



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 843**

51 Int. Cl.:
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06789722 .3**
96 Fecha de presentación : **11.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1915389**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Tecnología de lantionina ortogonal protegida de forma diferencial.**

30 Prioridad: **12.08.2005 US 708086 P**
26.05.2006 US 808907 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **ORAGENICS, Inc.**
13700 Progress Boulevard
Alachua, Florida 32615, US

72 Inventor/es: **Hillman, Jeffrey, D.;**
Orugunty, Ravi, S. y
Smith, James, Leif

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 843 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

Tecnología de lantionina ortogonal protegida de forma diferencial

Antecedentes

5 El desarrollo de antibióticos revolucionó la práctica de la medicina en la segunda mitad del siglo XX. La mortalidad debida a enfermedades infecciosas disminuyó notablemente durante este periodo. Armstrong y col., (1999) PAMA. 281, 61-66. Desde 1982, sin embargo, las muertes como resultado de enfermedades infecciosas han ascendido de forma constante en paralelo con el aumento de patógenos resistentes a antibióticos. Una amplia diversidad de bacterias médicamente importantes se están volviendo cada vez más resistentes a los antibióticos usados comúnmente en el tratamiento de infecciones clínicas. Han aparecido miles de informes y libros en la bibliografía durante los últimos 20 años que documentan este fenómeno. Armstrong y col., (1999) PAMA. 281, 61-66; Dessen y col., (2001) Curr. Drug Targets Infect. Disord. 1, 11-16; Rapp (2000) Surg Infect (Larchmt). 1, 39-47; Benin y Dowell (2001) Antibiotic resistance and implications for the appropriate use of antimicrobial agents, Humana Press, Totowa, NJ.

15 Aunque existe la necesidad de enseñar un uso más apropiado de los antibióticos, de forma más importante existe la necesidad de nuevos antibióticos. Se considera que la vancomicina es la última línea de defensa contra muchas infecciones bacterianas graves. El descubrimiento de cepas de bacterias patógenas con resistencia a la vancomicina es alarmante; presagia el aumento de patógenos multirresistentes a fármacos que serían intratables con los fármacos disponibles actualmente. El temor es que volveremos, de hecho, a la era anterior a los antibióticos a menos que se desarrollen pronto nuevos antibióticos.

20 Existe una pequeña clase de antibióticos estructuralmente novedosos denominados *lantibióticos* (bacteriocinas de Clase I) que pueden dividirse en 5 subclases basándose en diferencias en su química y en su biosíntesis: Tipo A(I), Tipo A(II), Tipo B, de Dos Componentes y aquellos de estructuras desconocidas. Esta clase de antibióticos se ha conocido durante décadas pero no se ha ensayado exhaustivamente para determinar su utilidad potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas, aunque se sabe que muchos lantibióticos tanto son potentes como tienen un amplio espectro de actividad, particularmente contra especies gram positivas. La principal razón para esto es la dificultad general de obtener estas moléculas en cantidades rentables suficientes para permitir su ensayo y comercialización.

30 La Nisina A (Figura 1) proporciona un buen ejemplo de un lantibiótico, y del número y tipos de complejidades químicas asociadas con lantibióticos. Los lantibióticos son ricos en los aminoácidos que contienen azufre, lantionina (Lan, ala-S-ala) y, frecuentemente, 3-metil lantionina (MeLan, abu-S-ala). La Lan consiste en restos de alanina que están conectados mediante puentes tioéter para crear estructuras de anillo que son críticas para la bioactividad. Típicamente hay 3-5 anillos de este tipo en un lantibiótico, y con frecuencia muchos de los anillos están superpuestos entre sí. Se cree que Lan y MeLan siempre tienen la estereoquímica meso. Además de los restos Lan y MeLan, pueden encontrarse en los lantibióticos otros aminoácidos modificados post-traduccionalmente (Figura 2), tales como 2,3-dideshidroalanina (Dha), 2,3 dideshidrobutilirina (Dhb), derivados de lantionina insaturados, tales como S-amino vinil-D-cisteína (AviCys) y S-amino-D-metilcisteína, así como restos de D-alanina, 2-oxopropionilo, 2-oxobutirilo e hidroxipropionilo. Como en el caso de la Nisina A, las estructuras de anillo generadas por Lan y MeLan pueden estar superpuestas (por ejemplo, anillos D y E), añadiendo más a la complejidad de la molécula.

40 Las bacterias Gram positivas son responsables de la biosíntesis de los lantibióticos conocidos. Generan la molécula madura usando una serie de etapas enzimáticas secuenciales que actúan sobre un prepropéptido sintetizado ribosómicamente. Los genes responsables de codificar las enzimas modificadoras se agrupan típicamente en un fragmento de ADN de 8-10 Kb que puede residir en el cromosoma, un plásmido o como parte de un transposón. En los lantibióticos de Tipo A(I) todos los restos de serina y treonina en el prepéptido sintetizado ribosómicamente codificado por el gen *lanA* se deshidratan por una enzima codificada por el gen *lanB*, y estos aminoácidos deshidratados están implicados en la formación de enlaces tioéter con un resto de cisteína cercano que esté situado más hacia el extremo carboxilo de la molécula. Esta reacción está catalizada por la proteína expresada por el gen *lanC*. En el caso de ciertos lantibióticos, tales como epidermina y mutacina 1140, la cisteína C-terminal se descarboxila por la enzima expresada por el gen *lanD* y se convierte en una S-amino vinil-D-cisteína. Después del transporte fuera de la célula por el producto del gen *lanT*, la secuencia líder del prepropéptido modificado se escinde después por una proteasa extracelular codificada por *lanP* para producir un antibiótico maduro. Ra y col., (1996) Microbiology-Uk. 142, 1281-1288; Kupke y Gotz (1996) Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 69, 139-150; Kuipers y col., (1996) Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 69, 161-169.

55 Los intentos de estudiar los lantibióticos para determinar su utilidad potencial en aplicaciones terapéuticas se han visto obstaculizados por la dificultad de obtenerlos en cantidades suficientes o con una pureza suficiente. De los 40 lantibióticos más o menos caracterizados hasta la fecha (Chatterjee y col., (2005) Chemical Reviews. 105, 633 683),

sólo el lantibiótico de Tipo A(I), Nisina A, producido por *Streptococcus lactis*, se ha generado en cantidades comerciales y ha encontrado una amplia aplicación como conservante alimentario durante los últimos 50 años. El uso generalizado a largo plazo de Nisina A sin el desarrollo de una resistencia significativa (DelvesBroughton y col., (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 69, 193-202) ha proporcionado un fuerte ímpetu al desarrollo de lantibióticos adicionales para diversas aplicaciones.

La producción a gran escala de Nisina A se realiza usando un procedimiento de fermentación que se ha refinado con los años. Recientemente se ha presentado un protocolo de purificación para Nisina A como patente de Estados Unidos (USPA 2004/0072333). El protocolo usaba un cóctel de proteasas costosas seguido de cromatografía en columna. Sin embargo, no existe ningún procedimiento comercialmente viable publicado para la purificación de Nisina A. Esto demuestra el actual interés en encontrar un procedimiento adecuado de producción de Nisina A pura y otros lantibióticos para aplicaciones terapéuticas.

Se presentan de por sí diversas opciones potenciales para la producción de lantibióticos a gran escala. Desde el punto de vista del coste de los materiales, los procedimientos de fermentación serían indiscutiblemente el mejor procedimiento. Los procedimientos de fermentación actuales para muchos lantibióticos producen cantidades de microgramos por litro, lo cual no es suficiente para el desarrollo de fármacos.

