



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 616**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99941773 .6**

96 Fecha de presentación : **31.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1109831**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2001**

54

Título: **Péptidos citotóxicos modificados por restos voluminosos o lipofílicos.**

30

Prioridad: **28.08.1998 GB 9818938**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2011

73

Titular/es: **LYTIX BIOPHARMA AS.**
Tromsø Science Park, P.O. Box 6447
Tromsø, NO

72

Inventor/es: **Svendsen, John, Sigurd;**
Rekdal, Øystein;
Sveinbjørnsson Baldur y
Vorland, Lars

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 616 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos citotóxicos modificados por restos voluminosos o lipofílicos.

La presente invención se refiere a péptidos bioactivos, más particularmente a péptidos que se han modificado para mejorar su actividad citotóxica.

- 5 Una gran variedad de organismos utilizan los péptidos como parte del mecanismo de defensa del hospedador, con los que en los vertebrados se complementa al sistema inmunitario mediado por las células, que es muy específico [Mor, A., Hani, K. y Nicolas, P (1994) *J. Biol. Chem*, 269, 31635-31641. Boman, H. G. (1996) *Scand. J. Immunol.* 43, 475-482]. Se han aislado péptidos antimicrobianos de especies tan distintas como las bacterias y los mamíferos [Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. y Ganz, T. (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11, 105-128]. Generalmente, estos péptidos antibióticos tienen una carga positiva neta y son propensión a formar estructuras de hélice α u hoja β anfipáticas cuando interactúan con la bicapa fosfolipídica externa de la membrana celular bacteriana [Besalle, R., Gorea, A., Shalit, J., Metger, J. W., Dass, C., Desiderio, D. M. y Fridkin, M. (1993), *J. Med. Chem.* 36, 1203-1209]. En la mayoría de los casos se conocen los mecanismos moleculares detallados de la acción antibiótica, aunque algunos péptidos clasificados como péptidos de clase L (lítica) se cree que interactúan con las membranas celulares bacterianas, formando probablemente canales iónicos o poros [Ludtke, S. J. , He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A, Yang, L y Huang, H. W (1996) *Biochemistry* 35, 13723-13728], lo que conlleva cambios de permeabilidad y la resultante lisis celular.

- Las magaininas son péptidos antibacterianos de la piel de la rana *Xenopus laevis* y se clasifican como antibióticos de clase L porque lisan específicamente las bacterias; otros péptidos tales como los mastroparanos, un veneno de abeja, carecen de esta especificidad porque lisan las células eucariotas así como las células procariotas, y se llaman venenos de clase L [Tytler, E. M., Anantharamiah, G. M., Walker, D. E., Mishra, V. K., Palgunachari, M. N. y Segrest, J. P (1995) *Biochemistry*, 34, 4393-4401]. La resistencia a los antibióticos mostrada por determinados microorganismos infecciosos es un problema creciente y siempre se necesitan nuevos antibióticos. Se conocen péptidos antibacterianos, tales como los péptidos de clase L, y se están descubriendo más con el objetivo de encontrar un péptido que sea muy citotóxico y preferentemente específico de las células procariotas. Existen diferencias en la estructura y la composición de las bicapas lipídicas entre los eucariotas y los procariotas, y entre los propios procariotas, lo que significa que diferentes péptidos tendrán especificidades muy diferentes.

- Al igual que las magaininas y los mastroparanos, se han aislado péptidos de defensa de hospedadores en las polillas y moscas (cecropinas) y en el cangrejo herradura. Está clara la acción directa de estos péptidos de defensa del hospedador para repeler a los predadores, por ejemplo como venenos. La búsqueda de péptidos que muestran efectos antibióticos ha conducido a la identificación de otras proteínas/péptidos que no se esperaría que tuvieran propiedades citotóxicas. Uno de éstos es la lactoferrina, un transportador de hierro que también muestra un efecto antibacteriano débil.

- Al igual que se han buscado nuevos péptidos antimicrobianos, más recientemente se ha explorado la mejora de la actividad de las proteínas o péptidos con propiedades antimicrobianas conocidas. En el caso de la lactoferrina bovina se ha digerido la proteína nativa con pepsina gástrica para producir un péptido, la lactoferrina B (LFB), que es mucho más activo que la lactoferrina bovina nativa. La LFB es un péptido de 25 restos que corresponde a los restos 17 a 41 de la lactoferrina bovina [Bellamy et al, (1992) *Biochem. Biophys. Acta.* 1121, pág. 130 y siguientes]. Se han llevado a cabo estudios de actividad según la estructura en las magaininas y se ha demostrado, por ejemplo, que la mejora de la helicidad y de la carga catiónica conduce a una mayor actividad antibacteriana [Chen, Y. H., Brown, J. H., Morell, J. L. y Huang, C. M. (1988) *FEBS Letters* 236, 462-466]. No obstante, tales modificaciones de secuencias a menudo dan lugar a una mayor actividad hemolítica. Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención preparar péptidos y/o derivados peptídicos que tengan una actividad antibacteriana significativa, pero que preferentemente tengan una toxicidad baja, a saber, poco efecto sobre las células eucariotas normales, por ejemplo, una actividad hemolítica baja. Aunque que los eritrocitos no se pueden considerar células eucariotas típicas, proporcionan una manera cómoda de ensayar toxicidad y son un tipo de célula que los péptidos bioactivos terapéuticos no deben lisar en ningún caso en una cantidad significativa.

Se ha encontrado que aumentando la voluminosidad o la naturaleza lipófila de un péptido, su bioactividad puede aumentar, en particular su citotoxicidad. Preferentemente se aumenta la voluminosidad y la lipofilia de uno o más restos de aminoácidos.

- 50 Por lo tanto, según la presente invención se da a conocer un péptido de 7 a 15 restos con tres o más restos catiónicos que es capaz de formar una hélice α anfipática y en el que se ha mejorado la citotoxicidad por la introducción de uno o más aminoácidos lipofílicos voluminosos no genéticos, en el que el grupo R de dicho aminoácido lipofílico y voluminoso no genético no es estándar, tiene al menos 9 átomos que no son de hidrógeno y tiene 2 anillos cerrados de 5 o 6 átomos, así como ésteres, amidas, sales y derivados cíclicos de los mismos, para uso en el tratamiento de una infección bacteriana o de un tumor en un paciente. Los aminoácidos estándares del código genético se pueden agrupar según sus características, particularmente la polaridad o la carga. Los agrupamientos adecuados son glicina y alanina, serina, treonina, asparragina, glutamina y cisteína, lisina, arginina e histidina, ácido aspártico y ácido glutámico y valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina. De los 20 aminoácidos estándares (genéticos), valina, leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano y fenilalanina se pretende que estén cubiertos por la terminología «voluminoso

y/o lipófilo», siendo preferentes los aminoácidos isoleucina, triptófano y fenilalanina. A lo largo de esta especificación, se han utilizado los códigos de tres letras y de una letra ampliamente utilizados y comprensibles para los 20 aminoácidos estándares. Al reemplazo de un aminoácido de un grupo con otro aminoácido en el mismo grupo se hace referencia convenientemente como una «sustitución conservativa». Tales sustituciones no afectan por lo general de forma material a las propiedades de los péptidos de la invención y allí donde cualquier péptido difiere de otro sólo por tales sustituciones, si un péptido es un péptido de acuerdo con la presente invención, entonces típicamente el otro péptido también será un péptido de acuerdo con la invención.

Los péptidos que incorporan un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético mostrarán preferentemente una mejora del efecto citotóxico contra las células bacterianas o de tumores al mismo tiempo que la toxicidad de los péptidos, por ejemplo, su actividad hemolítica, se reduce o aumenta sólo moderadamente en comparación con el péptido natural u original.

Ha resultado sorprendente encontrar que los aminoácidos o sus derivados de un determinado tamaño se pueden utilizar para dar a conocer péptidos modificados que son particularmente adecuados para su utilización como péptidos citotóxicos. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, «aminoácido lipófilo y voluminoso no genético» quiere significar cualquier aminoácido o derivado de aminoácido que aparece de forma natural, pero no uno de los 20 aminoácidos estándares del código genético, cuyo grupo R (cadena lateral α) preferentemente no tiene carga y tiene al menos 9 átomos que no son de hidrógeno. Los aminoácidos voluminosos y lipófilos no genéticos particularmente preferentes tendrán al menos 12, preferentemente al menos 18, átomos que no son de hidrógeno en el grupo R. La terminología «que no son de hidrógeno» se utiliza para indicar que los átomos de hidrógeno no están incluidos cuando se cuenta el número de átomos presentes en un grupo o molécula.

Preferentemente, el grupo R del aminoácido lipófilo y voluminoso no genético tendrá al menos 9 átomos que no son de hidrógeno, por ejemplo, átomos de carbono, y debe tener al menos 2 anillos cerrados de 5 o 6 átomos, y convenientemente, estos dos anillos están fusionados o unidos por puentes. Los anillos están formados por átomos de carbono, y también incluyen opcionalmente átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Los aminoácidos particularmente preferentes comprenden un indol sustituido o sin sustituir. El grupo debe ser preferentemente tridimensional. Los aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos preferentes incluyen adamantilalanina, 3-benzotienilalanina, 4,4'-bifenilalanina, 3,3-difenilalanina, 2,6-diclorobenciltirosina, ciclohexiltirosina, 7-benciloxitriptófano, tri-*tert*-butilriptófano, homotriptófano, 3-(antraceni)-L-alanina, L-tiroxina, 3,3',5-triyodo-L-tironina.

Una molécula lipófila es una que se asocia con su propia clase en una solución acuosa, no necesariamente porque las interacciones entre las moléculas lipófilas son más fuertes que entre la molécula lipófila y el agua, sino porque las interacciones entre una molécula lipófila y el agua destruiría las interacciones más fuertes entre las propias moléculas de agua. Por lo tanto, es preferible que el grupo R del aminoácido lipófilo y voluminoso no genético no contenga muchos grupos funcionales polares, por ejemplo, no más de 4, preferentemente 2 o menos. Tales grupos aumentarían la interacción de unión con el entorno acuoso y, por lo tanto, disminuirían la lipofilia de la molécula. Por lo tanto, se prefieren los grupos muy lipófilos. Por ejemplo, un grupo fenilo como componente de un grupo lipófilo y voluminoso sería preferente a un grupo piridilo, incluso aunque tengan el mismo grupo de átomos que no sean de hidrógeno y tengan un tamaño global similar.

Por lo tanto, los restos de aminoácidos lipófilos y voluminosos adecuados incluirán aminoácidos que se producen de forma natural y aminoácidos que no se producen de forma natural que tienen un grupo R como el definido previamente, por ejemplo, adamantilalanina o cualquier aminoácido, incluidos los aminoácidos del código genético, cuyos grupos R se han modificado para proporcionar un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético como el definido previamente.

Los aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos de esta segunda categoría incluyen restos de fenilalanina y triptófano modificado, en particular restos de triptófano que tienen sustituciones en la posición 1, 2, 5 y/o 7 del anillo de indol, siendo preferentes las posiciones 1 o 2. El experto en la técnica conoce otros muchos derivados de aminoácidos que tienen un carácter lipófilo y voluminoso, y se pretende que queden incluidos en la terminología «aminoácido lipófilo y voluminoso no genético».

Los aminoácidos adecuados incluyen tiroxina y los siguientes aminoácidos disponibles comercialmente y sus derivados:

L-3-benzotienilalanina, CAS = 72120-71-9 (Synthetech), D-3-benzotienilalanina, CAS = 111139-55-0 (Synthetech), L-4,4'-bifenilalanina (Synthetech), D-4,4'-bifenilalanina (Synthetech), L-3,3-difenilalanina (Synthetech), D-3,3-difenilalanina (Synthetech), L-2-indanilglicina (Synthetech), D-2-indanilglicina (Synthetech), L-1-naftilalanina, CAS = 55516-54-6 (Synthetech), D-1-naftilalanina, CAS = 78306-92-0 (Synthetech), L-2-naftilalanina, CAS = 58438-03-2 (Synthetech), D-2-naftilalanina, CAS = 76985-09-6 (Synthetech), 2,6-diclorobenciltirosina, CAS = 40298-71-3 (Senn Chemicals), Fmoc-benciltirosina (Senn Chemicals), Fmoc-ciclohexiltirosina (Senn Chemicals), N-acetilhomotriptófano (Toronto Research), 7-benciloxitriptófano (Toronto Research), homotriptófano (Toronto Research), Boc- (o Fmoc-) 3-(antraceni)-L-alanina (Peninsula Laboratories), Boc- (o Fmoc-) 3-(2-quinoil)-L-alanina (Peninsula Laboratories), Boc- (o Fmoc-) 3-(2-quinoil)-D-alanina (Peninsula Laboratories), Boc-2-indanil-L-glicina (Peninsula Laboratories), Boc-2-indanil-D-glicina (Peninsula Laboratories), Fmoc-L-p-(Trt-tiometil)fenilalanina (RSP), L-p-benzoilfenilalanina (Advanced ChemTech), D-p-benzoilfenilalanina (Advanced ChemTech), L- β -1-naftil-alanina (Advanced ChemTech), D- β -1-naftil-alanina (Advanced ChemTech), L-tiroxina Na, CAS = 6106-07-6 (Novabiochem), 3,3',5-triyodo-L-tironina Na, CAS = 55-06-1

(Novabiochem).

- Sorprendentemente, se ha encontrado que los grupos protectores químicos estándares unidos a un grupo R y, por lo tanto, que aumenta la voluminosidad y la lipofilia del resto, pueden aumentar la bioactividad de los péptidos. Tales grupos protectores se conocen bien en la técnica. Grupos protectores adecuados que pueden mejorar significativamente la actividad antibacteriana incluyen Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo) y Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuranosulfonilo), que pueden aumentar ventajosamente la voluminosidad y la lipofilia de los aminoácidos aromáticos, por ejemplo, Phe, Trp y Tyr. Así mismo, el grupo *tert*-butilo es un grupo protector habitual para un amplio abanico de aminoácidos y es capaz de proporcionar aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos como se describe en la presente memoria, particularmente cuando modifica restos aromáticos. El grupo Z (carboxibencilo) es otro grupo protector que se puede utilizar para aumentar la voluminosidad y la lipofilia de un aminoácido para proporcionar un péptido de acuerdo con la invención.

Aunque la observación inicial de que el aumento de la bioactividad era un resultado de una transferencia fortuita del grupo protector Pmc dentro del péptido desde el grupo guanidino de la arginina al triptófano, los aminoácidos tales como Trp que llevan el grupo protector se pueden sintetizar directamente y se pueden incorporar en el péptido.

- Esta observación de la transferencia del Pmc desde la Arg al Trp ha sido observada por Stierandova et al. en *Int. J. of Peptide Science* (1994) 43, 31-38. Los péptidos de acuerdo con la invención se pueden fabricar mediante la utilización de esta transferencia del grupo protector desde la Arg al Trp. Cuando estos dos aminoácidos están separados por una distancia de 1 a 3 aminoácidos, la transferencia del Pmc es más eficaz. Por lo tanto, los péptidos de acuerdo con la invención deben comprender convenientemente un aminoácido que lleve un grupo protector, por ejemplo, Trp con el Pmc unido en la posición 2 del anillo indólico. El grupo Pmc puede estar unido a un Trp que se haya añadido o a un resto Trp presente en el péptido original. En una realización preferente de la invención, los péptidos incorporarán uno o más restos de triptófano adicionales que luego se pueden modificar para aumentar más su carácter voluminoso y lipófilo y, por lo tanto, proporcionar un péptido de acuerdo con la invención.

- En el contexto de la presente invención, «derivados cíclicos» se refiere a los péptidos que son cíclicos como resultado de uno o más puentes disulfuro. Para algunos péptidos que incorporan dos o más restos de cisteína, esto será la forma que aparecerá en la naturaleza y la producción de un péptido lineal requerirá la modificación de los restos de cisteína.

- El aminoácido lipófilo y voluminoso no genético puede estar presente como añadido a los aminoácidos de la secuencia original, la cual puede ser un péptido que se produce de forma natural o un fragmento del mismo, o incorporar otras modificaciones a un péptido que se produce de forma natural o fragmento del mismo, o ser completamente sintético. Alternativa y preferentemente, el aminoácido lipófilo y voluminoso no genético puede estar en lugar de uno de los aminoácidos en la secuencia original. Cuando el aminoácido se «añade», entonces siguen estando todos los aminoácidos originales en el péptido. Cuando el aminoácido extra es «sustituto», reemplaza a uno de los aminoácidos originales, aunque un reemplazo puede incluir la modificación del resto existente para proporcionar un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético tal y como se ha definido previamente.

- El aminoácido lipófilo y voluminoso no genético está presente preferentemente en lugar de otro aminoácido no esencial que se produce de forma natural. Con «no esencial» se hace referencia a un aminoácido cuya presencia no es necesaria para que el péptido completo muestre actividad citotóxica. Típicamente, el péptido antes de la incorporación del aminoácido lipófilo y voluminoso no genético mostrará cierta actividad citotóxica, mejorándose esta actividad por la incorporación de un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético.

- En una realización preferente de la invención, el aminoácido lipófilo y voluminoso no genético estará presente adyacente a un aminoácido lipófilo y voluminoso genético presente en el péptido original, o preferentemente en lugar del mismo. En otras palabras, un aminoácido que ya es lipófilo y voluminoso se hace más lipófilo y voluminoso. Esto se puede conseguir con la modificación del grupo R del aminoácido original o reemplazando ese aminoácido con un aminoácido no genético. Los aminoácidos del código genético que se pueden considerar voluminosos y/o lipófilos se definieron previamente. Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, los péptidos incorporarán un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético en la forma de, por ejemplo, un resto de triptófano modificado (por ejemplo, Trp-Pmc) o, por ejemplo, un resto de tributiltriptófano en lugar de, por ejemplo, triptófano o fenilalanina.

Preferentemente, los péptidos de la invención incorporarán entre 1 y 5, por ejemplo 2 o 3, aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos tal y como está definido en la presente memoria.

- Para un péptido citotóxico determinado, las posiciones adecuadas para la incorporación de aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos que hacen aumentar la citotoxicidad se pueden identificar de diversas formas. Tal y como se explicó anteriormente, «incorporación» puede incluir la modificación de un resto existente. Se puede utilizar un barrido con alanina (que implica la sustitución secuencial de los aminoácidos por alanina) para identificar los aminoácidos no esenciales que se podrían sustituir por un aminoácido lipófilo y voluminoso o modificado para aumentar su lipofilia y voluminosidad. Alternativamente, un péptido candidato que forma una hélice α anfipática se puede representar como una «rueda helicoidal» de restos con los restos catiónicos identificados. Estos restos catiónicos formarán dominios o regiones cargados positivamente dentro de la estructura peptídica helicoidal tridimensional y las posiciones adecuadas para la incorporación de aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos, o la modificación para proporcionarlos, son

generalmente adyacentes a tales dominios catiónicos, o se sitúan en ellos, cuando se observan a lo largo del eje de la rueda helicoidal.

Incluso se ha encontrado que los péptidos que tienen una mejora de la actividad antibacteriana y/o antitumoral y preferentemente una reducción de la toxicidad, se pueden preparar trasladando un aminoácido lipófilo y voluminoso desde su posición en la secuencia original/nativa a una región adyacente al sector catiónico, por lo que la composición total de aminoácidos del péptido permanece inalterada. Se describen tales péptidos de 7 a 25 aminoácidos que tienen 3 o más restos catiónicos y que son capaces de formar una hélice α anfipática y que tienen un aminoácido lipófilo y voluminoso adicional adyacente al sector catiónico, donde dicho aminoácido lipófilo y voluminoso adicional se toma de otra posición no preferente de la secuencia. En lugar del aminoácido lipófilo y voluminoso se puede colocar el resto desde una posición adyacente al sector catiónico que reemplaza el aminoácido lipófilo y voluminoso, o cualquier otro aminoácido menos voluminoso y lipófilo. Los aminoácidos lipófilos y voluminosos adecuados en posiciones no preferentes que se pueden trasladar a la región adyacente al sector catiónico (posición preferente) se pueden identificar mediante, por ejemplo, un barrido con alanina que identifica los aminoácidos no esenciales, o mediante el estudio de una distribución de rueda helicoidal, donde las posiciones no preferentes típicamente se encuentran en el lado opuesto al dominio catiónico.

También se ha encontrado que los péptidos que tienen menos toxicidad pero todavía tienen una actividad antibacteriana o antitumoral razonable (a saber, que tienen una mayor selectividad) se pueden preparar reemplazando un aminoácido muy voluminoso y lipófilo no esencial tal como triptófano o fenilalanina con un aminoácido menos voluminoso y lipófilo, por ejemplo isoleucina o leucina, o incluso alanina o lisina. Generalmente, un aminoácido lipófilo y voluminoso «no esencial» se colocará en el lado opuesto de la hélice desde el sector catiónico, y tales aminoácidos lipófilos y voluminosos no esenciales se pueden identificar mediante un diagrama de rueda helicoidal o mediante un barrido con alanina. Sin embargo, estos péptidos deben conservar al menos 3 aminoácidos lipófilos y voluminosos como queda definido en la presente memoria. Por lo tanto, se describen péptidos citotóxicos modificados que tienen de 7 a 25 aminoácidos, al menos tres restos catiónicos y al menos tres aminoácidos lipófilos y voluminosos y que son capaces de formar una hélice α anfipática, en la que se describe que un resto de triptófano o fenilalanina no esencial de la secuencia original/nativa se reemplaza por un resto menos lipófilo y voluminoso, por ejemplo, isoleucina o alanina. La indolicina es un péptido rico en triptófano que se produce de forma natural y que se puede modificar ventajosamente de este modo para reducir su toxicidad.

Otros sitios adecuados para la incorporación de un aminoácido lipófilo y voluminoso son las posiciones de un aminoácido lipófilo existente, o cerca de él, o preferentemente adyacente a él. La proximidad se juzga en términos de la estructura secundaria en vez de la estructura primaria del péptido. Las técnicas implicadas en la realización de un barrido con alanina y en la construcción de diagramas de rueda helicoidal se conocen bien en la técnica.

En el caso de la LFB (17-31) (un fragmento de 15 aminoácidos de la LFB que carece de los diez restos del extremo carboxilo), los aminoácidos no esenciales determinados con la utilización de un barrido con alanina fueron Cys(3), Gln(7) y Gly(14), en los que el número está en términos absolutos en relación al propio péptido. Los análogos de la LFB (17-31) en los que estos aminoácidos están reemplazados por aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos pueden ser particularmente eficaces. Para las modificaciones de los péptidos de magainina, tales como la magainina 2, la incorporación de aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos en las posiciones Phe(16) y Glu(19) puede resultar particularmente eficaz.

Además de la presencia de uno o más aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos, los péptidos de acuerdo con la invención pueden incorporar ventajosamente otras modificaciones. En particular, aumentar la carga positiva global del péptido, por ejemplo al reemplazar uno o más aminoácidos que se producen de forma natural, particularmente los aminoácidos no esenciales, con uno o más restos cargados positivamente tales como lisina o arginina, puede mejorar adicionalmente la actividad del péptido. «Cargado positivamente» se refiere a la cadena lateral (grupo R) del resto aminoacídico que tiene una carga positiva neta a pH 7,0. En el caso de los péptidos que se utilizan como agentes antitumorales, donde el péptido puede ser capaz ventajosamente de formar una hélice α , las sustituciones dentro de la secuencia peptídica que sirven para disminuir el ángulo subtendido por el sector catiónico, esto es, el ángulo de la cara cargada positivamente de la hélice puede mejorar más la actividad. De hecho, la disminución del ángulo subtendido puede tener un mayor impacto sobre la actividad que la carga positiva neta por sí misma. Se pueden reemplazar ventajosamente otros restos por alanina. También se pueden incorporar ventajosamente otros aminoácidos lipófilos y/o voluminosos «genéticos» tal y como está definido en la presente memoria, por ejemplo, Trp o Phe.

