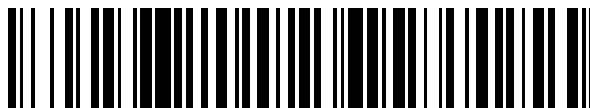


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 526 580**

21) Número de solicitud: 201331031

51) Int. Cl.:

C07D 211/46 (2006.01)

A61K 31/221 (2006.01)

C07C 229/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22) Fecha de presentación:

08.07.2013

43) Fecha de publicación de la solicitud:

13.01.2015

Fecha de la concesión:

16.10.2015

45) Fecha de publicación de la concesión:

23.10.2015

73) Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (30.0%)**

Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ (70.0%)

72) Inventor/es:

RETAMOSA HERNÁNDEZ, M^a Gracia;

MAESTRO GARCÍA-DONAS, Beatriz;

DÍEZ MARTÍNEZ, Roberto;

GARCÍA GONZÁLEZ, Pedro y

SANZ MORALES, Jesús Miguel

74) Agente/Representante:

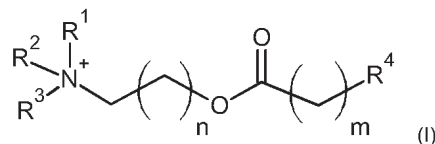
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54) Título: **Uso de un compuesto de fórmula (I) como bactericida frente a Streptococcus**

57) Resumen:

Uso de un compuesto de fórmula (I) como bactericida frente a Streptococcus.

Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) donde R¹ es alquilo C₁-C₆ o forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R²; R² es alquilo C₁-C₆, forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R¹, o es una cadena alquílica que se une a (CH₂)_n formando una amina bicíclica; R³ es alquilo C₁-C₂ o ausente; R⁴ es un sustituyente aromático que comprende al menos dos anillos aromáticos; n es un valor entre 1 y 2; y m es un valor entre 0 y 1; como bactericida frente a *Streptococcus*, preferiblemente frente a *Streptococcus pneumoniae*. Adicionalmente, compuesto de fórmula (Ia) y una composición bactericida que lo comprenda.



ES 2 526 580 B1

DESCRIPCIÓN

USO DE UN COMPUESTO DE FÓRMULA (I) COMO BACTERICIDA FRENTE A *Streptococcus*

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere uso de un compuesto químico, preferiblemente análogo de colina, atropina o ipratropio, capaz de inhibir las proteínas de unión a colina (CBPs) de *Streptococcus*, en particular *S. pneumoniae* o neumococo, y, por ello, con efecto bactericida contra estos microorganismos.

Estado de la técnica

Neumococo es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa que constituye hoy en día uno de los patógenos humanos más importantes y una causa fundamental de graves infecciones invasivas como la meningitis o bacteriemia, y de enfermedades que afectan al tracto respiratorio superior tal como otitis media y sinusitis, o al tracto respiratorio inferior tal como la neumonía (Tan, 2003. Curr. Opin. Infect. Dis. 16:271-277). Esta bacteria forma parte, de manera asintomática, de la microbiota del tracto respiratorio superior de niños sanos y, menos frecuentemente, de adultos sanos, y la colonización comienza poco después del nacimiento, lo que se conoce como estado de portador. Se ha estimado que las enfermedades neumocócicas causan la muerte de 1,6 millones de personas anualmente en todo el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo (World Health Organization, 2007. Wkly. Epidemiol. Rec. 82: 93-104; Klugman et al. 2007. Curr. Opin. Infect. Dis. 20: 11-15).

Tradicionalmente, la penicilina y sus derivados han constituido la primera opción para el tratamiento de las enfermedades neumocócicas, si bien el problema de la aparición de cepas resistentes a antibióticos ha supuesto un tema de la máxima preocupación. Retrospectivamente, los primeros neumococos multirresistentes y con alta resistencia a penicilina (MIC \geq 2 μ g/ml) se describieron en Sudáfrica en 1978 (Jacobs et al. 1978. N. Engl. J. Med. 299:735-740) y desde entonces su diseminación se ha debido fundamentalmente a la dispersión de una decena de clones predominantes (Corso et al. 1998. Microb. Drug Resist. 4:325-337). En la actualidad este tipo de cepas están distribuidas por todo el mundo: en Estados Unidos, alrededor del 44% de todas las cepas de neumococo son resistentes a

β -lactámicos mientras que en el sur de Europa se ha pasado de un 5% a un 50% de resistencia en sólo una década (Cartwright, 2002. Eur. J. Pediatr. 161: 188-195). En España, el aumento gradual de neumococos resistentes a penicilina se dio sobre todo en los años 80 del pasado siglo hasta alcanzar cifras del 50-60% entre los aislados pediátricos invasivos y no invasivos (Liñares et al. 2000. En: Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, New York: Mary Ann Liebert, pp. 399-407). No obstante, en un estudio llevado a cabo entre los años 2001 y 2003, se detectó un descenso en el número de cepas resistentes a penicilina en la población infantil, en coincidencia con un descenso en el consumo de antibióticos y con la introducción en 2001 de la vacuna heptavalente PCV7 (Oteo et al. 2004. J. Clin. Microbiol. 42:5571-5577).

Actualmente, las cepas resistentes a β -lactámicos se suelen tratar eficazmente con quinolonas o macrólidos, aunque también se han descrito situaciones de resistencia frente a antibióticos de estas familias (Low, 2005. Clin. Infect. Dis. 40:236-238). La vancomicina es el antibiótico utilizado como último recurso para casos de cepas multirresistentes pero ya se han empezado a documentar casos en los que se ha observado tolerancia a este fármaco (Moscoso et al. 2011. Environ. Microbiol. Rep. 3:640-650). De todos estos datos se deduce por lo tanto un escenario preocupante en el que la resistencia creciente a los antibióticos tradicionales constituye una seria amenaza contra la que hay que luchar identificando nuevas dianas alternativas para el desarrollo de antimicrobianos novedosos.

En este sentido, *S. pneumoniae* posee una familia de polipéptidos, denominados proteínas de unión a colina (CBPs), que reconocen específicamente como sitio de anclaje los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared y membrana celular, respectivamente. El número de CBPs en neumococo depende de la cepa bacteriana pero parece variar entre 10 y 15 (Tettelin et al. 2001. Science 293:498-506; Hoskins et al. 2001. J. Bacteriol. 183:5709-5717). Con la excepción de CbpF, cuya estructura tridimensional indica que está formada exclusivamente por repeticiones de unión a colina, (Molina et al. 2009. EMBO Rep. 10:246-251), todas las CBPs son proteínas modulares compuestas por, al menos, dos módulos diferentes, uno de reconocimiento de colina y otro funcional responsable de la actividad biológica de cada proteína, sea ésta enzimática o no (Swiatlo et al. 2004. En: The Pneumococcus. Tuomanen, E.I., Mitchell, T. J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D. C.: ASM Press, pp. 49-60). Se sabe desde hace tiempo que las CBPs desempeñan papeles fisiológicos importantes en procesos tales como la separación de las células hijas o la autólisis espontánea tanto en la fase estacionaria como la producida

por los antibióticos β -lactámicos (López y García, 2004. FEMS Microbiol. Rev. 28:553-580). Más recientemente, se ha demostrado la implicación de algunas CBPs en otros procesos tales como la formación de biopelículas (Moscoso et al. 2006. J. Bacteriol. 188:7785-7795), la tolerancia frente a glicopéptidos (Moscoso et al. 2011. Environ. Microbiol. Rep. 3:640-650), o el denominado “fratricidio” por el cual la inducción del estado de competencia para transformación genética induce la síntesis, en las células competentes, de una serie de proteínas (incluidas varias CBPs) que lisan a otros neumococos no competentes que están presentes en el mismo hábitat (Claverys y Havarstein, 2007. Nat. Rev. Microbiol. 5:219-229).

Además de neumococo, otras bacterias también tienen CBPs aunque en menor número. Entre ellas se encuentran algunas cepas pertenecientes al grupo Mitis, como *Streptococcus oralis* o *Streptococcus mitis* B6 (Madhour et al. 2011. Iran. J. Microbiol. 3:58-67). Sólo en ciertos genes codificantes de CBPs se puede asignar los homólogos correspondientes a las CBPs de neumococo, por lo que posiblemente la dotación de este tipo de proteínas superficiales en estas bacterias sea menor que la encontrada en neumococo.

Todos los fagos de neumococo, tanto líticos como atemperados, codifican mureína hidrolasas (endolisinas) pertenecientes a la familia de las CBPs, con la única excepción del fago Cp-7 (Bustamante et al. 2010. J. Biol. Chem. 285:33184-33196). De forma general, estas endolisinas forman parte del cassette lítico que la gran mayoría de los fagos usan como estrategia para romper la pared celular de la bacteria hospedadora al final de su ciclo lítico intracelular. En este sentido, algunas de estas enzimas fágicas purificadas, denominadas “enzibióticos”, se han empleado como agentes antimicrobianos capaces de provocar la lisis de las bacterias susceptibles en ensayos in vitro e in vivo (Fischetti, 2010. Int. J. Med. Microbiol. 300:357-362).

El módulo de unión a colina de las CBPs está formado por varias repeticiones de unos 20 aminoácidos cada una (Pérez-Dorado et al. 2012. Mol. Oral Microbiol. 27:221-245; Código PFAM PF01473). A partir de las estructuras cristalográficas de varias CBPs enteras, o de sus módulos de unión a colina, se ha podido concluir que cada repetición se pliega formando una horquilla β , lo que da lugar a una superhélice levógira con forma característica de solenoide que constituye el módulo de unión a colina de cada proteína. Los sitios de unión a colina se localizan en la interfase de dos repeticiones consecutivas, donde tres residuos aromáticos estructuralmente conservados, generalmente dos triptófanos de la

primera repetición y una tirosina de la siguiente, forman una cavidad en la que el grupo trimetil amonio se estabiliza fundamentalmente por interacciones catión- π .

Se ha demostrado que la adición exógena de colina a cultivos de neumococo compite con los residuos de colina de la pared celular por la unión a las CBPs y, por lo tanto, inhibe la actividad de éstas; entre otras LytA, responsable de la autólisis, y LytB, responsable de la separación de las células hijas al final de la división celular. Esta inhibición provoca la formación de largas cadenas y que el cultivo no se lise (Briese et al. 1985. Eur. J. Biochem. 146: 417-427). El encadenamiento inhibe la diseminación de las células hijas y por tanto la infectividad se ve disminuida por este motivo. Sin embargo, la utilización de colina como agente terapéutico se ve impedida por las altas concentraciones necesarias y la existencia de efectos secundarios derivados de la interacción de la colina con los receptores muscarínicos del individuo, lo que hace necesaria la investigación sobre compuestos alternativos.

En experimentos llevados a cabo hace varios años se demostró que el módulo C-LytA, la región C-terminal de la autolisina LytA de neumococo, es capaz de reconocer varios análogos de colina con similar o mayor afinidad que esta última (Sanz et al. 1988. FEBS Lett. 232: 308-312; Fernández-Tornero et al 2005, J Biol Chem. 280:19948-57). De acuerdo con estos estudios, el requisito mínimo necesario para constituir un ligando de las CBPs es el de ser una amina terciaria. De entre los más recientes análogos de colina ensayados como inhibidores de las CBPs cabe destacar los ésteres de aminas bicíclicas tales como la atropina e ipratropio, donde se pudo observar que estos compuestos no sólo presentaban mayor afinidad por las proteínas que la propia colina, sino que podían detener el crecimiento bacteriano e inducir la formación de células deformadas, además de disminuir la viabilidad celular en más de un 90% (Maestro et al. 2007. FEBS J. 274: 364-376), ocupando los sitios de unión a colina y, de este modo, impidiendo el reconocimiento de este aminoalcohol en la pared celular.

Los compuestos mencionados en (Maestro et al. 2007. FEBS J. 274: 364-376) poseen, además del grupo amina bicíclico, un anillo aromático. En el artículo se mencionaba únicamente la importancia de la existencia de un grupo aromático unido a la amina bicíclica a una cierta distancia de la misma, puesto que la amina bicíclica aisladamente no era capaz de reproducir el efecto biofísico de interacción fuerte con las CBPs. Dado que otros análogos de colina también con anillos aromáticos no eran capaces, en el artículo citado, de interaccionar con las CBPs con la misma intensidad, se desprende que la mera existencia

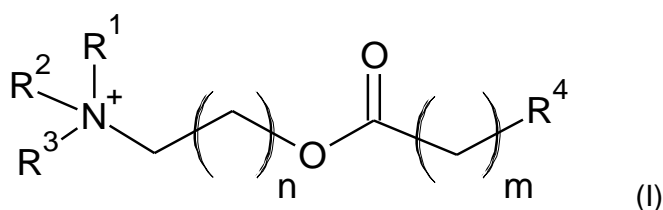
de un anillo aromático no es condición suficiente para convertir cualquier amina terciaria o cuaternaria en un agente antineumocócico.

