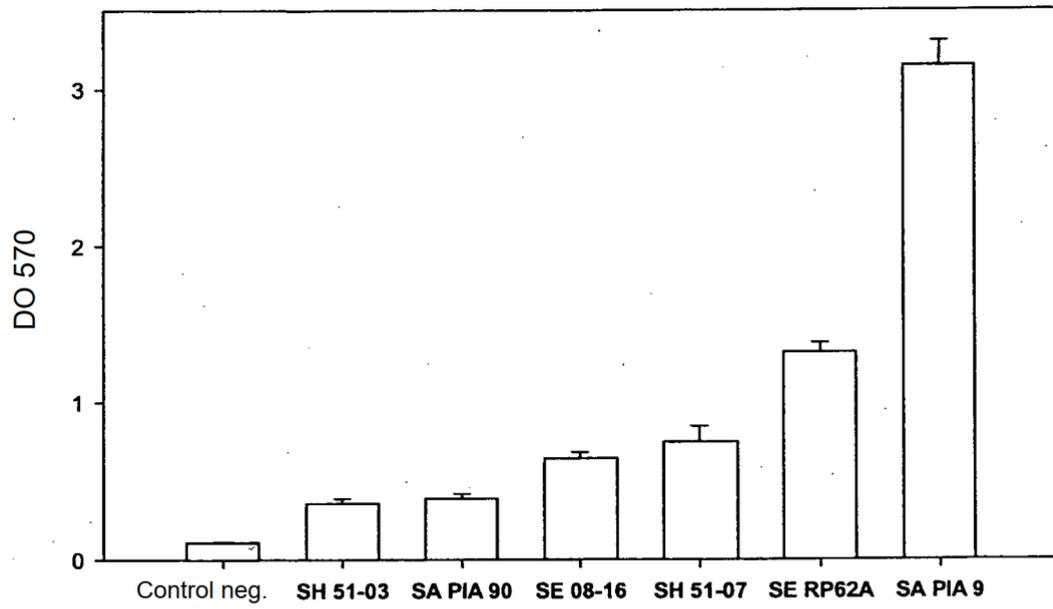
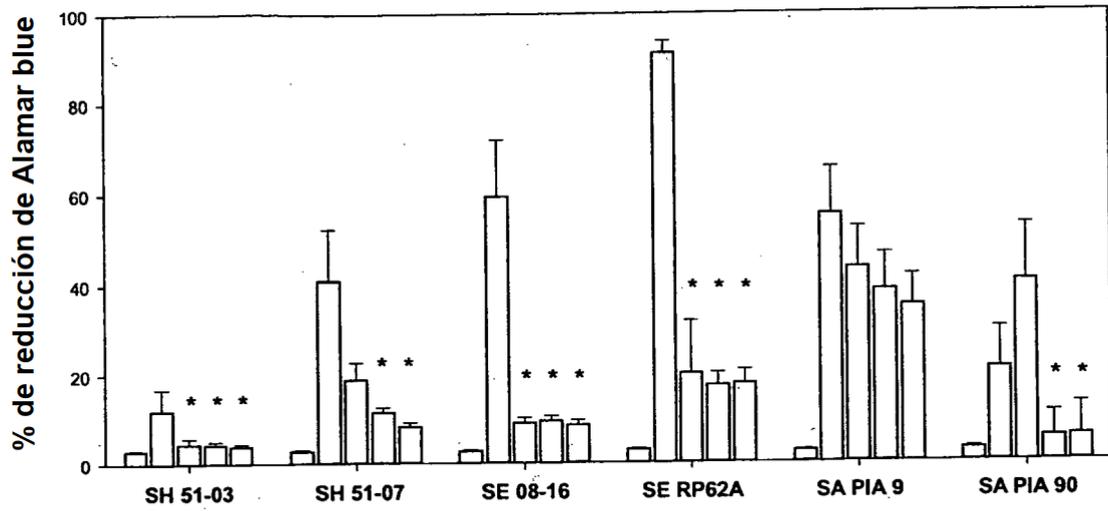