Los péptidos adecuados que se pueden modificar para proporcionar péptidos de acuerdo con la invención incluyen todos los péptidos tales como magaininas, análogos de PGLa, cecropinas, defensinas, melitina y lactoferrina, y péptidos líticos de clase L en general, etc., que se sabe que su forma intacta muestra actividad citotóxica, particularmente antimicrobiana. Otros péptidos adecuados incluyen los que no se producen de forma natural, pero que se han sintetizado, y que muestran actividad citotóxica, incluyendo tales péptidos las modelinas. En este contexto, «intacto» incluye los fragmentos obtenidos por la digestión de proteínas o péptidos que se producen de forma natural. Todavía se están descubriendo proteínas y péptidos antibacterianos nuevos y se cree que las técnicas de la presente invención tienen aplicabilidad general y se podrían aplicar simplemente, y con una posibilidad razonable de éxito, a péptidos que todavía están sin identificar pero que posteriormente se caracterizarán como citotóxicos, particularmente como antimicrobianos.

Péptidos particularmente preferentes según la presente invención son los que se basan en fragmentos de lactoferrina, particularmente los basados en la lactoferrina bovina (LFB) o fragmentos de la misma (por ejemplo, LFB 17-31) o el fragmento equivalente de la lactoferrina de otros animales.

Una ventaja particular de los péptidos de la presente invención es su tamaño pequeño, siendo preferentes los péptidos que tienen 15 o menos aminoácidos, convenientemente de 9 o 10 aminoácidos o menos. Un tal péptido pequeño eficaz es la LFB (17-27), en la que se han omitido Lys28, Leu29, Gly30 y Ala31 del extremo carboxilo de la LFB (17-31). Los péptidos se pueden producir por cualquier método conocido, convenientemente por digestión enzimática o escisión química de péptidos nativos y la modificación posterior, o mediante la síntesis directa a partir de los bloques de construcción aminoacídicos. Cuanto más corto es el péptido deseado, mejor es en cuanto se refiere a su fabricación, particularmente para la síntesis directa, que es el método preferente de fabricación, ya que esto limita los problemas asociados a la quiralidad de los aminoácidos. Además, los péptidos cortos son buenos para la bioadministración. Hay una demanda creciente de antibióticos que se puedan administrar sin necesidad de una inyección, tal como mediante inhalación y absorción por los capilares sanguíneos de los conductos nasales. De esta manera se podría administrar un péptido decaamérico con facilidad, pero los péptidos de más de 25 aminoácidos de longitud no se podrían administrar mediante inhalación.

También sería deseable aumentar la semivida en circulación del péptido y esto se podría conseguir modificando adicionalmente los péptidos de la invención para incluir aminoácidos artificiales ya que son resistentes a la degradación enzimática. Los péptidos largos pueden ser degradados por las endopeptidasas que escinden internamente el péptido, los péptidos más cortos serían menos vulnerables a la escisión por las endopeptidasas, y la degradación por las exopeptidasas, que atacan los extremos de un péptido, se podría reducir con la acetilación del extremo amino y si no con el bloqueo del extremo carboxilo.

También se ha observado que la incorporación de enantioaminoácidos puede aumentar significativamente la bioactividad de los péptidos de la invención, y que tales péptidos constituyen una realización preferente más de la presente invención. Los enantiopéptidos, que son la imagen especular exacta del péptido nativo, y los retroenantiopéptidos, que adoptan la misma conformación α helicoidal que el péptido nativo excepto que los enlaces amida apuntan en direcciones opuestas, han demostrado tener una excelente actividad antimicrobiana. De acuerdo con la invención, tales péptidos también incorporarán un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético como previamente ha quedado definido.

Los enantioaminoácidos también son resistentes a la degradación enzimática, y el resultante aumento de la semivida de los péptidos puede en cierto modo explicar la mejora de la actividad antibacteriana. Los enantioaminoácidos son caros y esto es otra razón por la que los péptidos relativamente cortos de la presente invención son particularmente ventajosos.

Por lo tanto, otros péptidos preferentes de acuerdo con la invención incorporan un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético como queda definido previamente y también comprenden uno o más D-aminoácidos, por ejemplo, 1/3 o 1/2 o 2/3 de los aminoácidos están en la forma D y se pueden distribuir de cualquier modo a lo largo de la secuencia, por ejemplo, alternándose con los L-aminoácidos.

Con la terminología «capaz» de formar una hélice α anfipática se quiere decir que el péptido puede, en determinadas circunstancias, formar una hélice α . Los péptidos no tienen por qué tener necesariamente la hélice α como su configuración natural en el medio acuoso, pero son capaces, por ejemplo en presencia de sustancias que proporcionan hélices tales como docetilsulfato de sodio (SDS), 2,2,2,-trifluoroetanol (TFE), 1,1,1,3,3,3,-hexafluoroisopropanol (HFIP) o micelas diferentes al SDS y a las membranas celulares (artificiales y naturales), de formar una hélice α o una estructura esencialmente en hélice α . El dicroísmo circular se puede utilizar convenientemente para analizar la presencia de una hélice α .

De más importancia que la formación de una hélice α es el hecho que los péptidos son anfipáticos, es decir, que la estructura secundaria del péptido es anfipática, tanto si es α helicoidal como si no lo es. Esto se pone en evidencia por la buena actividad de los enantiopéptidos que no forman una hélice α en cualquier entorno y los péptidos que incorporan uno o más D-aminoácidos.

Se describen compuestos no peptídicos que muestran la misma actividad citotóxica que su homólogos proteínicos. Tales peptidomiméticos o «moléculas pequeñas» capaces de imitar la actividad de una proteína o péptido es probable que se adapten mejor, por ejemplo, a la administración oral debido al aumento de su estabilidad química. Tales compuestos incluirán una parte que corresponde al «aminoácido lipófilo y voluminoso no genético» tal y como está definido previamente. Más particularmente, incluirán un grupo que corresponde al grupo R de dicho aminoácido lipófilo y voluminoso no genético, a saber, tiene al menos 7, preferentemente al menos 9, átomos que no son de hidrógeno en el equivalente del grupo R, estando este grupo sin carga y comprendiendo preferentemente pocos grupos polares.

Actualmente es habitual en la técnica reemplazar los agentes activos basados en proteínas o en péptidos, por ejemplo péptidos terapéuticos, por tales peptidomiméticos que tienen actividad funcionalmente equivalente. Existen diferentes colecciones moleculares y técnicas de química combinatoria y están disponibles para facilitar la identificación, selección y/o síntesis de tales compuestos mediante técnicas estándares (Kieber-Emons, T et al. *Current Opinion in Biotechnology* 1997, 8: 435-441). Tales técnicas estándares se pueden utilizar para obtener los compuestos peptidomiméticos de

acuerdo con la presente invención, a saber, compuestos orgánicos peptidomiméticos que muestran una actividad citotóxica esencialmente similar o igual a la de los péptidos de la invención, por ejemplo tal y como se describe en la presente memoria en los ejemplos.

5 Se describen compuestos orgánicos biomiméticos basados en los péptidos de la invención, caracterizados por que dichos compuestos muestran actividad citotóxica, por ejemplo antibacteriana o antitumoral, a al menos el nivel mostrado por los péptidos de la invención.

10 La terminología «citotóxico» pretende referirse no sólo a una actividad contra las células procariotas, sino también contra las células eucariotas. Aunque en determinadas circunstancias es deseable tener un péptido que tenga una buena actividad antibacteriana, pero que no lisa ni destruye de otro modo las células del paciente, los péptidos dentro del alcance de la presente invención han demostrado tener una actividad antitumoral. La actividad antitumoral de estos péptidos y los medicamentos que los contienen constituyen otros aspectos de la presente invención. La actividad antitumoral incluye la destrucción o reducción del tamaño o del número de tumores benignos o malignos y la prevención o reducción de las metástasis.

15 En general, los péptidos procedentes de la lactoferrina de acuerdo con la invención que no tienen aminoácidos no genéticos y que tienen una buena actividad contra las células tumorales tendrán de 25 a 10, preferentemente de 12 a 20, por ejemplo 18, aminoácidos. Los péptidos de acuerdo con un grupo lipófilo y voluminoso no genético y que tienen buena actividad antitumoral generalmente serán más cortos, con de 7 a 20, preferentemente de 10 a 20, más preferentemente de 10 a 15, aminoácidos. A modo de ejemplo, LFB 17-27 A₇ M₃ R_{2,11} W_{4,10} Y₁-NH₂ Pmc y LFB 18-24 R_{1,7} W_{2,3,6}, -NH₂ Pmc se requieren sólo a 50 y 38 µg/ml, respectivamente, para destruir el 50% de las células Meth A.

20 En general, los péptidos que tienen buena actividad contra los tumores serán más largos que los que muestran una buena actividad antibacteriana. Los péptidos antibacterianos tendrán típicamente de 7 a 15, preferentemente de 7 a 14, por ejemplo 8 o 9, aminoácidos.

25 La actividad antitumoral de los péptidos modificados es muy superior a que lo que se podría predecir simplemente del hecho que los péptidos tengan un efecto lítico sobre las células bacterianas. El efecto lítico observado en las células tumorales in vitro es poderoso y la regresión tumoral en los ratones es muy rápida, produciéndose en el plazo de 3 a 6 días. Se observa la inducción de una memoria inmunitaria, ya que la inoculación de las células tumorales en los ratones después del tratamiento y la regresión del tumor original no dio lugar a ningún crecimiento secundario del tumor.

30 Es importante señalar que se ha demostrado la regresión de los tumores establecidos, incluso con la LFB intacta. En este contexto, «intacta» se refiere también a fragmentos de la LFB que manifiestan esta actividad antitumoral, por ejemplo LFB (17-31). El péptido puede ser cíclico o lineal, preferentemente cíclico. La capacidad para tratar tumores sólidos es particularmente útil cuando un tumor no es extirpable. Una ventaja más es que el efecto citolítico observado en los tumores no es específico de especie y que, por lo tanto, los péptidos resultan útiles para tratar tumores humanos.

35 Las dosis adecuadas para el tratamiento de los tumores con los péptidos bioactivos le serán conocidas al experto en la técnica, y las dosis utilizadas en los experimentos con animales descritas en la presente memoria se pueden utilizar para estimar una dosis adecuada para otros pacientes humanos y animales. La administración de un péptido puede ser diaria, más usualmente en días alternos o cada tres o cuatro días. De 1 a 10, típicamente de 2 a 5, administraciones pueden dar lugar a un tratamiento satisfactorio. Se utilizarán protocolos de tratamiento similares para el tratamiento de infecciones bacterianas o víricas.

40 Los péptidos de acuerdo con la invención serán preferentemente al menos tan citotóxicos como la LFB (17-31). Algunos péptidos de acuerdo con la invención serán más activos en algunos aspectos (por ejemplo, antitumoral) que la LFB (17-31), pero menos activos en otros aspectos, por ejemplo, contra *E. coli*. Algunos péptidos pueden ser menos activos, pero otras propiedades, por ejemplo una actividad hemolítica baja, los hará útiles para determinadas aplicaciones.

45 La actividad antibacteriana de los péptidos de la invención puede manifestarse por sí misma de maneras muy diferentes. Determinadas modificaciones pueden dar lugar a péptidos que son bacteriostáticos y otras a péptidos que son bactericidas. Ventajosamente, la mayoría de los péptidos de acuerdo con la invención son bactericidas. Por lo tanto, entre otras cosas, la invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de bacterias, que comprende poner en contacto la bacteria con una cantidad inhibidora eficaz de un péptido citotóxico de acuerdo con la invención.

50 La terminología «poner en contacto» hace referencia a exponer las bacterias a un péptido de tal forma que puede inhibir, destruir o lisar eficazmente las bacterias, unirse a la endotoxina (LPS), o permeabilizar las membranas externas de las bacterias gramnegativas. La puesta en contacto puede ser in vitro, por ejemplo con la adición del péptido a un cultivo bacteriano para analizar la susceptibilidad de las bacterias al péptido. La puesta en contacto puede ser in vivo, por ejemplo con la administración del péptido a un sujeto con un trastorno bacteriano, tal como un choque septicémico. «Inhibir» o «cantidad inhibidora eficaz» se refiere a la cantidad de péptido que se requiere para ocasionar un efecto bacteriostático o bactericida. Ejemplos de bacterias que se pueden inhibir incluyen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. typhimurium* y *S. aureus*. El método de inhibir el crecimiento de las bacterias puede además incluir la adición de antibióticos para el tratamiento sinérgico o de combinación. El antibiótico apropiado administrado dependerá típicamente de la susceptibilidad de las bacterias, tanto si la bacteria es gramnegativa como grampositiva, y será fácilmente

discernible para el experto en la técnica.

- Además, diferentes modificaciones pueden mejorar la actividad antibacteriana contra determinados tipos de bacterias más que contra otros tipos. Por ejemplo, *S. aureus* es particularmente susceptible a los grupos lipófilos y voluminosos muy grandes, típicamente los que tienen al menos 12 o 18 átomos que no son de hidrógeno en el grupo R, por ejemplo
- 5 los péptidos que incorporan un resto de triptófano modificado con Pmc. Además, los grupos R que son esencialmente planos tienen una buena actividad contra *E. coli*, mientras que un grupo más tridimensional de lipofilia equivalente es preferente para producir una buena actividad contra *S. aureus*.

- Aunque, como se explicó anteriormente, la técnica de mejorar la actividad introduciendo un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético es de aplicabilidad general a una amplia variedad de péptidos citotóxicos, particularmente a los péptidos de clase L (líticos), son de particular interés los péptidos procedentes de mamíferos, particularmente los péptidos procedentes de la lactoferrina, especialmente de la lactoferricina. Se ha encontrado que a la secuencia de la lactoferricina bovina (LFB 17-41) se le pueden retirar hasta unos 10 restos del extremo carboxilo, por ejemplo a LFB (17-
- 10 31), sin una pérdida significativa de actividad antibacteriana. LFB 17-31 = **FKCRRWQWRMKKLGA**. Al igual que las lactoferrinas bovinas, se han identificado las regiones que corresponden a la LFB 17-31 en los humanos, LFH = **TKCFQWQRNMRKVRG**, en la cabra, LFC = **SKCYQWQRMRKLG**, en los ratones, LFM = **EKCLRWQNEMRKVG** y en los
- 15 cerdos, LFP = **SKCRQWQSKIRRTNP**, y tales regiones también son adecuadas para la manipulación según la invención.

- Se ha observado una variante de los efectos de un aumento de la lipofilia de determinados péptidos explicados anteriormente y se describe un péptido citotóxico de 15 aminoácidos o menos caracterizado por tener un grupo lipófilo/voluminoso adicional en un extremo. El grupo lipófilo/voluminoso incluye grupos orgánicos tales como grupos
- 20 protectores, especialmente Fmoc, Boc u otros grupos protectores del extremo amino, o grupos alquilo cíclicos, lineales o ramificados de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ en la que n está entre 5 y 20, preferentemente entre 8 y 14 y lo más preferentemente de 10 a 12, o grupos acilo cíclicos o lineales o ramificados que tienen entre 6 y 21, preferentemente 9 y 15 y lo más preferentemente 11 a 13, átomos de carbono. Por ejemplo, un péptido de LFB (17-31) que tiene un grupo alquilo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ en la punta aminoterminal aumentaba hasta 10 veces la actividad antibacteriana. Los grupos se unen al
- 25 extremo amino o carboxilo, o cercanos, preferentemente adyacentes, a los restos del extremo amino o carboxilo. Estos grupos pueden estar unidos a restos de aminoácidos naturales, o se pueden incorporar en el péptido aminoácidos no naturales que llevan el grupo lipófilo/voluminoso. La definición adecuada del «péptido citotóxico» es la que se explicó anteriormente.

- Por lo tanto, los péptidos pueden, además de incorporar un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético tal y como está
- 30 definido previamente, estar modificados en el extremo carboxilo y/o amino.

- Más específicamente, se ha encontrado que los péptidos que tienen actividad antibacteriana y/o antitumoral, pero una toxicidad baja, se pueden construir incorporando modificaciones del extremo amino que incluyen un grupo cíclico, preferentemente un anillo de 5 o 6 átomos que puede ser alquilo o arilo. Más preferentemente, el grupo que comprende la modificación del extremo amino abarca 2 o más anillos fusionados, uno o más de los cuales puede ser un anillo de 5
- 35 átomos, por ejemplo adamantilo o Fmoc. Sorprendentemente, se ha encontrado que los grupos que tienen un carácter tridimensional, como los que incorporan un sistema de anillos fusionados que no descansan en un único plano, tienen propiedades particularmente ventajosas.

Las moléculas adecuadas que se podrían utilizar para modificar el extremo amino incluyen:

- Ácido *cis*-biciclo [3.3.0]octan-2-carboxílico, [18209-43-3] (Aldrich); ácido abiético, [514-10-3] (Aldrich); ácido ursólico, [77-52-1] (Aldrich); ácido (1,2-metanofullereno- C_{60})-61-carboxílico, [155116-19-1] (Fluka); dimetilcubano-1,4-
- 40 dicarboxilato, [29412-62-2] (Fluka); ácido 2-norbornanoacético, [10007-01-8] (Aldrich); ácido 4-pentilbiciclo[2.2.2]octano-1-carboxílico, [73152-70-2] (Aldrich); ácido 3-noradamantanocarboxílico, [16200-53-6] (Aldrich); ácido 9-fluorenoacético, [6284-80-6] (Aldrich); *cis*-decahidro-1-naftol, [36159-47-4] (Aldrich); 9-etil-biciclo[3.3.1]nonano-9-ol, [21915-33-3] (Aldrich); 3-quinuclidinol, [1619-34-7] (Aldrich); [(1S)-endo]-(-)-borneol, [464-45-9] (Aldrich); (1R, 2R, 3R, 5S)-(-)-isopinocanfeol, [25465-65-0] (Aldrich); deshidroabietilamina [1446-61-3] (Aldrich); (\pm)-3-aminoquinuclidina [6530-09-2] (Aldrich); (R)-(+)-bornilamina, [32511-34-5] (Aldrich); 1,3,3-trimetil-6-aza-biciclo[3.2.1]octano [53460-46-1] (Aldrich); 1-adamantilamina, [768-94-5] (Aldrich); 9-aminofluoreno, [5978-75-6] (Aldrich); ácido (1R)-(-)-10-canforsulfónico, [35963-20-3] (Aldrich); ácido 5-isoquinolinosulfónico, [27655-40-9] (Aldrich); 2-quinolintiol, [2637-37-8] (Aldrich); 8-mercaptomentona, [38462-22-5] (Aldrich).

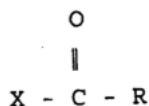
- Por lo tanto, las modificaciones del extremo amino típicamente comprenderán un grupo R lipófilo y voluminoso que se puede unir directamente a la amina del extremo amino para formar una amina aminoterminal mono-, di- y posiblemente
- 55 trialquilada catiónica. Alternativamente, el grupo R se puede unir mediante un resto enlazante, por ejemplo un grupo carbonilo (RCO), por ejemplo adamantilo o bencilo, carbamato (ROCO), por ejemplo Fmoc, o un conector que forma urea (RNHCO) o (R_2NCO), o un conector que forma una sulfonamida, boronamida o fosfonamida. Los enlazantes que forman sulfonamida pueden ser particularmente útiles cuando se requiere un péptido más estable. El grupo R lipófilo y voluminoso comprende preferentemente un grupo cíclico saturado, más preferentemente un grupo policíclico en el que los grupos cíclicos están fusionados o puenteados.

Los péptidos que incorporan tales modificaciones del extremo amino son particularmente eficaces como péptidos antitumorales y, sorprendentemente, la presencia de un grupo aminoterminal cíclico, preferentemente multicíclico, proporciona péptidos con una capacidad para destruir células tumorales, por ejemplo las células Meth A (de un fibrosarcoma), pero tienen poca actividad citotóxica contra las células normales, por ejemplo los eritrocitos o los fibroblastos normales. Esta selectividad es, por supuesto, muy deseable en el tratamiento in vivo de los tumores establecidos. Por ejemplo, el ciclohexil-LFB 17-31 a una concentración de 46 µg/ml destruyó el 50% de las células Meth A (estirpe celular de sarcoma murino), pero no destruyó el 50% de los eritrocitos o de los fibroblastos incluso a una concentración de 1000 µg/ml.

También se han investigado modificaciones del extremo carboxilo particularmente eficaces. Se sabe que la amidación del extremo carboxilo altera la carga global de un péptido, pero ahora se ha encontrado que las modificaciones mayores del extremo carboxilo, que incluyen la formación de ésteres, que incluye tioésteres o amidas primarias y secundarias sustituidas, da lugar a péptidos con una mejor actividad citotóxica. Los grupos modificadores del extremo carboxilo contendrán ventajosamente más de 4, preferentemente 6, más preferentemente 8 o 10 o más, átomos que no son de hidrógeno y forman, por ejemplo, un éster o amida bencilicos. Otros grupos del extremo carboxilo incluyen naftilamina, aminas aromáticas sustituidas tales como fenil-etilamina, grupos mono-, di- o triaminoalquilo, etc., prefiriéndose grupos que incorporan un grupo cíclico. Los grupos protectores estándares del extremo carboxilo también son adecuados como modificaciones que mejoran la actividad.

Por lo tanto, las modificaciones del extremo carboxilo típicamente comprenderán un grupo R lipófilo y voluminoso que se puede unir directamente al grupo carboxi del extremo carboxilo para formar una cetona. Alternativamente, el grupo R se puede unir a través de un resto conector, por ejemplo (OR) que forma un éster en el extremo carboxilo, (NH-R) o (NR₂), en el que los dos grupos R tienen que ser diferentes) que forma grupos amida primarios y secundarios, respectivamente, en el extremo carboxilo, o grupos (B-(OR)₂) que forman ésteres borónicos o análogos que contienen fósforo. El grupo R lipófilo y voluminoso comprende preferentemente al menos 4 átomos que no son de hidrógeno.

Típicamente, a incorporación de modificaciones en el extremo carboxilo se puede representar por la fórmula siguiente:



en la que X = un péptido de 7 a 25 aminoácidos de longitud que incorpora 3 restos catiónicos;

R = OR¹, SR¹ o R¹; y

R¹ = alquilo, cicloalquilo, aminoalquilo o arilo opcionalmente sustituido por grupos hidroxilo, alcoxi, aciloxi, alcocarboniloxi, amino, oxo o fluoro, y opcionalmente interrumpido por átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo.

Los grupos R¹ sustituidos pueden ser mono- o polisustituidos. La terminología «acilo» tal y como se utiliza en la presente memoria incluye tanto los grupos carboxilato como carbonato.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «alquilo» incluye un grupo de hidrocarburo saturado o insaturado alifático ramificado o de cadena lineal, corta o larga. R¹ puede contener hasta 40 átomos que no son de hidrógeno, preferentemente entre 4 y 12, más preferentemente de 6 a 10 de tales átomos.

Los péptidos pueden incluir los tres tipos de grupos lipófilos y voluminosos, pero preferentemente comprenderán dos de tales grupos.

También se describe un método para preparar un péptido que tiene una mejor actividad citotóxica y/o una mayor selectividad por tipos de células diana, que comprende incorporar un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético en un péptido de 7 a 15 aminoácidos con tres o más restos catiónicos que es capaz de formar una hélice α anfipática.

También se describe un método para mejorar la citotoxicidad o la selectividad de un péptido de 7 a 15 aminoácidos con tres o más restos catiónicos al incorporar en éste un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético.

Más arriba se ha dado a conocer una definición de aminoácido lipófilo y voluminoso no genético. Tal y como se explicó previamente, «incorporar» puede incluir la modificación de un resto existente o la introducción de tal resto en el péptido mediante adición o sustitución, preferentemente sustitución. Se puede utilizar un método de síntesis mediante el cual el aminoácido lipófilo y voluminoso no genético se incluye en la secuencia del péptido creciente, por lo que no se requiere el procesamiento posterior a la formación del péptido.

Cuando, en la presente memoria, se hace referencia a un péptido que tiene una «mejor» actividad citotóxica, se quiere decir que el péptido que se ha modificado de acuerdo con la invención tiene una mejor citotoxicidad contra una o más cepas de bacterias o tipos de células cancerosas cuando se compara con el péptido sin dicha modificación. Con «mayor selectividad por los tipos de células diana» se hace referencia a que aumenta la proporción de la actividad citotóxica contra las células diana en comparación con los tipos de células que no son diana. En otras palabras, se puede mejorar

la selectividad si, por ejemplo, la actividad antibacteriana de un péptido es la misma antes y después de la modificación, pero la actividad hemolítica disminuye después de la modificación. De igual forma, se pueden hacer péptidos útiles de acuerdo con la invención incluso cuando aumenta la actividad hemolítica, si la actividad antibacteriana o antitumoral aumenta en una cantidad mayor. La selectividad también puede hacer referencia a un tipo de bacteria sobre otra.