Breve descripción de la invención

- 5 Los ensayos realizados por los inventores muestran que los compuestos fórmula (I) consiguen disminuir la viabilidad de *Streptococcus pneumoniae in vitro* en niveles significativos, preferiblemente cuando se añaden al principio de la fase exponencial de crecimiento en cultivos en fase líquida.
- 10 Dada la importancia de las diferentes funciones que juegan las CBPs en la fisiología de neumococo y el papel de algunas como factores de virulencia, además del hecho de que son comunes a todos los serotipos neumocócicos, la inhibición funcional de todas estas proteínas constituye una aproximación prometedora como nueva terapia frente a este importante patógeno. Además, al compartir todas las CBPs un mecanismo muy similar de
- 15 reconocimiento de colina en la pared celular, el descubrimiento de un compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente, capaz de interferir en este reconocimiento constituye adicionalmente la obtención de un inhibidor simultáneo de toda la familia de CBPs, lo que dada la gran variedad de estas proteínas, dificultará significativamente la aparición de resistencias frente a dichas moléculas.

20

Así, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I)



donde

- 25 R^1 es alquilo C_1-C_6 o forma N-cicloalquilo C_5-C_8 junto con R^2 ,
 R^2 es alquilo C_1-C_6 , forma N-cicloalquilo C_5-C_8 junto con R^1 , o es una cadena alquílica que se une a $(CH_2)_n$ formando una amina bicíclica,
 R^3 es alquilo C_1-C_2 o ausente,
 R^4 es un sustituyente aromático que comprende al menos dos anillos
- 30 aromáticos,
 n es un valor entre 1 y 2, y

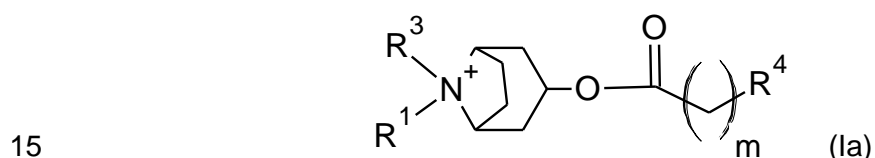
m es un valor entre 0 y 1;

como bactericida frente a *Streptococcus*, preferiblemente *S. pneumoniae*.

Los compuestos de fórmula (I) pueden utilizarse como bactericidas frente a diversas bacterias del género *Streptococcus* tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis* o *Streptococcus mitis*, siendo preferible el uso frente a *Streptococcus pneumoniae*.

Nada hace pensar, en vista del estado de la técnica conocido hasta el momento, que la modificación de los compuestos divulgados incorporando dos o más anillos aromáticos supondría una mejora sensible en cuanto a su efecto biofísico y microbiológico. Asimismo, nada hace pensar tampoco que el grupo hidroximetilo de atropina e ipratropio, esencial para su interacción con los receptores muscarínicos, y que está ausente en los compuestos que aquí se presentan, pudiera ser prescindible en cuanto a su acción antibacteriana.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al compuesto de fórmula (Ia)



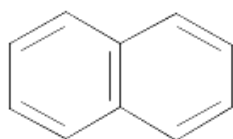
donde

R¹ es alquilo C₁-C₂,

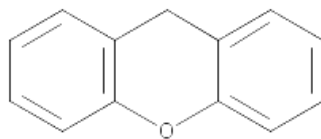
R³ es alquilo C₁-C₆ o ausente,

m es un valor entre 0 y 1; y

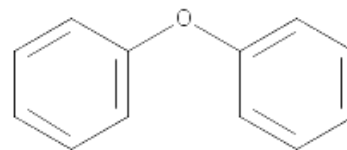
20 R⁴ es un arilo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C, D, E, F y G, donde:



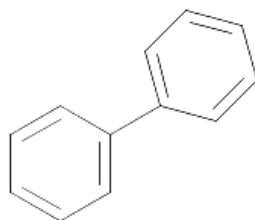
A



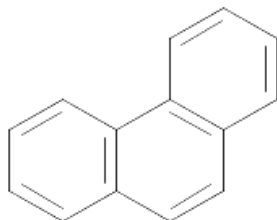
B



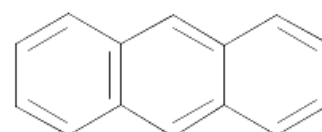
C



D

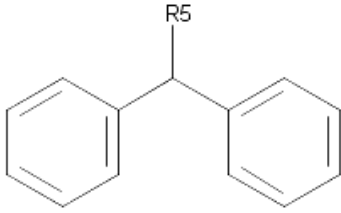


E



F

25

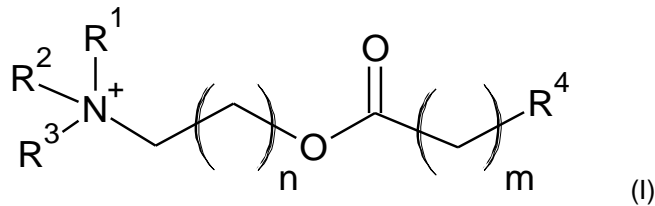


G

donde R⁵ es alquilo C₁-C₂.

5 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I)



10

R¹ es alquilo C₁-C₆ o forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R²,

R² es alquilo C₁-C₆, forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R¹, o es una cadena alquílica que se une a (CH₂)_n formando una amina bicíclica,

R³ es alquilo C₁-C₂ o ausente,

15

R⁴ es un sustituyente aromático que comprende al menos dos anillos aromáticos,

n es un valor entre 1 y 2, y

m es un valor entre 0 y 1;

20

como bactericida frente a *Streptococcus*. Preferiblemente, frente a *Streptococcus pneumoniae*.

25

En esta solicitud de patente, a no ser que se especifique lo contrario, se entiende por "alquilo C₁-C₆" una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de 1 a 6 átomos de carbono, o un cicloalquilo C₅-C₆, en ambos casos sin sustituyentes polares. Preferiblemente, el alquilo C₁-C₆ se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, butilo, isopropilo y ciclohexilo.

En esta solicitud de patente, a no ser que se especifique lo contrario, se entiende por “N-cicloalquilo C₅-C₈” una cadena hidrocarbonada no ramificada, sin sustituyentes polares y que se cicla sobre el átomo de nitrógeno. Preferiblemente, R¹-N-R² representa un grupo piperidino.

5

En esta solicitud de patente, a no ser que se especifique lo contrario, se entiende por “amina bicíclica” aquélla formada por dos ciclos hidrocarbonados, es decir, R² es una cadena alquílica que se une con (CH₂)_n formado un primer anillo, preferiblemente de 6 miembros, y a través de sendas ramificaciones que parten de R² y (CH₂)_n se forma el segundo anillo.

10 Preferiblemente, la amina bicíclica forma con (CH₂)_n una estructura de 8-azabicyclo[3.2.1]octano.

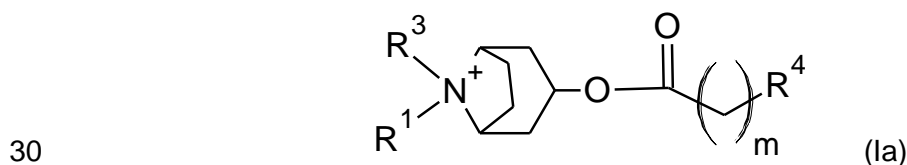
Adicionalmente, en esta solicitud de patente, se entiende por “sustituyente aromático que comprende al menos dos anillos aromáticos”, un sustituyente aromático con dos o más
15 anillos aromáticos no heterocíclicos, pudiendo dichos anillos estar fusionados o no, y sustituidos o no. Preferentemente los anillos aromáticos contienen 6 átomos de carbono.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I), donde

20 R¹ es alquilo C₁-C₂,
R² se une a (CH₂)_n formando una amina bicíclica del tipo 8-azabicyclo[3.2.1]octano, y
R³ es alquilo C₁-C₆ o ausente.

Preferiblemente, R³ se selecciona del grupo que consiste en ausente, metilo, etilo, butilo,
25 isopropilo y ciclohexilo. Más preferiblemente, está ausente o se selecciona entre etilo y metilo.

En una realización aún más preferida, el compuesto de la presente invención para usar como bactericida frente a *Streptococcus* tiene una fórmula (Ia),



donde R¹ es alquilo C₁-C₂, preferiblemente metilo, y

R³ es alquilo C₁-C₆ o ausente, preferiblemente ausente o etilo.

Los compuestos de fórmula (Ia) muestran un efecto antimicrobiano mucho mayor que los de fórmula (I) donde R^2 es alquilo o forma un N-cicloalquilo junto a R^1 .

5 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I), donde

R^1 es alquilo C_1-C_2 o forma un cicloalquilo C_5-C_8 con R^2 ,

R^2 es alquilo C_1-C_6 o forma un cicloalquilo C_5-C_8 con R^1 ,

R^3 es alquilo C_1-C_6 o ausente.

10

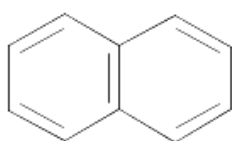
Preferiblemente, R^3 se selecciona del grupo que consiste en ausente, metilo, etilo, butilo, isopropilo y ciclohexilo. Más preferiblemente, ausente o se selecciona entre etilo y metilo.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula (I),
15 preferiblemente al compuesto de fórmula (Ia), para usar como bactericida frente a *Streptococcus*, preferiblemente *S. pneumoniae*, tal como se describe en esta solicitud de patente, donde R^3 está ausente, es decir, el compuesto de fórmula (I) comprende una amina terciaria.

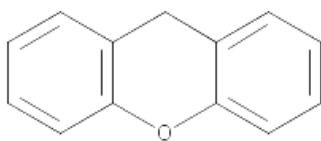
20 Tal como se muestra en el apartado de ejemplos, las aminas terciarias son más efectivas a la hora de lisar los cultivos de neumococo que las cuaternarias, siendo más evidente esta distinción en las aminas bicíclicas de fórmula (Ia).

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto de
25 fórmula (I), preferiblemente compuesto de fórmula (Ia), tal como se describe en esta solicitud de patente, donde R^4 es un arilo que comprende dos o tres anillos aromáticos, pudiendo estos anillos ser adyacentes o estar separados.

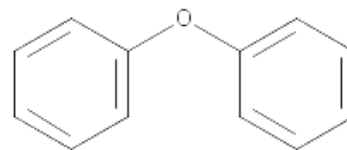
En una realización aún más preferida, R^4 es un arilo seleccionado del grupo que consiste en
30 A, B, C, D, E, F y G.



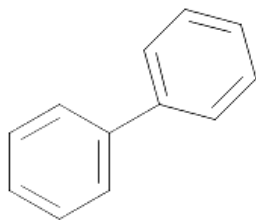
A



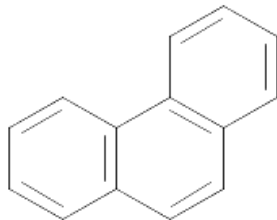
B



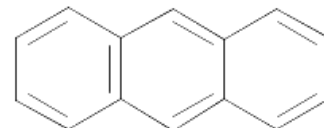
C



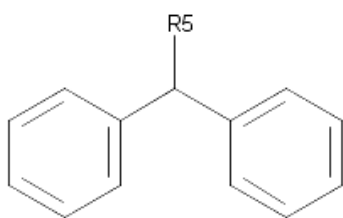
D



E



F



G

5 donde R⁵ es alquilo C₁-C₂.

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más sustituyentes en los anillos aromáticos. Sin embargo, no han de contener heteroátomos como parte de los mencionados anillos aromáticos.

10

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) como bactericida frente a *Streptococcus*, preferiblemente *S. pneumoniae*, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en los incluidos en la Tabla 1.

15

Tabla 1: compuestos de fórmula (I) preferidos.