Como alternativa, se ha explorado la producción *in vitro* usando la maquinaria de modificación de lantibióticos en los lantibióticos de Tipo A(I). Kupke y Gotz (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 69, 39-150; Kuipers y col., (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 69, 161-169. Las enzimas responsables de la modificación post-traducciona del prepropéptido de lantibiótico no son activas en lisados sin células o como entidades purificadas, con la excepción de LandD. Kupke y Gotz (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 69, 139-150; 10; Kupke y Gotz (1997) *Journal of Biological Chemistry*. 272, 4759-4762; Kupke y col., (1992) *Journal of Bacteriology*. 174, 5354-5361; Kupke y col., *Fems Microbiology Letters*. 112, 43-48; Kupke y col., (1995) *Journal of Biological Chemistry*. 270, 11282-11289; Kupke y col., (1994) *Journal of Biological Chemistry*. 269, 5653-5659. En el caso de los lantibióticos de Tipo A(II) se ha descrito recientemente en *Science* que es posible la síntesis *in vitro* de lacticina 481. Las moléculas que pertenecen a este grupo y los lantibióticos de Tipo B usan sólo una única enzima multicabeza, LanM, para lograr la formación de los restos de Dha, Dhb, Lan y MeLan. Xie y col. (2004) *Science*, 303, 679-681. El informe de biosíntesis de lacticina 481 no proporcionó ninguna información detallada respecto al rendimiento o la pureza, pero su trabajo se realizó en la escala de nanogramos. El progreso descrito en este informe representa una etapa pequeña pero significativa hacia adelante, y es muy aclamada la recepción de puntos adicionales a la urgente necesidad de desarrollo de lantibióticos como agentes terapéuticos.

Una tercera opción para la producción a escala comercial de lantibióticos usando el grupo de genes *lan* clonados en un vector o vectores de expresión apropiados y un huésped no sensible es poco probable que se deba a la complejidad del sistema y a la probable necesidad de regular de forma diferencial la expresión de los diversos genes implicados. El grupo de genes *lan* para galiderrina se ha clonado en *Bacillus subtilis* en un intento por mejorar la producción de este lantibiótico particular. Sin embargo, esta estrategia no dio como resultado rendimientos enormemente aumentados y no será adecuada para todos los lantibióticos, ya que se sabe que los sitios reguladores de genes varían de una especie a otra. Una estrategia relacionada hacía uso de un gen artificial para mutacina 1140 clonado en *Escherichia coli*. Este gen artificial sustituía los codones naturales para los restos de serina y treonina implicados en la formación de puentes tioéter con codones de cisteína. Este gen modificado se clonó en pET32 y se expresó en la cepa Origami de *E. coli* para maximizar los enlaces disulfuro. Se desarrollaron procedimientos químicos novedosos para extruir un solo átomo de azufre de los grupos disulfuro, convirtiéndolos de este modo en tioéteres. En general, este procedimiento demostró ser factible, pero los rendimientos obtenidos eran bajos debido a las múltiples permutaciones de enlaces disulfuro y a la dificultad de separar la forma activa de los isómeros no activos.

Son críticas para la bioactividad de la Nisina A y de otros lantibióticos las estructuras de anillo a menudo superpuestas, creando un problema difícil de superar sintéticamente. Se han investigado ampliamente procedimientos sintéticos *in vitro* para la síntesis de diversos péptidos bioactivos que contienen lantionina, así como lantibióticos. El desafío de sintetizar lantibióticos es arduo y, hasta ahora, no se ha desarrollado ninguna estrategia sintética completa. Se han descrito en la bibliografía varios procedimientos de síntesis de lantioninas. Estos incluyen las desulfurizaciones basadas *in situ* de unidades de cistina en péptidos preensamblados usando condiciones básicas o nucleófilas. Galande y col., (2003) *Biopolymers (Peptide Science)* 71, 543-551; Galande y Spatola (2001) *Letters in Peptide Science*; 8, 247-251. Los procedimientos de desulfurización todavía tienen que demostrar su viabilidad comercial debido a la ausencia de diastereoselectividad y escasos rendimientos. También se han usado estrategias biomiméticas en las que se generan restos de Dha en un péptido preformado, seguido de una adición de Michael para formar el anillo de lantionina. La preorganización del péptido conduce presumiblemente a una adición de Michael diastereoselectiva. Burage y col., (2000) *Chemistry A. European Journal*. 6, 1455-1466.

También se ha empleado la ciclación de péptidos sobre resina de oxima, en la que se sintetiza un péptido lineal que contiene una lantionina protegida ortogonalmente, seguido de ciclación y escisión de producto peptídico cíclico. Melacini y col., (1997), J. Med Chem. 40, 2252-2258; Osapay y col., (1997) Journal of Medicinal Chemistry. 40, 2441-2251. Estos procedimientos son prometedores pero carecen de la capacidad para producir lantibióticos con anillos tioéter superpuestos. Esto se vuelve particularmente importante cuando se tiene en cuenta que la mayoría de los lantibióticos conocidos contienen anillos superpuestos.

Conceptualmente, existen claras ventajas para desarrollar estrategias sintéticas *in vitro*, incluyendo modificaciones de procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), respecto a las estrategias biológicas y biomiméticas. En primer lugar, la composición de las moléculas no se limita al conjunto normal de aminoácidos fisiológicos; es posible diseñar análogos de aminoácidos e incorporarlos usando procedimientos de síntesis en fase sólida bien establecidos. También puede aplicarse una síntesis en paralelo, aumentando de este modo radicalmente el número de candidatos a sustrato. Debido a que la estrategia se realiza en su totalidad *in vitro*, se eliminan muchas de las preocupaciones que surgen de las síntesis *in vivo* de moléculas bioactivas. Por ejemplo, la degradación de productos durante la fermentación no sería una preocupación, ni serían una preocupación los efectos citotóxicos de la molécula bioactiva sobre el microorganismo productor.

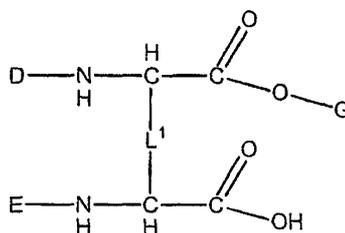
Para conseguir el objetivo de la síntesis *in vitro*, se han diseñado lantioninas ortogonales con grupos protectores potencialmente adecuados para SPPS usando diferentes estrategias, tales como la adición de Michael de cisteína a Dha preformada. Probert y col., (1996) Tetrahedron Letters, 37, 1101-1104. Este procedimiento condujo a una mezcla 1:1 de diastereómeros y, por lo tanto, se demostró que tenía escaso valor comercial. La apertura del anillo de serina lactona con cisteínas protegidas también se ha descrito, pero esto condujo a una mezcla de lantioninas y tioésteres. La apertura del anillo de aziridinas se ha investigado, pero se demostró que producía mezclas regioisoméricas debido a la apertura de la aziridina en la posición α y β . Dugave y Menez (1997) Tetrahedron-Asymmetry. 8, 1453-1465; Swali y col., (2002) Tetrahedron. 58, 9101-9109. Informes más recientes sugieren que alquilar una cisteína convenientemente protegida con una β -bromoalanina protegida puede dar como resultado la síntesis de lantioninas, pero este procedimiento no permite la construcción de moléculas con anillos superpuestos. Zhu (2003) European Journal of Organic Chemistry. 20, 4062-4072. Bregant y Tabor (2005) J. Org. Chem. 70, 2430-2438 describen la síntesis de un análogo del anillo de Nisina C.

Debido a que los análogos protegidos con Fmoc/Boc que están disponibles en el mercado para SPPS no son suficientes para resolver el desafío de sintetizar lantibióticos y otros péptidos bioactivos restringidos conformacionalmente, existe la necesidad en la técnica de la síntesis de péptidos con puentes intramoleculares que crean estructuras de anillos internos, incluyendo múltiples anillos y estructuras de anillos superpuestos. En particular, existe la necesidad de procedimientos *in vitro* para sintetizar lantibióticos a gran escala.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares que comprende dos puentes intramoleculares superpuestos, que comprende:

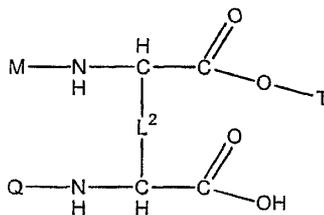
- a) unir covalentemente el extremo carboxi-terminal libre de un primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial de fórmula



con un soporte sólido o con el extremo amino-terminal libre de un aminoácido o polipéptido opcionalmente unido a un soporte sólido, y en el que L^1 representa cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente, en el que D, E y G son grupos protectores, cada uno de los cuales se elimina selectivamente en condiciones de reacción diferentes, y en el que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector D son diferentes de las de la eliminación del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica;