- 5 Los péptidos, particularmente aquéllos en los que el grupo R lipófilo y voluminoso tal y como se definen en la presente memoria es una cadena lateral modificada de un aminoácido «genético», se pueden expresar en hospedadores procariontes y eucariotes mediante sistemas de expresión bien conocidos por el experto en la técnica. También se conocen bien los métodos para aislar y purificar, por ejemplo, los péptidos expresados en los microorganismos.

- Si se elige un hospedador bacteriano para la expresión de un péptido, puede ser necesario tomar medidas para proteger al hospedador frente al péptido antibacteriano expresado. Tales técnicas se conocen en la técnica e incluyen la utilización de una cepa bacteriana que es resistente al péptido particular que se está expresando o la expresión de un péptido de fusión con sección a uno o ambos extremos que inhabilita la actividad antibiótica del péptido; entonces se puede escindir el péptido de fusión. En cualquier caso, la actividad del péptido expresado puede ser baja, y sólo se incrementa a niveles realmente citotóxicos por la modificación posterior a la síntesis que proporciona un péptido de acuerdo con la invención, por ejemplo, la adición de Pmc.

- Los péptidos de la invención se pueden sintetizar directamente de algún modo cómodo. Por lo general, los grupos reactivos presentes (por ejemplo, amino, tiol y/o carboxilo) se protegerán a lo largo de toda la síntesis. La última etapa de la síntesis será, por lo tanto, la desprotección de un derivado protegido de la invención. Tal y como se explicó anteriormente, determinados péptidos de la invención llevarán un «grupo protector» ya que es el responsable de la mejor citotoxicidad.

Al construir el péptido, se puede comenzar, en principio, bien por el extremo carboxilo o bien por el extremo amino, aunque se prefiere el procedimiento que comienza por el extremo carboxilo. El aminoácido no genético se puede incorporar en esta etapa a medida que se alarga la secuencia o como resultado de una modificación posterior a la síntesis.

- 25 Los métodos de síntesis de péptidos se conocen bien la técnica, pero para la presente invención puede ser particularmente cómodo llevar a cabo la síntesis en un soporte de fase sólida, conociéndose bien tales soportes en la técnica.

- Se conoce un amplio abanico de grupos protectores para aminoácidos y los grupos adecuados protectores de aminas pueden incluir carbobenzoxi (también llamado Z), *t*-butoxicarbonilo (también llamado Boc), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenceno sulfonilo (Mtr) y 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (también llamado Fmoc). Se apreciará que cuando el péptido crece desde el extremo carboxilo, un grupo protector de amina estará presente en el grupo amino α de cada nuevo resto añadido y habrá que retirarlo selectivamente antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

- Los grupos protectores de carboxilos que pueden emplearse, por ejemplo, incluyen grupos éster de escisión fácil tales como grupos bencilo (Bzl), *p*-nitrobencilo (ONb), pentaclorofenilo (OPClP), pentafluorofenilo (OPfp) o *t*-butilo (OtBu), así como los grupos de acoplamiento en soportes sólidos, por ejemplo grupos metilo unidos a poliestireno.

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

- Existe un amplio abanico de procedimientos para retirar los grupos protectores de carboxilos y de aminas. Sin embargo, éstos deben ser coherentes con la estrategia de síntesis empleada. Los grupos protectores de las cadenas laterales deben ser estables en las condiciones utilizadas para retirar el grupo protector amino α antes de la siguiente etapa de acoplamiento.

Los grupos protectores de aminas, tal como Boc, y los grupos protectores de carboxilos, tal como *t*Bu, se pueden retirar simultáneamente mediante tratamiento ácido, por ejemplo, con ácido trifluoroacético. Los grupos protectores de tiol, tal como Trt, se pueden retirar selectivamente mediante un oxidante tal como yodo.

- Los péptidos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante desprotección incompleta para dejar grupos que mejoran la actividad citotóxica de los péptidos. Alternativamente, se pueden preparar grupos R modificados aminoterminal y carboxiterminal después de la síntesis del péptido y la desprotección asociada.

Un método particularmente preferente implica la síntesis utilizando derivados de aminoácidos de la fórmula siguiente: Fmoc-amino-ácido-Opfp.

- Se describen composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos de la invención tal y como están definidos anteriormente junto con un diluyente, vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. El experto en la técnica conoce los diluyentes, excipientes y vehículos adecuados. Se describen los péptidos de la invención para uso en los métodos de tratamiento, particularmente en el tratamiento o la prevención de las infecciones bacterianas, o como un agente antitumoral, tanto en la destrucción como en la reducción del tamaño o del número de tumores benignos o malignos que puede ser ascitis y en la prevención de las metástasis.

Las composiciones a utilizar de acuerdo con la invención se pueden presentar, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración oral, nasal, parenteral, intravenosa, intratumoral o rectal.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «farmacéutico» incluye las aplicaciones veterinarias de la invención.

- 5 Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden presentar en las formas farmacéuticas convencionales de administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, pulverizadores nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formulaciones de liberación retardada. Los péptidos de la invención son particularmente útiles para la administración tópica, por ejemplo en el tratamiento de las úlceras diabéticas. Se pueden emplear excipientes farmacéuticos convencionales así como los métodos de producción usuales para la preparación de estas formulaciones. Se pueden producir comprimidos, por ejemplo, al mezclar el ingrediente o ingredientes activos con excipientes conocidos, tales como, por ejemplo, con diluyentes, tales como carbonato de calcio, fosfato de calcio o lactosa, disgregantes tales como almidón de maíz o ácido algínico, aglutinantes tales como almidón o gelatina, lubricantes tales como estearato de magnesio o talco, y/o agentes para obtener la liberación retardada, tales como carboxipolimetileno, carboximetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, o polivinilacetato.
- 10
- 15 Si se desea, los comprimidos pueden consistir en varias capas. Se pueden producir comprimidos recubiertos recubriendo núcleos, obtenidos en un modo similar a los comprimidos, con los agentes que se utilizan con frecuencia en los recubrimientos de comprimidos, por ejemplo, polivinilpirrolidona o goma laca, goma arábiga, talco, dióxido de titanio o azúcar. Para obtener la liberación sostenida o evitar incompatibilidades, el núcleo puede consistir en varias capas también. El revestimiento del comprimido también puede consistir en varias capas para obtener la liberación retardada,
- 20 en cuyo caso se pueden utilizar los excipientes mencionados anteriormente para los comprimidos.

También se pueden utilizar sistemas de vehículos específicos de órganos.

Las disoluciones para inyección se pueden, por ejemplo, producir del modo convencional, tal como mediante la adición de agentes conservantes, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizantes, tales como EDTA. A continuación se introducen las soluciones en viales o ampollas para inyección.

- 25 Los pulverizadores nasales que son un método preferente de administración se pueden formular de igual forma en disolución acuosa y se pueden envasar en contenedores de pulverización bien con un propulsor de aerosol o suministrarlos mediante la compresión manual. Se pueden producir cápsulas que contienen uno o varios ingredientes activos, por ejemplo, mezclando los ingredientes activos con vehículos inertes, tales como lactosa o sorbitol, y llenando cápsulas de gelatina con la mezcla.
- 30 Se pueden producir, por ejemplo, supositorios adecuados mezclando el ingrediente activo o combinaciones de ingredientes activos con los vehículos convencionales diseñados para este propósito, tales como grasas naturales o polietilenglicol o derivados de los mismos.

- Las dosis unitarias que contienen los compuestos de esta invención preferentemente contienen de 0,1 a 10 mg, por ejemplo, de 1 a 5 mg, de los péptidos de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente más ingredientes activos, incluidos otros agentes citotóxicos tales como otros péptidos antimicrobianos. Otros ingredientes activos pueden incluir diferentes tipos de antibióticos, citocinas, por ejemplo INF- γ , TNF, CSF y factores de crecimiento, inmunomoduladores, quimioterápicos, por ejemplo, cisplatino o anticuerpos.
- 35

- La presente invención da a conocer el uso terapéutico de los péptidos de la invención tal y como se definen anteriormente, a saber, los péptidos a usar como medicamentos, por ejemplo, antibacterianos o antitumorales. También se describe un método para tratar o prevenir infecciones bacterianas en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de uno o más de los péptidos de la invención y un método para tratar tumores en un paciente que comprende la administración de uno o más de los péptidos de la invención. El tratamiento de los tumores incluye la destrucción o la reducción del tamaño o del número de tumores benignos o malignos, que pueden ser ascitis, y la prevención de las metástasis.
- 40

- 45 Aún otro aspecto de la presente invención comprende la utilización de uno o más de los péptidos de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar infecciones bacterianas o tumores.

- Los antibacterianos tales como los péptidos de la presente invención tienen una amplia variedad de aplicaciones además de como fármacos. Se pueden utilizar, por ejemplo, como esterilizantes para materiales susceptibles a la contaminación microbiana. Los péptidos de la invención muestran amplia actividad antimicrobiana y antibiótica y, por lo tanto, también son adecuados como agentes antivíricos y antimicóticos que tendrán aplicaciones farmacéuticas y de agricultura, y como promotores de la cicatrización de heridas o espermicidas.
- 50

Los péptidos, cuando se utilizan en composiciones tópicas, generalmente están presentes en una cantidad de al menos el 0,1% en peso. En la mayoría de los casos, no es necesario emplear el péptido en una cantidad mayor del 1,0% en peso.

- 55 Los péptidos antitumorales se pueden administrar en combinación, posiblemente en combinación sinérgica, con otros

agentes activos o formas de tratamiento, por ejemplo la administración de un péptido de acuerdo con la invención se puede combinar con quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radioterapia o con la administración de otros péptidos antitumorales.

5 Al emplear tales composiciones sistémicamente (intramuscular, intravenosa, intraperitoneal), el péptido activo está presente en una cantidad que alcanza una concentración del péptido en el suero de al menos unos 5 µg/ml. En general, la concentración del péptido en el suero no tiene que superar los 500 µg/ml. Una concentración preferente en el suero es de unos 100 µg/ml. Se pueden conseguir tales concentraciones en el suero incorporando el péptido en una composición que se administra sistémicamente a una dosis de 1 a unos 10 mg/kg. En general, el (los) péptido(s) no tiene(n) que administrarse a una dosis que exceda los 100 mg/kg.

10 Los péptidos ejemplificados en la presente memoria representan los péptidos preferentes según la invención. Cualquier péptido cuya secuencia específica se describe en la presente memoria, particularmente los péptidos que son más activos contra las células bacterianas que la LFB 17-31, constituye un aspecto más de la presente invención.

15 Algunos de los aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos preferentes que se incorporan en los péptidos de la invención incluyen triptófanos sustituidos que proporcionan un aumento de la voluminosidad y la lipofilia, y un aumento significativo de la bioactividad. Se han hecho sustituciones en la posición 1 (o la posición N del indol) y la posición 2 adyacente, y estos nuevos compuestos, descritos en el ejemplo 2, constituyen aún otro aspecto más de la presente invención. Los nuevos triptófanos sustituidos en la posición 1 incluyen 1-bencil-triptófano y 1-tosil-triptófano.

20 Se han construido los siguientes restos nuevos de triptófano sustituido en la posición 2, Z-Trp(2-nitrofenilsulfenilcloruro)-OH y óxidos del mismo y Z-Trp(2-Pmc)-OH, en los que Z es un grupo protector, por ejemplo Fmoc. El método II del ejemplo 2E es una nueva vía de síntesis diseñada recientemente ex profeso para la preparación de un abanico de 2-sulfonas. Por lo tanto, se describe un método para preparar restos de triptófano sustituido en la posición 2 del anillo indólico que comprende transferir el grupo con el que se sustituirá al triptófano desde un grupo que contiene guanidilo a un triptófano N-prottegido. Preferentemente, el grupo que contiene guanidilo es un grupo arilalquil- o alquil-guanidilo, lo más preferentemente es un grupo feniletilguanidilo. Preferentemente, el grupo N-protector es Fmoc y preferentemente el grupo sustituyente en el triptófano es Pmc.

La LFB 17-41 cuyos restos de cisteína se han bloqueado mediante piridiletilación o acetamido-metilación, pero que no incorporan más aminoácidos lipófilos y voluminosos, no son por sí mismos péptidos de la invención.

Ahora se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, en los cuales:

30 La [figura 1](#) muestra la secuencia de aminoácidos y la carga a pH 7 de las lactoferrinas sintéticas de diferentes especies;

La [figura 2](#) muestra los efectos de la lactoferrina B cíclica y lineal sobre una estirpe celular de fibrosarcoma Meth A in vitro después de una incubación de 24 horas;

La [figura 3](#) muestra los efectos de diferentes derivados de la LFB sobre las células Meth A in vitro después de media hora de incubación, + = modificado con Pmc; – = sin modificar;

35 La [figura 4](#) muestra los efectos de diferentes derivados de la LFB sobre las células Meth A in vitro después de 4 horas de incubación, + = modificado con Pmc; – = sin modificar;

La [figura 5](#) muestra los efectos de la retro LFB 17-31 (+) modificada con Pmc, de la Fmoc LFB 17-31 (A₈) y de la LFB 17-31 sobre las células Meth A in vitro después de media hora. Se utilizó RPMI como control negativo y Tritón X-100 como control positivo. Las concentraciones están en mg/ml;

40 La [figura 6](#) muestra los efectos de la retro LFB 17-31 (+) modificada con Pmc, de la Fmoc LFB 17-31 (A₈) y de la LFB 17-31 sobre las células Meth A in vitro después de 4 horas. Se utilizó RPMI como control negativo y Tritón X-100 como control positivo. Las concentraciones están en mg/ml;

45 La [figura 7](#) muestra la respuesta según la dosis en la estirpe celular de leucemia promielótica humana HL 60 después de 4 horas. Se incubaron 1×10^7 células HL 60 con péptidos a 50, 30, 20, 10, 5, 1 µg, 1000-20 µg/ml en 2 horas y se colorearon con MTT;

La [figura 8](#) muestra la inhibición del crecimiento tumoral; se inocularon células tumorales Meth A (5×10^7 células) el día 1 y se trataron el día 7 y el día 10 con 0,5 mg (1 mg de P1) de los diferentes péptidos;

La [figura 9](#) muestra el efecto de la D-LFB (17-31) A₇ Pmc-NH₂ sobre el melanoma murino B16F10.

50 La [figura 10](#) muestra el tamaño de los tumores establecidos en los ratones Bulb/c que se reinoculan con células Meth A después de un tratamiento satisfactorio con cLFB. Los ratones no se trataron con cLFB u otros péptidos en el estudio, por lo que se muestra cierta forma de inmunidad adaptativa. Las células Meth A se reinoculaban 1 mes después del tratamiento de los tumores de Meth A con la LFB.

Ejemplo 1**Péptidos procedentes de la lactoferrina humana, bovina, murina y caprina****A) Análisis de la concentración inhibidora mínima (CIM)**

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Todas las cepas se conservaron a -70°C . Se hicieron crecer las bacterias en agua con Bacto Peptona al 2% (Difco 1807-17-4). Todas las pruebas se realizaron con bacterias en la parte central de la fase de crecimiento logarítmico. La determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM) de los péptidos para las cepas bacterianas se realizó en agua con Bacto Peptona al 1%. Se utilizó una técnica de microdilución estándar con un inóculo de 2×10^6 UFC/ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Dado que los péptidos están cargados positivamente y, por lo tanto, se podrían adherir al plástico de los pocillos, controlamos la concentración real de los péptidos en la solución por HPLC. No hubo ninguna diferencia entre la concentración de los péptidos antes o después de añadir la disolución a los pocillos de plástico.

B) Síntesis de péptidos

Inicialmente, la lactoferrina B utilizada fue un obsequio de Wayne Bellamy (Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co, Ltd, Japón). Más adelante en el estudio, los péptidos se sintetizaron con un PepSynthesizer 9050 Plus (Milligen). Todos los péptidos se sintetizaron en fase sólida mediante el uso de la química del fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Las cisteínas de los péptidos que contienen cisteína se protegieron con grupos acetamidometilo para impedir la formación de puentes disulfuro. Los péptidos se analizaron y se purificaron por HPLC de fase inversa en un cromatógrafo Waters 600E (Millipore) con detección UV a 254 nm. Se analizaron las fracciones purificadas en la HPLC en una cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS) con una interfaz de electropulverización (Fisons VG Quattro) y/o con espectrometría de masas y bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS) (Fisons VG Tribrid).

Estructura de las lactoferrinas

La estructura de la lactoferrina humana se determina a una resolución de 2,8 a 2,2 Å mediante cristalografía con rayos X. La lactoferrina (LFH) humana consiste en los restos 1 a 47 de la lactoferrina humana. La LFH contiene dos fragmentos peptídicos; uno que consiste en los restos 12 a 47 ciclados con un puente disulfuro entre Cys20 y Cys37, el segundo fragmento (restos 1 a 11) está conectado al fragmento 12 a 47 a través del puente disulfuro entre Cys10 y Cys46. En la estructura de la lactoferrina humana, los restos correspondientes comprenden una hoja β (restos 4 a 11), una hélice α (restos 12 a 29), un giro (restos 30 y 31), seguido de una hoja β (restos 31 a 47) [Day, C. L., Anderson, B. F., Tweedie, J. W. y Baker, E. N. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 1084-1100]. La lactoferrina bovina (LFB) con sólo 25 restos (restos 17 a 41) en una única cadena es mucho más simple que la LFH desde el punto de vista estructural.

30 Actividad antibiótica de las lactoferrinas sintéticas con secuencias de diferentes especies

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de las lactoferrinas de cabra [Provost, F. L., Nocard, M., Guerin, G. y Martin, P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1324-1332] y ratón [Pentecost, B. T. y Teng, C. T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10134-10139] y muestran una elevada homología de secuencia con las lactoferrinas humana y bovina. Los restos involucrados en el motivo de hélice-giro-hoja se pueden identificar fácilmente en la secuencia como se muestra en la figura 1. Como la LFB es más antibacteriana que la LFH, los restos que corresponden a la LFB (17-41) se eligieron en la secuencia de aminoácidos de la lactoferrina humana, murina y caprina para preparar péptidos análogos a la lactoferrina; LFH (18-42), LFM (17-41) y LFC (17-41), respectivamente. El puente disulfuro no es esencial para la actividad antibiótica de la lactoferrina bovina y la humana [Bellamy et al (1992)] y todos los péptidos se prepararon con protección de los restos de cisteína con ACM para evitar la ciclación o la oxidación.

40 Las actividades antibacterianas de las lactoferrinas sintéticas expresadas en forma de CIM se recogen en la tabla 1, que muestra que la LFB (17-41) mostraba la actividad antibacteriana más significativa contra *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 1. Concentración inhibitora mínima (CIM) en µg/ml (µM) de las lactoferricinas sintéticas sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM en <i>S. aureus</i> ATCC 25923
LFH (18-42)	> 200	> 200
LFB (17-41)	30	30
LFM (17-41)	> 200	> 200
LFC (17-31)	750	1000
LFB (14-31)	70 (28)	200 (80)
LFB (17-31)	40 (20)	100 (50)
LFB (18-31)	80 (43)	200 (108)
LFB (19-31)	200 (120)	> 250 (150)
LFB (20-31)	100 (62)	200 (124)
LFB (17-31) K ₁₇	60 (30)	100 (50)
LFB (17-31) F ₂₀	20 (10)	200 (100)
LFB (17-31) K ₁₇ F ₂₀	20 (10)	200 (100)

Análogos de LFB con una longitud de cadena diferente

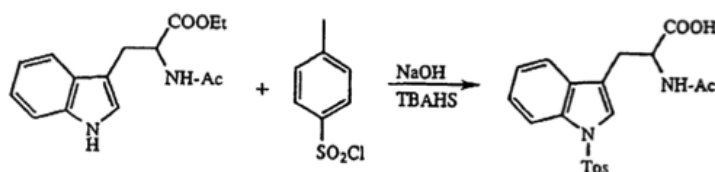
- 5 Una propiedad que se considera importante al determinar la actividad antibacteriana de los péptidos lineales es su capacidad para adoptar estructuras helicoidales. En la proteína lactoferrina intacta, los restos 14 a 28 se localizan en una hélice α , los restos 29 a 31 comprenden un giro y los restos 32 a 41 están en una hoja β . Por lo tanto, se anticipa que el efecto antibacteriano de las lactoferricinas podría originarse en la parte de la secuencia que participa en la hélice de la proteína intacta. Como la secuencia de la lactoferricina bovina, la LFB (17-41), fue el único péptido con una
- 10 propiedad antibacteriana significativa, elegimos preparar una variedad más corta del péptido bovino, la LFB (17-31), que contenía los restos de la hélice y del giro de la proteína, mientras que se retiraron los 10 restos que abarcaban la hoja. A pesar del hecho de que la LFB (17-31) tiene una carga neta más baja (fig. 1) que la LFB (17-41) y la LFC (17-41), todavía conserva la mayor parte del efecto antibacteriano tal y como se muestra en la tabla 1. Estos resultados indican que incluso si la carga global es importante, no es suficiente para la actividad antibacteriana.

15 Ejemplo 2

Preparación de nuevos triptófanos sustituidos

En los siguientes ejemplos y a lo largo del texto, la fórmula general siguiente: Z-XX (n-y)-OH se refiere a un aminoácido sustituido (XX) en la que el grupo NH₂ del aminoácido está Z-protégido, el aminoácido está y-sustituido en la posición n y el grupo COOH del aminoácido está libre.

20 A) Preparación de Ac-Trp (1-Tos)-OH



Experimental:

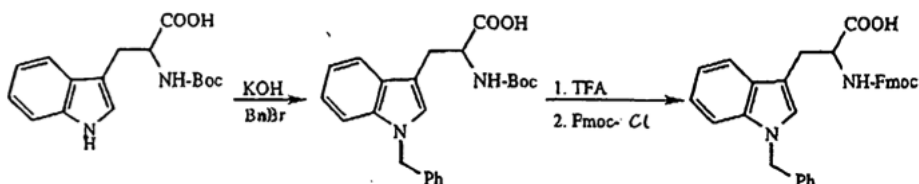
- 25 Una mezcla de Ac-Trp-OEt (0,19 g, 0,69 mmol), cloruro de tosilo (0,20 g, 1,04 mmol), hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (2 mg, 0,01 equiv.) y NaOH (0,07 g, 1,73 mmol) en diclorometano se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. A la mezcla de reacción se le añadió HCl diluido hasta que se alcanzó un pH de 2 a 3 y entonces se lavó con agua. A la fase orgánica se le añadió una base diluida, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano, se acidificó y de nuevo se extrajo con diclorometano.

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,89 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 3,1 a 3,35 (m, 2H), 4,87 (m, 1H), 6,63 (d, 1H), 7,1 a 7,3 (m, 4H), 7,46 (m, 2H), 7,68 (d, 2H), 7,89 (d, 1H), 9,34 (s, ancho, 1H).

- 30 MS (EI): m/z 383 (10%), 284 (84%), 157 (8%), 155 (61%), 130 (26%), 129 (24%).

Materiales:

Ac-Trp-OEt Preparado según el procedimiento descrito en «Preparation of diacetyltryptophan ethyl ester», Bodanszky, M y Bodanszky A, *The practice of Peptide Synthesis* (1994) p30; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5ª ed. (1989) pág. 1273.

B) Preparación de Fmoc-Trp (1-Bencil)-OH

5

Boc-Trp(1-bencil)-OH¹:

Se añadió sulfóxido de dimetilo (7 ml) a hidróxido de potasio (0,73 g, 13 mmol) (sedimentos triturados) y se agitó la mezcla durante 5 minutos. A continuación se le añadió Boc-Trp-OH (1 g, 3,3 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 hora. Se añadió bromuro de bencilo (1,13 g, 6,6 mmol) y la mezcla se enfrió brevemente y se agitó durante otras 20 horas más antes de añadir agua (20 ml). Se extrajo la mezcla con éter dietílico (3 x 20 ml). Se ajustó el pH de las fases acuosas combinadas a 2-3 mediante la adición de HCl a 1 M (20 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 x 20 ml). Cada extracto se lavó con agua (3 x 20 ml). Las fases de éter dietílico combinadas se secaron con MgSO₄ y se retiró el disolvente a presión reducida. Se aisló el producto como cristales blancos (0,89 g, 2,3 mmol). Rendimiento: 69%.