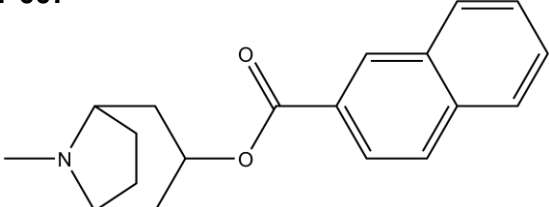
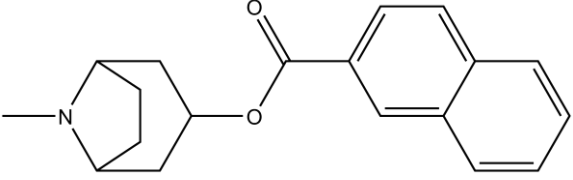
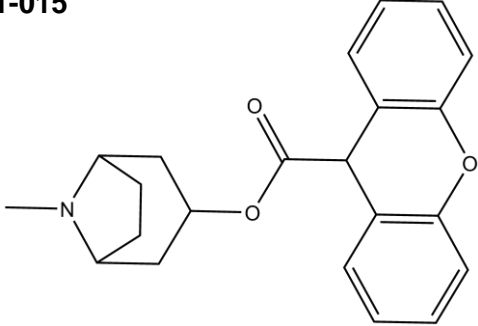
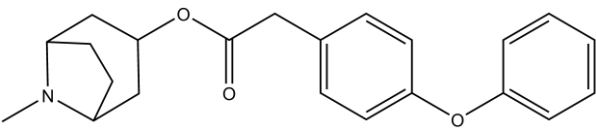
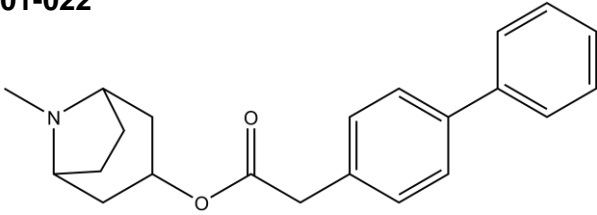
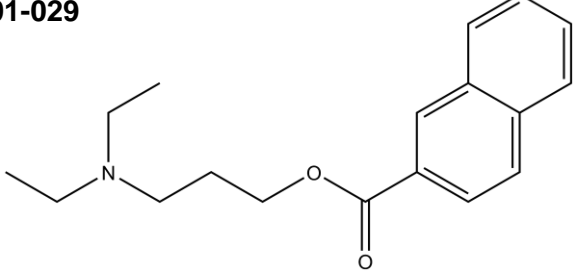
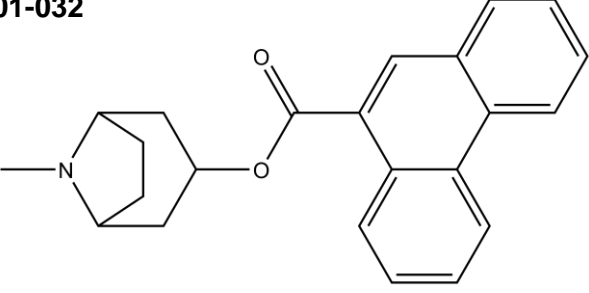
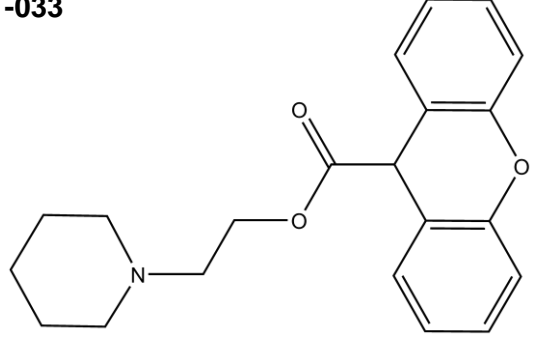
<p>01-007</p>  <p>2-(Naftalen-2-il) acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>	<p>01-008</p>  <p>2-Naftoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>
<p>01-015</p>  <p>9H-Xanteno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>	<p>01-019</p>  <p>2-(4-Fenoxifenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>
<p>01-022</p>  <p>2-(Bifenil-4-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>	<p>01-029</p>  <p>2-Naftoato de 3-dietilaminopropilo</p>
<p>01-032</p>  <p>Fenantreno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>	<p>01-033</p>  <p>9H-xanteno-9-carboxilato de 2-(piperidin-1-il)etilo</p>

Tabla 1: compuestos de fórmula (I) preferidos (continuación)

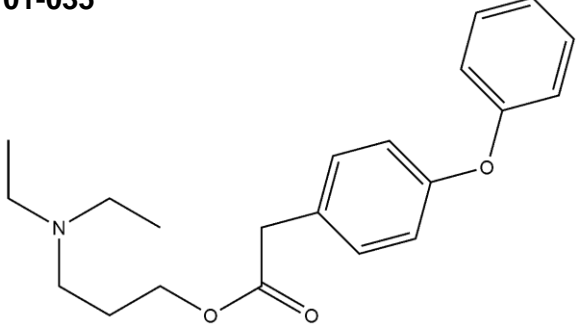
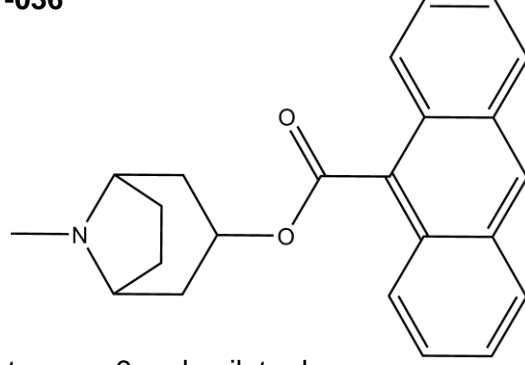
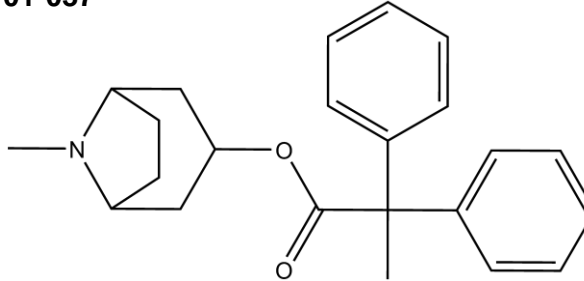
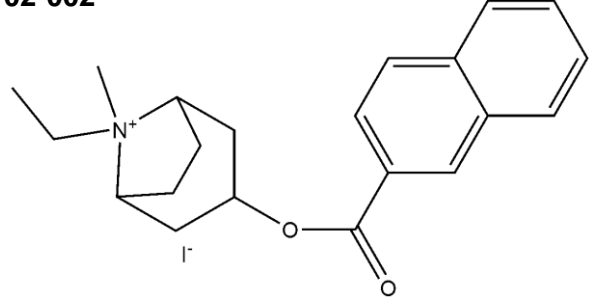
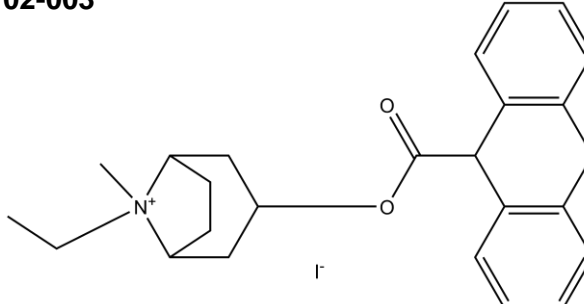
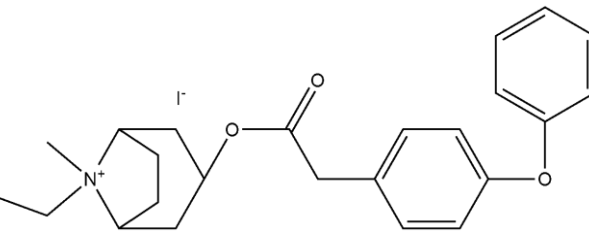
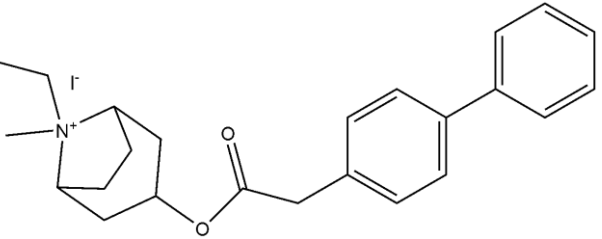
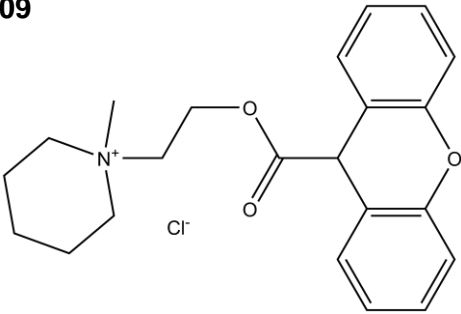
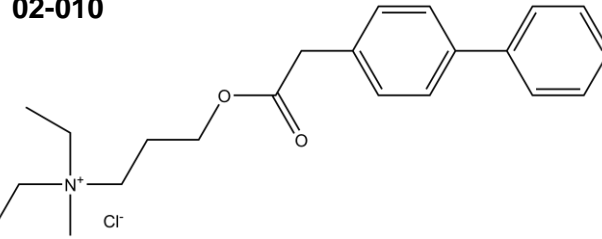
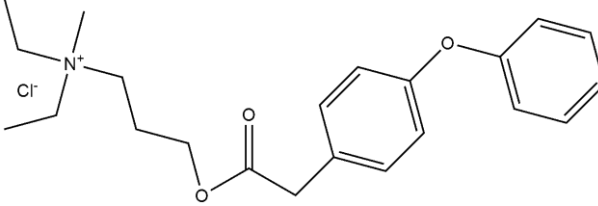
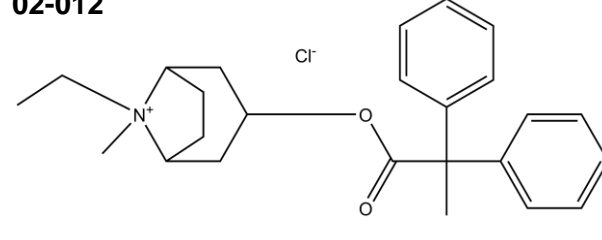
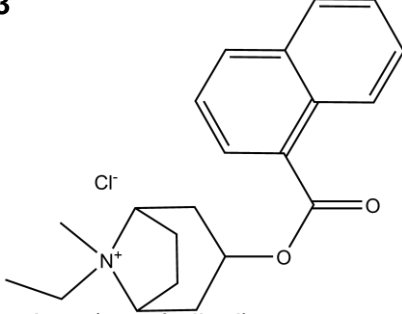
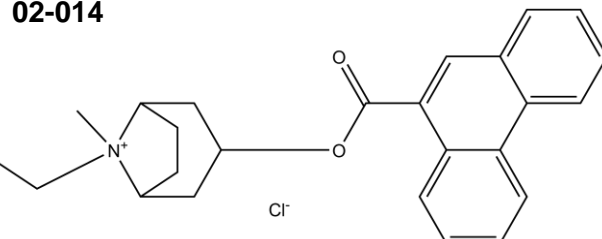
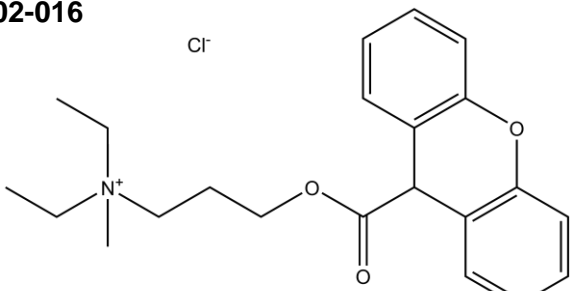
<p>01-035</p>  <p>2-(4-Fenoxifenil)acetato de 3-(dietilamino)propilo</p>	<p>01-036</p>  <p>Antraceno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabiclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>
<p>01-037</p>  <p>2,2-difenilpropanoato de 8-metil-8-azabiclo[3.2.1]octan-3-ilo</p>	<p>02-002</p>  <p>Yoduro de 3-(2-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabiclo[3.2.1]octano</p>
<p>02-003</p>  <p>Yoduro de 3-(9<i>H</i>-xanteno-9-carboniloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabiclo[3.2.1]octano</p>	<p>02-004</p>  <p>Yoduro de 3-(2-(4-fenoxifenil)acetoxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabiclo[3.2.1]octano</p>

Tabla 1: compuestos de fórmula (I) preferidos (continuación)

<p>02-005</p>  <p>Yoduro de 3-(2-(bifenil-4-il)acetoxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano</p>	<p>02-009</p>  <p>Cloruro de 1-(2-(9H-xanteno-9-carboniloxi)etil)-1-metilpiperidinio</p>
<p>02-010</p>  <p>Cloruro de 3-(2-(bifenil-4-il)acetoxi)-N,N-dietil-N-metilpropan-1-amonio</p>	<p>02-011</p>  <p>Cloruro de N,N-dietil-N-metil-3-(2-(4-fenoxifenil)acetoxi)propan-1-amonio</p>
<p>02-012</p>  <p>Cloruro de 3-(2-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano</p>	<p>02-013</p>  <p>Cloruro de 3-(1-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano</p>
<p>02-014</p>  <p>Cloruro de 3-(fenantreno-9-carboniloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano</p>	<p>02-016</p>  <p>Cloruro de N,N-dietil-N-metil-3-(9H-xanteno-9-carboniloxi)propan-1-amonio</p>

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) como bactericida frente a *Streptococcus*, preferiblemente *S. pneumoniae*, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-029, 01-032, 01-033, 01-035, 01-036, 01-037, 02-002, 02-003, 02-004, 02-005, 02-009, 02-010, 02-011, 02-012, 02-013, 02-014 y 02-016. Más
5 preferiblemente, se selecciona del grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-032, 01-036, 01-037, 02-002, 02-003, 02-004, 02-005, 02-012, 02-013 y 02-014.