- b) eliminar el grupo protector E para formar un extremo amino-terminal libre;
 c) añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
 d) opcionalmente repetir c) una o más veces;
 e) unir covalentemente el extremo carboxi-terminal libre de un segundo puente intramolecular ortogonal

protegido de forma diferencial de fórmula



con el extremo amino-terminal libre, en el que L^n es como se ha definido anteriormente, en el que M, Q y T son grupos protectores, cada uno de los cuales se elimina selectivamente en condiciones de reacción diferentes, en el que D y M se eliminan solamente en condiciones diferentes, en el que G y T se eliminan solamente en condiciones diferentes, en el que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector M son diferentes de las de la eliminación del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica, y en el que E y Q se eliminan en condiciones diferentes de las que eliminarán D y de las que eliminarán M;

f) eliminar el grupo protector Q para formar un extremo amino-terminal libre;

g) opcionalmente añadir un aminoácido amino-protegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;

h) opcionalmente repetir g) una o más veces;

i) eliminar el grupo protector G del primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo carboxi-terminal libre;

j) acoplar el extremo carboxi-terminal libre al extremo amino-terminal libre;

k) eliminar el grupo protector D del primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo amino-terminal libre;

l) opcionalmente, añadir un aminoácido amino-protegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;

m) opcionalmente repetir l) una o más veces;

n) eliminar el grupo protector T del segundo puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial formando un extremo carboxi-terminal libre;

o) acoplar el extremo carboxi-terminal libre al extremo amino-terminal libre;

p) eliminar el grupo protector M del segundo puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo amino-terminal libre; y

q) opcionalmente añadir un aminoácido amino-protegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre; y

r) opcionalmente repetir q) una o más veces.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la estructura de la Nisina A [**SEC ID N°: 1**], incluyendo puentes intramoleculares entre los restos 7 y 10, que crean el anillo E, entre los restos 9 y 12, que crean el anillo D, entre los restos 16 y 22, que crean el anillo C, entre los restos 24 y 27, que crean el anillo B, y entre los restos 28 y 32, que crean el anillo A. Los anillos A, B y C ejemplifican estructuras de anillo en serie y los anillos D y E ejemplifican anillos superpuestos. También se muestra un análogo de Nisina A sintético [**SEC ID N°: 2**].

La **Figura 2** muestra ejemplos de aminoácidos modificados post-traduccionalmente.

La **Figura 3** muestra una estrategia retrosintética para generar lantioninas protegidas de forma diferencial.

La **Figura 4** muestra la estrategia sintética para cisteína protegida con Fmoc.

La **Figura 5** muestra la estrategia sintética para una Lantionina 1 protegida ortogonalmente, que incluye la síntesis de éster propargílico de N(Alloc)-D-β-bromoalanina.

La **Figura 6** muestra la estrategia sintética para una Lantionina 2 protegida ortogonalmente, que incluye la síntesis de éster bencílico de N(ivdDe)-D-β-bromoalanina.

Descripción detallada de la invención

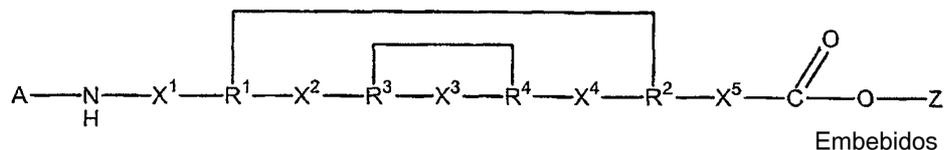
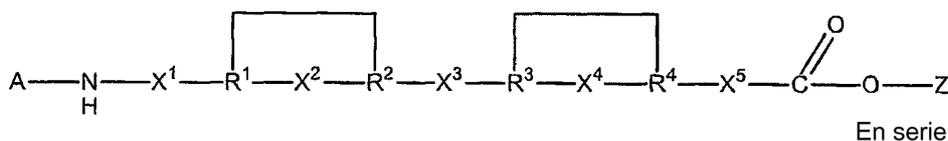
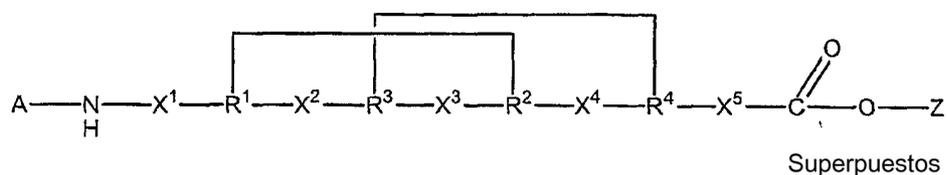
Se desvela en el presente documento una tecnología de lantionina ortogonal protegida de forma diferencial (DPOLT) para la síntesis en fase sólida de péptidos. La tecnología depende de la fabricación a granel de diversos puentes peptídicos protegidos ortogonalmente cuyos grupos protectores de carboxilo y amino activos pueden eliminarse de forma diferencial. Los puentes peptídicos protegidos ortogonalmente pueden usarse, por ejemplo, en la síntesis de péptidos en fase sólida, para preparar péptidos bioactivos restringidos conformacionalmente que contienen puentes intramoleculares que forman estructuras de anillo. En particular, la DPOLT puede usarse para sintetizar polipéptidos que contienen más de un puente intramolecular y que tienen estructuras de anillos superpuestos.

aminoácidos situados en diferentes cadenas peptídicas "X".

Como se usan en el presente documento, las expresiones "grupo protector de extremo amino-terminal" y "grupo protector de extremo carboxi-terminal" se refieren a cualquier resto químico capaz de añadirse a y opcionalmente eliminarse de un sitio reactivo (un grupo amino y un grupo carboxi, respectivamente, en este caso), para permitir la manipulación de una entidad química en sitios distintos del sitio reactivo.

Los aminoácidos de los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención pueden incluir los 20 aminoácidos que aparecen de forma natural, así como los aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Spatola, (1983) en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Weinstein, ed., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser los isómeros ópticos D o L. En una realización preferida, los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención contienen uno o más de los restos siguientes, en cualquier combinación: 2,3-dideshidroalanina (Dha), (Z)-2,3-dideshidrobutirina (Dhb), hidroxipropionilo, 2-oxobutirilo y 2-oxopropionilo (véase la Figura 2).

Un experto en la materia apreciará que los péptidos con puentes intramoleculares de la invención pueden tener más de un puente intramolecular, creando una amplia variedad de estructuras posibles. Por ejemplo, para un polipéptido con puentes intramoleculares que contiene dos puentes intramoleculares, los puentes intramoleculares pueden estar en serie, embebidos o superpuestos, como se muestra a continuación.



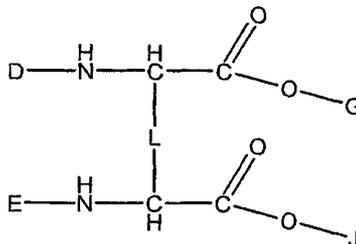
Cuando dos puentes intramoleculares están superpuestos, se entiende que un aminoácido del segundo puente intramolecular está, en la secuencia de aminoácidos primaria, entre los dos aminoácidos del primer puente intramolecular y el otro aminoácido del segundo puente intramolecular está antes de ambos o después de ambos aminoácidos del primer puente intramolecular. Cuando dos puentes intramoleculares están en serie, se entiende que ambos aminoácidos del segundo puente intramolecular están, en la secuencia de aminoácidos primaria, antes de ambos o después de ambos aminoácidos del primer puente intramolecular. Cuando los dos puentes intramoleculares están embebidos, se entiende que ambos aminoácidos del segundo puente intramolecular están, en la secuencia de aminoácidos primaria, entre los dos aminoácidos del primer puente intramolecular.

Cuando el péptido con puentes intramoleculares tiene tres o más puentes intramoleculares, pueden formarse un mayor número de estructuras posibles. Puede haber múltiples anillos superpuestos, por ejemplo. En un ejemplo, un polipéptido con puentes intramoleculares puede tener 5 puentes intramoleculares, donde 2 de los 5 puentes forman estructuras de anillos superpuestos y los 3 puentes restantes están en serie entre sí y con los anillos superpuestos. El antibiótico Nisina A representa dicha estructura (véase la Figura 1).

En una realización preferida, los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención son péptidos antibióticos. En una realización más preferida, los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención son Nisina A y análogos de la misma.

Puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial

Los puentes intramoleculares protegidos de forma ortogonal de acuerdo con la invención tienen la fórmula general siguiente:



Fórmula II

5 en la que L representa cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente, D y E son hidrógeno o grupos protectores de extremo amino-terminal, y G y J son hidrógeno o un grupo protector de extremo carboxi-terminal.

El enlace que comprende las cadenas laterales de aminoácidos puede ser un tioéter, un disulfuro, una amida o un éter. En una realización preferida, el puente intramolecular comprende un enlace tioéter.

10 La incorporación de puentes intramoleculares “protegidos de forma diferencial” o “protegidos ortogonalmente” en la síntesis de polipéptidos proporciona la eliminación selectiva de sus grupos protectores separados y aparte de la eliminación de grupos protectores en otras porciones de la cadena peptídica, incluyendo otros puentes intramoleculares. En otras palabras, los grupos protectores de un puente intramolecular particular se seleccionan de modo que sus condiciones de escisión no comprometan la estabilidad de otros grupos protectores o funcionales en el polipéptido. La reactividad cruzada durante la desprotección de estos grupos es mínima y puede controlarse mediante técnicas de espectroscopía de masas convencionales. El producto deseado puede purificarse de estas impurezas mediante HPLC convencional u otras técnicas. Las escisiones pueden efectuarse en cualquier orden de prioridad seleccionado.

20 Se describen grupos protectores y la forma en que se introducen y eliminan, por ejemplo, en “Protective Groups in Organic Chemistry”, Plenum Press, Londres, N.Y. 1973; y en “Methoden der organischen Chemie”, Houben-Weyl, 4ª edición, Vol. 15/1, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1974; y en Theodora W. Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, Nueva York 1981. Una característica de muchos grupos protectores es que pueden eliminarse fácilmente, es decir, sin la aparición de reacciones secundarias no deseadas, por ejemplo, mediante solvolisis, reducción, fotólisis, mediante el uso de catálisis organometálica, tal como de catalizadores de organopaladio y organocobalto o, como alternativa, en condiciones fisiológicas.

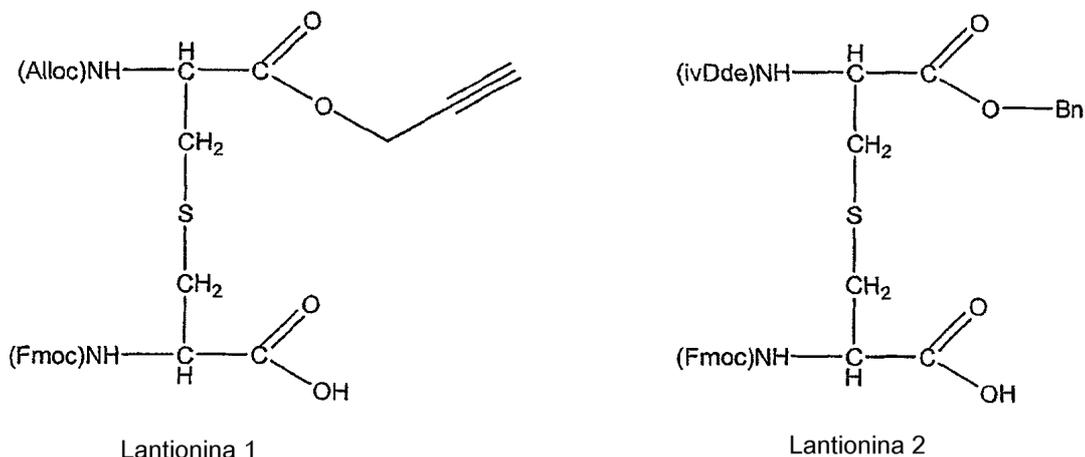
25 Se conocen en la técnica numerosos grupos protectores. Una lista ilustrativa de grupos protectores incluye metilo, formilo, etilo, acetilo, t-butilo, anisilo, bencilo, trifluoroacetilo, N-hidroxisuccinimida, t-butoxicarbonilo, benzoílo, 4-metilbencilo, tioanizilo, tiocresilo, benziloximetilo, 4-nitrofenilo, benziloxicarbonilo, 2-nitrobenzoílo, 2-nitrofenilsulfenilo, 4-toluenosulfonilo, pentafluorofenilo, difenilmetilo, 2-clorobenziloxicarbonilo, 2,4,5-triclorofenilo, 2-bromobenziloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, trifenilmetilo y 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo. Para análisis de diversos tipos diferentes de grupos protectores de amino- y carboxi- véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.221.736 (presentada el 22 de junio de 1993); la Patente de Estados Unidos Nº 5.256.549 (presentada el 26 de octubre de 1993); la Patente de Estados Unidos Nº 5.049.656 (presentada el 17 de septiembre de 1991); y la Patente de Estados Unidos Nº 5.521.184 (presentada el 28 de mayo de 1996).

35 Puede usarse cualquier combinación de grupo protectores, con tal de que los grupos protectores puedan eliminarse de forma selectiva durante la síntesis del polipéptido con puentes intramoleculares diana. En una realización preferida, los grupos protectores amino-terminales se seleccionan del grupo que consiste en Fmoc, Alloc e IvDde. En otra realización preferida, los grupos protectores carboxi-terminales se seleccionan del grupo que consiste en éster propargílico y éster bencílico.

40 En una realización preferida, el puente intramolecular protegido ortogonalmente es una lantionina o derivado de lantionina protegido ortogonalmente. En una realización más preferida, el puente intramolecular protegido ortogonalmente es lantionina protegida amino-terminalmente y/o carboxi-terminalmente (Lan), β-metil lantionina (MeLan), S-[(Z)-2-aminovinil]-D-cisteína (AviCys) o S-[(Z)-2-aminovinil]-2-metil-D-cisteína (véase la Figura 2). Dichos puentes intramoleculares protegidos ortogonalmente pueden sintetizarse por procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización más preferida, el puente intramolecular es lantionina. Pueden sintetizarse lantioninas protegidas como se muestra retrosintéticamente en la Figura 3 usando una metodología de rutina. La estereoquímica de los productos de lantionina puede asegurarse en esta fase comenzando con los estereoisómeros correctos de los aminoácidos apropiados, por ejemplo, cisteína y serina.

5 En una realización más preferida, el puente intramolecular es Lantionina 1 o Lantionina 2:



que pueden sintetizarse, por ejemplo, como se resume en la Figuras 5 y 6, respectivamente. En resumen, en relación con la Figura 5, para la Lantionina 1, la D-serina se convierte en su derivado Alloc protegido amino-terminalmente y posteriormente se convierte en el éster propargílico protegido carboxi-terminalmente. El éster propargílico de N(Alloc)-D-serina se convierte en su derivado de β-bromoalanina correspondiente. La conversión puede conseguirse, por ejemplo, disolviendo el éster propargílico de N(Alloc)-D-serina en diclorometano y tratando la solución con un equivalente de tetrabromuro de carbono y trifenilfosfina. Estas reacciones son muy suaves y se han usado de forma rutinaria para convertir hidroxilos en bromuros. Zhu (2003) European Journal of Organic Chemistry. 20, 4062-4072. Como alternativa, las síntesis se consiguen usando tribromuro de fósforo en un disolvente tal como tolueno o diclorometano seguido de tratamiento básico suave para proporcionar las D-β-bromoalaninas deseadas. Olah y col. (1980) Journal of Organic Chemistry. 45, 1638-1639. También pueden usarse otros procedimientos. Por último, el derivado de β-bromoalanina se hace reaccionar con Fmoc-L-Cys en condiciones de alquilación adecuadas para formar la Lantionina 1. La Lantionina 2 puede sintetizarse de forma similar como se resume en la Figura 6.

20 Síntesis de polipéptidos con puentes intramoleculares

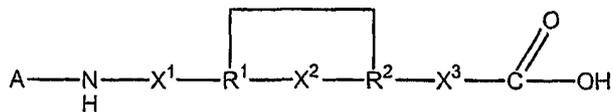
Los polipéptidos con puentes intramoleculares pueden sintetizarse por cualquier medio que proporcione el uso y la incorporación de puentes intramoleculares protegidos ortogonalmente, incluyendo síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), síntesis de péptidos en fase de solución, ligación química nativa, ligación de proteínas mediada por inteína y ligación química, o una combinación de las mismas. En una realización preferida, los polipéptidos con puentes intramoleculares se sintetizan usando una versión modificada de SPPS convencional. Los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención pueden sintetizarse mediante SPPS manual o mediante el uso de sintetizadores de SPPS automáticos disponibles en el mercado.