10

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,41 (s, 9H), 3,33 (m, 2H), 4,64 (m, 1H), 5,02 (m, 1H), 5,24 (s, 2H), 6,95 (s, 1H), 7,01 a 7,38 (m, 8H), 7,59 (d, J = 7,7 Hz, 1H).

15

H-Trp(1-bencil)-OH:

Se disolvió Boc-Trp(1-Bn)-OH en TFA al 98% y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se retiró el disolvente a presión reducida. El producto se aisló como un aceite y se utilizó sin más purificación.

Fmoc-Trp(1-bencil)-OH:

20 Se disolvió H-Trp(1-Bn)-OH (1,90 g, 6,5 mmol) en una disolución al 10% de Na₂CO₃ en agua (21 ml, 20 mmol). Se añadió dioxano (15 ml) y se agitó la mezcla en un baño de agua con hielo. Se le añadió clorocarbonato de 9-fluorenilmetilo (1,69 g, 6,5 mmol) en porciones pequeñas y se continuó la agitación a la temperatura del baño de agua con hielo durante 4 horas y a continuación a temperatura ambiente durante 8 horas. Se vertió la mezcla de reacción en agua (400 ml) y se extrajo con éter (3 x 200 ml). Las fases de éter combinadas se secaron con MgSO₄ y se retiró el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en gel de sílice en disolvente A (disolvente A = acetato de etilo:metanol = 4:1). Después de la purificación, el producto se obtuvo como un compuesto cristalino. El rendimiento fue de 2,42 g (72%).

25

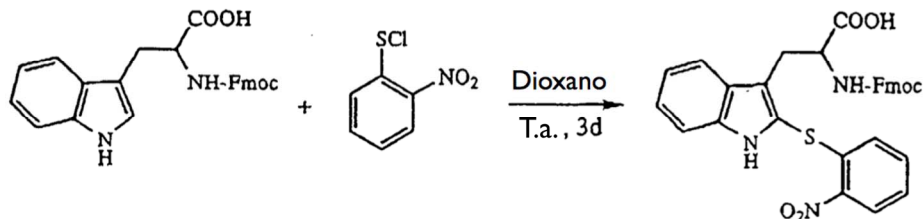
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3,34 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 4,37 (m, 2H), 4,78 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,31 (d, 1H), 6,91 a 7,74 (m, 19H).

30 Materiales:

Boc-Trp-OH	BACHEM n.º A-2360
Fmoc-ONSu	Fluka n.º 46920
Ácido trifluoroacético	Fluka n.º 91700 /KEBO n.º 1.8341-100

Referencia 1: Heaney, H. y Ley, S. V. *J. Chem. Soc. Perkin 1* (1973) 499-500

c) Preparación de Fmoc-Trp(2-Nps)-OH



A una disolución de 2,0 g (4,7 mmol) de Fmoc-L-triptófano en 12 ml de dioxano se le añadieron 0,87 g (4,6 mmol) de 2-nitrofenil-sulfenilcloruro (2-Nps-Cl) en 25 ml de dioxano con agitación a temperatura ambiente. Después de reposar durante 3 días, se añadieron 50 ml de éter etílico a la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente. El producto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en el disolvente A (disolvente A = cloroformo:etanol:heptano – 1:1:1). R_f 0,43. Después de la purificación se obtuvo el producto como un compuesto cristalino amarillo pardusco. El rendimiento fue de 2,5 g (89%).

HPLC (C18): t_R 8,3 min, B al 85-100% en 20 minutos. (A: H_2O + TFA al 0,1%; B: CH_3CN + TFA al 0,1%)

1H RMN ($DMSO-d_6$): δ 3,16 (m, 1H), 3,38 (m, 1H), 4,00 a 4,10 (m, 3H), 4,19 (m, 1H), 6,72 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,22 a 7,49 (m, 7H), 7,60 (dd, $J = 7,3$ y 12,1 Hz, 2H), 7,86 (m, 3H), 8,24 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 11,51 (s, 1H).

Después de la incorporación de Fmoc-Trp(2-Nps)-OH en un péptido, el análisis de electropulverización y MS confirmó la masa molecular esperada.

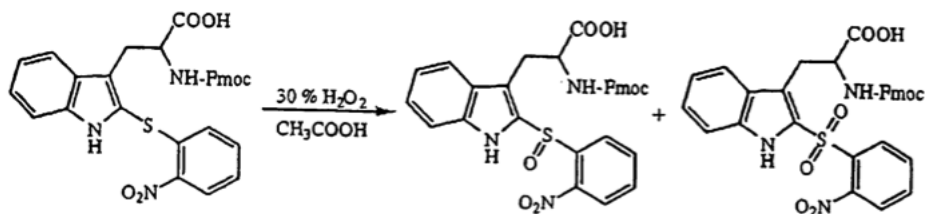
Materiales:

Fmoc-Trp-OH BACHEM n.º B-1445/SENN n.º 02019

Cloruro de 2-nitrofenilsulfenilo Fluka n.º 73740

15

D) Oxidación de Fmoc-Trp(2-Nps)-OH



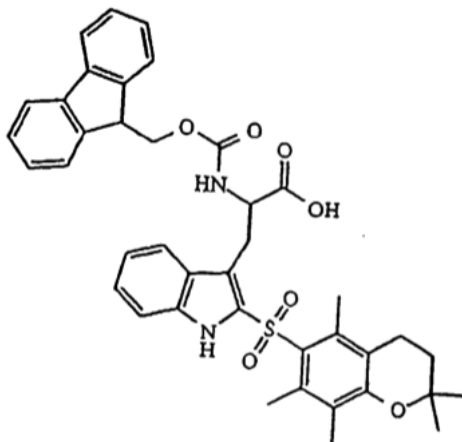
A una disolución de 1,12 g (1,9 mmoles) de Fmoc-Trp(2-Nps)-OH en 15 ml de ácido acético glacial se le añadieron 12 ml de H_2O_2 al 30% con agitación a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción durante 12 horas a 65°C. Se recogió el precipitado, se le añadió agua y se liofilizó. El rendimiento fue de 0,59 g (52%). Se obtuvo el producto como un compuesto cristalino amarillo.

HPLC (C18): t_R 6,4 min, B al 85-100% en 20 min. (A: H_2O + TFA al 0,1%; B: CH_3CN + TFA al 0,1%).

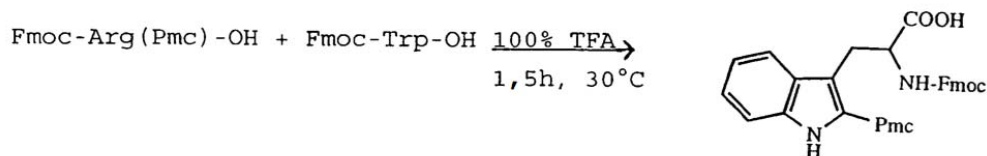
1H RMN ($DMSO-d_6$): δ 3,25 (dd, $J = 9,0$ y 14,5 Hz, 0,5 H), 3,54 (m, 1H), 3,77 (dd, $J = 5,9$ y 14,3 Hz, 0,5 H), 4,01 a 4,26 (m, 3H), 4,32 (m, 0,5 H), 4,40 (m, 0,5 H), 7,00 a 7,98 (m, 15H), 8,23 (m, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,56 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 11,08 (s, 0,5 H), 11,17 (s, 0,5 H).

Después de la incorporación de Fmoc-Trp(2-NpsO₂)-OH en un péptido, el análisis de electropulverización y MS reveló que la oxidación del Fmoc-Trp(2-Nps)-OH había sido incompleta; el producto fue casi una mezcla 3:1 del sulfóxido Fmoc-Trp(2-NpsO)-OH y la sulfona Fmoc-Trp(2-NpsO₂)-OH. La RMN de protones indica una mezcla 1:1 de los dos compuestos basándose en conjuntos dobles de señales para los protones β , α y carboxílicos.

E) Preparación de Fmoc-Trp(2-Pmc)-OH



Método I: mediante la transferencia del grupo Pmc desde el Fmoc-Arg(Pmc)-OH



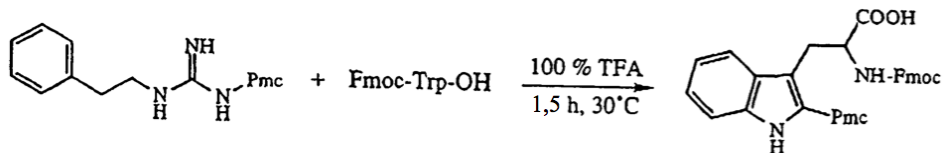
5 Se disolvieron Fmoc-Arg(Pmc)-OH (0,5 g, 0,75 mmol) y Fmoc-Trp-OH (0,43 g, 0,1 mmol) en 10 ml de TFA al 100% y se calentó a 30°C durante 1,5 horas. Después de la evaporación del TFA, se retiró el Fmoc-Arg-OH mediante cromatografía en columna en gel de sílice con heptano/acetato de etilo 2:1 como fase móvil. Se aisló el Fmoc-Trp(2Pmc)-OH mediante HPLC preparativa [C18, B al 70-100% en 15 min, t_R 14,8 min, (A: H₂O + TFA al 0,1%; B: CH₃CN + TFA al 0,1%)]. El rendimiento aislado fue de 130 mg (0,19 mmol, 25%).

10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (s, 6H), 1,79 (t, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 2,59 (t, 2H), 3,03 (m, 1H), 3,25 (m, 1H), 4,1 a 4,3 (m, 3H), 4,42 (m, 1H), 6,53 (d, 1H), 7,15 a 7,78 (m, 12H), 8,90 (s, 1H).

Materiales:

Fmoc-Arg(Pmc)-OH BACHEM n.º B-1670
 Fmoc-Trp-OH BACHEM n.º B-1445/SENN n.º 02019
 Ácido trifluoroacético KEBO n.º 1.8341-100/Fluka n.º 91700

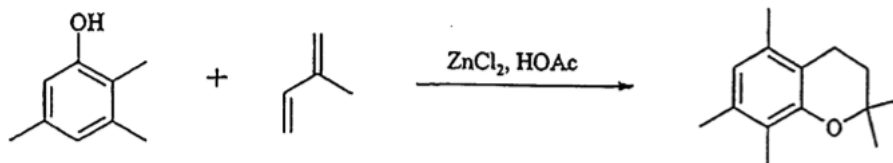
Método II: mediante la transferencia del grupo Pmc desde el feniletilguanidil-Pmc

15 2,2,5,7,8-Pentametilcromano:

Referencias:

Robert Ramage, Jeremy Green y Alexander J. Blake, *Tetrahedron*, vol. 47, n.º 32, págs. 6353-6370, 1991.

Reacción:



Sustancias químicas:

Sustancia	Cantidad	MM	mmol	Equiv.	Fuente
2,3,5-Trimetilfenol	50,03 g	136,20	367,33	1,0	Fluka
Isopreno	25,09 g	68,12	368,32	1,0	Jannsen Chimica
ZnCl ₂	5,94 g	136,29	43,58	0,12	Fluka
Ácido acético	47 ml	-	-	-	KEBO lab

Procedimiento:

- 5 Se agitaron 2,3,5-trimetilfenol (50,03 g, 0,367 mol), isopreno (25,09 g, 0,368 mol) y cloruro de zinc fusionado (5,94 g, 0,044 mol) con ácido acético anhidro (47 ml) durante 14 horas a temperatura ambiente. La mezcla de color rojo turbio se calentó entonces gradualmente y se volvió transparente. Con el reflujo, la mezcla de reacción se volvió negra y después de 8 horas en reflujo se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en 250 ml de agua y se separó el aceite negro. Se extrajo el agua con pentano (3 x 200 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con álcali de Claisen (2 x 150 ml), agua (3 x 250 ml) y salmuera (2 x 200 ml), se secó sobre CaCl₂ y se evaporó a un aceite pardo a presión reducida. El producto bruto se destiló a 0,48 mBar, lo que proporcionó el producto como un líquido amarillo pálido (36,90 g, rendimiento del 49%); p. e. 82-96°C (0,48 mBar); pureza >95% (GC).

Resultados:

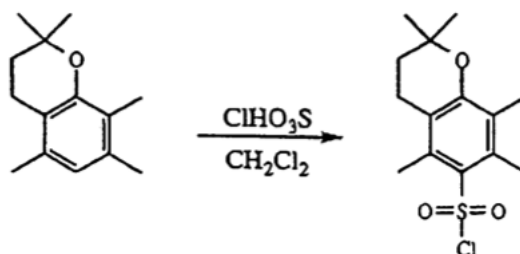
El producto se aisló como un líquido amarillo pálido que se solidificó al enfriarse con un rendimiento del 49%.

- 15 ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1,30 (6H, s, 2 x CH₃), 1,78 (2H, t, J = 7 Hz, CH₂), 2,07 (3H, s, CH₃), 2,15 (3H, s, CH₃), 2,19 (3H, s, CH₃), 2,59 (2H, t, J = 7 Hz, CH₂), 6,54 (1H, s, H aromático).

¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 11,42 (C-CH₃), 18,91 (C-CH₃), 19,84 (C-CH₃), 20,49 (C-CH₂), 26,97 (2 x C-CH₃), 32,79 (C-CH₂), 73,10 (C(CH₃)₂), 116,67 (Ar-C), 122,03 (Ar-C), 122,29 (Ar-C), 133,44 (Ar-C), 134,70 (Ar-C), 151,72 (Ar-C).

MS (GC/MS):

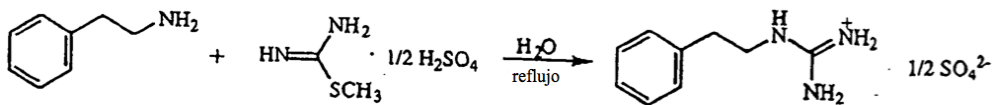
- 20 m/z = 204 (100), 189 (14), 149 (91).

Cloruro de 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo:

- 25 A una disolución de 2,2,5,7,8-pentametilcromano (3,39 g, 16,6 mmol) en 30 ml de diclorometano a -8°C se le añadió en agitación ácido clorosulfónico (3,98 g, 34,2 mmol) en 30 ml de diclorometano en 3 minutos. La mezcla se agitó a -8°C durante 15 minutos y a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se agitó cuidadosamente con 50 ml de diclorometano y 100 ml de hielo un par de veces y se separaron las fases. El producto bruto contenía alrededor del 16% del material de partida a juzgar por la ¹H RMN. Cuando se le añadió el pentano caliente al producto bruto, se formó un aceite oscuro que se retiró por decantación. A continuación se aisló el producto por cristalización a partir del pentano como un polvo pardo claro (2,80 g, 9,3 mmol). Rendimiento del 56%.

- 30 ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,34 (s, 6H), 1,85 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,14 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 2,68 (t, J = 7,0 Hz, 2H).

Hemisulfato de 2-feniletilguanidina:



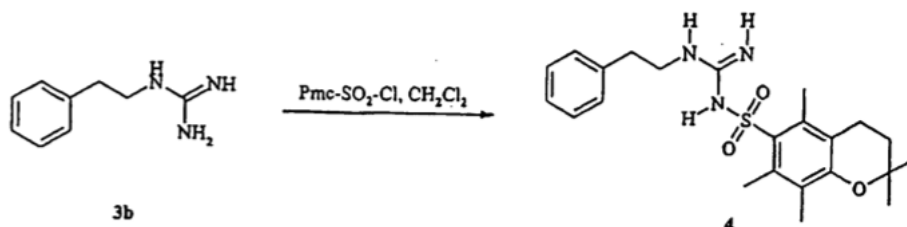
Se disolvieron 2-feniletilamina (8,49 g, 70,1 mmol) y sulfato de S-metilisotiurea (9,43 g, 33,9 mmol) en 100 ml de agua destilada. Se hizo pasar aire sobre la mezcla de reacción y a través de NaOH al 50% (500 ml) y luego a través de sulfato cuproso al 5% (250 ml). Se calentó la mezcla de reacción con reflujo durante 5 horas. La evaporación del disolvente produjo un polvo blanco. El producto se aisló por cristalización a partir de etanol al 96%, se lavó con acetona y éter dietílico fríos y se secó en un desecador. Después de tres cristalizaciones, el producto contenía sólo cantidades menores del material de partida. La reacción produjo un 61,5% (9,14 g) de hemisulfato de 2-feniletilguanidina.

^1H RMN (D_2O): δ 2,87 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,44 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 7,24 a 7,38 (m, 5H).

10 Feniletilguanidil-Pmc:

Reacción: Ian Michael Eggleston, tesis doctoral, Universidad de Oxford, 1990.

Reacción:



Sustancias químicas:

Sustancia	Cantidad	MM	mmol	Equiv.	Fuente
Hemisulfato de 2-feniletilguanidina	7,40 g	212,24	34,87	1,5	B11-01
Pmc-SO ₂ -Cl	7,00 g	302,07	23,17	1,0	B15-02
CH ₂ Cl ₂	150 ml	-	-	-	KEBO lab

15

Procedimiento:

Se suspendió el hemisulfato de 2-feniletilguanidina (3) (7,40 g, 34,87 mmol) en NaOH a 6 M (80 ml) y se extrajo en cloroformo (2 x 80 ml). Después de la evaporación del disolvente al vacío, el residuo aceitoso se coevaporó con benceno (2 x 10 ml). Se disolvió la guanidina libre (3b) en 75 ml de diclorometano en un matraz de fondo curvo de 250 ml equipado con una barra de agitación magnética y un embudo de adición de 100 ml con un equilibrador de presión. Se cargó el embudo con Pmc-SO₂-Cl (7,00 g, 23,17 mmol) disuelto en 75 ml de diclorometano. Se enjuagó el equipo con nitrógeno, y se llevó a cabo la reacción con un flujo de nitrógeno débil. El matraz de fondo curvo se enfrió en un baño de hielo y agua, y la disolución de Pmc-SO₂Cl se añadió durante un periodo de 20 a 25 minutos. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzase la temperatura ambiente durante una noche. El diclorometano se evaporó al vacío y se repartió el residuo entre agua (100 ml) y acetato de etilo (120 ml). A continuación se lavó la capa orgánica con agua (100 ml). Tras el enfriamiento del acetato de etilo, el producto apareció como un polvo amarillo pálido/blanco, que se retiró por filtración y se secó al vacío.

Resultados:

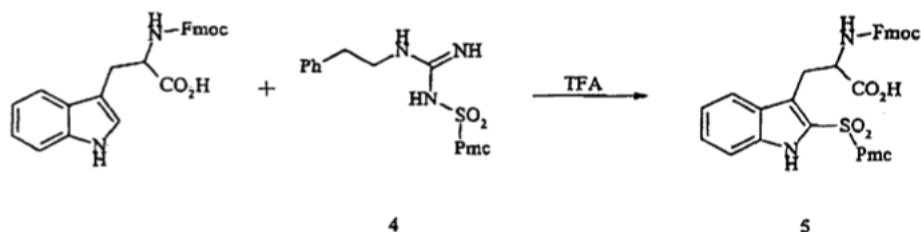
Se aislaron 3,32 g de un polvo amarillo pálido. El rendimiento de la reacción es del 33%. Punto de fusión: 145-147°C.

30 ^1H RMN (CDCl_3): δ = 1,30 (6H, s, 2 x CH₃), 1,80 (2H, t, J = 7,0 Hz, CH₂), 2,09 (3H, s, CH₃), 2,51 (3H, s, CH₃), 2,52 (3H, s, CH₃), 2,61 (2H, t, J = 6,6 Hz, CH₂), 2,81 (2H, t, J = 7,0 Hz, CH₂), 3,43 (2H, m, CH₂), 6,21 (3H, s ancho, 3 x NH), 7,12 a 7,25 (5H, m, protones aromáticos).

MS: m/z = 429 (6), 204 (37), 149 (100), 105 (24), 92 (37).

Fmoc-Trp(2-Pmc)-OH:

Reacción:



Sustancias químicas:

Sustancia	Cantidad	MM	mmol	Equiv.	Fuente
Fmoc-Trp-OH	4,14 g	426,49	9,71	1,0	SENN
N ^G -(6-SO ₂ -Pmc)-2-feniletilguanidina	2,08 g	429,59	4,84	1,0	BEH-B17
Ácido trifluoroacético	25 ml	-	-	-	Fluka

Procedimiento:

- 5 Se agitaron N^G-(6-SO₂-Pmc)-2-feniletilguanidina (2,08 g, 4,84 mmol) y Fmoc-Trp-OH (4,14 g, 9,71 mmol) con ácido trifluoroacético (25 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se evaporó la mezcla de reacción al vacío y se repartió el residuo entre cloroforno y ácido clorhídrico a 1 M. Al enfriar la disolución de cloroforno, el exceso de Fmoc-Trp-OH se pudo retirar por filtración.

El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo/heptano, 1:1).

10 Resultados:

El compuesto del título se aisló como un polvo blanco con un rendimiento del 26%.

Materiales:

Ácido clorosulfónico	Fluka n.º 26388
Feniletilamina	Fluka n.º 77900
Sulfato de S-metilisotiurea	Fluka n.º 67730
Fmoc-Trp-OH	BACHEM n.º B-1445/SENN n.º 02019
Ácido trifluoroacético	KEBO n.º 1.8241-100/Fluka n.º 91700

F) Preparación de Fmoc-2,5,7-triterbutilriptófano

15 2,5,7-triterbutilriptófano

Se mezclaron triptófano (4,00 g, 19,59 mmol), ácido trifluoroacético al 98% (60 ml) y *tert*-butanol (15,54 g, 209,66 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 48 horas. Se evaporó el ácido trifluoroacético. Se suspendió el residuo en 40 ml de agua destilada y se ajustó el pH a neutro con la adición de hidrogenocarbonato de sodio. Se obtuvo el producto bruto mediante filtración. La cristalización a partir de etanol al 50% proporcionó el producto como un polvo blanco (puro al 85-90%).

¹H RMN (CDCl₃): δ = 1,34 (9H, s, 3 CH₃), 1,46 (9H, s, 3 CH₃), 1,49 (9H, s, 3CH₃), 7,45 (1H, s, CH aromático), 7,18 (1H, s, CH aromático), 5,29 (1H, s, NH).

Fmoc-2,5,7-triterbutilriptófano:

Se preparó el compuesto del título como está descrito para el Fmoc-Trp(1-bencil)-OH.

25 Ejemplo 3

Bioactividad de los análogos de la lactoferricina

Síntesis de los análogos

Se sintetizaron todos los péptidos en un sintetizador de péptidos automático 9050 de Millipore utilizando la protección

con Fmoc y la activación con ésteres de pentafluorofenilo (Pfp) o la activación *in situ* con el reactivo de acoplamiento HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio). En el caso del acoplamiento con ésteres de pentafluorofenilo, se añadió 1-HOBt (1-hidroxi-benzotriazol) para catalizar la reacción, y cuando se utilizó el reactivo de acoplamiento HATU, la reacción se catalizó por base con DIPEA (diisopropiletilamina). Todos los aminoácidos con cadenas laterales reactivas se protegieron con grupos protectores inestables en ácido y se escindieron al tratarlos con TFA (ácido trifluoroacético) que contenía depuradores (véase más adelante la mezcla de depuradores). Al mismo tiempo, los péptidos se escindieron del soporte sólido al tratarlo con la solución de TFA.