Figura 2



B
Linezolid

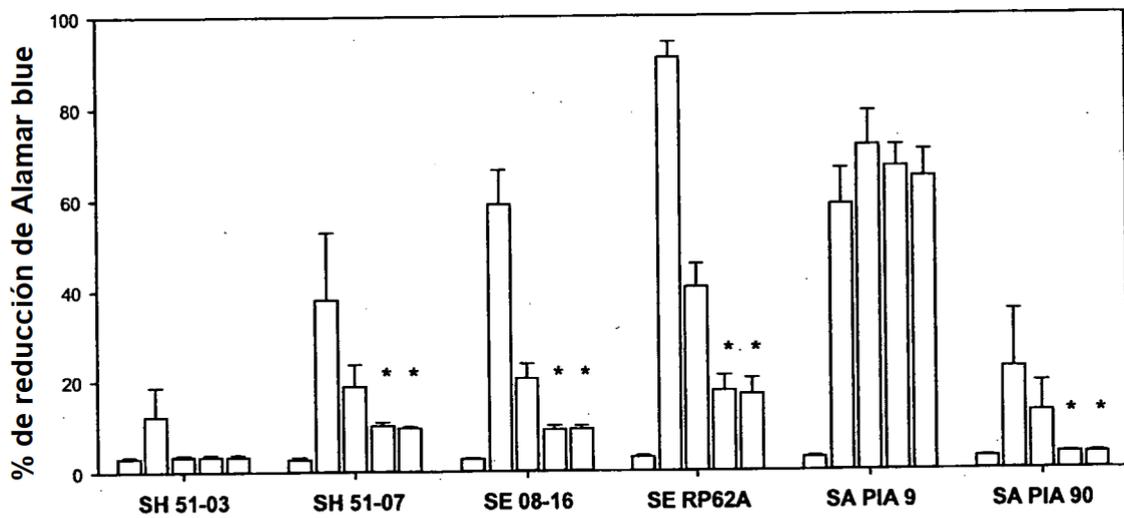
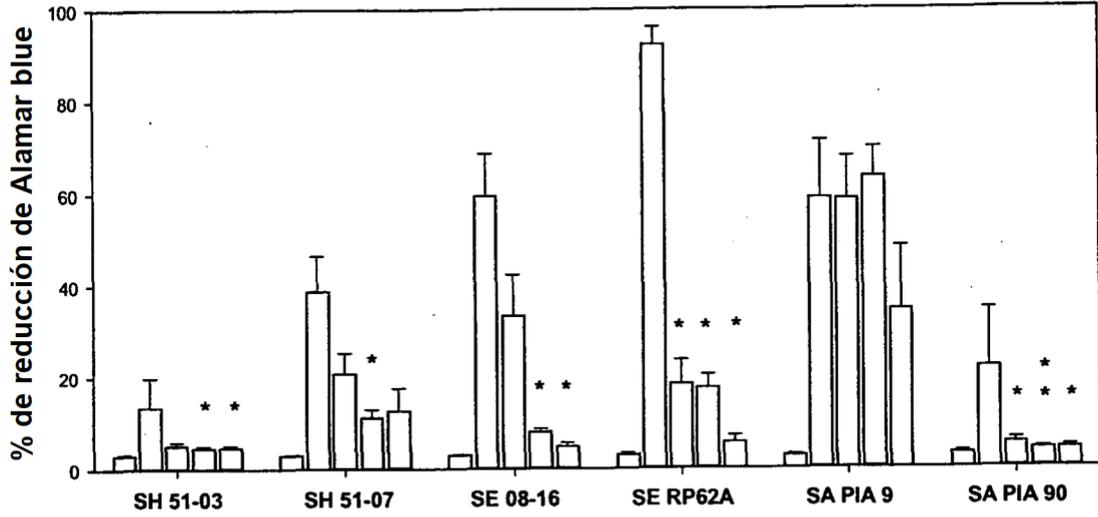