La SPPS se ha conocido en la técnica desde principios de los años 60 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc, 85: 2149-2154, 1963) y se emplea ampliamente. Existen varias variaciones conocidas en la estrategia general. (Véase, por ejemplo, "Peptide Synthesis, Structures, and Applications" © 1995 por Academic Press, Capítulo 3 y White (2003) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical Approach, Oxford University Press, Oxford). Muy brevemente, en la síntesis de péptidos en fase sólida el resto aminoácido C-terminal deseado se acopla a un soporte sólido. El aminoácido posterior que se añadirá a la cadena peptídica se protege en su extremo amino-terminal con Boc, Fmoc u otro grupo protector adecuado, y su extremo carboxi-terminal se activa con un reactivo de acoplamiento convencional. El extremo amino-terminal libre del aminoácido unido a soporte se deja reaccionar con el aminoácido posterior, acoplando los dos aminoácidos. El extremo amino-terminal de la cadena peptídica en crecimiento se desprotege, y el procedimiento se repite hasta que se completa el polipéptido deseado.

De acuerdo con los procedimientos de la invención, pueden sintetizarse péptidos con puentes intramoleculares por incorporación de puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial en SPPS convencional. Las porciones de la cadena polipeptídica que no son parte del puente intramolecular pueden sintetizarse mediante técnicas de SPPS convencionales conocidas en la materia. En una realización preferida, se usan aminoácidos

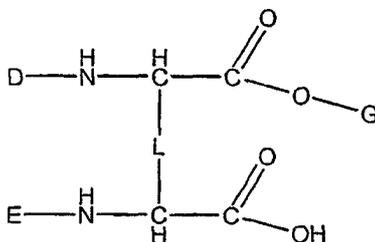
protegidos con Fmoc o Boc amino-terminalmente. En una realización más preferida, se usa SPPS basada en Fmoc. Los puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial se incorporan en la cadena polipeptídica a través de la desprotección selectiva de sus grupos amino y carboxi activos.

- 5 Pueden usarse diferentes procedimientos para sintetizar un polipéptido con puentes intramoleculares que tenga un solo puente intramolecular, como se muestra en Fórmula general III:



Fórmula III

en la que A, Xⁿ y Rⁿ son como se han definido previamente para la Fórmula I. Dicho polipéptido se prepara usando un solo puente intramolecular de fórmula general IV:



Fórmula IV

- 10 en la que L representa cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente, D y E son grupos protectores de extremo amino-terminal y G es un grupo protector de extremo carboxi-terminal.

- En resumen, el puente intramolecular se acopla a través de su extremo carboxi-terminal libre a una cadena peptídica unida a un soporte sólido, o directamente al soporte sólido. Se acoplan aminoácidos adicionales al extremo amino-terminal libre del puente intramolecular después de su desprotección (eliminación de E). El grupo protector (G) en el grupo carboxi restante del puente intramolecular se elimina y el grupo carboxi se acopla al extremo amino-terminal libre de la cadena polipeptídica así formada. Posteriormente pueden añadirse opcionalmente aminoácidos adicionales al grupo amino restante.
- 15

- Durante la síntesis de los polipéptidos, en un momento cualquiera habrá solamente un único "extremo amino-terminal libre" en la cadena polipeptídica en crecimiento y un solo "extremo carboxi-terminal libre" que se acoplará con el extremo amino-terminal libre. Cada vez que se añade y desprotege un aminoácido, el extremo amino-terminal libre se bloqueará por el aminoácido añadido y, si el aminoácido recién añadido se desprotege posteriormente, se formará un nuevo extremo amino-terminal libre. Un experto en la materia entenderá que en tales circunstancias solamente hay un único extremo amino-terminal libre.
- 20

- Más específicamente, en la síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares que tiene un solo puente intramolecular, D se selecciona de modo que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector D no den como resultado la eliminación de E o G y/o del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica. También es aplicable la inversa. En otras palabras, como ejemplo, si el polipéptido se sintetiza usando SPPS basada en Fmoc, D se selecciona de modo que pueda escindirse selectivamente en condiciones que no eliminen E, G y/o Fmoc. De forma similar, D y G se seleccionan de modo que las condiciones para la eliminación de Fmoc no den como resultado la escisión de D o G. En una realización preferida, el grupo protector de amino E es equivalente al grupo protector de amino de los aminoácidos de la cadena polipeptídica que no son parte del puente intramolecular. Por lo tanto, cuando se usa por ejemplo SPPS basada en Fmoc, E es preferentemente Fmoc.
- 25
- 30

- La síntesis del polipéptido con puentes intramoleculares comienza con el acoplamiento del aminoácido C-terminal a un soporte sólido. La expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier material en fase sólida sobre el que se sintetiza un polipéptido. El soporte sólido incluye términos tales como "resina", "fase sólida" y "soporte". Un soporte sólido puede estar compuesto por polímeros orgánicos tales como poliestireno, polietileno, polipropileno,
- 35

polifluoroetileno, polietileno y poli(acrilamida), así como copolímeros e injertos de los mismos. Un soporte sólido también puede ser inorgánico, tal como vidrio, sílice, vidrio de tamaño de poro controlado (CPG) o sílice de fase inversa con grupos adecuados en los que pueden unirse y escindirse aminoácidos de una forma fácil. La configuración de un soporte sólido puede ser en forma de perlas, esferas, partículas, gránulos o una superficie. Las superficies pueden ser planas, sustancialmente planas o no planas. Los soportes sólidos pueden ser porosos o no porosos y pueden tener características de hinchamiento o de no hinchamiento. Un soporte sólido puede configurarse en forma de un pocillo, depresión u otro recipiente. Una pluralidad de soportes sólidos pueden configurarse en una matriz, abordable para la administración robótica de reactivos, o por medios de detección incluyendo exploración por iluminación con láser y recogida de luz confocal o deflectora. Están disponibles en el mercado muchos soportes sólidos. El acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido puede controlarse para determinar su finalización mediante ensayos conocidos en la técnica.

En una realización preferida, se usan aminoácidos con Fmoc en la síntesis de la cadena polipeptídica. Están disponibles en el mercado aminoácidos con Fmoc, o pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Pueden añadirse aminoácidos adicionales a la cadena polipeptídica usando metodología de SPPS convencional. Cuando se usan, por ejemplo, aminoácidos con Fmoc, el grupo protector de amino Fmoc del aminoácido C-terminal, una vez acoplado a la resina, puede eliminarse, por ejemplo, por exposición a piperidina al 20 % en DMF. El siguiente aminoácido con Fmoc puede acoplarse a la cadena polipeptídica usando química de acoplamiento convencional. Los aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas pueden protegerse con grupos protectores adecuados de modo que sus cadenas laterales permanezcan protegidas durante toda la síntesis del polipéptido con puentes intramoleculares de interés. Las etapas de acoplamiento y desprotección pueden repetirse según se desee usando los aminoácidos apropiados. Esto completa la síntesis de X^3 de fórmula general III.

El puente intramolecular se acopla a la cadena polipeptídica en crecimiento mediante química de acoplamiento convencional. Como alternativa, si el puente intramolecular cae en el extremo C-terminal del polipéptido con puentes intramoleculares, el puente intramolecular puede acoplarse directamente a la resina a través de su grupo carboxi libre. El grupo protector E se elimina entonces selectivamente en condiciones apropiadas, por ejemplo, usando piperidina al 20 % en DMF cuando E es Fmoc. En relación con la fórmula general III, R^2 se acopla ahora a la cadena polipeptídica. Posteriormente pueden añadirse uno o más aminoácidos a la cadena polipeptídica a través de acoplamiento y desprotección secuencial (X^2 de fórmula general III).