A) Adhesión del primer aminoácido al soporte sólido cuando se sintetizan los péptidos todo D

El soporte sólido PAC-PEG-PS (Ácido peptídico - Polietilenglicol - resina de poliestireno) (1 eq.) se mezcló junto con Fmoc-D-aminoácido-OPfp (5 eq.) y DMAP (dimetilaminopiridina) (1 eq.) en un volumen pequeño de DMF (dimetilformamida) y se dejó hinchar durante 30 minutos. A continuación se agitó la disolución lentamente durante 4 horas y media. Entonces se añadieron el AC₂O (ácido acético anhidro) (2,5 eq.) y el DMAP (0,1 eq.) a la disolución para acetilar cualquier grupo hidroxilo que quede en el soporte sólido. Luego se agitó la disolución una hora más. El soporte sólido con el aminoácido unido por el extremo carboxilo se aisló por filtración y se lavó varias veces sobre el filtro con DMF. Después se utilizó el soporte sólido en la síntesis del péptido diana sobre el sintetizador de péptidos automático 9050 de Millipore.

B) Acetilación del grupo H₂N del extremo amino utilizando ácido acético anhidro

Se disolvió el complejo péptido-resina en un volumen pequeño de DMF y se trató con un exceso de anhídrido acético (20 eq.) y DMAP (5 eq.) durante cuatro horas, al mismo tiempo que se agitaba lentamente la disolución con un imán pequeño. Se comprobó que la acetilación era completa mediante una prueba de ninhidrina/prueba de Kaiser (véase a continuación).

C) Prueba de ninhidrina/prueba de Kaiser

Se trató menos de 1 mg del complejo péptido-resina con volúmenes iguales pequeños de una disolución de ninhidrina al 5% en etanol, una disolución de 80 g fenol en etanol a 20 ml y una disolución de piridina destilada y seca. Se calentó la mezcla de reacción durante dos minutos a 110°C y se investigó al microscopio (en esta prueba, una mezcla de reacción amarilla indica una acetilación satisfactoria, mientras que una disolución azul indica que todavía hay grupos amino libres).

D) Escisión de los grupos protectores inestables en ácido

La escisión de los grupos protectores inestables en ácido y la escisión de los péptidos del soporte sólido se consiguió mediante una mezcla de anisol al 2%, etanditiol al 2% (EDT), agua al 2% y fenol al 2% en TFA, y con una duración de la escisión inferior a cuatro horas. A continuación se retiró el soporte sólido por filtración y se precipitó el péptido en éter dietílico. La disolución de éter que contiene TFA se retiró con una pipeta Pasteur, y el péptido se lavó varias veces con éter dietílico y se secó a gran vacío.

E) Purificación

Se purificaron los péptidos por HPLC utilizando una columna de fase inversa C18 (*) y una mezcla de agua y acetonitrilo (ambos se añadieron en TFA al 0,1%) como fase móvil. La longitud de onda seleccionada para la detección de las fracciones con el péptido fue de 254 nm.

(*) Cartucho PrePak[®] 25 x 100 mm. DeltaPak[™] C18 15 µm 100 Å (Waters Corporation).

F) Análisis

Se analizaron todos los péptidos en busca de impurezas en una columna analítica de fase inversa C18 de HPLC con una mezcla de agua y acetonitrilo (ambos se añadieron en TFA al 0,1%) como fase móvil. Se determinaron las masas moleculares de los péptidos mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización de iones positivos (VG Quattro Quadrupole).

Derivados de aminoácidos utilizados en la síntesis de los análogos L y D de la lactoferrina

Fmoc-AlaPEG-PS (soporte sólido)	Fmoc-Lys(tBoc)-OPfp
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Met-OPfp
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Fmoc-β-(2-naftil)-alanina-OH
Fmoc-Asn(Trt)-OPfp	Fmoc-Phe-OPfp
Fmoc-Cys(Acm)-OPfp	Fmoc-Ser(tBu)-OPfp
Fmoc-Gln-OPfp	Fmoc-Thr(tBu)-OPfp

Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp

Fmoc-Trp-OPfp

Fmoc-Gly-OPfpFmoc-Tyr(tBu)-OPfp

Fmoc-Leu-OPfp

Los derivados de aminoácidos se compraron en Bachem, MilliGen/Biosearch (División de Millipore) o en PersSeptive Biosystems.

Actividad antimicrobiana de los péptidos del barrido con alanina que contienen un resto triptófano-Pmc

- 5 Durante la desprotección de los grupos protectores inestables en ácido y la escisión del péptido de la resina con ácido trifluoroacético, se observó una reacción secundaria que implicaba la transferencia del grupo protector Pmc (grupo 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo) desde la arginina a la segunda posición del indol del triptófano. Se ha realizado el aislamiento de estos subproductos y los resultados de los análisis de la CIM se ofrecen en la tabla 2. Esta tabla también muestra los resultados de un barrido con alanina realizado sobre la LFB sin ningún grupo Pmc.
- 10 Durante un barrido con alanina se producen una serie de péptidos en los que los aminoácidos sucesivos se han sustituido por alanina.

La secuencia de la lactoferrina bovina nativa de los aminoácidos 17 a 31 (LFB 17-31) es H_2N -Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-COOH (SEQ ID n.º 1).

- 15 **Tabla 2.** Resultados de la CIM para péptidos de barrido con alanina con un grupo Pmc unido a uno de los dos restos de triptófano. También se muestran los resultados de un barrido con alanina realizado en la LFB sin ningún grupo Pmc.

Péptido	Con Pmc		Sin Pmc	
	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>
LFBA 1	8,75	10	70	> 200
LFBA 2	11,25	10	80	> 200
LFBA 3	7,5	7,5	25	100
LFBA 4	15	27,5	70	> 200
LFBA 5	10	50 (*)	120	> 200
LFBA 6	25	17,5	> 200	> 200
LFBA 7	20	7,5	30	150
LFBA 8	15	17,5	> 200	> 200
LFBA 9	10	12,5	55	> 200
LFBA 10	20	22,5	140	> 200
LFBA 11	22,5	22,5	70	> 200
LFBA 12	20	20	50	> 200
LFBA 13	15	15	50	> 200
LFBA 14	15	17,5	25	160
LFBA 17-31	10	10	50	100

* Se ha observado la CIM de 25.

- 20 Los resultados muestran que un grupo Pmc unido a uno de los restos de triptófano aumenta la actividad cuatro veces contra *E. coli*. Aún más marcado es el efecto sobre *S. aureus*. Esta bacteria grampositiva se encontró que era casi totalmente resistente a todos los análogos del barrido con alanina, pero ahora muestra una CIM entre 10 y 22,5 µg/ml. Esto constituye un aumento de diez veces en la actividad antibacteriana respecto a la LFB 17-31 nativa. El resto triptófano-Pmc, que es hidrófobo, parece por lo tanto aumentar la afinidad del péptido por las partes hidrófobas de la membrana de las células bacterianas hasta el punto que la actividad antibacteriana del péptido no es tan dependiente de la secuencia como en el caso del péptido sin este resto.

- 25 **Comparación de la actividad antimicrobiana entre la lactoferrina bovina nativa (LFB 17-31) y la enantio-, retro- y retro-enantio-LFB 17-31, y estos mismos péptidos incorporando un resto de triptófano-Pmc**

Los péptidos que contenían un grupo Pmc transferido desde un resto arginina a un resto triptófano también se aislaron después de la síntesis de las enantio-, retro- y retro-enantio-LFB 17-31.

Tabla 3. Resultados de la CIM para la lactoferrina bovina nativa (LFB 17-31), enantio-, retro- y retro-enantio-LFB 17-31, y para estos péptidos con un grupo Pmc unido a uno de los dos restos de triptófano.

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>	% de hemólisis a 10 µg/ml
LFB 17-31 nativa	50	100	2,6
Enantio-LFB 17-31	7,5	60	3,05
Retro-LFB 17-31	80	200	2,01
Retro-enantio-LFB 17-31	6,25	80	3,31
LFB 17-31 Pmc	10	10	2,8
Enantio-LFB 17-31 Pmc	7,5 (*)	100	3,17
Retro-LFB 17-31 Pmc	10	10	2,5
Retro-enantio-LFB 17-31 Pmc	7,5	12,5	5,28

* Se ha observado una CIM de menos de 5.

5 El enantio-péptido, que es la imagen especular exacta del péptido nativo, muestra mejoras destacables en la actividad antibacteriana (de hecho, este péptido muestra la misma actividad que el péptido nativo LFB 17-31 con un resto triptófano-Pmc, en el caso de *E. coli*). En términos de configuración, esto significa que un análogo de LFB 17-31 todo con D-aminoácidos interacciona mejor con los fosfolípidos quirales de la membrana celular de las bacterias que el péptido nativo de LFB 17-31 todo con L-aminoácidos. Esto también puede implicar que este enantio-péptido es más resistente a las proteasas degradables de las bacterias.

10 El retro-péptido, con una secuencia invertida respecto a LFB 17-31, no muestra mejoras en la actividad antibacteriana, lo que es coherente con la teoría de que la actividad antibacteriana de la LFB 17-31 es específica de la secuencia. Este péptido realmente no es un isómero de la lactoferrina bovina porque la secuencia de aminoácidos es totalmente diferente. La actividad antibacteriana baja de este péptido no es, por lo tanto, ninguna sorpresa.

15 Se observó una actividad antibacteriana notablemente elevada contra *E. coli* por parte del retro-enantio-péptido, el cual, como ya se ha mencionado, adopta la misma conformación en hélice α que el péptido nativo LFB 17-31, salvo que los enlaces amida apuntan en direcciones opuestas. El estereoisómero todo con L-aminoácidos, retro-LFB 17-31, muestra una actividad antibacteriana baja. La razón puede ser que los péptidos todo con D-aminoácidos o bien interaccionan más fuertemente con los fosfolípidos quirales de la membrana celular de las bacterias, o bien son más resistentes a las proteasas que sus homólogos todo con L-aminoácidos.

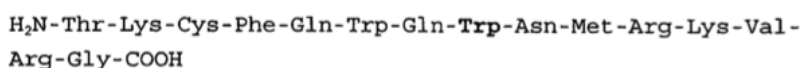
20 La actividad de los péptidos contra *S. aureus* no es tan elevada como se observó para *E. coli*, lo que indica que las interacciones de los péptidos con la capa de lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas podría ser más fuerte que las interacciones con la membrana celular lipídica de las bacterias grampositivas.

25 La actividad de los péptidos que contienen triptófano-Pmc no muestra las mismas diferencias entre los isómeros todo con D-aminoácidos y todo con L-aminoácidos, como se observó para los péptidos sin el grupo Pmc. El efecto del resto triptófano-Pmc parece ser más pronunciado que los efectos configuracionales encontrados entre los péptidos sin este resto, especialmente en el caso de *S. aureus*. Lo más destacable es el tremendo aumento de la actividad del retro-péptido-Pmc. La actividad de este péptido aumenta ocho veces en el caso de *E. coli* y más de diez veces en el caso de *S. aureus* precisamente debido al resto de triptófano-Pmc.

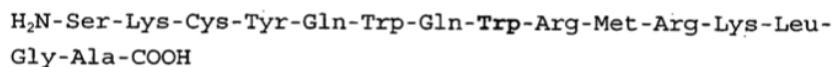
30 Las mejoras observadas con la modificación del Pmc en el caso de *E. coli* son insignificantes, pero la modificación hace aumentar la actividad contra *S. aureus* unas seis veces. Las bacterias grampositivas son obviamente más vulnerables a los péptidos que contienen triptófano-Pmc que a sus homólogos que no contienen triptófano-Pmc.

Actividad antimicrobiana de la lactoferrina humana (LFH), porcina (LFP) y caprina (LFG) con triptófano modificado

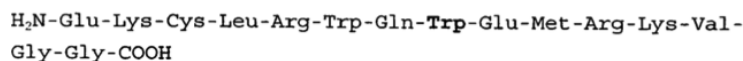
35 Los resultados del barrido con alanina de la lactoferrina bovina (LFB 17-31) mostraron que los dos restos de triptófano en las posiciones seis y ocho no se podían sustituir por alanina sin una pérdida importante de actividad antibacteriana. La evaluación de las partes similares de la secuencia de la lactoferrina LFH, LFP y LFG nativa muestra que estos péptidos carecen del resto triptófano en la posición ocho, pero durante la evolución han conservado el resto de triptófano en la posición seis. Se han sintetizado análogos de LFH, LFP y LFG con un resto de triptófano sustituido en la posición ocho para ver si la actividad antimicrobiana de estos péptidos podía aumentar. Los valores de la CIM para las secuencias nativas se dan en la tabla 4, junto con los péptidos con el triptófano modificado.



Secuencia de la lactoferricina humana modificada (LFH W₈). El triptófano sustituido está resaltado. (Arg →Trp)



Secuencia de la lactoferricina caprina modificada (LFG W₈). El triptófano sustituido está resaltado. (Arg →Trp)



- 5 **Tabla 4.** Resultados de la CIM para la lactoferricina humana (LFH W₈) y la caprina (LFG W₈) con triptófano modificado (los valores de la CIM para la LFB 17-31 nativa y las secuencias nativas de la LFH y la LFG también se recogen para la comparación).

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>	% de hemólisis a 10 µg/ml
LFH W ₈	110	> 1000	2,5
LFP W ₈	500	> 1000	2,9
LFG W ₈ Y ₁₃	110	> 1000	NA
LFG W ₈	500	> 1000	2,7
LFB 17-31 nativa	50	100	2,6
LFH nativa	> 1000	> 1000	NA
LFP nativa	> 1000	> 1000	
LFG nativa	750	NA	2,4

NA = no analizada.

- 10 Tanto la LFH W₈ como la LFG W₈ muestran mejoras en la actividad contra *E. coli* en comparación con las secuencias nativas de los mismos péptidos.

Actividad antimicrobiana de LFH, LFP y LFG con un resto de triptófano-Pmc

Durante la escisión ácida del péptido (tanto con como sin las modificaciones de la secuencia nativa mencionadas antes) de la resina y la escisión de los grupos protectores inestables en ácido, se aisló un subproducto con un grupo Pmc unido a uno de los restos de triptófano y se le analizó la actividad antibacteriana. Los resultados se muestran en la tabla 5.

- 15

Tabla 5. Resultados de la CIM para la LFH, LFG y LFP con un grupo Pmc unido a uno de los dos restos de triptófano, en el caso de LFC Pmc y LFH Pmc, el grupo Pmc se unirá al único triptófano disponible.

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>
LFG Pmc	25	25
LFH Pmc	25	50
LFH W ₈	25	20
LFG W ₈ Pmc	50	75
LFP W ₈ Pmc	20	50
LFH W ₈ Y ₁₃ Pmc	25	20

- 20 Como para todos los péptidos que contienen triptófano-Pmc analizados hasta ahora, estos péptidos generalmente muestran unas mejoras notables en la actividad antibacteriana contra *E. coli* y contra *S. aureus*.

Actividad antimicrobiana de los análogos de la lactoferricina bovina (LFB 17-31) ricos en triptófano

- 25 El barrido con alanina mostró que los dos restos triptófano de la secuencia de la lactoferricina 17-31 bovina eran absolutamente esenciales para la actividad antibacteriana del péptido. La sustitución por alanina de cualquiera de los dos restos condujo a una pérdida importante de la actividad antibacteriana. El barrido con alanina también mostró que los aminoácidos no esenciales de la secuencia de la lactoferricina bovina 17-31 eran los tres restos Cys(3), Gln(7) y Gly(14). Basándose en este conocimiento, se sintetizaron por tanto una serie de cinco análogos de la lactoferricina bovina 17-31 ricos en triptófano con uno, dos o tres de los aminoácidos no esenciales sustituidos por triptófano. Esta técnica en la que se realiza un barrido con alanina y luego se reemplazan los aminoácidos que no parecen esenciales

con triptófano u otros aminoácidos lipófilos y/o voluminosos se puede utilizar para mejorar la citotoxicidad de los péptidos de forma general, y no se limita a la lactoferricina. Las secuencias de los análogos de la lactoferricina bovina ricos en triptófano se muestran a continuación.

LFB W₃:

5

H₂N-Phe-Lys-Trp-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-COOH

LFB W₁₄:

H₂N-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Trp-Ala-COOH

LFB W_{3,14}:

H₂N-Phe-Lys-Trp-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Trp-Ala-COOH

10 LFB W_{3,7,14}:

H₂N-Phe-Lys-Trp-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Trp-Ala-COOH

LFB W_{4,10}:

H₂N-Phe-Lys-Cys-Trp-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Trp-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-COOH

15 **Tabla 6.** Resultados de la CIM para cinco análogos de la lactoferricina bovina (LFB 17-31) ricos en triptófano junto con la LFB 17-31 nativa.

Péptidos	CIM en <i>E.coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>
LFB 17-31	50	100
LFB W ₃	20	20
LFB W ₁₄	20	25
LFB W _{3,14}	10	10
LFB W _{3,7,14}	20	20
LFB W _{4,10}	5	10

La sustitución de los aminoácidos no esenciales en la secuencia de LFB 17-31 por restos de triptófano mejora la actividad antibacteriana de estos péptidos al menos el doble de la de la secuencia nativa en el caso de *E. coli*, y del cuádruple en el caso de *S. aureus*.

20 El péptido W_{3,7,14}, con tres restos de triptófano adicionales (en total, cinco restos de triptófano en el péptido) ha disminuido la actividad. Esto es probablemente se deba más a un problema de solubilidad al ser este péptido menos soluble en disoluciones acuosas y por lo tanto proporcionar concentraciones más bajas que las calculadas. Esto se ha observado físicamente durante los procedimientos de análisis de la CIM, en los que el péptido tendía a precipitar a concentraciones elevadas.

25 **Ejemplo 4**

También se han preparado péptidos de magainina sustituidos. La magainina 2 nativa tiene la secuencia siguiente:

MAG2

H₂N-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-COOH

30 La tabla 7 que sigue muestra los resultados de la CIM para el péptido nativo y una serie de péptidos modificados en los que se han hecho sustituciones únicas de aminoácidos por triptófano o fenilalanina en las posiciones 16 o 19, con un

aumento resultante de la actividad antibacteriana.

Tabla 7

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>	CIM en <i>S. aureus</i>
Mag2	20	> 200
Mag2 W ₁₆	5-10	5-10
Mag2 W ₁₉	5-10	5-10
Mag2 F ₁₉	5-10	5-10

Ejemplo 5

5 Efectos antitumorales de los diferentes péptidos

La LFB 17-41 cíclica era de Morinaga, Milk Industry, Japón.

Citotoxicidad

- Se aplicaron diferentes células tumorales humanas y murinas (4×10^6) en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar) en un volumen de medio RPMI 1640 de 0,1 ml. Se añadieron las disoluciones peptídicas (0,1 ml) y se incubaron las placas a 37°C durante 30 minutos, 4 horas o 24 horas. Se midió la citotoxicidad utilizando el método MTT (Mosmann et al., *J. Immunol.* (1986) 136, 2348-2357).

Microscopia electrónica

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

- Para la microscopia electrónica de barrido, se cultivaron células Meth A en una placa de cultivo de 12 pocillos y se trataron con diferentes péptidos tal y como se describió anteriormente. Se fijaron las células en el fijador de McDowell fijado posteriormente en OsO₄ al 1%, se deshidrataron y se secaron en el punto crítico según los procedimientos estándares. Se examinaron las células en un microscopio de barrido Jeol JSM-5300.

Microscopia electrónica de transmisión (MET)

- Se recogieron células Meth A de 12 placas de cultivo mediante aspiración y se fijaron en el fijador de McDowell durante una noche, seguido de la fijación posterior, deshidratación e inclusión en Epon Araldite siguiendo los procedimientos estándares. Se cortaron secciones ultrafinas en un Reichert Ultracut S y a continuación se les dio contraste en acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo de Reynold. Se examinaron las secciones en un microscopio electrónico de transmisión Jeol LEM-1010.

Animales experimentales

- Se adquirieron las ratonas CB6F1 (Balb/c x C57 BL/6) libres de patógenos específicos de unas 8 semanas de edad a Charles River (Alemania). Las ratonas se mantuvieron con comida y agua estándares para laboratorios. A las ratonas que llevaban tumores se les realizó la detección sistemática serológica en busca de la infección vírica (LDH, CMV) y la micoplásmica, y en todos los casos dio negativo.

Tumores

- Meth A es una estirpe celular de sarcoma murino no adherente [Sveinbjörnsson et al, (1996) BBRC 223; 643-649] singénica en Balb/c y se mantuvo in vitro en RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 2%. Se recogieron las células en la fase de crecimiento y se lavaron en medio nuevo y se inyectaron por vía subcutánea en la región abdominal de las ratonas. Cada ratona recibió una sola inoculación de 5×10^6 células tumorales viables en RPMI 1640.

Resultados

- 35 In vitro

Citotoxicidad

Derivados de la lactoferricina B

A) Meth A

1. LFB cíclica y lineal

- 40 Se estudió el efecto citotóxico de la LFB (17-41) cíclica y lineal sobre las células Meth A. La LFB lineal, cuyas cisteínas

están protegidas con Acm, destruyeron las células Meth A (1×10^4 /ml) con eficacia a concentraciones mayores de 0,6 mg/ml después de incubar 4 horas (figura 2). La LFB cíclica, que es un fragmento escindido enzimáticamente de la lactoferrina bovina, destruyó con eficacia más del 99% de las células a concentraciones mayores de 0,8 mg/ml.

2. Derivados de la LFB

- 5 A los derivados de la LFB con diferentes longitudes y modificaciones se les analizaron sus propiedades citotóxicas. Se incubaron células Meth A con diferentes concentraciones de los diferentes derivados de la LFB, durante media hora y 4 horas. Tal y como se muestra en la figura 3, la LFB 17-31 intacta no tuvo ningún efecto citotóxico significativo sobre las células Meth A a concentraciones de hasta 1 mg/ml después de una incubación de media hora. En este experimento presentó un efecto débil a 1 mg/ml después de una incubación de 4 horas (figura 4). El análogo de LFB 17-31 modificado con Pmc destruyó las células tumorales a concentraciones por encima de 500 μ g/ml después de incubar media hora. Se necesitó la misma concentración para conseguir una destrucción eficaz después de 4 horas. La LFB (17-41) lineal modificada con Pmc fue ligeramente más eficaz que la LFB 17-31 modificada con Pmc.

En las figuras, «-» denota que no hay ninguna modificación con Pmc y «+» denota la modificación con Pmc.

- 15 Una secuencia más corta, LFB 20-29, modificada con Pmc destruyó más del 90% de las células a 250 μ g/ml. Un análogo de LFB 17-31 (sustituido con alanina en la posición 8) que se modificó con Pmc y cuyo extremo amino se protegió con Fmoc resultó eficaz a concentraciones mayores que 100 μ g/ml después de media hora y a 50 μ g/ml después de cuatro horas. Un péptido de LFB protegido con Fmoc (sustituido con alanina en la posición 8) destruyó la mayor parte de las células a 250 μ g/ml a la media hora y las 4 horas (figuras 5 y 6). Por lo tanto, parece que una combinación de la modificación con Fmoc y Pmc mejoró el efecto citotóxico de la LFB más que cada una de las dos modificaciones por separado. También se analizó el análogo retro-LFB. La retro-LFB 17-31 modificada con Pmc también poseía una mejora del efecto citotóxico en comparación con la LFB 17-31 intacta (figuras 5 y 6).

B) Estirpe celular HL60 de leucemia promielocítica humana

- 25 Se estudió el efecto citotóxico de la LFB 17-41 (PB), LFB 14-31 (P1), LFB 14-31 Pmc (P2), LFB 17-31 (P3) y LFB 17-31 Pmc (P4) sobre las células HL60 humanas. La LFB 14-31 y la LFB 17-31 no mostraron ningún efecto citotóxico a la concentración analizada, mientras que la LFB 17-41 poseía un débil efecto citotóxico dependiente de la concentración. El péptido LFB 17-31 Pmc indujo un efecto marcadamente más fuerte (unas 5 veces mayor) que los otros péptidos analizados. Véase la figura 7.

3. Estudios de ME

- 30 Los resultados de la MEB y la MET muestran que las membranas de las células aparecen muy rotas por los péptidos de la lactoferrina, lo que da lugar a una liberación eficaz del material intracelular. La lisis parece ser muy rápida, a saber, en el plazo de unos minutos para los péptidos más eficaces.