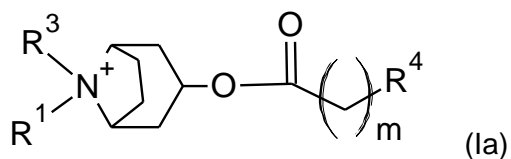
En una realización especialmente preferida, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del
10 grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-032, 01-036 y 01-037. Aún más preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-032, 01-036 y 01-037.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula
15 (I) tal como se describe en esta solicitud de patente para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad ocasionada por *Streptococcus*, preferiblemente ocasionada por *S. pneumoniae*, tales como neumonía, meningitis, sinusitis aguda, otitis media, empiema, efusión pleural, conjuntivitis, bacteremia, sepsis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, celulitis, queratitis y abscesos cerebrales.
20 Preferiblemente, el compuesto de la presente invención tiene fórmula (Ia).

También debe entenderse como parte de esta solicitud de patente el compuesto de fórmula
(I) tal como se describe en este primer aspecto de la invención, para tratar o prevenir una
enfermedad ocasionada por *Streptococcus*, preferiblemente ocasionada por *S. pneumoniae*.
25 Preferiblemente, el compuesto de la presente invención tiene fórmula (Ia).

También debe entenderse como parte de esta solicitud un método para tratar o prevenir una
enfermedad ocasionada por *Streptococcus*, preferiblemente ocasionada por *S. pneumoniae*,
que comprende administrar el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en el primer
30 aspecto de esta invención. Preferiblemente, el compuesto de la presente invención tiene
fórmula (Ia).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (Ia)



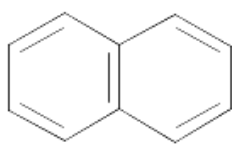
donde

R^1 es alquilo C_1-C_2 ,

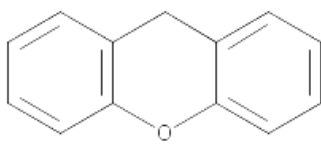
R^3 es alquilo C_1-C_6 o ausente,

5 m es un valor entre 0 y 1; y

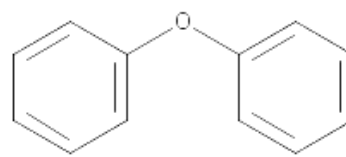
R^4 es un arilo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C, D, E, F y G, donde:



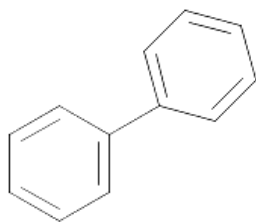
A



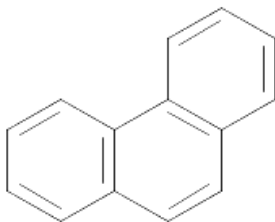
B



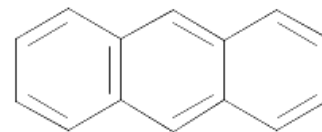
C



D

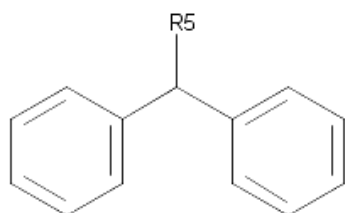


E



F

10



G

donde R^5 es alquilo C_1-C_2 .

15 En una realización preferida, el compuesto de fórmula (Ia) se selecciona del grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-019, 01-032, 01-036, 02-002, 02-004, 02-013 y 02-014.

Los compuestos de la presente invención pueden obtenerse por procedimientos convencionales, por ejemplo, los descritos en [Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 \(2012\) 1448–1454](#); [Russian Journal of General Chemistry, 2010, Vol. 80, No. 9, pp. 1812–1818](#).

20

Es necesario señalar que, comparados con colina, atropina e ipratropio, los compuestos de fórmula (I) ensayados muestran claramente una mayor hidrofobicidad, como se desprende de la estimación del logaritmo de su coeficiente de reparto en octanol-agua (LogP) (Tabla 2),
5 calculado aquí a partir de las utilidades en web de la empresa Molinspiration Cheminformatics (Nova Ulica, Eslovaquia). Este aumento en la hidrofobicidad tiene dos consecuencias. En primer lugar se disminuye su solubilidad acuosa y por lo tanto compromete su empleo experimental sobre cultivos celulares a ciertas concentraciones de compuesto. En segundo lugar, algunos de los compuestos muestran valores de LogP
10 cercanos al límite de 5.0 establecido como un valor umbral en las conocidas "Reglas de Lipinski" (Lipinski y cols, 1997. Adv. Drug. Del. Rev. 23:3–25) que se emplean habitualmente como recomendación para el diseño de fármacos. Si bien estas reglas son empíricas y no exentas de excepciones, tales dificultades estimadas explican la ausencia de investigaciones previas realizadas sobre estos compuestos y refuerza la novedad de nuestra
15 aproximación.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición bactericida o farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), preferiblemente (Ia), tal como se describen en esta solicitud de patente. Estas composiciones comprenden al menos
20 un componente adicional adecuado para el uso que se pretende dar a la composición.

En particular, la composición bactericida que se describe en esta solicitud de patente puede comprender uno o una combinación de los compuestos de fórmula (I) ó (Ia). También se ha de prever, para su administración, la utilización de soportes transportadores de tales
25 compuestos en una o en múltiples copias, por ejemplo mediante el uso de nanopartículas, puesto que se ha demostrado que la dosis antimicrobiana de un determinado compuesto puede reducirse en varios órdenes de magnitud tras su disposición múltiple en la superficie de tales partículas, como por ejemplo se ha demostrado con partículas dendriméricas conteniendo varias copias de colina frente a *Streptococcus pneumoniae* (Hernández-
30 Rocamora et al, 2009. Angew. Chem. Int. Ed. 48: 948-951).

Por otro lado, la composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), preferiblemente (Ia), puede administrarse por diferentes vías de administración, por ejemplo por vía oral, tópica, inhalatoria o parenteral, eligiéndose la más adecuada
35 dependiendo de si la atención es ambulatoria u hospitalaria. Para cada caso, estas

composiciones pueden comprender uno o más excipientes farmacológicamente aceptables adecuados según la forma de administración, por ejemplo, en forma inyectable, pastillas, pomadas, pulverizadores o cápsulas inhalatorias, y que no ejerzan reacciones secundarias adversas en el individuo.

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1 (A y B): Cambio en la anisotropía de fluorescencia de la proteína C-LytA-GFP tras la adición de los compuestos de la invención (1 mM) (compuestos identificados en la Tabla 3). El control de colina se muestra en negro, y los de atropina e ipratropio se muestran gris. Los datos barrados significan precipitación de la proteína.

Figura 2: Gráfica mostrando la densidad óptica a 550 nm de cultivos de la cepa R6 de *S. pneumoniae* en función del tiempo en presencia de distintos compuestos añadidos a una concentración de 1 mM.

Figura **2A**, en presencia de aminas terciarias derivadas de atropina: (—●—), control; (—▽—), compuesto 01-007; (—■—), 01-008; (—◇—), 01-015; (—○—), 01-022; (—▲—), 01-026; (—□—), atropina 10 mM.

Figura **2B**, en presencia de otras aminas terciarias derivadas de atropina: (—●—), control; (—○—), 01-019; (—▽—), 01-032; (—■—), 01-036; (—◇—), 01-037.

Figura **2C**, en presencia de otras aminas terciarias: (—●—), control; (—▽—), 01-029; (—■—), 01-033; (—◇—), 01-035.

Figura **2D**, en presencia de aminas cuaternarias derivadas de ipratropio: (—●—), control; (—▽—), 02-002; (—■—), 02-003; (—◇—), 02-004; (—▲—), 02-005; (—○—), 02-012; (—□—), 02-013; (—◆—), 02-014.

Figura **2E** en presencia de otras aminas cuaternarias derivadas de colina: (—●—), control; (—▽—), 02-009; (—■—), 02-010; (—◇—), 02-011; (—▲—), 02-016.

Figura 3. Gráfica mostrando la densidad óptica en función del tiempo, en cultivos de las cepas R6 (símbolos oscuros) y D39 (símbolos claros) de *S. pneumoniae*, en ausencia (●, ○) o en presencia (■, □) de compuestos derivados de atropina en concentración 1 mM. Figura **3A**, compuesto 01-008; Figura **3B**, compuesto 01-019; Figura **3C**, compuesto 01-022.

Figura 4. Microfotografías de *S. pneumoniae* D39 control (Figura **4A**) y en presencia de compuesto 01-032 en concentración 1 mM (Figura **4B**).

Figura 5: Descenso de la viabilidad de *S. pneumoniae* R6 por efecto de compuestos a una concentración de 1 mM. Los compuestos se muestran agrupados por grupo arilo común. Las barras con fondo blanco indican aminas terciarias, y las que tienen fondo gris indican aminas cuaternarias. Las barras lisas indican aminas no bicíclicas, mientras que las barras rayadas indican aminas bicíclicas.

Figura **5A:** Compuestos con grupo arilo del tipo "A"

Figura **5B:** Compuestos con grupo arilo del tipo "B"

Figura **5C:** Compuestos con grupo arilo del tipo "C"

Figura **5D:** Compuestos con grupo arilo del tipo "D"

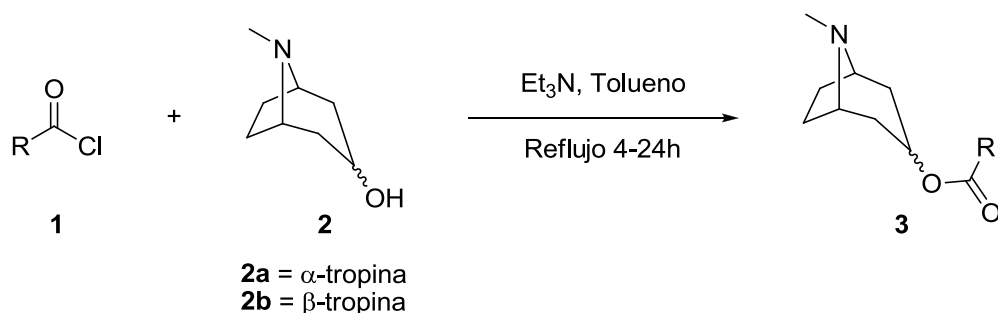
Figura **5E:** Compuestos con grupo arilo del tipo "E"

Figura **5F:** Resto de compuestos con grupo arilo del tipo "A"

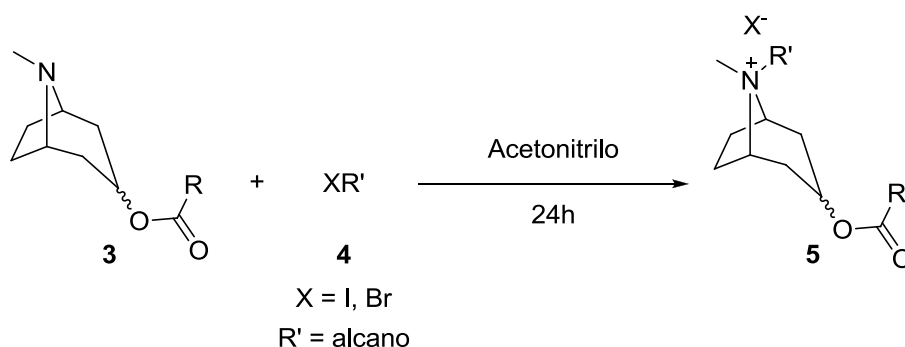
Ejemplos

Ejemplos de síntesis: La invención también proporciona un método para la preparación de los compuestos de fórmula I. Dependiendo del tipo de compuesto, se describen dos métodos diferentes.

a) **Para las aminas del tipo bicíclicas terciarias (3)**, el procedimiento comprende hacer reaccionar el cloruro de ácido correspondiente (**1**) con una disolución de α - o β -tropina (**2**) y trietilamina en cantidades molares 1.1:1:1.1 en tolueno destilado. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 4-24h. A continuación la mezcla de reacción fue lavada dos veces con una disolución saturada de bicarbonato de sodio y con otra de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó con sulfato magnésico y se evaporó el disolvente a presión reducida. La purificación de los diferentes compuestos fue llevada a cabo por precipitación, recristalización o cromatografía en columna de SiO₂.