Figura 3 A y B

C
Tetraciclina



D
Vancomicina

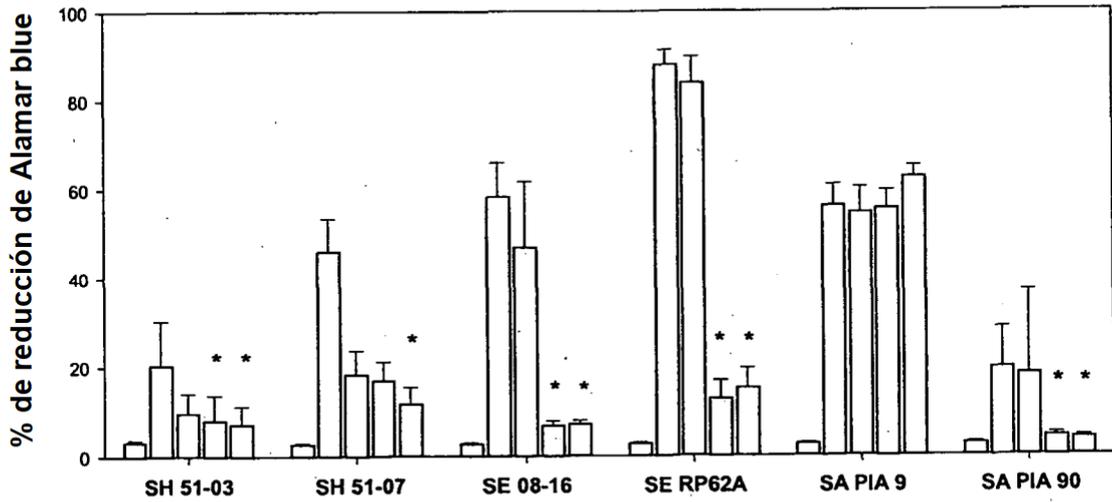
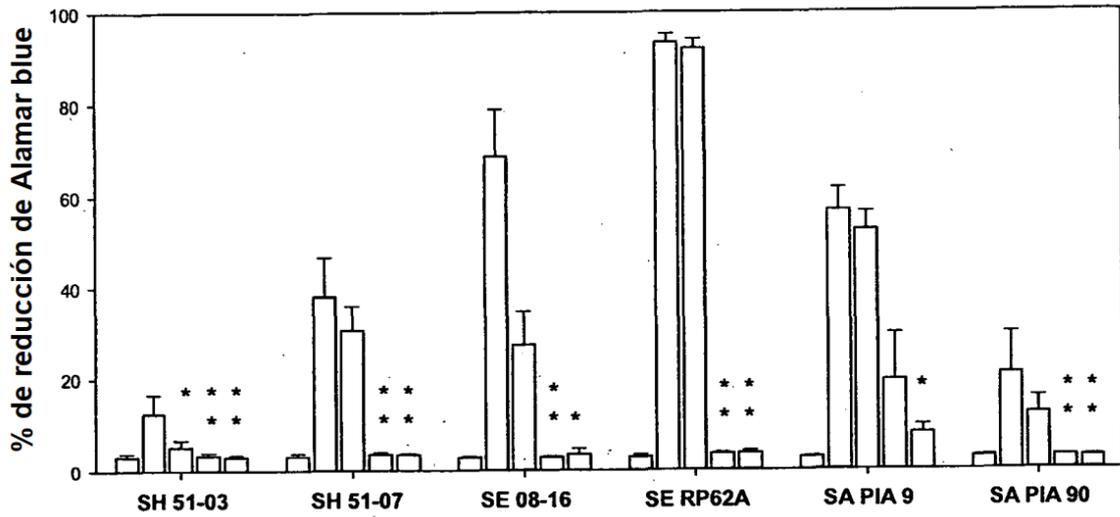