In vivo

1. Regresión tumoral

Fibrosarcoma Meth A murino

- 35 Después de una única inoculación de 5×10^7 células Meth A viables, se inyectaron diferentes péptidos de LF dentro del tumor (LFB 14-31, LFB 17-31 Pmc, 500 μ g en una dosis de 50 μ l; LFB 17-31, 1000 μ g en una dosis de 50 μ l), el día 7 y el día 10. También se inyectó la LFB 14-31 por vía intraperitoneal (PBI), 500 μ g/ml. La disolución salina sola se inyectó en los ratones de control (50 μ l) (K1, K2, K3). El diámetro del tumor (media de transversal y longitudinal) se midió con un calibrador electrónico.

- 40 **El efecto in vivo de LFB 17-31, LFB 17-31 Pmc y LFB sobre el fibrosarcoma Meth A murino**

Como se muestra en la figura 8, los tres péptidos analizados, LFB 17-31 (PB), LFB 14-31 Pmc (P2) y LFB 14-31 (P1), indujeron la regresión de los tumores Meth A después del tratamiento el día 7 y el día 10. «Diam. mm» se refiere al diámetro de los tumores.

- 45 Resulta interesante señalar que también se erradicaron los tumores en los ratones que se trataron por vía intraperitoneal con LFB 14-31 (PBI). Los ratones tratados con disolución salina sola se representan como K1, K2 y K3.

Ejemplo 2: Melanoma murino B16F10

- 50 Después de una sola inoculación de 5×10^6 células viables de melanoma murino B16F10, se inyectó D-LFB A₇ Pmc-NH₂ en el interior del tumor el día 10 y el 12 (500 μ g/inyección en 50 μ l de disolución salina). La disolución salina sola se inyectó en el ratón de control (50 μ l). Se midió el diámetro del tumor (media de transversal y longitudinal) en días alternos con un calibrador electrónico.

El efecto in vivo de D-LFB A₇ Pmc-NH₂ sobre el melanoma murino B16F10

Como se muestra en la figura 9, D-LFB A₇ Pmc-NH₂ (pep) fue capaz de inducir con eficacia la regresión de los tumores sólidos. El eje y representa el diámetro del tumor en milímetros. Tres de los cinco fueron erradicados totalmente después de sólo dos inyecciones. Después de seis días tras el primer tratamiento, un tumor empezó a crecer de nuevo, y 10 días después del primer tratamiento, un segundo tumor empezó a crecer.

2. Inmunidad adaptativa

Después del tratamiento satisfactorio de los tumores de Meth A establecidos, se mantuvieron algunos ratones durante un mes antes de volver a inocular las células tumorales tal y como se ha descrito anteriormente. En algunos de estos ratones se realizó una tercera inoculación de células tumorales un mes después de la segunda inoculación. No se establecieron tumores en estos ratones y se mantuvieron los ratones durante un periodo más largo sin ningún efecto sobre su estado normal.

Ejemplo 6

También se ha investigado el efecto de la modificación química de otro péptido moderadamente activo. El péptido declarado es un fragmento de la lactoferrina bovina, que corresponde a los restos 14 a 31 de la secuencia nativa (véase la tabla 1 en la figura 1 para la secuencia completa). La actividad antimicrobiana se expresa en forma de valores de la CIM contra *E. coli* y *S. aureus*, la toxicidad se expresa como la concentración que ocasionó la hemólisis del 50% (CE₅₀) y la actividad antitumoral se expresa en forma de número de µg/ml de péptido requerido para destruir el 50% de las células Meth A para los péptidos se muestran a continuación en la tabla 8.

Tabla 8

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> µg/ml	CIM en <i>S. aureus</i> µg/ml	CE ₅₀ (µM)	CI ₅₀ en Meth A µg/ml
LFB 14-31	70	> 250	> 404	Ninguna actividad
LFB 14-31 Pmc	15	20	244	14,6
LFB 14-31 A _{2,6,10,17}	20	2,5	> 440	165
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} Pmc	20	2,5	165	12,8
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R ₄	30	20	> 438	75,8
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R ₄ Pmc	10	2,5	290	6,9
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R _{4,11}			> 444	75,5
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R _{4,11} Pmc			327	5,2
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ R ₄	10	2,5	>440	30,2
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ R ₄ Pmc	10	2,5	20	7,7
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄	10	10	>440	28,1
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ Pmc	10	2,5	89	5,2

Al igual que antes, la presencia del grupo Pmc lipófilo/voluminoso en uno o más de los restos de triptófano mejora la actividad antimicrobiana y antitumoral. Resulta interesante señalar que la presencia de este grupo lipófilo y voluminoso artificial es capaz de mejorar selectivamente la actividad bactericida, mejorando más generalmente la actividad contra *S. aureus* que contra *E. coli*.

25 **Ejemplo 7**

La tabla 9 muestra datos sobre la actividad antibacteriana y sobre la toxicidad de los péptidos basados en la LFB que incorporan un aminoácido lipófilo y voluminoso no genético en lugar de uno de los aminoácidos en la secuencia nativa. Otros péptidos también incorporan un grupo (Pmc) que hace aumentar la voluminosidad y la lipofilia de uno de los restos de triptófano que se producen de forma natural.

Tabla 9

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> µg/ml	CIM en <i>S. aureus</i> µg/ml	% de hemólisis a 10 µg/ml	% de hemólisis a 100 µg/ml
LFB	50	100	2,6	3,47
LFB Bip ₃	10	10		
LFB Bip ₆	25	25		
LFB Bip ₈	15	15		
LFB Bip _{6,8}	10	5		
LFB Bip ₃ Pmc	37,5	2,5		
LFB Bip ₈ Pmc	25	5		
LFB Tbt ₃	25	5		
LFB Tbt ₃ Pmc	37,5	10		
LFB Tbt ₆	12,5	10		
LFB Tbt ₆ Pmc	37,5	10		
LFB Tbt ₈	12,5	5		
LFB Tbt ₈ Pmc	25	5		
LFB Tbt _{6,8}	25	5		
LFB Nal ₆	20	75	2,2	4,4
LFB Nal ₆ Pmc	25	20	2,8	17,8
LFB Nal _{6,8}	10	20	2,8	4,9
LFB Nal ₈	10	50	3	4,7
LFB Nal ₈ Pmc	20	10	6,96	18,86
LFB NPS-O ₆	20	100	2,8	4,1
LFB NPS ₆	23	50	4,2	5,9

En la tabla de anterior,

Bip = bifenilalanina

Tbt = tri-*tert*-butilriptófano

5 Nal = 2-naftilalanina

NPS = orto-nitrofenilsulfonilo

NPS-O = orto-nitrofenilsulfonilo

Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo

Todos los péptidos son LFB 17-31 y modificaciones del mismo.

10 Ejemplo 8

Se realizaron experimentos para investigar el efecto que tienen el Pmc y la variación de la longitud del péptido sobre la actividad antitumoral y la toxicidad (actividad hemolítica).

Los resultados de estos experimentos se presentan en la tabla 10 que sigue.

Tabla 10

Péptido	CI ₅₀ (µM) en Meth A		CE ₅₀ (µM) en eritrocitos		Selectividad +Pmc
	-Pmc	+Pmc	-Pmc	+Pmc	
LFB 14-31 A _{2,6,10,17}	165	15	> 440	118	8
LFB 14-30 A _{2,6,10,17}	> 227	14	> 454	184	13
LFB 14-29 A _{2,6,10}	> 235	18	>469	367	20
LFB 14-28 A _{2,6,10}	> 248	12	> 438	> 438	> 36

La presencia de un grupo Pmc en uno o más de los restos de triptófano de un péptido de LFB aumentó significativamente su actividad antitumoral y algo menos su actividad hemolítica. Sorprendentemente, se encontró que al reducir la longitud del péptido, aumentaba la selectividad, esto es, la actividad antitumoral frente a la actividad hemolítica del péptido.

5

Ejemplo 9

Se prepararon péptidos modificados para investigar el efecto de aumentar el número de restos de triptófano en los péptidos activos procedentes de margainina. Los resultados de estas modificaciones se muestran en la tabla 11 que sigue, que contiene los valores de CIM para las bacterias típicas y que muestra la actividad antitumoral de los µg/ml de péptido requerido para destruir el 50% de las células Meth A.

10

Tabla 11

Péptidos	CIM en <i>E. coli</i> (µg/ml)	CIM en <i>S. aureus</i> (µg/ml)	CI ₅₀ en Meth A (µg/ml)
Mag 2	20	> 100	100
Mag 2 W ₁₉	7,5	10	9
Mag 2 W _{6,8}	> 100	> 100	
MSI 24	5	5	> 100
MSI 24 W ₇	5	5	26
MSI 24 W ₁₁	5	2,5	24
MSI 20			>100
MSI 20 W ₆	*	*	22
Tosmag	8	8	18
Tosmag W ₁₆	10	5	
Tosmag W _{12,16}	10	5	
Tosmag W _{12,16}	5	10	
Tosmag W _{6,12,15,17}	15	10	23
Tosmag W _{5,9,13,16,20}	> 50	> 50	23

Mag 2: NH₂-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-~~Leu~~-His-~~Ser~~-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-~~Glu~~-Ile-Met-Asn-Ser-COOH.

Tosmag: NH₂-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Arg-Lys-
Phe-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Arg-Ile-Leu-Lys-Lys-Gly-COOH.

MSI24: NH₂-Lys-Met-Ala-Ser-Lys-Ala-Gly-Lys-Ile-Ala-Gly-
Lys-Ile-Ala-Lys-Val-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-NH₂.

MSI20: NH₂-Lys-Val-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Val-Ala-Leu-
Lys-Ala-Leu-Lys-Val-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-NH₂.

Para los péptidos que tienen sólo una actividad antitumoral moderada, el reemplazo de un resto con triptófano aumenta significativamente la actividad.

5 Tomag es ya muy citotóxico y no es sorprendente que la actividad no mejore significativamente por la sustitución con triptófano, ya que reemplaza uno o más restos de fenilalanina que son por sí mismos lipófilos y voluminosos.

Claramente, aumentar demasiado la voluminosidad y lipofilia del péptido puede ser contraproducente. Se puede deber al hecho de que se reemplazan los restos importantes o al hecho de que hay un límite en la voluminosidad/lipofilia que deben tener las cadenas laterales del péptido.

Ejemplo 10

10 Métodos para preparar ésteres de péptidos

TRANSESTERIFICACIÓN DESDE LA RESINA

Se pueden obtener ésteres de péptidos totalmente protegidos mediante la transesterificación catalizada por una base desde las resinas de tipo Merrifield y SASRINTM. Se han obtenido buenos rendimientos con metanol y alcohol bencílico. Los mejores resultados se obtuvieron empleando bien KCN₂O LiBr/DBU como catalizador.

15 Procedimiento estándar para la transesterificación catalizada por KCN:

Antes de utilizarla, hay que secar cuidadosamente la resina peptídica y el disolvente empleados, pues deben resistir el tratamiento prolongado con KCN. Se producirá la transesterificación, incluso aunque la solubilidad del KCN es baja; no molestará la sal residual. Se suspende la resina peptídica en una mezcla del alcohol deseado y el codisolvente, por ejemplo, dimetilacetamida (normalmente 1:1, 10 ml/g de resina). Después de 30 minutos, se añade suficiente KCN
20 sólido, de manera que se obtenga una disolución a 0,08 M (o al menos a saturación). Después de agitar durante 24 horas, la resina se retira por filtración y se lava con el codisolvente. Se debe destruir el catalizador inmediatamente, por ejemplo agitando vigorosamente el filtrado con suficiente FeCl₂ anhidro sólido. El azul de hierro floculará, se deja reposar durante unos 30 minutos y se retira por filtración. El filtrado debe permanecer verdoso. Si hay que realizar más tareas dependerá de la solubilidad del producto, pero se debe tratar con agua. Después de retirar el alcohol y el
25 codisolvente, el residuo se resuspende en un disolvente orgánico, por ejemplo acetato de etilo o cloroformo, para otra extracción acuosa con la que retirar las sales.

ESTERIFICACIÓN BENCÍLICA DIRECTA DE LOS N-ACILPÉPTIDOS

Los derivados de (p-hidroxifenil)bencilmetilsulfonio (HOBMX) generan con facilidad cationes bencílicos, lo que convierte los péptidos protegidos en el extremo amino y en las cadenas laterales en sus ésteres de bencilo sin racemización.

30 Procedimiento general: el péptido y el carbonato de potasio se disuelven en diclorometano y se agita la mezcla a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se añade el HOBMCl a la disolución y se agita durante 8 horas. Las sales inorgánicas de la mezcla de reacción se retiran por filtración y el filtrado se evapora al vacío. El residuo se disuelve en tolueno y se lava con una disolución acuosa de NaOH a 0,5 M y luego con agua. La capa orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y el filtrado se evapora al vacío.

35 Ejemplo 11

Se preparó una serie de péptidos modificados adicionalmente basados en la lactoferrina murina. En los datos siguientes (véase la tabla 12), LFM se refiere a los restos 17-31 de la lactoferrina murina. Los péptidos más cortos están indicados mediante la notación en la que, por ejemplo, LFM 17-24 representa un péptido de 8 restos que corresponde a los aminoácidos de las posiciones 17 a 24 de la lactoferrina murina.

40 El equivalente murino de la LFB es generalmente mucho menos activo que su equivalente bovino; sin embargo, al modificar el péptido de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar péptidos con una mejora enorme de la actividad antibacteriana. La LFM no posee un resto triptófano en la posición 8, a diferencia de su homólogo bovino más activo. Los inventores han identificado que este resto es importante para la actividad de la LFB y, por lo tanto, se ha realizado esta sustitución de la asparragina por el triptófano. Esta sustitución por sí sola no mejora significativamente la

actividad contra las cepas bacterianas analizadas. Se podría mejorar más la actividad al sustituir uno o ambos restos aniónicos en las posiciones 1 y 9 con la alanina sin carga, o más preferentemente un resto catiónico tal como la arginina.

Se podrían construir péptidos con buena actividad antimicrobiana al incorporar más restos lipófilos/voluminosos, por ejemplo un resto tirosina en la posición 13 en el lugar de la menos voluminosa valina, y/o al modificar el resto de triptófano mediante la incorporación del grupo Pmc más voluminoso.

Además, fue sorprendente encontrar que resultaban particularmente eficaces los péptidos más cortos basados en fragmentos de la LFM cuando se modificaban para introducir más aminoácidos voluminosos/lipófilos, por ejemplo triptófano o tirosina, y para aumentar la carga global del péptido al reemplazar los restos nativos por restos catiónicos tales como arginina.

Tabla 12

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> µg/ml	CIM en <i>S. aureus</i> µg/ml	% de hemólisis a 10 µg/ml	% de hemólisis a 100 µg/ml
LFM	> 1000	> 1000	2,3	3,1
LFM W ₈	> 1000	1000	2,6	4,8
LFM W ₈ Y ₁₃	> 1000	> 1000		
LFM A ₁ W ₈	750	> 1000	2,4	3
LFM A ₁ W ₈ Y ₁₃	500	> 1000		
LFM A ₉ W ₈	> 1000	> 1000	2,5	3,5
LFM A ₉ W ₈ Y ₁₃	> 1000	> 1000		
LFM A _{1,9} W ₈	200	> 1000	2,8	3,7
LFM A _{1,9} W ₈ Y ₁₃	150	> 1000		
LFM R ₁ , W ₈	75	500	2,8	3,48
LFM R ₁ W ₈ Pmc	> 200	> 200		
LFM R ₁ W ₈ Y ₁₃	50	50		
LFM R ₉ W ₈	500	> 1000	3,1	4,59
LFM R ₉ W ₈ Pmc	20	50		
LFM R ₉ W ₈ Y ₁₃	150	1000		
LFM R _{1,9} W ₈	25	75	3,69	
LFM R _{1,9} W ₈ Pmc	10	5		4,9
LFM R _{1,9} W ₈ Y ₁₃	25	50		
LFM A ₁ R ₉ W ₈ Y ₁₃	50	200		
LFM 17-24 R _{1,2,8} W _{3,7} Y ₄ NH ₂	5	2,5		
LFM 17-24 R _{1,2,8} W _{3,7} Y ₄ NH ₂ Pmc	25	1-2,5		
LFM 18-24 R _{1,7} W _{2,3,6} Y ₅ NH ₂	10	0,5-1		
LFM 17-25 A ₄ R _{2,8,9} W _{3,7} Y ₁ NH ₂	10	5		
LFM 17-25 A ₄ R _{2,8,9} W _{3,7} Y ₁ NH ₂ Pmc	20	2,5		
LFM 17-26 A ₇ R _{2,8,9} W _{3,4,10} Y ₁ NH ₂	10	2,5		

Ejemplo 12

La tabla 13 que sigue ilustra el efecto de modificaciones químicas adicionales que proporcionan péptidos de acuerdo con la invención.

Tabla 13

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> µg/ml	CIM en <i>S. aureus</i> µg/ml	% de hemólisis a 10 µg/ml	% de hemólisis a 100 µg/ml	CI ₅₀ en Meth A µg/ml
LFB	50	100	2,6	3,47	500
LFB Pmc	10	10	2,8	4,4	120
LFB Pmc ₆	10	10	3,4	6	148
LFB Pmc ₈	18	10	3,6	9,79	150
LFB 18-31	80	200			
LFB 18-31 Pmc	10	10			
LFB 19-31	200	> 250			
LFB 19-31 Pmc	10	15			
LFB 20-28 A ₄	> 100	> 100	0	1,68	500
LFB 20-28 A ₄ Fmoc					120
LFB 20-28 A ₄ Fmoc Pmc					35
LFB 20-28 A ₄ Pmc	15		3,9	12,6	110
LFB 20-29	60	> 100	1,75	2,74	500
LFB 20-29 Fmoc	5	10	10,3	28,2	140
LFB 20-29 Fmoc Pmc			2,5	60,2	50
LFB 20-29 Pmc	10	10	5,6	18,9	160
LFB 20-30	40	> 100	2,16	3,1	
LFB 20-30 Pmc	15	10	5,54	15,8	
LFB 20-31	100	200			
LFB 20-31 Pmc	10	10			
LFB A ₁	70	> 200			
LFB A ₁ Pmc	8,75	10			
LFB A ₂	80	> 200			
LFB A ₂ Pmc	11,25	10			
LFB A ₃	25	100			500
LFB A ₃ Pmc	7,5	7,5	2	3,67	130
LFB A ₄	7,0	> 200			
LFB A ₄ Pmc	15	27,5			
LFB A ₅	120	> 200			
LFB A ₅ Pmc	10	50			
LFB A ₆	> 200	> 200	2,78	3,27	
LFB A ₆ Pmc	25	17,5			
LFB A ₇	30	150			500
LFB A ₇ Pmc	20	7,5	2,1	3,8	88
LFB A ₈	> 200	> 200	2,8	3,45	500
LFB A ₈ Fmoc	60	10	2,87	7,79	
LFB A ₈ Fmoc Pmc			6,75	45,4	
LFB A ₈ Pmc	15	17,5			275
LFB A ₉	55	> 200			

LFB A ₉ Pmc	10	12,5			
LFB A ₁₀	140	> 200			
LFB A ₁₀ Pmc	20	22,5			
LFB A ₁₁	70	> 200			
LFB A ₁₁ Pmc	22,5	22,5			
LFB A ₁₂	50	> 200			
LFB A ₁₂ Pmc	20	20			
LFB A ₁₃	50	> 200			
LFB A ₁₃ Pmc	15	15			
LFB A ₁₄	25	160			500
LFB A ₁₄ Pmc	15	17,5			100

A menos que se indique otra cosa, LFB representa LFB 17-31.

Ejemplo 13

La tabla 14 que sigue ilustra los datos de actividad antibacteriana así como los de toxicidad (% de hemólisis) para otros péptidos de acuerdo con la invención.

Tabla 14

Péptido	CIM en <i>E. coli</i> µg/ml	CIM en <i>S. aureus</i> µg/ml	% de hemólisis a 10 µg/ml	% de hemólisis a 100 µg/ml	Cl ₅₀ en Meth A µg/ml
LFB F ₄	20	200	2,4	3,2	
LFB F ₄ Pmc	20	20			
LFB F ₄ K ₁	20	200			
LFB F ₄ K ₁ Pmc	10	10			
LFB K ₁	60	100			
LFB K ₁ Pmc	10	10			
LFB W ₃	20	20	2,3	3,8	
LFB W ₃ Pmc	> 50	10	3,55	17,35	
LFB W _{3,14}	10	10	3,1	5,1	
LFB W _{3,14} Pmc	20	20			
LFB W _{3,7,14}	20	20	4,02	66,1	
LFB W _{3,7,14} Pmc	30	20	18,1	85,9	
LFB W _{4,10}	5	10	4,45	27,8	500
LFB W _{4,10} Pmc	20	20	2,27	14,2	110
LFB W ₁₄	20	25	3	4,1	
LFB W ₁₄ Pmc	25	10			

Ejemplo 14

Los péptidos bacterianos que son activos contra las cepas bacterianas que han mostrado resistencia a otros antibióticos son péptidos potencialmente muy útiles. La tabla 15 que sigue ofrece los datos de la actividad antibacteriana y de la toxicidad de algunos péptidos preferentes de la invención. MRSA es *S. aureus* resistente a la metilina y MRSE es *S. epidermidis* resistente a la metilina.