A continuación, el grupo protector G se elimina selectivamente en condiciones apropiadas. En una realización preferida, G es un grupo propargilo, que puede escindirse usando dicobaltooctacarbonilo en diclorometano, o éster bencílico, que puede escindirse usando un protocolo de hidrogenación que use paladio sobre carbón vegetal y ciclohexadieno en diclorometano. Esto completa la adición de R^1 de fórmula general III, por lo que el puente intramolecular se incorpora completamente en el polipéptido formando la estructura de anillo.

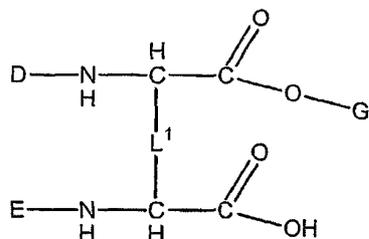
El grupo protector D puede entonces desprotegerse selectivamente en condiciones apropiadas. En una realización preferida, D es Alloc, que puede escindirse usando $Pd(PPh_3)_4$ al 20 % molar y 20-25 equivalentes de $PhSiH_3$ en diclorometano, o ivDde, que puede escindirse por hidrazina al 2-10 % en DMF. El polipéptido con puentes intramoleculares puede alargarse posteriormente a través de acoplamiento y desprotección secuencial de aminoácidos adicionales (X^1 en la fórmula general III).

Los polipéptidos con puentes intramoleculares con múltiples anillos en serie, es decir, que tienen más de un puente intramolecular, pueden sintetizarse de forma similar usando un solo puente intramolecular protegido de forma diferencial. Opcionalmente, puede usarse más de un puente intramolecular protegido de forma diferencial, que difieran entre sí solamente por sus grupos protectores, para sintetizar un polipéptido que tenga múltiples anillos. También pueden usarse múltiples puentes intramoleculares protegidos de forma diferencial que varíen en su estructura de cadena lateral (por ejemplo, Lan y MeLan), para incorporar diferentes restos con puentes intramoleculares. Los grupos protectores en dichos puentes posteriores pueden ser iguales o diferentes que los grupos protectores en el primer puente intramolecular incorporado en la cadena polipeptídica. El polipéptido con puentes intramoleculares con múltiples anillos en serie se sintetiza incorporando completamente un primer puente intramolecular en la cadena polipeptídica, formando la primera estructura de anillo, eliminando el grupo protector amino-terminal, extendiendo opcionalmente la cadena polipeptídica a través de acoplamiento y desprotección secuencial de aminoácidos adicionales, incorporando completamente un segundo puente intramolecular (igual o diferente del primer puente intramolecular) a través de su extremo carboxi-terminal, extendiendo opcionalmente el polipéptido, y repitiendo estas etapas según se desee para sintetizar el polipéptido con puentes intramoleculares diana.

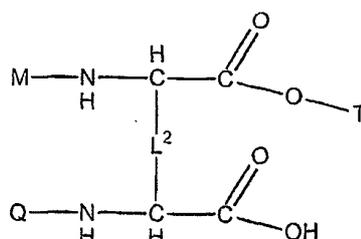
Para polipéptidos con puentes intramoleculares con múltiples anillos que estén superpuestos o embebidos, debe usarse más de un puente intramolecular protegido ortogonalmente. Aunque las estructuras de cadena lateral de los múltiples puentes intramoleculares protegidos ortogonalmente pueden ser iguales o diferentes, los grupos protectores deben estar protegidos ortogonalmente de forma diferencial para permitir la desprotección selectiva de sus grupos amino y carboxi respectivos. El número de dichos puentes depende del número de anillos superpuestos

o embebidos. Cuando, por ejemplo, dos anillos del polipéptido con puentes intramoleculares están superpuestos entre sí, o uno está embebido dentro del otro, se usan dos puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial diferentes; cuando, por ejemplo, 3 anillos están superpuestos entre sí o están embebidos dentro del otro, se usan tres puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial diferentes, etc.

- 5 En un ejemplo, en el que el polipéptido con puentes intramoleculares de interés contiene dos anillos superpuestos, se usan dos puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial de las fórmulas generales V y VI:



Fórmula V



Fórmula VI

- 10 en las que L^1 y L^2 representan cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente (L^1 puede igual o diferente de L^2), D, M, E y Q son grupos protectores de extremo amino-terminal y G y T son grupos protectores de extremo carboxi-terminal; en las que D y M son escindibles solamente en condiciones diferentes; en las que E y Q pueden escindirse en las mismas condiciones; en las que E y Q se escinden en condiciones diferentes de las que escindirán D y de las que escindirán M; y en las que G y T son escindibles solamente en condiciones diferentes. En una realización preferida, los grupos protectores de amino E y Q son equivalentes al grupo protector de amino de los aminoácidos de la cadena polipeptídica que no son parte del puente intramolecular. Por lo tanto, cuando se usa
15 por ejemplo SPPS basada en Fmoc, E y Q son preferentemente Fmoc. En tal situación, E y Q también pueden ser, por ejemplo, Boc.

- De acuerdo con los procedimientos de la invención, un polipéptido con puentes intramoleculares que contiene dos anillos superpuestos puede sintetizarse por acoplamiento primero del aminoácido C-terminal a un soporte sólido. Pueden añadirse opcionalmente aminoácidos adicionales a la cadena polipeptídica usando metodología de SPPS
20 convencional. En una realización preferida, se usan aminoácidos con Fmoc en la síntesis de la cadena polipeptídica. Pueden protegerse aminoácidos que tienen cadenas laterales reactivas con grupos protectores adecuados de modo que sus cadenas laterales permanezcan protegidas durante toda la síntesis del polipéptido con puentes intramoleculares de interés. Las etapas de acoplamiento y desprotección pueden repetirse según se desee usando los aminoácidos apropiados. El puente intramolecular de fórmula general V se acopla después a la cadena
25 peptídica en crecimiento a través de su grupo carboxi libre y posteriormente se escinde E. D y G permanecen sin afectar. En una realización preferida, E es Fmoc. Después, uno o más aminoácidos pueden acoplarse opcionalmente de forma secuencial al extremo amino-terminal libre del polipéptido por ciclación a través de etapas de acoplamiento y desprotección de acuerdo con la SPPS convencional. A continuación, el puente intramolecular de fórmula general VI se acopla a la cadena peptídica en crecimiento a través de su grupo carboxi libre y Q se
30 escinde posteriormente. D, G, M y T permanecen sin afectar. En una realización preferida, Q es Fmoc. De nuevo, después uno o más aminoácidos pueden acoplarse opcionalmente de forma secuencial al extremo amino-terminal libre del polipéptido. Para formar el primer anillo, G se escinde después usando una química de desprotección apropiada, y el grupo carboxi libre resultante se acopla al extremo amino-terminal libre de la cadena polipeptídica. Los grupos protectores D, M y T permanecen sin afectar. Posteriormente, el grupo protector D se elimina en condiciones adecuadas, exponiendo un grupo amino libre. Los grupos protectores M y T permanecen sin afectar durante la escisión de D. Después, pueden acoplarse opcionalmente aminoácidos adicionales al grupo amino libre en el extremo N-terminal del polipéptido. Para formar el segundo anillo y, por lo tanto, los anillos superpuestos, T se
35 escinde en condiciones adecuadas y el grupo carboxi libre resultante se acopla al extremo amino-terminal libre de la cadena polipeptídica. El grupo protector M puede escindirse entonces en condiciones apropiadas, y la cadena polipeptídica extenderse adicionalmente a través del acoplamiento secuencial de aminoácidos adicionales.