Figura 3 C y D

A

Compuesto A



B

Compuesto B

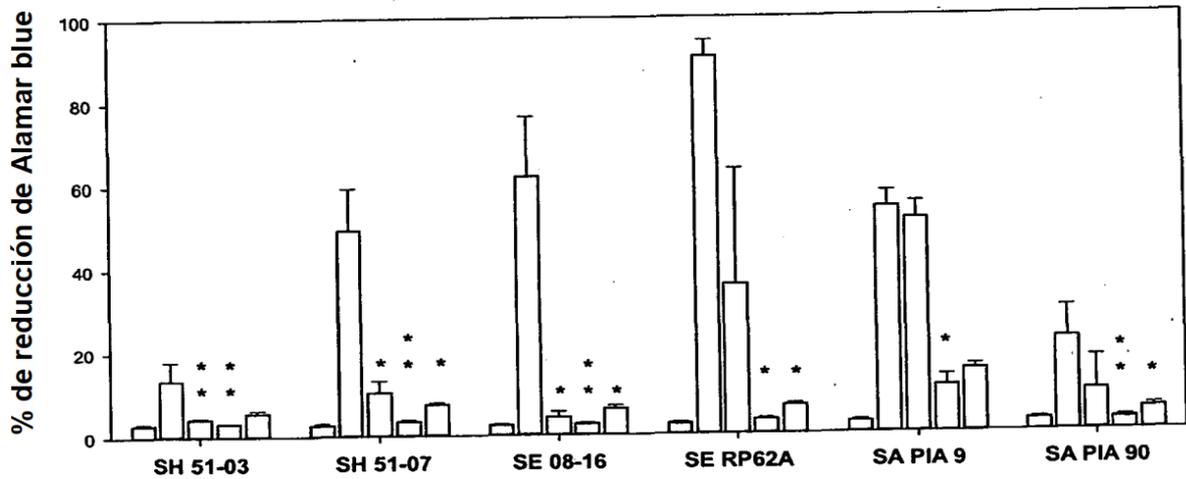


Figura 4 A y B

C