En la tabla 15, LFB = LFB 17-31 a menos que se indique otra cosa. Se utilizan los códigos de una y tres letras previamente identificados y, además, se representan los grupos modificadores del extremo amino siguientes:

Bz = bencilo

Chx = ciclohexilo

5 Ad = adamantilo

Tabla 15

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>		CIM en <i>S. aureus</i>		CIM en MRSA		CIM en MRSE		CE ₅₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Bz LFB										
Chx LFB			> 20	> 9,2	2,5-5	1,1-2,3				
Ad LFB			7,5-10	3,3-4,5	2,5-5	1,1-2,2				
LFB Pmc ₆	10,0	4,3	2,5	1,1	2,5	1,1			> 1000	> 429
LFB A ₃ Pmc	7,5	3,4	5,0	2,2					> 1000	> 449
LFB A ₇ Pmc	20,0	8,8	15,5-20	6,8-8,8	≥ 20	≥ 8,8	17,5	7,7	> 1000	
LFB A _{3,7}			> 20	> 10,5	17,5-20	9,2-10,5	5,0	2,6	> 1000	> 525
LFB A _{3,7} Pmc			2,5	1,2	2,5	1,2	2,5	1,2	> 1000	> 461
LFB W _{3,14}	10,0	4,5	2,5	1,1	2,5	1,1	2,5	1,1	> 1000	> 453
LFB retro Pmc	10,	4,3	5-7,5	2,1-3,2					> 1000	> 429
LFB enantio Pmc	7,5	3,2	2,5-5	1,1-2,1	2,5-5	1,1-2,1	2,5	1,1	> 1000	> 429
LFB 20-30 Pmc	15,0	8,3	10,0	5,5						
LFB 17-27 A _{3,7} R _{2,11} W _{4,10} Y ₁ NH ₂	10,0	5,9	2,5	1,5	0,5-1	0,3-0,6	2,5	1,5	700 ± 300	400 ± 200
LFB 17-27 A ₇ M ₃ R _{2,11} W _{4,10} Y ₁ NH ₂	10,0	5,7	0,5-1	0,3-0,6					510 ± 160	291 ± 91
LFB 17-27 A _{3,7} R _{2,11} W _{4,10} Y ₁ NH ₂ Pmc			1-2,5	0,5-1,3					43 ± 8	22 ± 4
LFB 17-27 A ₇ M ₃ R _{2,11} W _{4,10} Y ₁ NH ₂ Pmc									40 ± 10	20 ± 5
LFB 14-31 A _{2,6,10,17}	20,0	8,8	> 2,5	> 1,1	5,0	2,2			> 1000	> 440
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} Pmc	20,0	7,9	> 2,5	> 1,0					< 1000	> 394
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R ₄	30,0	13,1	20,0	8,8					> 1000	> 438
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R ₄ Pmc	10,0	3,9	> 2,5	> 1,0					739	290

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>		CIM en <i>S. aureus</i>		CIM en MRSA		CIM en MRSE		CE ₅₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R _{4,11}			12,5-15	5,6-6,7	2,5-5	1,1-2,2			> 1000	> 444
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} R _{4,11} Pmc			2,5-5	1,0-2,0	2,5-5	1,0-2,0			823	327
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ R ₄	10,0	4,4	> 2,5	> 1,1					> 1000	> 440
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} K ₁₆ L ₁₄	10,0	4,4	10,0	4,4					> 1000	> 440
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄										110
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ L ₁₄ Om _{5,4,8,12,15,16}			2,5	1,2	2,5	1,2			425	202
LFM R _{1,9} W ₈ Pmc	10,0	4,4	1,0	0,4					> 1000	> 435
LFM 17-24 R _{1,2,8} W _{3,7} Y ₄ NH ₂	5,0	3,7	2,5-5	1,8-3,7	1,0	0,7	2,5	1,8	> 1000	> 733
LFM 17-24 R _{1,2,8} W _{3,7} Y ₄ NH ₂ Pmc	20-50	34-53	1-2,5	0,6-1,5	1-2,5	0,6-1,5	2,5	1,5	120 ± 70	74 ± 43
LFM 18-24 R _{1,7} W _{2,3,6} Y ₅ NH ₂	10,0	8,3	0,5-1	0,4-0,8	0,5-2,5	0,4-2,1	1,0	0,8	> 1000	> 829
LFM 17-25 A ₄ R _{2,8,9} W _{3,7} Y ₁ NH ₂	10,0	7,0	0,5-5	0,3-3,5					> 1000	> 697
LFM 17-25 A ₄ R _{2,8,9} W _{3,7} Y ₁ NH ₂ Pmc	20,0	11,8	2,5	1,5					140 ± 90	82 ± 53
LFM 17-26 A ₇ R _{2,8,9} W _{3,4,10} Y ₁ NH ₂	10,0	6,2	1,0	0,6	2,5	1,5			880 ± 90	543 ± 56
LFM 17-26 A ₇ R _{2,8,9} W _{3,4,10} Y ₁ NH ₂ Pmc	200,0	106,0	2,5	1,3	2,5	1,3			150 ± 90	79 ± 48
LFB Bip ₃	12,5	5,9	2,5-5	1,2-2,4	2,5	1,2				
LFB Bip _{6,8}	≥ 12,5	≥ 5,8	3,0	1,4	2,5	1,2				
LFB Bip ₃ Pmc	≤ 25	≤ 10,5	2,5	1,1	2,5-5	1,1-2,1				
LFB Bip ₈ Pmc	15,0	6,3	2,5	1,1	2,5	1,1				
LFB Nal _{6,8}	10,0	4,8	20,0	9,6	5,0	2,4			> 1000	> 479
LFB Tbt ₆	12,5	5,6	2,5	1,1	1-2,5	0,4-1,1	2,5	1,1	> 1000	> 448
LFB Tbt ₆ Pmc	37,5	15,0	2,5-5	1,0-2,0	5,0	2,0			410 ± 70	164 ± 28
LFB Tbt ₈	12,5	5,6	2,5-5	1,1-2,2	0,5-2,5	0,2-1,1	2,5	1,1	> 1000	> 448

Péptido	CIM en <i>E. coli</i>		CIM en <i>S. aureus</i>		CIM en MRSA		CIM en MRSE		CE ₅₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
LFB Tbt ₈ Pmc	25-50	10-23	2,5-7,5	1,0-3,0	5,0	2,0			290 ± 70	116 ± 28
LFB Tbt _{6,8}	25-37,5	12-18	2,5	1,2	5,0	2,3	2,5	1,2	230 ± 30	107 ± 14
LFB Tbt ₃	25,0	11,1	2,5	1,1	2,5	1,1			500 ± 40	223 ± 18

Ejemplo 15

La tabla 16 que sigue ofrece los valores de la CIM para una variedad de péptidos que incorporan una proporción de D-aminoácidos.

Péptido	Secuencia*	CIM µg/ml en <i>E. coli</i>	CIM µg/ml en <i>S. aureus</i>	CIM µg/ml en MRSA
LFM 17-27 A ₇ R _{2,8,9} W _{3,4,10} Y ₁ NH ₂	TYR-ARG-ALA- TRP-ARG-TRP- ALA-TRP-ARG- TRP-ARG-CONH ₂	10	2,5	
	tyr-ARG-ala-TRP- arg-TRP-ala-TRP- arg-TRP-arg- CONH ₂	7,5	7,5	2,5
	tyr-arg-ala-TRP- ARG-TRP-ala- TRP-ARG-TRP- ARG-CONH ₂	7,5	5	2,5
LFM 18-24 R _{1,7} W _{2,3,6} Y ₅ NH ₂	ARG-TRP-TRP- ARG-TYR-TRP- ARG-CONH ₂	10	1	
	arg-TRP-trp-ARG- tyr-TRP-arg- CONH ₂	7,5	5	2,5
	arg-trp-TRP-ARG- TYR-trp-arg- CONH ₂	7,5	5	2,5

5 *Las mayúsculas representan L-aminoácidos, las minúsculas representan D-aminoácidos.

Ejemplo 16

Citotoxicidad de los péptidos de la invención

10 Se midió el efecto citotóxico de los péptidos en diferentes células tumorales humanas y murinas utilizando el método de MTT (Mosmann et al., *J. Immunol.* (1986) 136, 2348-2357). El MTT es una sal de tetrazolio soluble que produce una solución amarilla cuando se prepara en medios o soluciones salinas que carecen del rojo fenol. El MTT disuelto se convierte en un formazano púrpura insoluble mediante la escisión del anillo tetrazolio por las enzimas deshidrogenásicas. Este formazano insoluble en el agua se puede solubilizar con isopropanol u otros disolventes, y el material disuelto se mide en el espectrofotómetro. Se midió la absorbencia en función de la concentración del colorante convertido.

15 La conversión del colorante soluble en el formazano púrpura insoluble se utiliza en los ensayos que miden la proliferación celular. Las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células vivas producen este cambio, mientras que las células muertas no.

Se utiliza este ensayo para medir el grado de muerte celular ocasionada por los péptidos.

Células:

20 Se mantuvieron las células en medio RPMI-1641 que contiene FBS al 10%, L-glutamina al 1% y penicilina y estreptomycinina al 0,1%. Las células que se utilizaron en el ensayo se hicieron crecer hasta la confluencia, se trataron

con tripsina y se separaron para dar una suspensión de células únicas, se contaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió a una concentración de 4×10^5 células/ml en RPMI-1640 sin FBS ni L-glutamina (medio de ensayo). Se transfirieron 100 ml de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se estimularon las células añadiendo 100 ml de distintas concentraciones de los péptidos diluidos en el medio de ensayo a cada pocillo. Las concentraciones finales de péptido fueron, por ejemplo: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 200 mg/ml. Dado que hay una dilución de dos veces al añadir la solución peptídica a los pocillos que contienen la suspensión celular, la disolución peptídica tenía que estar concentrada al doble. Como control negativo se añadió solo medio a las células, y como control positivo (destrucción del 100%), se añadió Tritón X-100 al 1%. Después de un periodo de incubación de 4 horas, se añadieron 20 ml de MTT disueltos en PBS a una concentración de 5 mg/ml a cada pocillo, y se incubó la placa durante 2 horas más. Entonces se retiraron 130 ml del sobrenadante y se añadieron 100 ml de alcohol ácido (HCl a 0,04-0,1 N en isopropanol) a cada pocillo para disolver los cristales de color azul oscuro. Se colocó la placa en un agitador durante 1 hora y se leyó en el espectrofotómetro a 590 nm en un lector de placas de microtitulación con el programa Softmax.

Ensayo hemolítico

15 Se determinó la actividad hemolítica de los péptidos utilizando eritrocitos humanos recién preparados. Se tomaron 8 ml de sangre de una persona sana. Se transfirieron 4 ml de sangre a un tubo de policarbonato que contenía heparina a una concentración final de 10 U/ml, y los otros 4 ml de sangre se transfirieron a un tubo de cristal que contenía EDTA a una concentración final del 15%. Los eritrocitos se aislaron de la sangre tratada con heparina mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min y se lavó tres veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para retirar el
20 plasma y la capa de leucocitos. Se resuspendió el sedimento de células en PBS para obtener el volumen final de 4 ml. El péptido se diluyó a una concentración de 2 mg/ml y 0,1 mg/ml. El péptido se diluyó además a las concentraciones que se mencionan en la tabla 1. A cada tubo se le añadió primero el PBS, y luego los eritrocitos y las disoluciones peptídicas. El hematocrito en la sangre tratada con EDTA se determinó después de 30 min con Sysmex K-1000, y los eritrocitos resuspendidos se diluyeron a un hematocrito del 10%. Los eritrocitos en PBS (1%) con y sin los péptidos
25 (tabla 18) se incubaron en un agitador a 37°C durante 1 hora y a continuación se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante con cuidado a tubos de policarbonato nuevos y se midió la absorbencia del sobrenadante a 540 nm. La hemólisis basal era la hemoglobina liberada en presencia de PBS, y la hemólisis al 100% era la hemoglobina liberada en presencia de Tritón X-100 al 0,1%.

Tabla 17

Tubo n.º	Concentración final del péptido ($\mu\text{g/ml}$)	Péptido o Tritón X-100 (μl)	Eritrocitos (μl)	PBS (μl)	Volumen total (μl)
1 (péptido a 2 mg/ml)	Control neg.		70	630	700
2 (péptido a 2 mg/ml)	Control pos.	7	70	623	700
3 (péptido a 2 mg/ml)	1000	250	50	200	500
4 (péptido a 2 mg/ml)	500	125	50	325	500
5 (péptido a 2 mg/ml)	100	35	70	595	700
6 (péptido a 2 mg/ml)	50	17,5	70	612,5	700
7 (péptido a 0,1 mg/ml)	10	70	70	560	700
8 (péptido a 0,1 mg/ml)	1	7	70	623	700

30

Ejemplo 17

Síntesis de péptidos en fase sólida

Inicialmente, la lactoferrina B utilizada fue un obsequio de Wayne Bellamy (Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd, Japón). Los demás péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos automático 9050 de
35 Millipore. Generalmente, en la síntesis en fase sólida las cadenas de péptidos se ensamblan desde el extremo carboxilo al extremo amino. El primer aminoácido (extremo carboxilo) se unió covalentemente a un soporte insoluble (la resina) mediante un conector (ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético). Se añadieron los aminoácidos restantes, uno por uno, hasta que se completó la secuencia peptídica.

Mediante el método del Fmoc, el extremo α -amino del aminoácido se protegió temporalmente con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), que es un inestable a las bases. No sólo se protegió el grupo α -amino del aminoácido.
40 Algunos de los aminoácidos tienen cadenas laterales reactivas que es necesario proteger durante la síntesis para evitar las reacciones secundarias. Estos grupos protectores, excepto para la cisteína, era inestables en ácido y se escindieron

al tratarlos con TFA (ácido trifluoroacético) y depuradores (véase más adelante).

Antes de la síntesis, al soporte sólido PEG-PS (resina de polietilenglicol-poliestireno) se le añadió un volumen pequeño de DMF (dimetilformamida) y se dejó hinchar durante 30 minutos. Una vez empaquetado en una columna, el grupo Fmoc se retiró por tratamiento con una disolución de piperidina al 20% en DMF. Ahora, el aminoácido protegido siguiente era capaz de unirse al extremo amino libre del aminoácido unido a la resina por su extremo carboxilo. No obstante, el acoplamiento o la acilación no se produce de forma espontánea y hay que activar el carboxilato. Esto se consiguió mediante el uso de aminoácidos activados previamente, tales como ésteres de pentafluorofenilo (Pfp) o aminoácidos con carboxilatos libres capaces de reaccionar con el reactivo de acoplamiento HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) in situ. Mediante el uso de ésteres de Pfp, se añadieron 1,3 eq. de HOBt (1-hidroxi-benzotriazol) para catalizar la reacción, mientras que cuando se utilizaba el reactivo de acoplamiento HATU, la reacción se catalizaba por base con 2,4 eq. de DIPEA (diisopropiletilamina). Generalmente se empleó un exceso de cuatro veces de los aminoácidos activados. Los aminoácidos se disolvieron en la disolución del activador en cantidad suficiente, como se calculó con el programa Express-Peptide.

A continuación, los aminoácidos se añadieron al aminoácido/péptido unido al soporte por el grupo α -amina totalmente desprotegido, y se recicló a través del bucle mezclado para conseguir la formación del enlace peptídico. La capacidad de las resinas utilizadas se subió de 0,15 a 0,23 mmol/g, lo que significa que había disponibles sitios de unión para los siguientes aminoácidos, de donde se calculó la cantidad de equivalentes del activador. El ciclo de acoplamiento estándar para los aminoácidos fue de 30 minutos, con la excepción de arginina, isoleucina, treonina, tirosina, valina y los aminoácidos que se unen después, que requerían 60 minutos. Se eligieron tiempos de acoplamiento más largos para estos aminoácidos debido a que se sabe que las cadenas laterales largas producen un impedimento estérico durante la reacción de acoplamiento. Una vez que el acoplamiento se completó, se lavó con DMF para retirar la solución con el exceso de aminoácidos y los subproductos de la reacción. El siguiente ciclo comenzó con el desbloqueo del grupo α -amino del aminoácido del extremo amino. El proceso de desbloqueo del grupo α -amino seguido de acoplamiento se repitió durante tantos ciclos como fuera necesario para ensamblar el péptido deseado.

Después de completar la síntesis, el material se transfirió desde la columna a un embudo y se lavó con metanol (3x) y diclorometano (2x). La escisión de los grupos protectores de las cadenas laterales inestables en ácido y la escisión de los péptidos desde el soporte sólido se consiguió con una mezcla de anisol al 2%, etanditiol al 2%, agua al 2% y fenol al 2% en TFA, y con tiempos de escisión de no más de cuatro horas. Entonces se retiró el soporte sólido mediante filtración, el filtrado se concentró a gran vacío, y el péptido se precipitó en éter dietílico. La solución de éter que contenía el TFA se retiró con una pipeta Pasteur, y se lavó el péptido varias veces con éter dietílico y se secó al gran vacío.

Derivados de aminoácidos:

Fmoc-L-Ala-OPfp
 Fmoc-L-Arg (Pmc) -OPfp
 Fmoc-L-Cys (Acm) -OPfp
 Fmoc-L-Gln-OPfp
 Fmoc-L-Glu (OtBu) -OPfp
 Fmoc-L-Gly-OPfp
 Fmoc-L-Ile-OPfp
 Fmoc-L-Leu-OPfp
 Fmoc-L-Lys (tBoc) -OPfp
 Fmoc-L-Met -OPfp
 Fmoc-L-Phe-OPfp
 Fmoc-L-Ser (tBu) -OPfp
 Fmoc-L-Trp-OPfp
 Fmoc-L-Tyr (tBu) -OPfp
 Fmoc-L-Val-OPfp

Derivados de aminoácidos: los derivados de aminoácidos se compraron a Bachem, MilliGen/Biosearch (División de Millipore) o a PerSeptive Biosystems. El fenol se compró a Fluka, y el anisol se compró a Sigma. DMF, PIP, DIPEA TFA y la resina PEG-PS se compraron a PerSeptive Biosystems.

Ejemplo 18

La tabla 18 siguiente muestra la actividad antitumoral y los datos de toxicidad de un derivado de la LFB 14-31 que incorpora, o bien dos aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos en lugar de un Trp, o bien incorpora un grupo

(Pmc) que aumenta la lipofilia y la voluminosidad de uno de los restos de Trp o Phe que se producen de forma natural.

Tabla 18

Péptido variable	CE ₅₀ en eritrocitos (μM)	CE ₅₀ en Meth A (μM)
LFB 14-31 A _{2,6,10,17}	> 440	165
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} Bip ₄	336	23,4
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} Pmc	165	12,8
LFB 14-31 A _{2,6,10,17} Tbt ₉	25,6	9,5

La presencia de alguna de las tres modificaciones no genéticas en un derivado de la LFB 14-31 aumentó significativamente su actividad antitumoral. Sin embargo, el péptido modificado con Tbt poseía la mayor actividad hemolítica entre los tres análogos modificados que se analizaron.

Ejemplo 19

La tabla 17 que sigue muestra la actividad antibacteriana y antitumoral y la toxicidad de otros péptidos de acuerdo con la invención. En particular, las sustituciones muestran que el reemplazo del triptófano puede dar lugar a péptidos con una toxicidad baja (actividad contra los eritrocitos y los fibroblastos normales) ventajosa.

Tabla 19

Sustitución	Péptido	Cl ₅₀ en Meth A (µM) (4h)	CIM en <i>E. coli</i> (µM)	CIM en <i>S. aureus</i> (µM)	CE ₅₀ eritrocitos (µM)	Cl ₅₀ en fibroblastos (µM)	en
	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	6,6	2/4	2	110	17	
<u>Alanina</u>							
W ₃ → A ₃	LFB 14-31 A _{2,3,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	24,1	15	10	> 463	190	
W ₉ → A ₉	LFB 14-31 A _{2,6,9,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	16,2	10	5	382	46,3	
W ₁₁ → A ₁₁	LFB 14-31 A _{2,6,10,11,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	11,1	10	> 2,5	278	46,3	
W _{9,11} → A _{9,11}	LFB 14-31 A _{2,6,9,10,11,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	110,1	30	30	> 489	> 489	
<u>Lisina</u>							
W ₃ → K ₃	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K _{3,16} L ₁₄ R ₄	230			> 451	230	
W ₉ → K ₉	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K _{9,16} L ₁₄ R ₄	13,5	30	10	> 451	58,7	
W ₁₁ → K ₁₁	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K _{11,16} L ₁₄ R ₄	7,9	5	< 2,5	> 451	30,7	
W _{9,11} → K _{9,11}	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K _{9,11,16} L ₁₄ R ₄	> 300			> 463	> 463	
<u>Isoleucina</u>							
W ₃ → I ₃	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I ₃ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	9	2/4	2/4	323	20	
W ₉ → I ₉	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I ₉ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	12	5	< 1		26	
W ₁₁ → I ₁₁	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I ₁₁ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	6	2/5	< 1		15	
W _{9,11} → I _{9,11}	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I _{9,11} K ₁₆ L ₁₄ R ₄	22				26	
W _{3,9} → I _{3,9}	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I _{3,9} K ₁₆ L ₁₄ R ₄	36	5	5	> 470	108	
W _{3,11} → I _{3,11}	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I _{3,11} K ₁₆ L ₁₄ R ₄	16	2,5	5	413	45	
W _{3,9,11} → I _{3,9,11}	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ I _{3,9,11} K ₁₆ L ₁₄ R ₄	47	<u>2,5</u>	10	> 487	280	
F ₇ → A ₇	LFB 14-31 A _{2,6,10,17} F ₇ K ₁₆ L ₁₄ R ₄	34,6	15	10	> 455	288,9	

REIVINDICACIONES

1. Péptido modificado de 7 a 15 restos con tres o más restos catiónicos que es capaz de formar una hélice α anfipática y en el que la citotoxicidad se ha mejorado mediante la introducción de uno o más aminoácidos lipófilos y voluminosos no genéticos, en el que el grupo R de dicho aminoácido lipófilo y voluminoso no genético no es estándar,
5 tiene al menos 9 átomos que no son de hidrógeno y tiene dos anillos cerrados de 5 o 6 átomos, así como ésteres, amidas, sales y derivados cíclicos del mismo para uso en el tratamiento de una infección bacteriana o un tumor en un paciente.
2. Péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el aminoácido lipófilo y voluminoso no genético es un resto de fenilalanina o triptófano modificado.
- 10 3. Péptido para uso según la reivindicación 2, en el que el resto modificado es triptófano que tiene sustitución en la posición 1 o 2 del anillo indol.
4. Péptido para uso según la reivindicación 1, en el que el aminoácido lipófilo y voluminoso no genético se selecciona entre el grupo que consiste en 3-benzotienilalanina, 4-4'-bifenilalanina, 3,3-difenilalanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, benciltirosina, ciclohexiltirosina, 7-benzioxitriptófano, 3-antraceniL-alanina, 3-(2-quinolil)alanina, p-
15 benzoilfenilalanina, tiroxina y 3,3',5-triyodo-L-tironina.
5. Péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende uno o más D-aminoácidos.
6. Utilización de un péptido según está definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una infección bacteriana o un tumor en un paciente.

Tabla 1: Secuencia de aminácidos y carga a pH 7 de las lactoferrinas sintéticas de diferentes especies


Especie	Secuencia	Nombre	Carga a pH 7
Humana	T K C F Q W Q R R M R K V R G P P V S C I K R D S	LFH (18-42)	5,85
Bovina	F K C R R W Q W R M K K L G A P S I T C V R R A F	LFB (17-41)	7,84
Murina	E K C L R W Q N E M R K V G G P P L S C V K K S S	LFM (17-41)	3,85
Caprina	S K C Y Q W Q R R M R K L G A P S I T C V R R T S	LFC (17-41)	6,85
Bovina	P E W F K C R R W Q W R M K K L G A	LFB (14-31)	6,85
Bovina	F K C R R W Q W R M K K L G A	LFB (17-31)	5,88
Bovina	K C R R W Q W R M K K L G A	LFB (18-31)	5,88
Bovina	C R R W Q W R M K K L G A	LFB (19-31)	4,88
Bovina	R R W Q W R M K K L G A	LFB (20-31)	4,91
Bovina	K K C R R W Q W R M K K L G A	LFB (17-31) K ₁₇	6,87
Bovina	F K C E R W Q W R M K K L G A	LFB (17-31) F ₂₀	5,87
Bovina	K K C E R W Q W R M K K L G A	LFB (17-31) K ₁₇ , F ₂₀	4,88
Estructura secundaria	 ← Hélice → Giro → Hoja →		