- De acuerdo con los procedimientos de la invención, un polipéptido con puentes intramoleculares que contiene dos anillos embebidos puede sintetizarse de forma similar usando dos puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial de fórmulas generales V y VI. La síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares que
40 contiene dos anillos embebidos es comparable a la síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares que contiene dos anillos superpuestos, diferenciándose solamente en el orden de desprotección y acoplamiento de los puentes intramoleculares de las fórmulas V y VI. En concreto, el puente intramolecular de fórmula V se acopla al

extremo amino-terminal libre de una cadena peptídica unida a través de su extremo carboxi-terminal a un soporte sólido, o el puente intramolecular de fórmula V se acopla directamente al soporte sólido. E se escinde posteriormente, y uno o más aminoácidos pueden acoplarse después opcionalmente de forma secuencial al extremo amino-terminal libre del polipéptido por ciclación a través de etapas de acoplamiento y desprotección de acuerdo con SPPS convencional. A continuación, el puente intramolecular de fórmula general VI se acopla a la cadena peptídica en crecimiento a través de su grupo carboxi libre, y posteriormente se escinde Q. De nuevo, uno o más aminoácidos pueden acoplarse después opcionalmente de forma secuencial al extremo amino-terminal libre del polipéptido. Para formar el primer anillo, T se escinde después usando una química de desprotección apropiada, y el grupo carboxi libre resultante se acopla al extremo amino-terminal libre de la cadena polipeptídica. Posteriormente, el grupo protector M se elimina en condiciones adecuadas, exponiendo un grupo amino libre. Después pueden acoplarse opcionalmente aminoácidos adicionales al grupo amino libre en el extremo N-terminal del polipéptido. Para formar el segundo anillo, y por lo tanto los anillos embebidos, G se escinde en condiciones adecuadas y el grupo carboxi libre resultante se acopla al extremo amino-terminal libre de la cadena polipeptídica. El grupo protector D puede escindirse después en condiciones apropiadas, y la cadena polipeptídica extenderse adicionalmente a través del acoplamiento secuencial de aminoácidos adicionales.

Un experto en la materia apreciará que pueden prepararse de forma similar moléculas más complejas a través de variaciones de los procedimientos anteriores. Por ejemplo, un polipéptido que tenga dos anillos superpuestos y 3 anillos adicionales en serie puede sintetizarse por combinación de los procedimientos desvelados para la síntesis de polipéptidos con puentes intramoleculares que contienen anillos superpuestos con los procedimientos desvelados para la síntesis de polipéptidos con puentes intramoleculares que tienen anillos en serie.

Durante la síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares, el desarrollo y la precisión de la síntesis pueden controlarse opcionalmente mediante diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo, Maldi y CL-EM. Tras completarse la síntesis, el polipéptido con puentes intramoleculares se escinde del soporte sólido en condiciones adecuadas. Cuando el polipéptido sintetizado contiene cantidades significativas de azufre (por ejemplo, para polipéptidos que contienen lantionina), puede usarse un cóctel de TFA/tioanisol/agua/fenol/etanodiol (82,5/5/5/2,5). El desarrollo de la reacción de escisión puede controlarse periódicamente mediante CL-EM u otra técnica adecuada. Dependiendo de los grupos protectores de cadena lateral seleccionados, su escisión puede efectuarse durante la escisión del polipéptido de la resina o, como alternativa, en una etapa separada. El producto final puede aislarse, por ejemplo, por precipitación a partir de éter frío, y purificarse por procedimientos conocidos incluyendo HPLC de fase inversa.

Los polipéptidos con puentes intramoleculares de la invención pueden analizarse estructuralmente y para determinar su función bioquímica mediante técnicas conocidas. Puede conseguirse un análisis estructural por técnicas que incluyen RMN bidimensional y cristalografía de rayos X. Se han analizado estructuralmente con éxito polipéptidos con puentes intramoleculares usando RMN bidimensional TOCSY adquirida a un tiempo de mezcla de 60 ms (Braunschweiler y Ernst (1983), *Journal of Magnetic Resonance* 53, 521-528) y NOESY adquirida a 200 ms, 400 ms, 450 ms. Kumar y col. (1980), *Biochem. Biophys. Res Commun.* 95, 1-6. Smith, J. L. (2002) Dissertation, University of Florida, Gainesville. Smith y col. (2000), *European Journal of Biochemistry* 267, 6810-6816.

En una realización preferida, los procedimientos de la invención se usan para sintetizar polipéptidos con puentes intramoleculares que contienen una o más lantioninas o derivados de lantionina. En una realización más preferida, los procedimientos de la invención se usan para sintetizar antibióticos. En una realización más preferida, los procedimientos de la invención se usan para sintetizar Nisina A y análogos de la misma.

La Nisina A y análogos de la misma pueden ensayarse para determinar su actividad biológica usando procedimientos conocidos. (Hillman y col. (1984), *Infection and Immunity* 44, 141-144; Hillman y col. (1998), *Infection and Immunity* 66, 2743-2749). El análisis estructural de la Nisina A y análogos de la misma sintetizados por los procedimientos de la invención puede ayudarse de la comparación con la estructura tridimensional de la Nisina A producida biológicamente, previamente determinada por Van De Yen y col. por RMN (1991, *European Journal of Biochemistry* 202, 1181-1188). A partir de las asignaciones de aminoácidos realizadas por este trabajo de determinación de estructura covalente anterior es posible caracterizar rápidamente los enlaces covalentes e identificar todos los NOE de largo alcance relevantes para la determinación estructural de la Nisina A y análogos de la misma sintetizados por los procedimientos de la invención.

Aplicaciones de la tecnología DPOLT

La DPOLT es una tecnología de plataforma que surgió de una estrategia multidisciplinaria. Existen varias ventajas que hacen que esta tecnología sea tan deseable. En primer lugar, y lo más destacado, permitirá la síntesis y exploración rápida de un número importante de antibióticos candidato y otros péptidos bioactivos para determinar su aplicación potencial en el campo de la terapéutica sin tener que dedicar grandes cantidades de tiempo y gastos a encontrar procedimientos de fermentación y purificación para su análisis. Existen aproximadamente 50 antibióticos que contienen puentes tioéter superpuestos, descubriéndose más cada año, que pueden sintetizarse

mediante los procedimientos desvelados en el presente documento. Estos antibióticos incluyen los antibióticos de Tipo A(I) Nisina A, Nisina Z, Subtilina, Ericina S, Ericina A, Estreptina, Epidermina, [Val1-Leu6]-epidermina, Galidermina, Mutacina 1140, Mutacina B-Ny266, Mutacina III, Mutacina I, Pep5, Epilancina K7 y Epicidina 280; los antibióticos de Tipo A(II) Lacticina 481, Variacina, Mutacina II, Estreptococina A-FF22, Salivaricina A, [Lys2-Phe7]-salivaricina A, Plantaricina C, Sublancina 168 y Butirivibriocina OR79A; los antibióticos de Tipo B Cinamicina, Duramicina, Duramicina B, Duramicina C, Curamicina C, Ancovenina, Mersacidina, Actagardina, Ala(0)-actagardina y Subtilocina A; los antibióticos de Dos Componentes Lacticina 3147A1, Lacticina 3147A2, Estafilococina C55 α , Estafilococina C55 β , Plantaricina W α , Plantaricina W β , Citolisina L_L, Citolisina L_S; y otros antibióticos tales como Ruminococina A, Carnocina UI 49, Macedocina, Bovicina HJ50, Nukacina ISK-1 y morfógeno SapB. (Véase, por ejemplo, Chatterjee y col., 2005. Chem. Rev. 105, 633-83.)

A tenor de experiencias pasadas parece probable que no se lograrán rápidamente muchos procedimientos de fermentación y purificación para muchos antibióticos. La Nisina A, que se descubrió hace más de 50 años, continúa siendo objeto de intenso estudio para encontrar un procedimiento rápido y adecuado de purificación para su desarrollo como agente terapéutico. Una solicitud de patente de Estados Unidos reciente (Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0072333) intenta conseguir este fin, pero usa una diversidad de costosas proteasas y múltiples etapas de purificación. Es extremadamente probable que los procedimientos de SPPS empleados por la DPOLT consigan el fin deseado de una forma mucho más rentable. Actualmente, están comercializadas en el mercado más de 35 moléculas bioactivas que se sintetizan usando procedimiento de SPPS, tales como oxitocina, sandostatina y fuzeona, y con el tiempo la demanda aumentará seguramente. El uso de DPOLT permite la sustitución específica de sitio de aminoácidos y sus análogos, incluso en una estrategia de biblioteca combinatoria, que proporciona un procedimiento óptimo para descubrir agentes terapéuticos nuevos y mejorados para su propósito deseado. A este respecto, la DPOLT es la única tecnología existente para la síntesis de moléculas con anillos superpuestos y tiene el potencial de generar una diversidad de moléculas bioactivas, aparte de antibióticos, para su uso en diversas aplicaciones. La DPOLT permite que la producción *in vitro*, por ejemplo, de antibióticos estructuralmente complejos (incluyendo aquellos con estructuras de anillos superpuestos) se realice de una forma comercialmente viable usando procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida de rutina.