Compuesto C

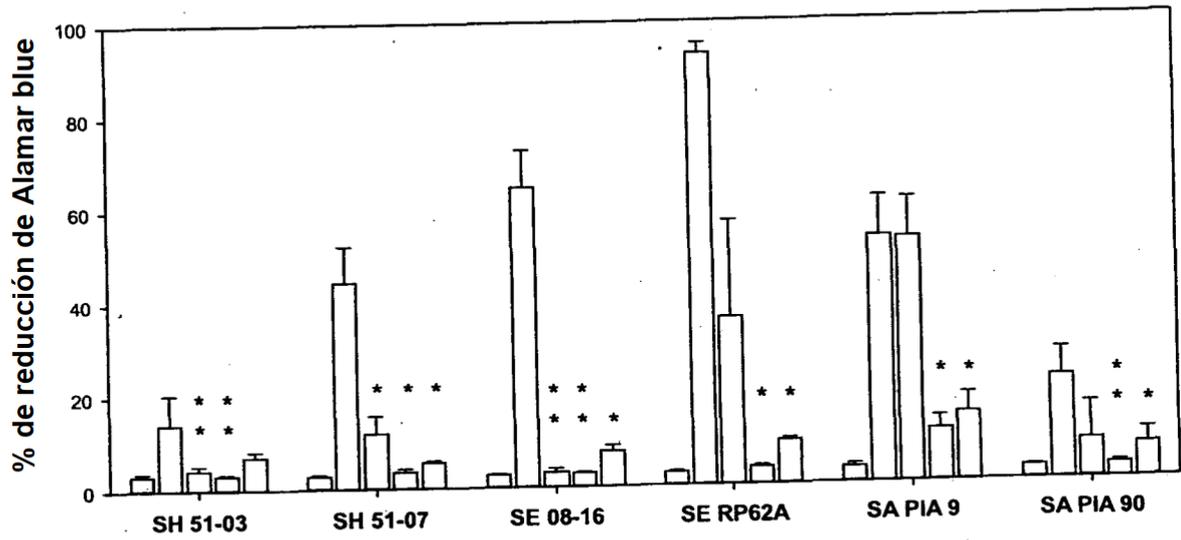


Figura 4 C

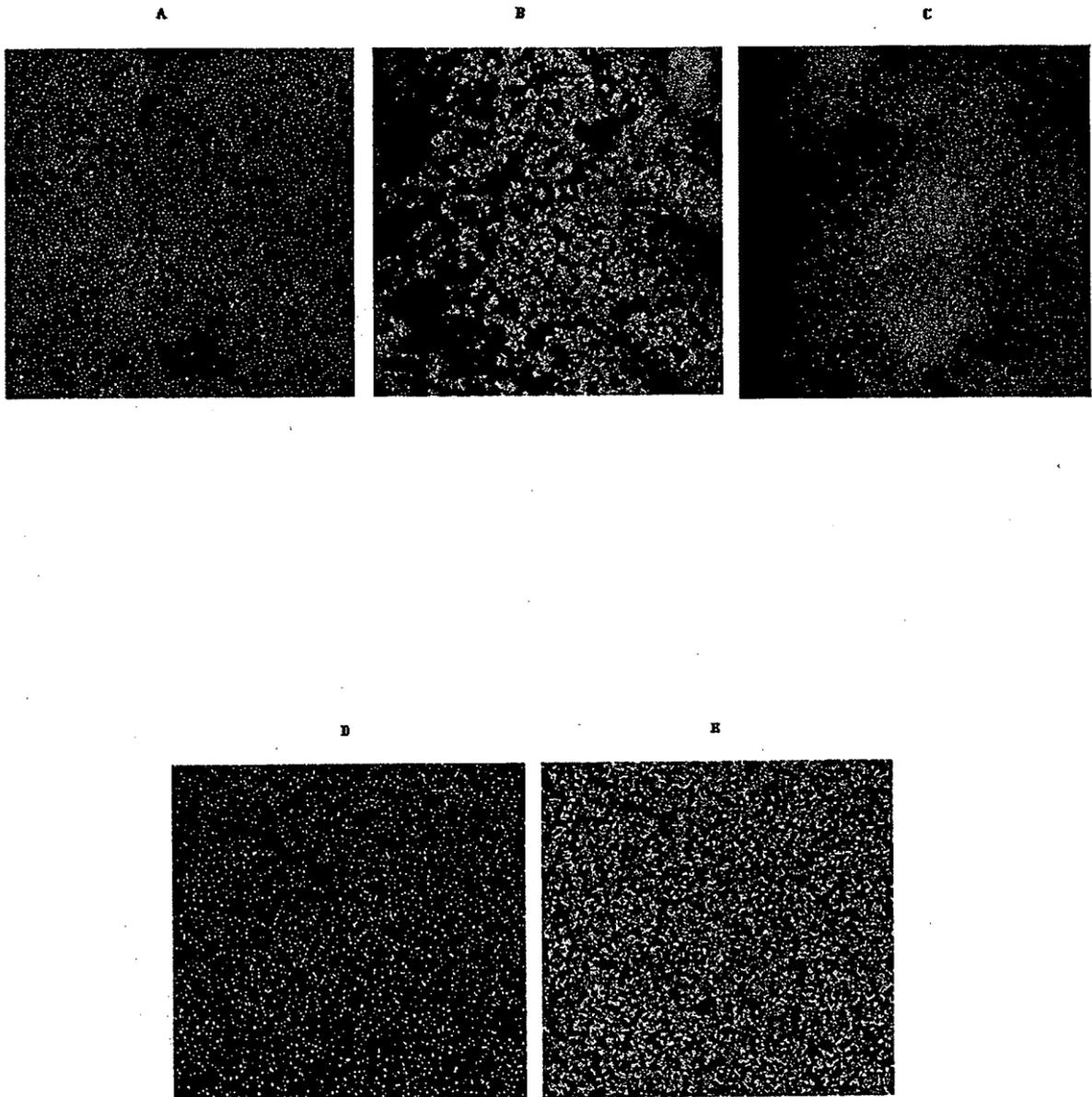