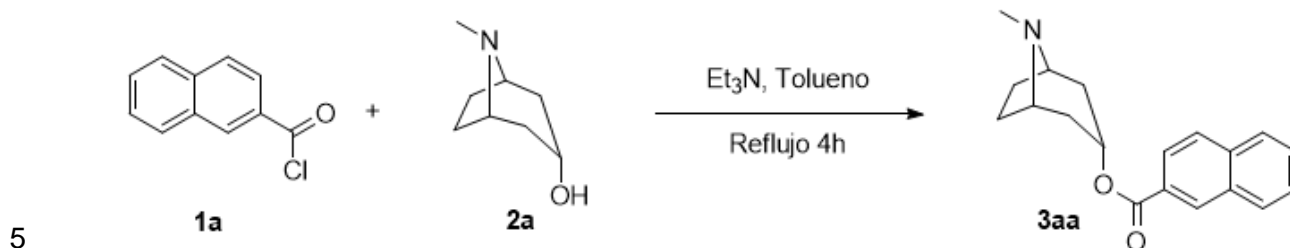
b) Para las aminas del tipo bicíclicas cuaternarias (5), el procedimiento comprende hacer reaccionar la correspondiente amina bicíclica terciaria (**3**) disuelta en acetonitrilo con el yodo- o bromoalcano (**4**) durante 24h a temperatura ambiente. La purificación de los diferentes compuestos fue llevada a cabo por precipitación.



Ejemplo: 3 α . 2-Naftoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo(3aa)

Se adicionó cloruro de naftóilo (**1a**) (31.5 g, 165 mmol) a una disolución a reflujo de α -tropina (**2a**) (21,2 g, 150 mmol) y trietilamina (22.9 mL, 165 mmol) en tolueno destilado (200 mL). La mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante 4h, tras las cuales dicha mezcla fue lavada 3 veces con una disolución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 75 mL), con otra de cloruro de sodio (75 mL) y secada con sulfato magnésico. A continuación precipitó un sólido blanco que fue filtrado y lavado con diclorometano. El filtrado resultante fue evaporado a presión reducida obteniendo así el producto deseado como un sólido blanco con un 90% de rendimiento. Para la caracterización fue recristalizado en tolueno/acetonitrilo.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.98 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.68 (ddd, J = 8.3, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.63 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.4 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.10 – 3.05 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.13 (dt, J = 15.0, 4.9 Hz, 2H), 2.07 – 1.99 (m, 4H), 1.76 (d, J = 14.6 Hz, 2H). HRMS (m/z): $[\text{M}^+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_2$: 295.38; encontrado, 296.13.



El resto de compuestos utilizados en los ejemplos de actividad se sintetizaron con una química similar.

Ejemplos de actividad

- 10 Con los 57 compuestos identificados en la Tabla 3 se llevaron a cabo estudios de anisotropía de fluorescencia utilizando la proteína de fusión C-LytA-GFP.

Tabla 3. Identificación de todos los compuestos probados en este estudio.

Número	Nombre	Número	Nombre
01-001	2-Fenilacetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-002	2-Fenilpropanoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-003	2-(3-Metoxifenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-004	2,2-Difenilacetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-005	2-(4-Fluorofenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-006	2-(4-Trifluorometilfenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-007	2-(Naftalen-2-il) acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-008	2-Naftoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-009	2- <i>p</i> -Tolilacetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-010	2-(4-Metoxifenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-011	9-Hidroxi-9H-fluoren-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-013	2-(Piridin-4-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-014	2-(Piridin-3-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-015	9 <i>H</i> -Xanteno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-016	3-(Tiofen-2-il)propanoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-017	3-(Furan-2-il)propanoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-018	Tiofen-2-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-019	2-(4-Fenoxifenil)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo

Tabla 3. Identificación de todos los compuestos probados en este estudio (continuación).

Número	Nombre	Número	Nombre
01-020	1-Metil-1H-pirrol-2-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-022	2-(Bifenil-4-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-023	1H-indol-3-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-024	4-Fenilbutanoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-025	1-Methyl-1H-indol-3-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-026	Quinolin-2-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-027	2-(Furan-2-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-028	2-(Piridin-2-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-029	2-Naftoato de 3-dietilaminopropilo	01-030	9H-Xanteno-9-carboxilato de 3-(diethylamino)propilo
01-031	1-Naftoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-032	Fenantreno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-033	9H-xanteno-9-carboxilato de 2-(piperidin-1-il)etilo	01-034	2-(Bifenil-4-il)acetato de 3-(dietilamino)propilo
01-035	2-(4-Fenoxifenil)acetato de 3-(dietilamino)propilo	01-036	Antraceno-9-carboxilato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
01-037	2,2-difenilpropanoato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo	01-038	2-(4'-Fluorobifenil-4-il)acetato de 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo
02-001	Yoduro de 8-isopropil-8-metil-3-(3-(tiofen-2-il)propanoiloxi)-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-002	Yoduro de 3-(2-naftoiloxi)-8-etil--8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano
02-003	Yoduro de 3-(9H-xanteno-9-carboniloxi)--8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-004	Yoduro de 3-(2-(4-fenoxifenil)acetoxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano
02-005	Yoduro de 3-(2-(bifenil-4-il)acetoxi)--8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-006	Yoduro de 3-(2-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano
02-008	Cloruro de 3-(antraceno-9-carboniloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-009	Cloruro de 1-(2-(9H-xanteno-9-carboniloxi)etil)-1-metilpiperidinio

Tabla 3. Identificación de todos los compuestos probados en este estudio (continuación).

02-010	Cloruro de 3-(2-(bifenil-4-il)acetoxi)- <i>N,N</i> -dietil- <i>N</i> -metilpropan-1-amonio	02-011	Cloruro de <i>N,N</i> -dietil- <i>N</i> -metil-3-(2-(4-fenoxifenil)acetoxi)propan-1-amonio
02-012	Cloruro de 3-(2-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-013	Cloruro de 3-(1-naftoiloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano
02-014	Cloruro de 3-(fenantreno-9-carboniloxi)-8-etil-8-metil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano	02-015	Cloruro de 3-(2-naftoiloxi)- <i>N,N</i> -dietil- <i>N</i> -metilpropan-1-aminio
02-016	Cloruro de <i>N,N</i> -dietil- <i>N</i> -metil-3-(9H-xanteno-9-carboniloxi)propan-1-amonio		

5 Estos análisis indican el grado de unión del compuesto (ligando) con la proteína, ya que la mayor o menor unión del ligando produce un cambio en la anisotropía de la fluorescencia emitida por el fluoróforo correspondiente a GFP. La concentración final de la proteína C-LytA-GFP en estos experimentos fue de 0.005 mM y la de los ligandos de 1 mM obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 1 y la Tabla 2. Se puede observar

10 que el descenso en la anisotropía de fluorescencia producido por la adición de varios de los compuestos sintetizados a la solución de proteína C-LytA-GFP es mayor que la provocada por la unión de colina, atropina o ipratropio, llegando incluso a inducir la precipitación de la proteína, lo que indica una mejor interacción molecular, por lo que los estudios posteriores con cultivos de neumococo *in vitro* se hicieron con estos compuestos seleccionados.

15

Tabla 2

Características de compuestos ensayados y efecto sobre la anisotropía de fluorescencia de

Tipo de amina	Compuesto del que deriva	Identificación	logP estimado	Descenso de anisotropía de fluorescencia de C-LytA-GFP (1 mM ligando) (%)
Terciaria bicíclica	Atropina (logP = 1.7)	01-007	4.0	11
		01-008	4.1	22
		01-015	4.1	40
		01-019	4.5	29
		01-022	4.6	43
		01-032	4.9	91 ^a
		01-036	4.9	80 ^a
		01-037	4.6	15
Terciaria no bicíclica	Otros	01-029	4.3	17
		01-033	4.2	15 ^a
		01-035	4.8	19
Cuaternaria bicíclica	Ipratropio (logP = -1.4)	02-002	0.5	28 ^a
		02-003	0.2	43 ^a
		02-004	0.9	50
		02-005	1.0	27
		02-012	1.0	48
		02-013	0.1	43
		02-014	1.3	74
Cuaternaria no bicíclica	Colina (logP = -4.2)	02-009	0.2	38
		02-010	0.9	47
		02-011	0.8	37
		02-016	0.3	51

la proteína C-LytA-GFP

5

A continuación, los compuestos que indujeron mayores niveles de descenso de anisotropía, indicativos de una fuerte interacción con la proteína, se ensayaron en cultivos de diferentes cepas de neumococo, analizando la curva de crecimiento del cultivo, la morfología de las células y su viabilidad, así como la concentración inhibitoria mínima (MIC).

10

Ejemplo 1: Ensayo estándar de crecimiento sobre las cepas R6 y D39.

Anisotropía: Adición de compuesto 1 mM a una fusión C-LytA-GFP.

5 **Cultivos:** Adición de compuesto 1 mM a densidad óptica (D.O.) de 0.15 a 550 nm en cultivos de la cepa R6 ó D39

Disminución en células viables: Adición de compuesto 1 mM a $D.O_{550}=0.15$ durante 3 horas seguido de dilución y plaqueo en cultivos de las cepas R6 y D39.

10

Para comprobar el efecto de los citados compuestos sobre *S. pneumoniae*, se usaron las dos cepas de referencia: R6, no capsulada, y D39, con cápsula de tipo 2. En el experimento modelo se añadieron los diferentes compuestos a cultivos en el inicio de la fase exponencial de crecimiento ($DO_{550} \sim 0.15$) y se siguió la curva de crecimiento de todas las muestras incubadas a 37°C. Dos horas después de la adición de los compuestos, se tomaron muestras para calcular la viabilidad y observar al microscopio óptico la morfología de cada cultivo. Todos los compuestos ensayados se prepararon en etanol a una concentración stock de 100 mM, y las diluciones correspondientes se hicieron igualmente en etanol. En consecuencia, se puso un tubo control del cultivo de la cepa de neumococo correspondiente con el mismo volumen de alcohol que se añade con los compuestos, lo que demostró que no había una influencia significativa en el crecimiento bacteriano. Para cada compuesto se probó un rango de concentraciones entre 100 μ M y 1 mM. Estos ensayos permitieron determinar el efecto particular que ejercía cada compuesto sobre el crecimiento, y la consiguiente letalidad, en todas las condiciones probadas y sobre las cepas de referencia.

25

Para todos los compuestos analizados, el mayor efecto inhibitor del crecimiento bacteriano y el índice de letalidad más elevado, comparado con los cultivos control no tratados, se ejerció cuando el compuesto se añadía en el inicio de la fase exponencial de crecimiento. Por esta razón se muestran los resultados obtenidos para un cierto grupo representativo de compuestos a 1 mM de concentración y en determinadas condiciones experimentales, donde se pueden observar las diferentes curvas de crecimiento (Figura 2), tasas de viabilidad y concentraciones mínimas inhibitorias (Tabla 4). La Figura 2 muestra en muchas ocasiones un efecto de disminución de la densidad óptica de los cultivos bacterianos de la cepa R6, debido a lisis de los mismos, y muy especialmente en presencia de aminas terciarias.

35

Por su parte, la Tabla 4 muestra un acusado descenso en viabilidad bacteriana en la cepa R6, muy especialmente en presencia de aminas terciarias bicíclicas. También se recogen en esta tabla las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de algunas de estas moléculas, presentando un valor de 8 µg/ml (23 µM) el compuesto más efectivo (compuesto 01-032).

Los experimentos realizados sobre la cepa capsulada D39 con los compuestos que contienen una amina terciaria siguieron todos una tónica similar a la cepa R6 en cuanto a descenso de densidad óptica, viabilidad y concentraciones mínimas inhibitorias (Figura 3, Tabla 4) demostrando que la presencia de la cápsula polisacáridica, habitual en las cepas patógenas de *S. pneumoniae*, no reduce significativamente el efecto antibacteriano de tales compuestos. Por el contrario, la cepa D39 es más resistente a la acción de las aminas cuaternarias, observándose generalmente un aumento en el porcentaje de células viables tras el tratamiento con estos ligandos. La Figura 4 muestra asimismo un ejemplo de las deformaciones morfológicas provocadas en las células bacterianas de la cepa D39 por el compuesto 01-032, donde se observan las estructuras lisadas.