Figura 1

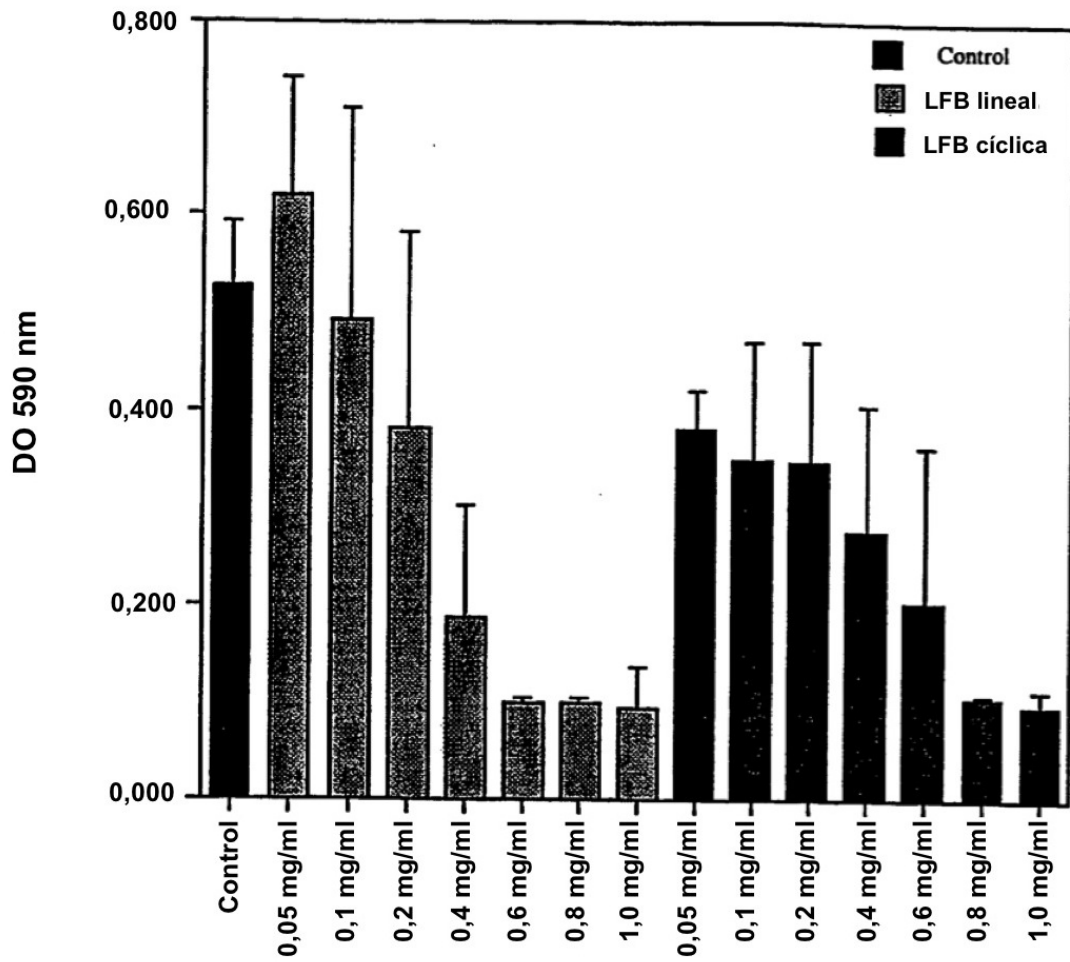


Figura 2

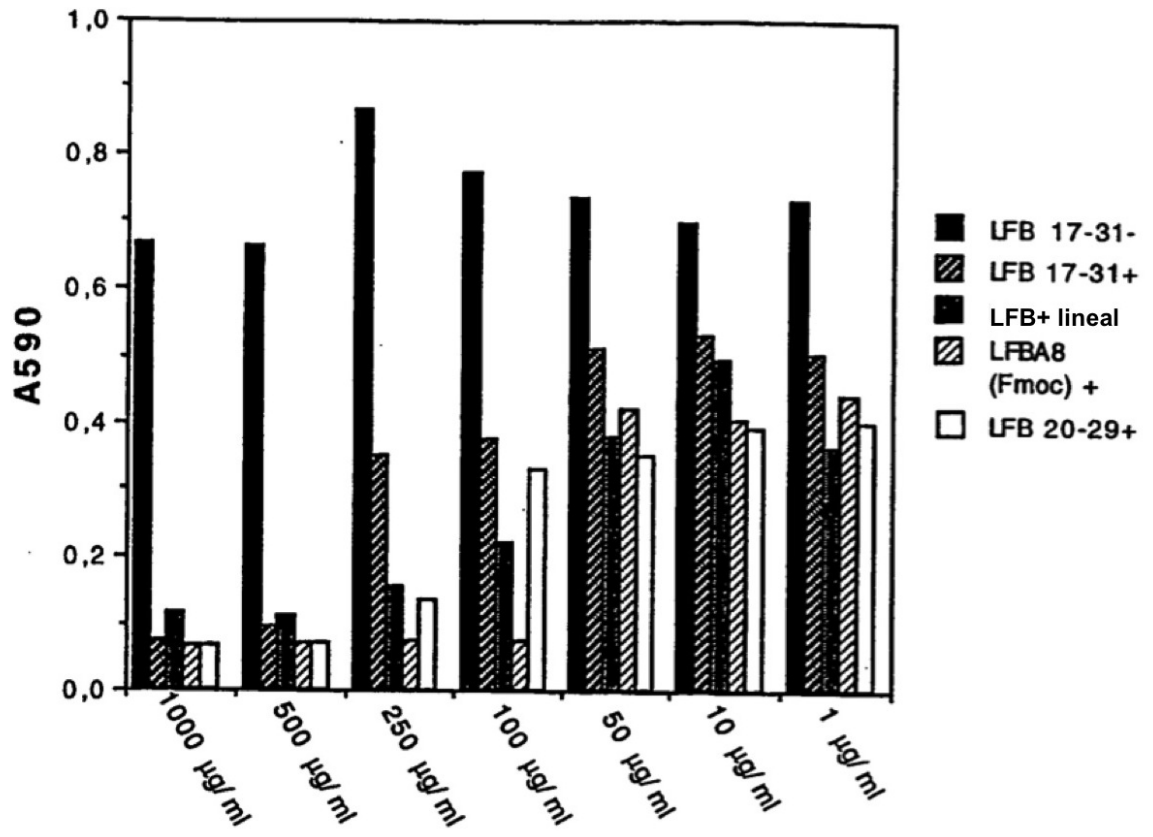


Figura 3

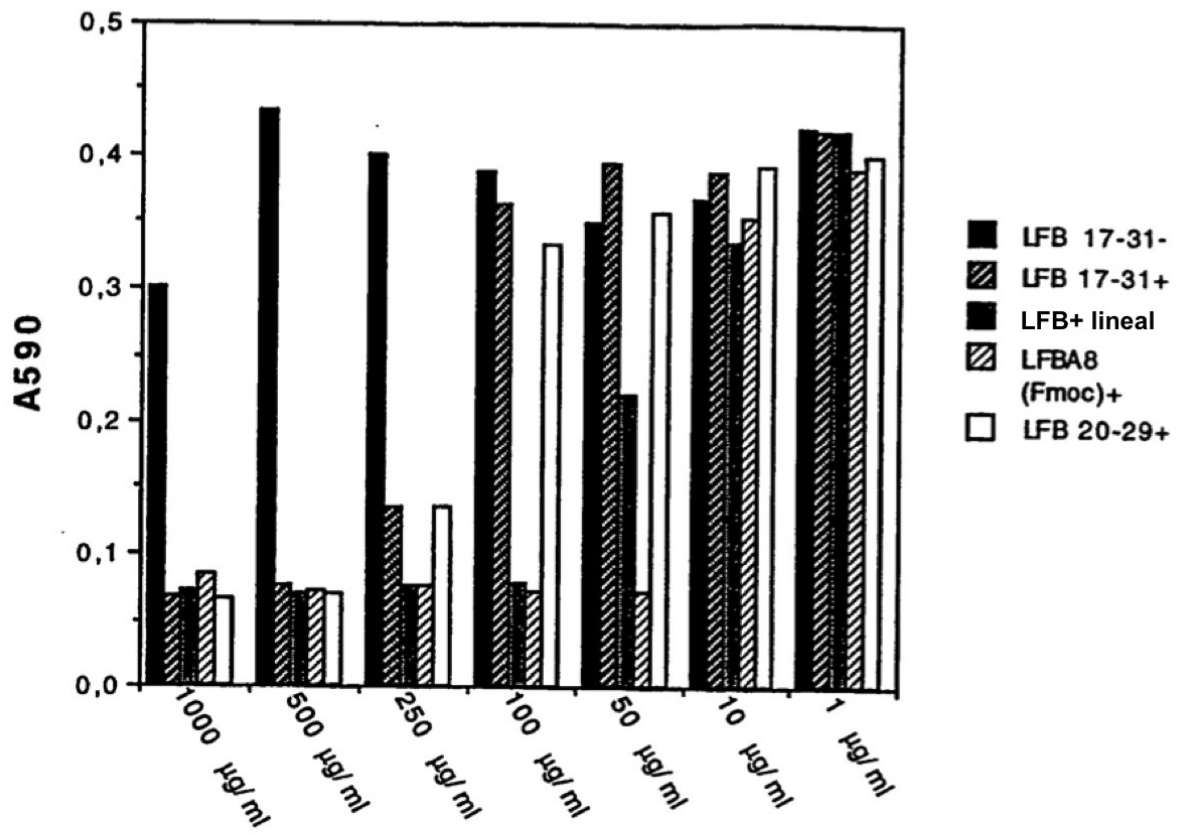


Figura 4

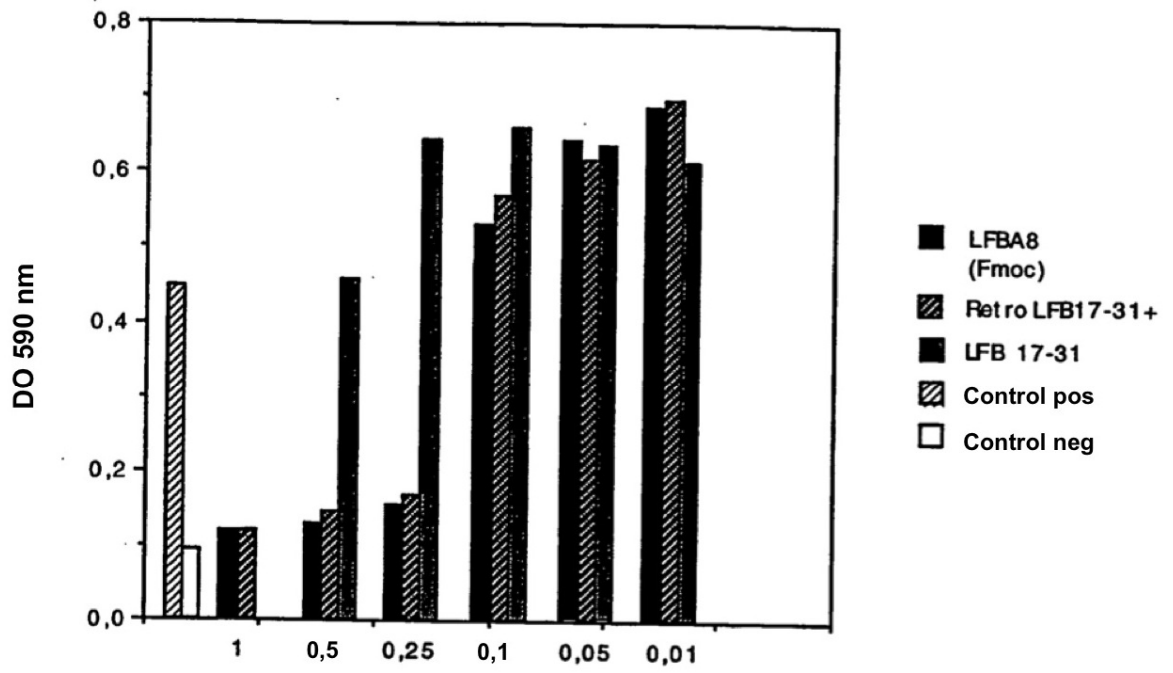


Figura 5

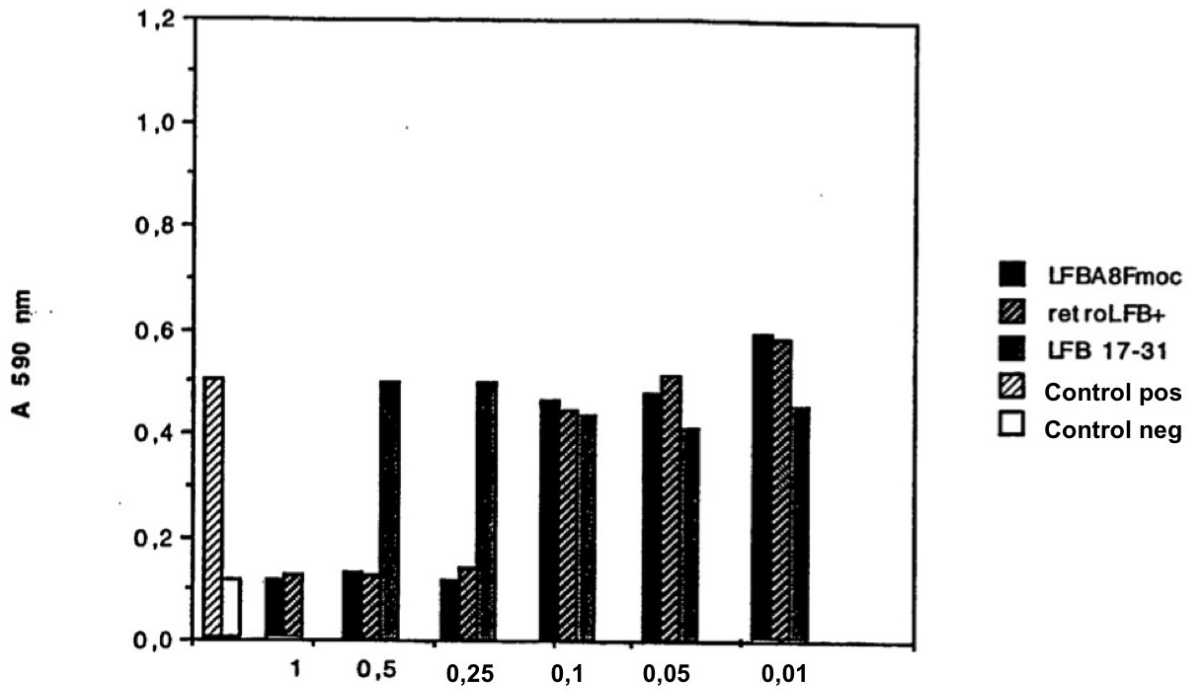


Figura 6

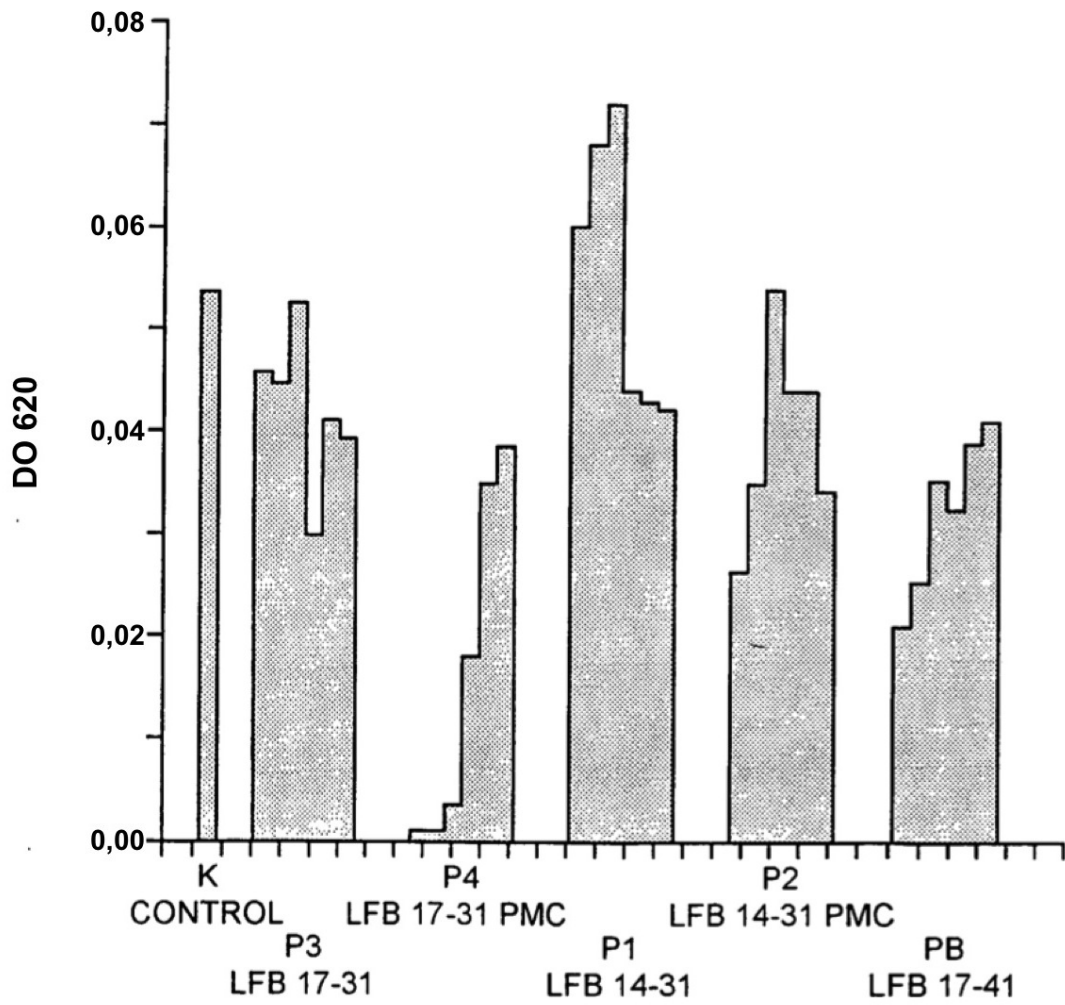


FIG. 7

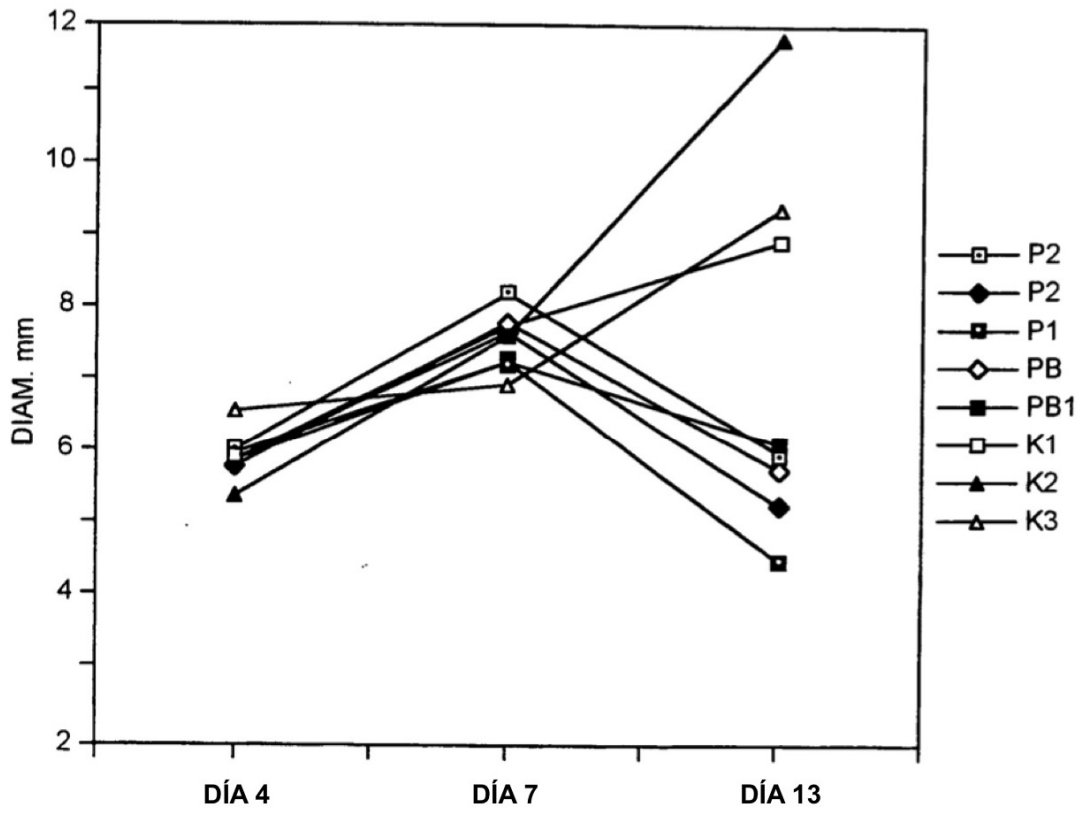


FIG. 8

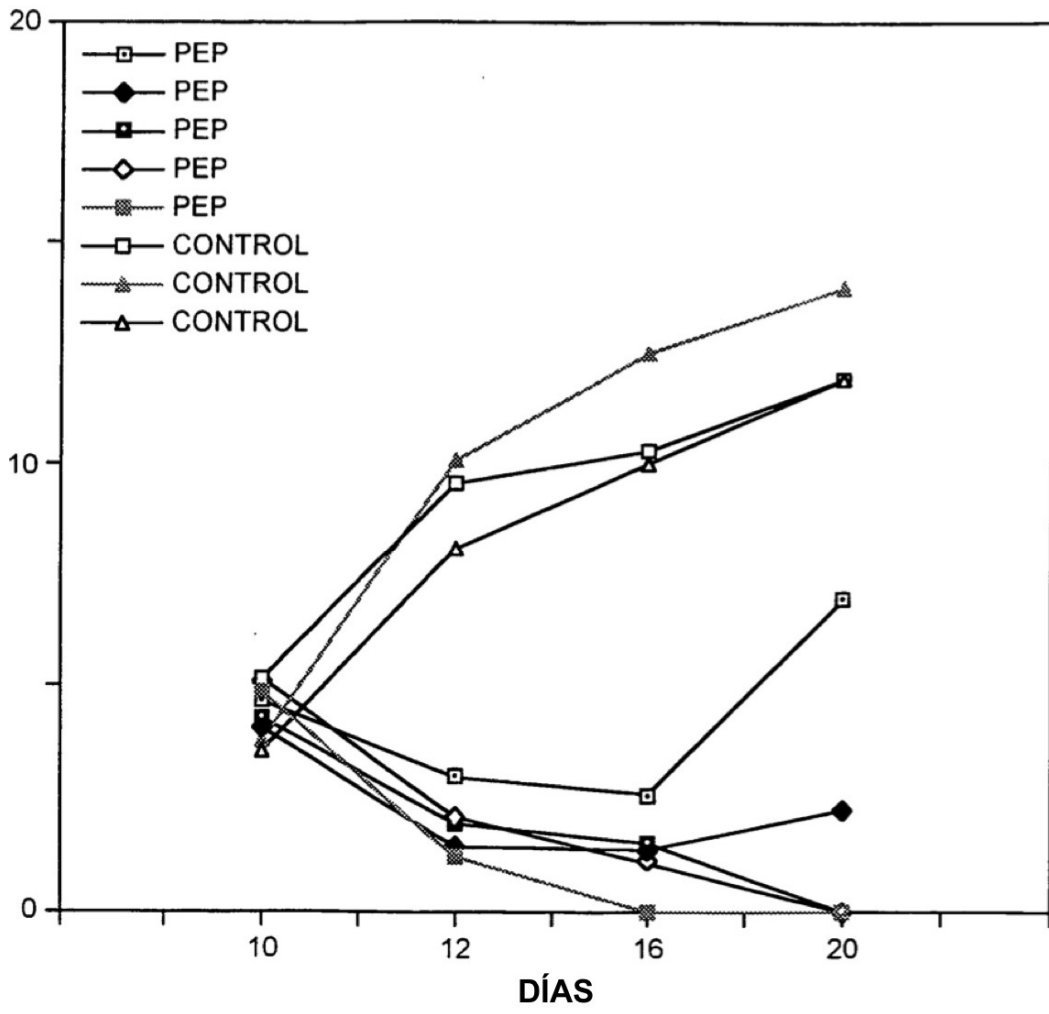


Fig. 9

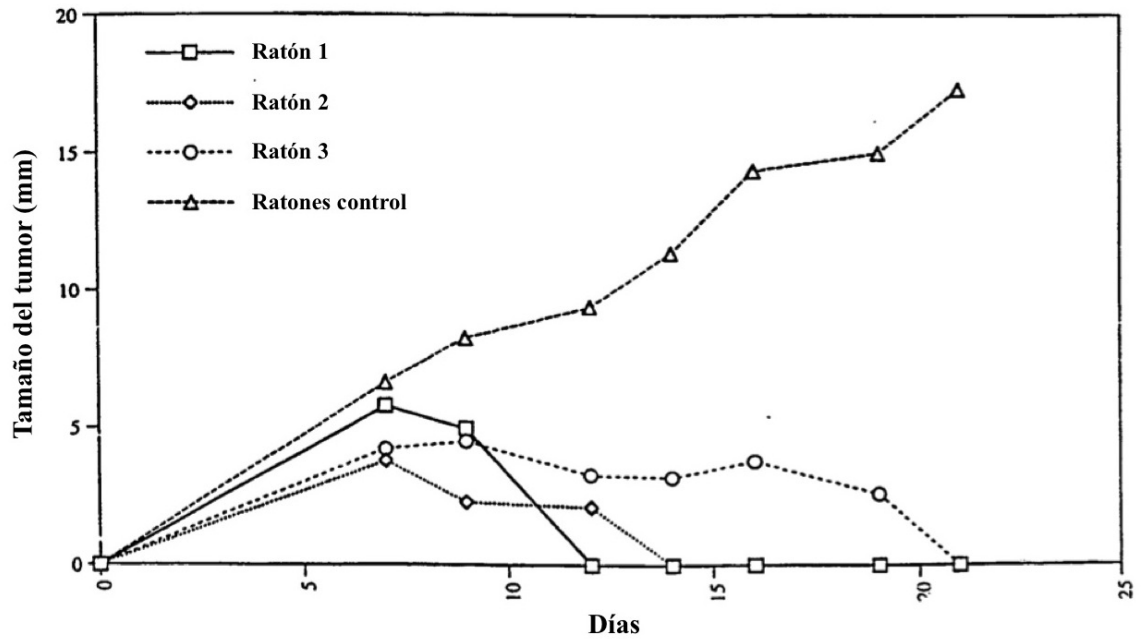


Figura 10