Figura 5 A-E

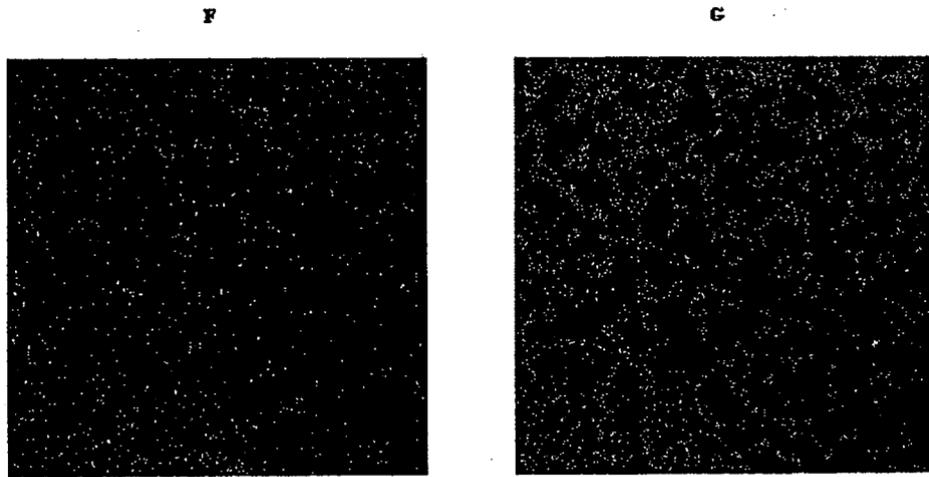


Figura 5 F y G

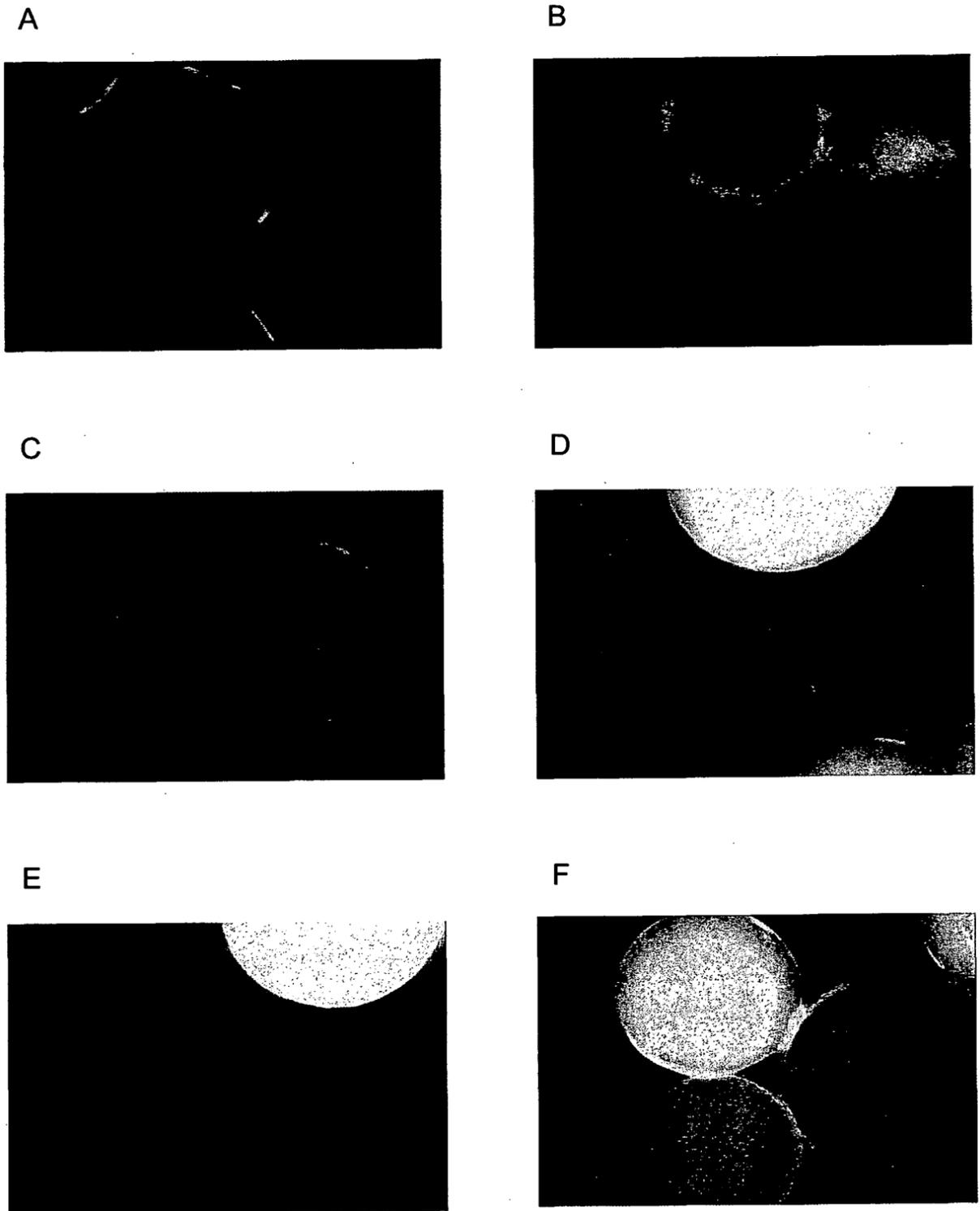


Fig. 6