Tabla 4

Efecto de compuestos sobre cultivos celulares *in vitro* de *S. pneumoniae*. Ensayo sobre las cepas R6 (no capsulada) y D39 (capsulada)

Tipo de amina	Identificación	Descenso en densidad óptica (%)		Viabilidad respecto a cultivo sin ligando ^a (%)		Concentración mínima inhibitoria (MIC) (µg/ml)	
		R6	D39	R6	D39	R6	D39
Terciaria bicíclica	01-007	86	84	<0.001	0.005	N.D.	N.D.
	01-008	100	98	0.003*	0.005*	64	64
	01-015	100	100	0.001*	0.02	128	128
	01-019	100	100	<0.001*	<0.001*	32	32
	01-022	99	90	<0.001*	0.04*	32	32
	01-032	100 ^c	54 ^c	<0.001**	<0.001**	8	8
	01-036	56	37	<0.001*	0.003*	32	64
	01-037	92	93	<0.001*	0.01*	128	128
Terciaria no bicíclica	01-029	86	7	0.03	16	N.D.	N.D.
	01-033	100 ^c	100 ^c	0.04	0.7	N.D.	N.D.
	01-035	91	81	0.10	0.006	N.D.	N.D.
Cuaternaria bicíclica	02-002	0	-8 ^b	1.6	0.9	N.D.	N.D.
	02-003	19	-12 ^b	0.2	7.8	N.D.	N.D.
	02-004	39	67	0.005	N.D.	N.D.	N.D.
	02-005	86	35	<0.001	1.0	N.D.	N.D.
	02-012	61	61	N.D.	<0.001	N.D.	N.D.
	02-013	-13 ^b	-195 ^b	8.6	22	N.D.	N.D.
	02-014	34 ^c	68 ^c	8.6	70	N.D.	N.D.
Cuaternaria no bicíclica	02-009	38	-188 ^b	0.8	7.4	N.D.	N.D.
	02-010	47	0	0.5	0.9	N.D.	N.D.
	02-011	37	46	0.8	2.0	N.D.	N.D.
	02-016	51	6	1.7	8.5	N.D.	N.D.

5 ^a Experimentos frente a [ligando] = 1 mM excepto (*) ([ligando] = 0.5 mM) y (**) ([ligando] = 0.1 mM)

^b Un signo negativo significa que ha habido aumento de la densidad óptica por crecimiento celular.

10 ^c El compuesto absorbe intensamente a 550 nm y se ha restado un blanco del mismo, aunque que los datos pueden estar afectados de cierto error.

N.D.: No determinado

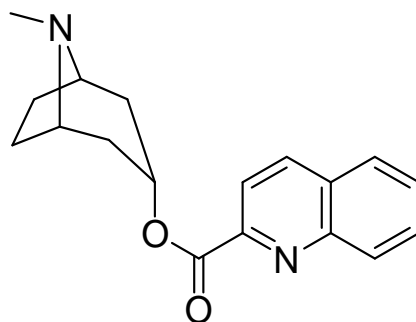
Como se ha mencionado, en general, las aminas terciarias (Figuras 2A, 2B y 2C) son más efectivas a la hora de reducir la densidad óptica de los cultivos de neumococo R6 que las cuaternarias (Figuras 2D y 2E). Asimismo, el descenso en viabilidad celular es mucho menor en el caso también de las cuaternarias (Tabla 4).

5

En la Figura 5 se confirma que, para un mismo sustituyente aromático, las aminas terciarias son más eficaces que las cuaternarias en cuanto a descenso de la viabilidad bacteriana, y se muestra además que las aminas bicíclicas son más eficaces que las no bicíclicas.

10 El número de anillos aromáticos en los diferentes compuestos ensayados establece una diferencia muy significativa con respecto a los compuestos anteriormente divulgados (atropina e ipratropio). Estos últimos poseen un sólo anillo aromático, mientras que la totalidad de los compuestos ensayados poseen dos o tres. El incremento en aromaticidad está relacionado con su potencia antimicrobiana, como puede observarse en la Figura 2A,
15 donde se muestra que una concentración de 10 mM de atropina apenas afecta al crecimiento bacteriano mientras que una concentración 10 veces menor de los compuestos 01-007 y 01-022 induce la lisis del cultivo. Tales compuestos (01-007 y 01-022) únicamente se diferencian de la atropina en la adición de un anillo aromático más.

20 Asimismo, la incorporación de heterociclos en la parte aromática de los compuestos parece reducir su poder antimicrobiano. La Figura 2A muestra que el compuesto 01-026 que sólo se diferencia de su análogo 01-008 en la incorporación en el primero de un átomo de nitrógeno en la parte aromática, induce un cambio en la anisotropía de la proteína C-LytA-GFP mucho menor que el segundo (Figura 1). Además, en una concentración de 1 mM, el compuesto
25 01-026 no afecta a la densidad óptica del crecimiento bacteriano, mientras que 01-008 ejerce un efecto apreciablemente lítico. Por último, tras el tratamiento de la cepa R6 con el compuesto 01-026 se comprobó una viabilidad del cultivo del 2.4% con respecto al control, muy lejos de la viabilidad remanente tras el tratamiento con 01-008 (0.003% a una concentración de la mitad, Tabla 4) y aumentándose las diferencias en el caso de la cepa
30 D39 (45% de viabilidad para 01-026 frente a un 0.005% para 01-008).



01-026

5

Ejemplo 2. Se analizó el efecto del compuesto 01-032 en cultivos de las cepas R6 y D39 de *S. pneumoniae* tanto en presencia como en ausencia de un exceso de colina en el medio. La Tabla 5 muestra que altas concentraciones de colina revierten en parte el efecto del compuesto 01-032, tanto a nivel de descenso en la densidad óptica del cultivo como en la viabilidad celular. Además, la Tabla 6 muestra que el efecto del compuesto 01-032 sobre distintas cepas mutantes de *S. pneumoniae* que carecen de uno o más genes funcionales de determinadas proteínas de unión a colina, disminuye significativamente de manera específica fundamentalmente en aquellos casos en los que el gen mutado es precisamente el de la amidasa LytA, lo que indica que probablemente los compuestos seleccionados son capaces de modificar la función biológica de esta proteína de manera mayoritaria. Estos resultados sugieren, en cualquier caso, que los compuestos fórmula (I) actúan de manera específica sobre las proteínas de unión a colina de la bacteria.

20

Tabla 5

Efecto de la adición de colina sobre la actividad antineumocócica del compuesto 01-032 (cepas R6 y D39). El compuesto se utilizó a una concentración de 0.1 mM

Adición	Descenso en densidad óptica a 550 nm respecto a control (%)		Viabilidad respecto a cultivo sin ligando (%)	
	R6	D39	R6	D39
Ninguna	89	82	<0.001	<0.001
Colina 143 mM	27	37	2.4	0.1

5

Tabla 6

Efecto del fenotipo celular sobre la actividad antineumocócica del compuesto 01-032 (cepas R6 y D39). El compuesto se utilizó a una concentración de 0.1 mM. El compuesto absorbe intensamente a 550 nm y se ha restado un blanco del mismo, aunque que los datos pueden estar afectados de cierto error. N.D.: No determinado.

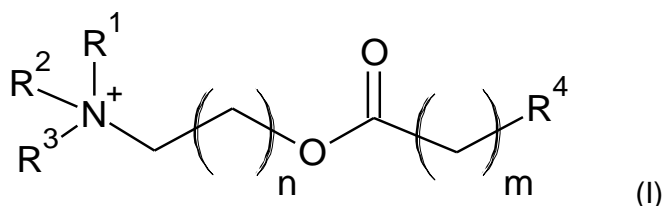
10

Mutante	Fenotipo	Proteínas de unión a colina ausentes en la cepa	Descenso en densidad óptica a 550 nm respecto a control (%)	
			R6	D39
--	Nativo	Ninguna	89	82
M32	LytA ⁻	Amidasa LytA	25	20
M32B	LytB ⁻	Glucosaminidasa LytB	78	65
M32C	LytC ⁻	Lisozima LytC	82	85
M31 (R6)	LytAC ⁻	Amidasa LytA Lisozima LytC	2	14
M31BC	LytABC ⁻	Amidasa LytA Glucosaminidasa LytB Lisozima LytC	N.D.	28
M31D	Pce ⁻	Fosforilcolinesterasa Pce	N.D.	52

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I)

5



donde

R¹ es alquilo C₁-C₆ o forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R²,

R² es alquilo C₁-C₆, forma N-cicloalquilo C₅-C₈ junto con R¹, o es una cadena alquílica que se une a (CH₂)_n formando una amina bicíclica,

10

R³ es alquilo C₁-C₂ o ausente,

R⁴ es un sustituyente aromático que comprende al menos dos anillos aromáticos,

n es un valor entre 1 y 2, y

15

m es un valor entre 0 y 1;

como bactericida frente a *Streptococcus*.

2. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, donde

R¹ es alquilo C₁-C₂,

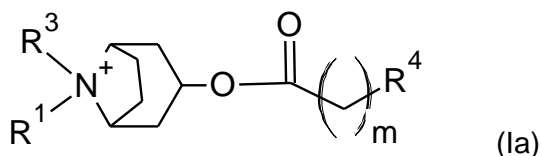
20

R² se une a (CH₂)_n formando una amina bicíclica del tipo 8-azabicyclo[3.2.1]octano, y

R³ es alquilo C₁-C₆ o ausente.

3. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 2, donde dicho compuesto tiene una fórmula (Ia).

25



4. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, donde

R¹ es alquilo C₁-C₂ o forma un cicloalquilo C₅-C₈ con R²,

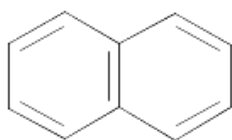
R² es alquilo C₁-C₆ o forma un cicloalquilo C₅-C₈ con R¹,

R^3 es alquilo C_1-C_6 o ausente.

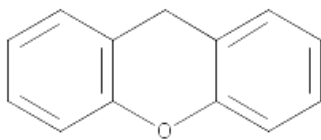
5. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R^3 está ausente.

5

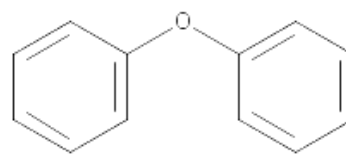
6. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R^4 es un arilo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C, D, E, F y G.



A

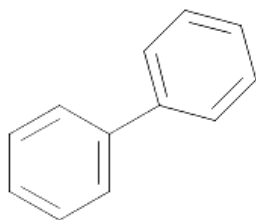


B

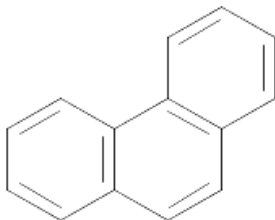


C

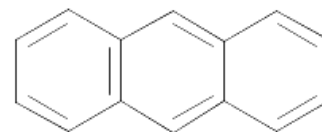
10



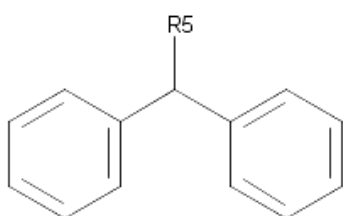
D



E



F



G

15 donde R^5 es alquilo C_1-C_2 .

7. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-029, 01-032, 01-033, 01-035, 01-036, 01-037, 02-002, 02-003, 02-004, 02-005, 02-009, 02-010, 02-011, 02-012, 02-013, 02-014 y 02-016.

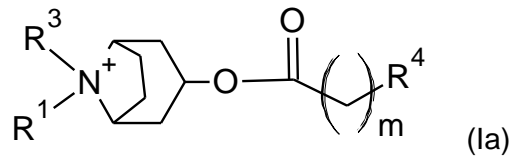
20

8. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 7, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 01-008, 01-015, 01-019, 01-022, 01-032, 01-036 y 01-037.

9. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad ocasionada por *Streptococcus*.

5

10. Compuestos de fórmula (Ia)



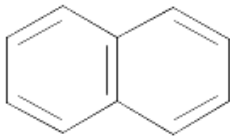
donde

R¹ es alquilo C₁-C₂,

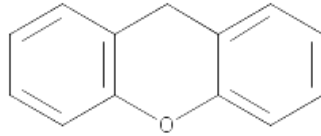
10 R³ es alquilo C₁-C₆ o o ausente,

m es un valor entre 0 y 1; y

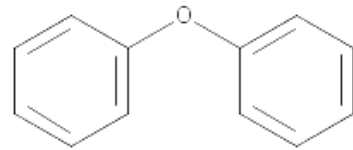
R⁴ es un arilo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C, D, E, F y G, donde:



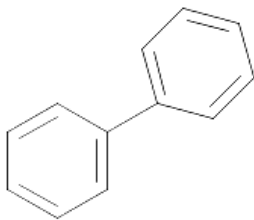
A



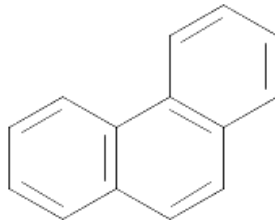
B



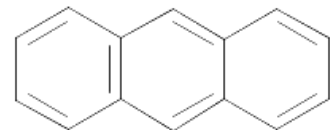
C



D

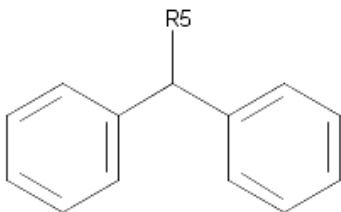


E



F

15



G

donde R⁵ es alquilo C₁-C₂.

20

11. Compuesto de fórmula (Ia) según la reivindicación 10, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en 01-007, 01-008, 01-019, 01-032, 01-036, 02-002, 02-004, 02-013 y 02-014.
- 5 12. Composición bactericida que comprende al menos un compuesto de fórmula (Ia) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.

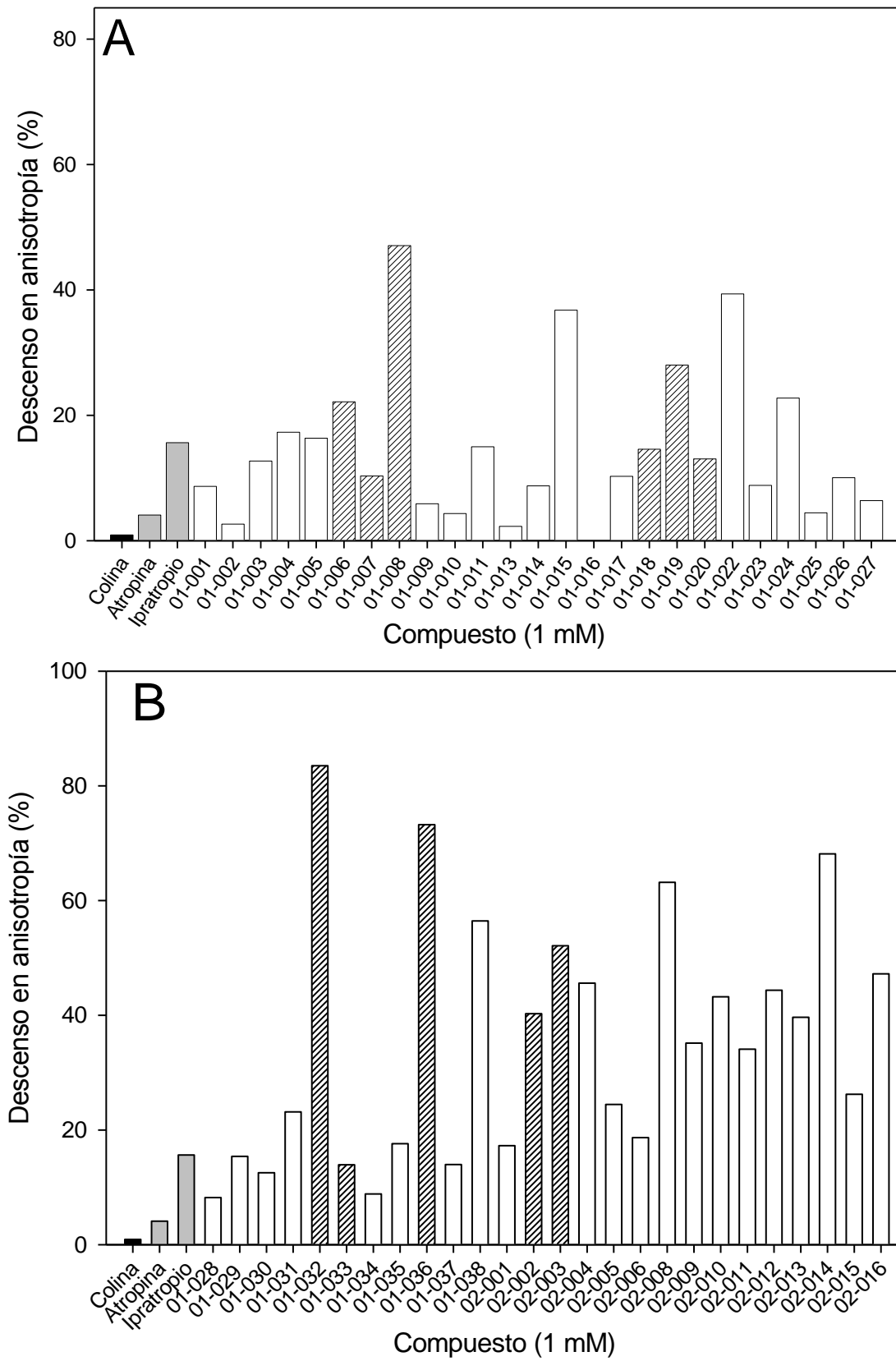


Fig. 1

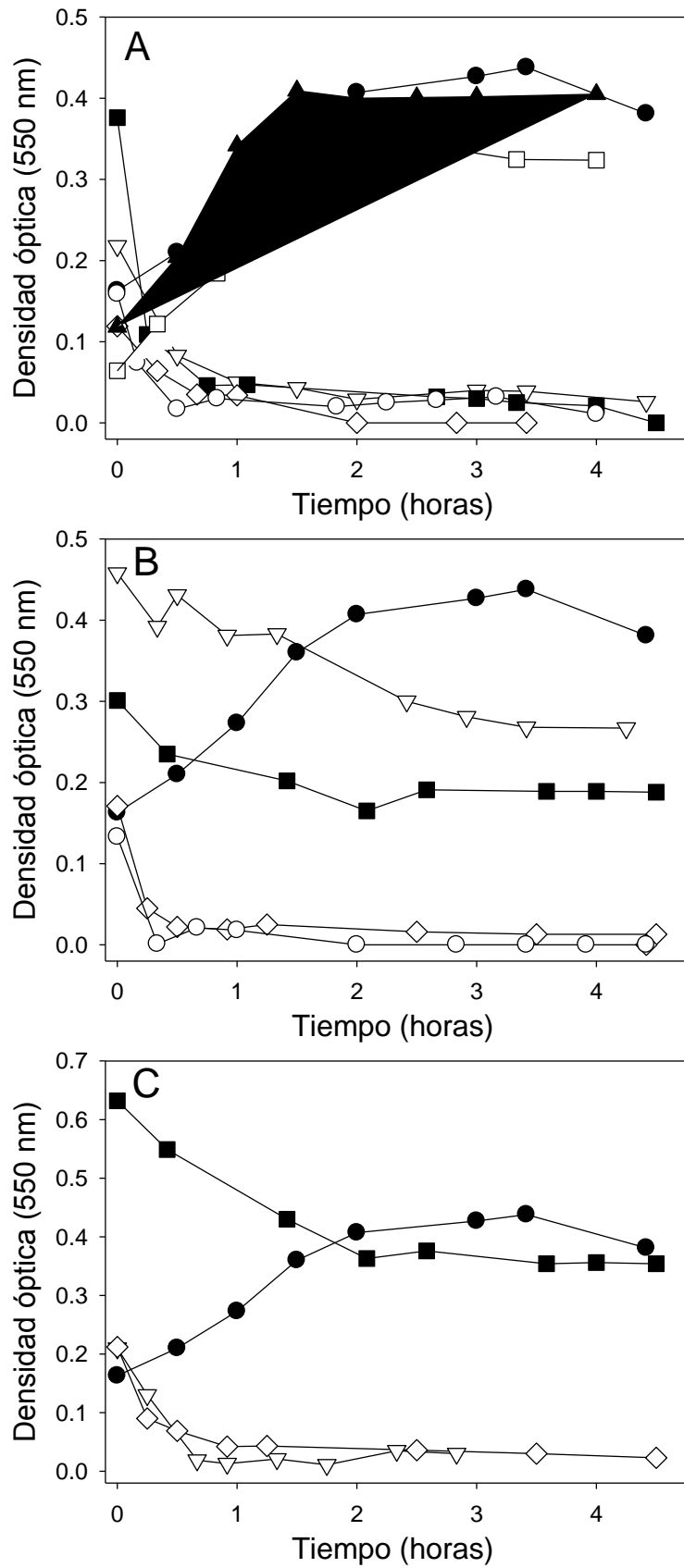


Fig. 2

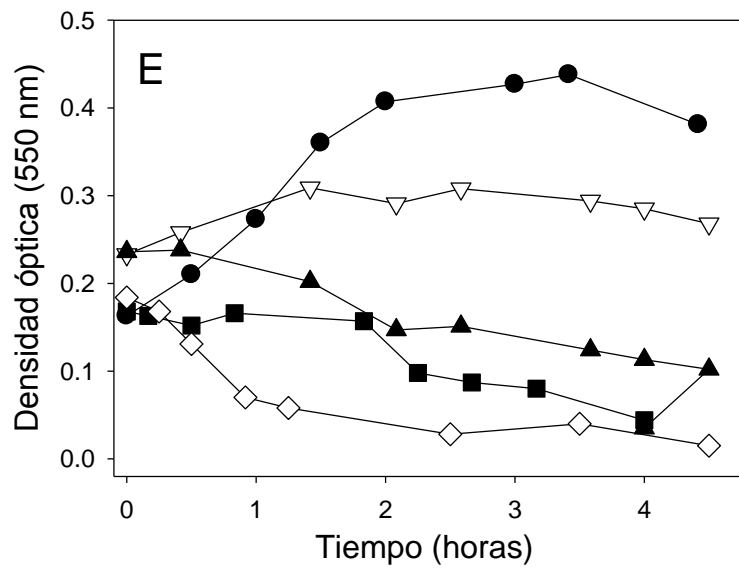
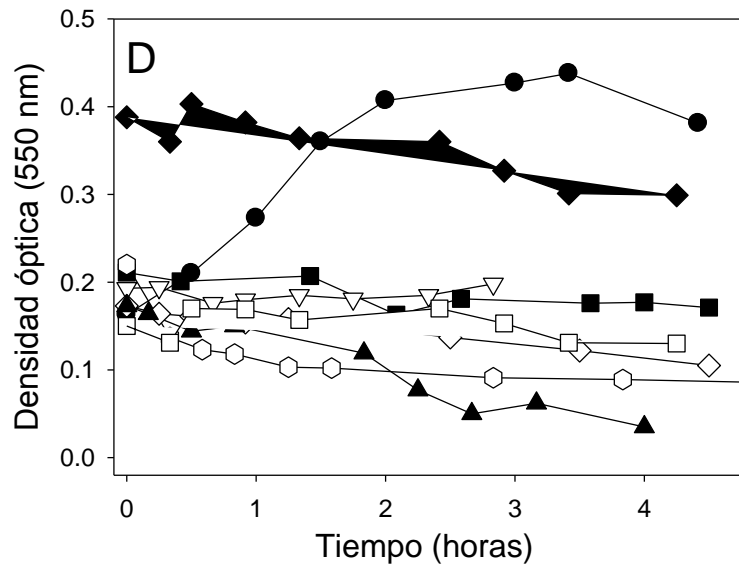


Fig. 2 (continuación)

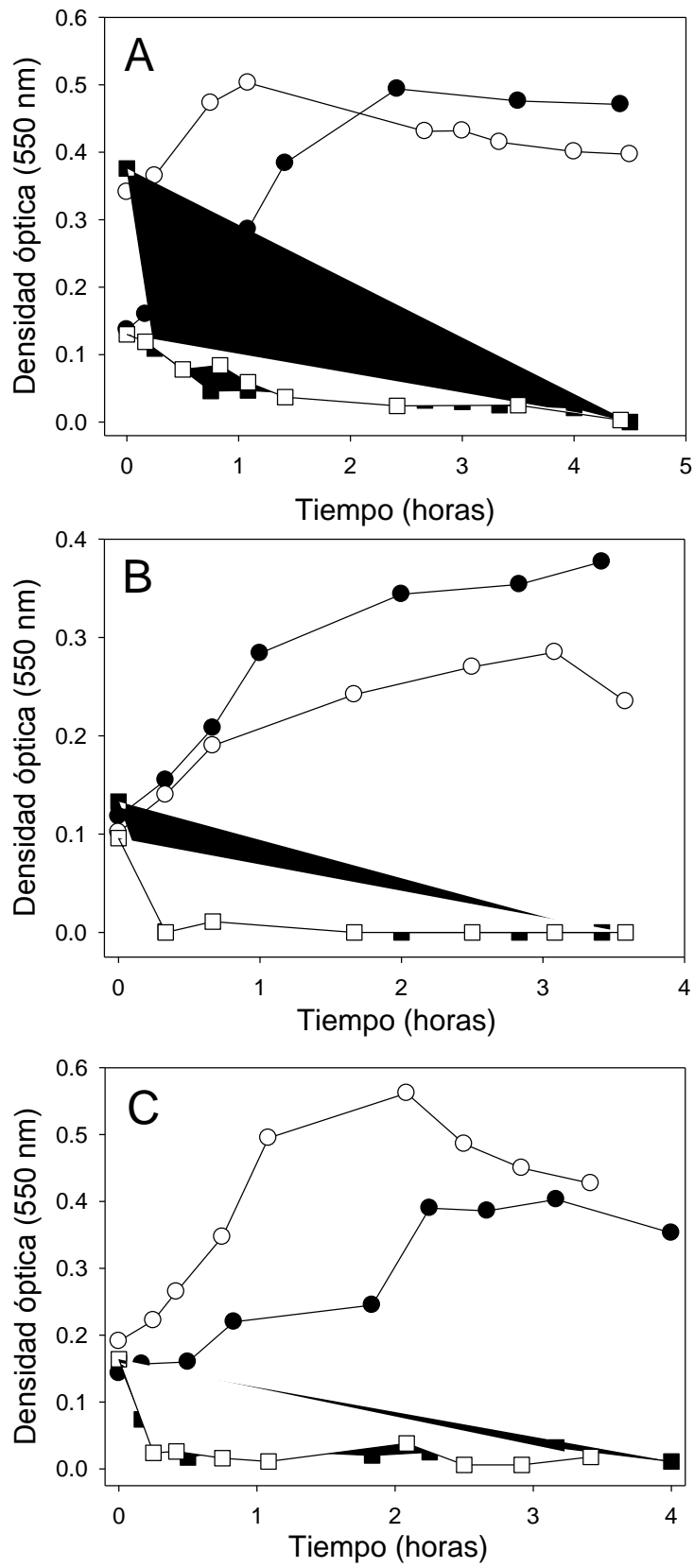


Fig. 3

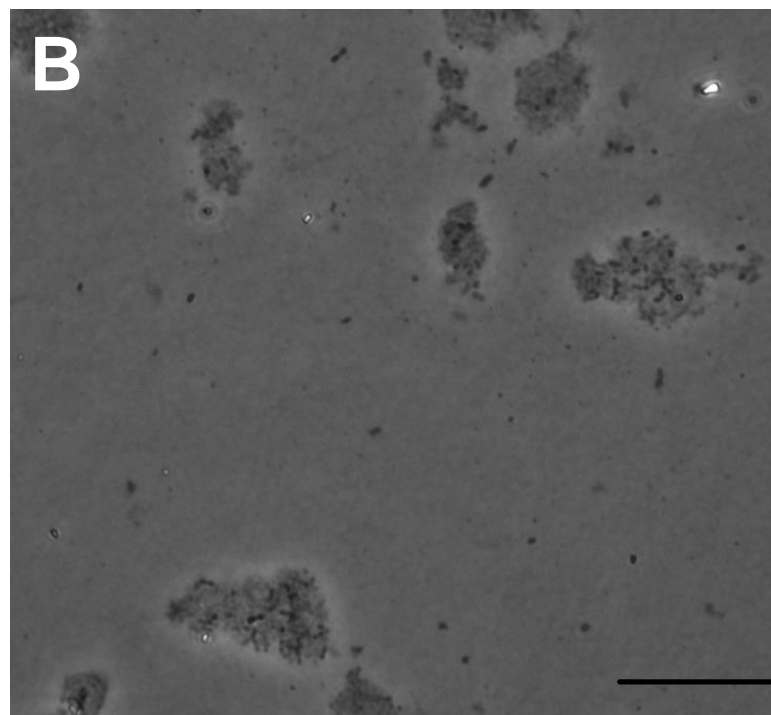
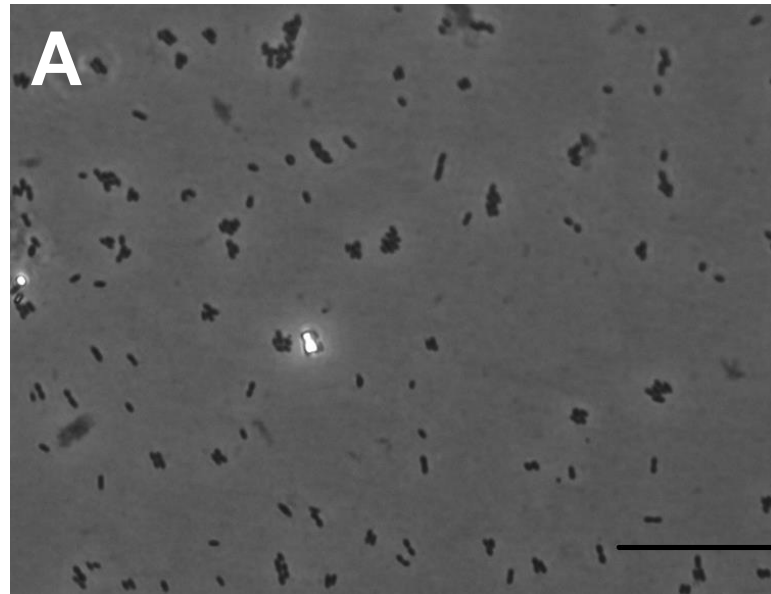


Fig. 4

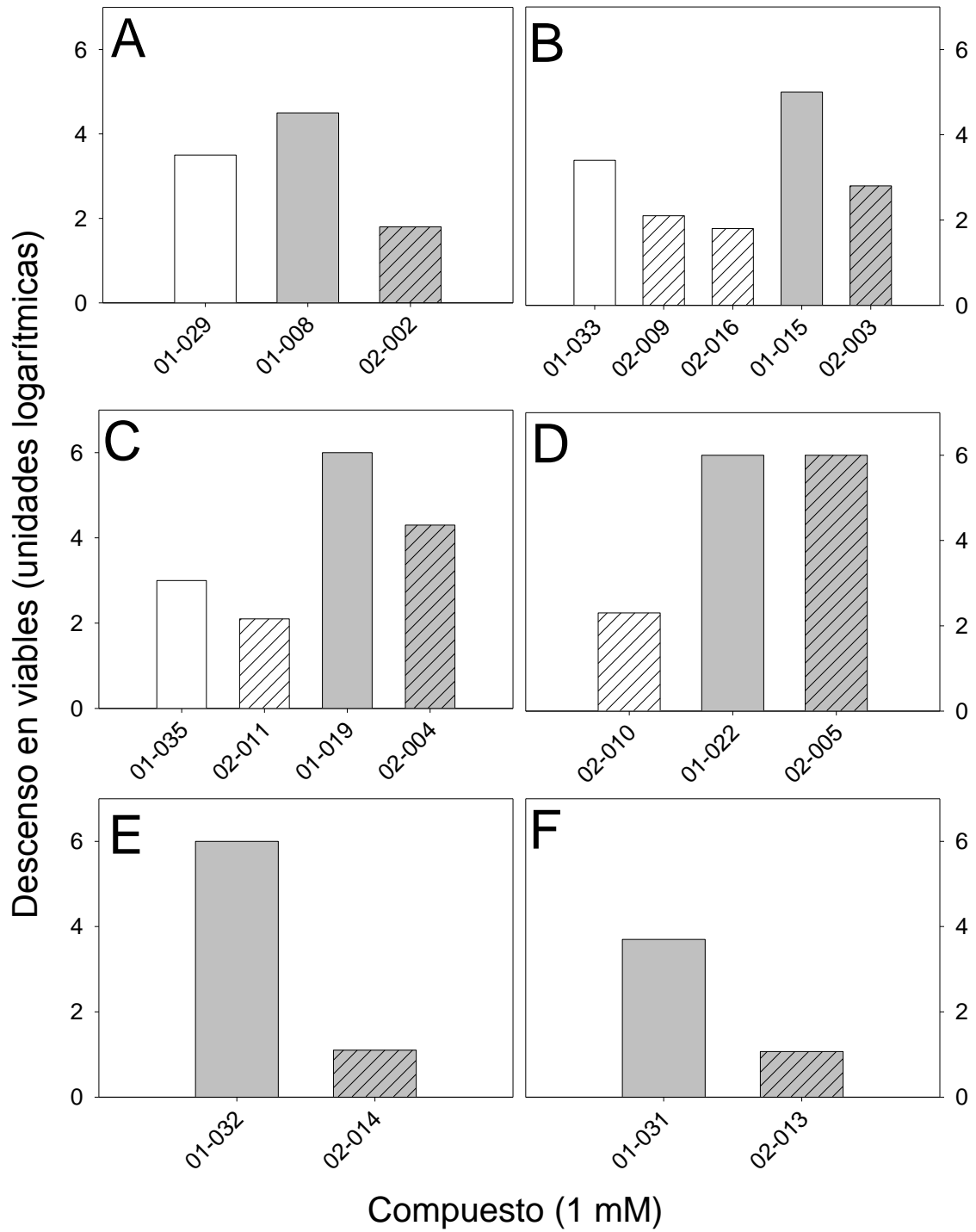


Fig. 5



②① N.º solicitud: 201331031

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.07.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MAESTRO, B. et al. "Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines". FEBS Journal, 2007 Vol. 274. N. 2, páginas 364-376. Ver Resumen; Tabla 1; páginas 373-374, apartado "Discusión".	1-12
A	US 20070037752 A1 (ANSORGE, S. et al.) 15.02.2007, párrafo 1; reivindicaciones 77,78,84; compuesto A9.117.	1-12
A	ABRAMSON, F.B. et al. "Relationships between chemical structure and affinity for postganglionic acetylcholine receptors of the guinea-pig ileum". British Journal of Pharmacology, 1974, Vol. 51, páginas 81-93. Ver Resumen; página 91, Tabla 4.	1-12
A	US 2659732 A (CUSIC, J.W. et al.) 17.11.1953, página 1, columna 1, líneas 1-49; página 1, columna 2, líneas 41-46.	1-12
A	MAKSAY, G. et al. "Synthesis of tropeines and allosteric modulation of ionotropic glycine receptors". Journal of Medicinal Chemistry, 2004, Vol. 47, N. 25, páginas 6384-6391. Ver Resumen.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.10.2014

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D211/46 (2006.01)

A61K31/221 (2006.01)

C07C229/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07D, C07C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXT, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MAESTRO, B. et al. "Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines". FEBS Journal, 2007 Vol. 274. N. 2, páginas 364-376. Ver Resumen; Tabla 1; páginas 373-374, apartado "Discursión".	2007
D02	US 20070037752 A1 (ANSORGE, S. et al.)	15.02.2007
D03	ABRAMSON, F.B. et al. "Relationships between chemical structure and affinity for postganglionic acetylcholine receptors of the guinea-pig ileum". British Journal of Pharmacology, 1974, Vol. 51, páginas 81-93. Ver Resumen; página 91, Tabla 4.	1974

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere al uso de aminocarboxilatos de fórmula general I como bactericidas frente a Streptococcus, a los aminocarboxilatos bicíclicos de fórmula general Ia y a composiciones bactericidas que incluyen alguno de dichos aminocarboxilatos bicíclicos.

El documento D01 divulga los aminocarboxilatos benzoilcolina, atropina e ipratropio, aminocarboxilatos compuestos no coincidentes con los definidos en la solicitud al presentar como sustituyente un único grupo arilo. Dichos compuestos inhiben las proteínas enlazantes de colina (C-LytA) presentes en Streptococcus pneumoniae, habiendo probado que las aminas atropina e ipratropio inhiben in vitro fuertemente el crecimiento de pneumococcus (Resumen; Tabla 1; páginas 373-374, apartado "Discusión").

El documento D02 divulga el compuesto 9H-xanteno-9-carboxilato de 2-(piperidin-1-il)etilo, compuesto concordante con los compuestos de fórmula general I definidos en las reivindicaciones 1 y 4 de la solicitud. Dicho compuesto presenta actividad de inhibición de aminopeptidasas, pudiendo ser incorporado en composiciones para el tratamiento de procesos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, procesos alérgicos o de rechazo de tejidos trasplantados (párrafo 1; reivindicaciones 77, 78 y 84, compuesto A9.117).

El documento D03 divulga el compuesto $\text{Ph}_2\text{CHCOOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$ junto a otras aminocarboxilatos de fórmula concordante con los compuestos de fórmula general I definidos en la reivindicación 1 de la solicitud. Dichos compuestos presentan afinidad por los receptores de acetilcolina postganglionicos. Los compuestos que complejan los receptores de acetilcolina pueden ser utilizados para la preparación de composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras demencias (Resumen; página 7, Tabla 4).

Aunque son conocidos en el estado de la técnica aminocarboxilatos concordantes con los de fórmula general I definidos en la reivindicación 1 de la solicitud, estos presentan actividad diferente a la antibiótica, por lo que se reconoce novedad a la invención definida en las reivindicaciones 1-9 de la solicitud (Art. 6.1 LP 11/1986). Igualmente no se han encontrado en el estado de la técnica aminas bicíclicas sustituidas por grupos diaril-carboxilato como las de fórmula Ia definidos en la reivindicación 10 de la solicitud por lo que las reivindicaciones 10-12 de la solicitud son igualmente nuevas (Art. 6.1 LP 11/1986).

Por otro lado, aunque es conocida la actividad antibiótica de las aminocarboxilato benzilcolina (compuesto aminocarboxilato funcionalizado con un único grupo aromático), atropina e ipratropio (aminas bicíclicas sustituidas por un grupo fenilcarboxilato), ver documento D01 considerado el más cercano en el estado de la técnica, se considera que dicho documento no dirige al experto en la materia hacia el uso como antibiótico frente a Strptococcus de aminocarboxilatos sustituidos por más de un grupo aromático como son de fórmula general I de la solicitud sin la necesaria experimentación, ni igualmente hacia aminas bicíclicas sustituidas por gruposdiaril- carboxilato, las cuales presentan una buena inhibición del crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-12 de la solicitud posee actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).