La DPOLT proporciona dos ventajas significativas en la exploración y desarrollo de nuevos antibióticos para aplicaciones comerciales: las estrategias de fermentación son claramente preferibles desde el punto de vista del coste de los materiales para la producción, pero el tiempo y el esfuerzo necesarios para optimizar dichos procedimientos pueden ser prohibitivos durante las fases iniciales del descubrimiento de fármacos. Además, como en el caso de la Nisina A, puede no conseguirse fácilmente la purificación de fermentaciones de alto rendimiento. La purificación del producto final, típicamente, no es un problema significativo en la SPPS. La DPOLT tiene la ventaja de permitir la exploración de un gran número de compuestos potencialmente útiles de una forma rápida para el ensayo clínico. Para compuestos que parecen prometedores, la DPOLT proporciona una vía rápida de comercialización, y también indica aquellas moléculas que podrían servirse proporcionando el tiempo y el esfuerzo necesarios para desarrollar procedimientos de fermentación. Para compuestos que carecen de las características necesarias para un desarrollo adicional, tales como aquellos con un escaso espectro de actividad, con una farmacocinética defectuosa, con problemas de toxicidad, etc., la DPOLT permitirá la eliminación rápida y eficaz de los mismos de la consideración. Por último, puesto que la DPOLT depende de la síntesis de péptidos en fase sólida, será sencillo explorar y desarrollar análogos con características mejoradas, tales como aquellos que superen la resistencia bacteriana. Por lo tanto, el procedimiento puede aplicarse a otros antibióticos y péptidos de interés y para identificar los que tienen una funcionalidad deseable y características económicamente favorables.

Los usos más evidentes para la DPOLT y los antibióticos sintetizados mediante los procedimientos de la invención son el tratamiento médico y veterinario de infecciones bacterianas. También existen varias otras aplicaciones potenciales. Los antibióticos son una alternativa bien establecida y atractiva a otros agentes bactericidas para su uso en la conservación de alimentos y en cosmética. DelvesBroughton y col., (1996) *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 69, 193-202; Rollema y col., (1995) *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 2873-2878; Liu y Hansen, (1990) *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 2551-2558; Huot y col., (1996) *Letters in Applied Microbiology*. 22, 76-79; Delvesbroughton, (1990) *Food Technology*. 44, 100; Delvesbroughton (1990) *Journal of the Society of Dairy Technology*. 43, 73-76; Delvesbroughton y col., (1992) *Letters in Applied Microbiology*. 15, 133-136; Thomas y Wimpenny (1996) *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2006-2012; Sahl y Bierbaum (1998) *Annual Review of Microbiology*. 52, 41-79. Además, los antibióticos se han estudiado con cierto éxito como desinfectantes tópicos, particularmente como colutorios para promover la salud oral. Howell y col., (1993) *Journal of Clinical Periodontology*. 20, 335-339.

Los fármacos antibióticos tienen un potencial enorme y probablemente serán bien recibidos por la comunidad médica. Aunque el mercado para uso de antibióticos continúa siendo grande y permanecerá así siempre que existan enfermedades infecciosas, el ciclo de vida global para la mayoría de los antibióticos es corto debido a mutaciones y resistencia bacteriana. Los beneficios de la clase de antibióticos de fármacos antibióticos es que tienen una trayectoria demostrada de ser relativamente resistentes a la adaptación bacteriana y se ha descubierto

que tienen una actividad bactericida potente contra varios patógenos bacterianos resistentes a otros antibióticos.

La presente invención puede entenderse mejor a la luz de los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de lantioninas ortogonales protegidas de forma diferencial

5 A. Síntesis de Fmoc-Cys

Se sintetizó cisteína protegida con Fmoc (Figura 3, estructura B) en una secuencia de dos etapas a partir de L-cistina como se resume en la Figura 4. Se disolvió carbonato sódico (4,6 g, 43,6 mmol) y L-cistina (5,0 g, 20,8 mmol) en agua (200 ml). La solución resultante se enfrió hasta 10 °C. Se disolvió FmocCl (11,85 g, 45,8 mmol) en dioxano (80 ml) y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución acuosa de L-cistina. La solución se agitó durante 2 h a 10 °C y se dejó que se calentara gradualmente a temperatura ambiente. Se obtuvo un espeso precipitado blando que se filtró sobre un embudo de vidrio sinterizado. El producto se trituró con éter dietílico (50 ml) y se secó al vacío durante 2 días. Se obtuvo *N,N*-Bis(Fmoc)-L-cistina (14,0 g, rendimiento del 98 %) como un polvo blanco.

15 Se disolvió *N,N*-Bis(Fmoc)-L-cistina (12,0 g, 17,5 mmol) en metanol (300 ml). Se añadió cinc granular (12,0 g) a esta solución y la mezcla resultante se agitó energicamente usando un agitador magnético. Se añadió ácido trifluoroacético (75 ml, 1 mol) gota a gota en la mezcla de reacción durante un periodo de 2 h y se agitó a temperatura ambiente durante un periodo de 12 h. La reacción se controló mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa C-18 (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC, cloroformo/metanol/ácido acético = 30:1:0.1, v/v). Tras la desaparición de la *N,N*-bis(Fmoc)-L-cistina, la mezcla de reacción se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio para reducir el volumen hasta aproximadamente 100 ml. Se añadió diclorometano (400 ml) y la mezcla se lavó con ácido clorhídrico acuoso 2 N. La fase acuosa se extrajo con diclorometano y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio. La concentración de la solución dio *N*-(Fmoc)-L-cisteína, 8,8 g 73 %) (Figuras 3 y 4, estructura B) como un polvo blanco.

B. Síntesis de éster propargílico de *N*-(Alloc)-D-serina

25 La síntesis de éster propargílico de *N*-(Alloc)-D-serina (Figura 3, estructura A) se realizó de la forma siguiente (véase la Figura 5). Se disolvió D-serina (10,5 g, 100 mmol) y carbonato sódico (11,1 g, 105 mmol) en agua (100 ml). Se añadió acetonitrilo (50 ml) a esta solución y la mezcla se enfrió en un baño de hielo a 5 °C. Se añadió cloroformato de alilo (11,7 ml, 13,3 g, 110 mmol) gota a gota durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó que se calentara gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró al vacío hasta aproximadamente 100 ml para eliminar el acetonitrilo y el residuo se enfrió hasta 0-5 °C. El pH de la solución se ajustó a 2,0 por adición de HCl acuoso concentrado (aproximadamente 10 ml). El producto se extrajo con acetato de etilo (5 x 40 ml) y el extracto se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio al vacío para dar *N*-(Alloc)-D-serina (16,9 g, 89 %) que apareció como un aceite amarillo pálido.

35 Se disolvió *N*-(Alloc)-D-serina (16 g, 85 mmol) en DMF (70 ml). Se añadió bicarbonato sódico (7,9 g, 94 mmol) a la solución resultante. Se añadió bromuro de propargilo (80 % en tolueno, 10,5 ml, 94 mmol) gota a gota durante un periodo de 20 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml). La solución se lavó con bicarbonato sódico acuoso (2 x 50 ml) y agua (2 x 50 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio al vacío para dar el éster propargílico de *N*-(Alloc)-D-serina (18 g, rendimiento del 93 %).

C. Síntesis de éster (bencilico) de *N*-(ivDde)-D-serina

45 Se preparó *N*-(ivDde)-D-serina (Figura 3, estructura C) a partir de D-serina e ivDde-OH que se sintetizó por O-acilación de dimedona con cloruro de isovalerilo en presencia de piridina, seguido de la reorganización del 3-metilbutanoato de 5,5-dimetil-3-oxociclohex-1-enilo formado con cloruro de aluminio usando un procedimiento descrito anteriormente (Akhrem, A. A., y col. Synthesis 1978, 925). En particular, se añadió una solución de cloruro de isovalerilo (13,5 ml, 13,3 g, 110 mmol) en diclorometano (50 ml) gota a gota durante un periodo de 15 min a una solución agitada de dimedona (14 g, 100 mmol) y piridina (9,7 ml, 9,5 g, 120 mmol) en diclorometano (150 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h y se lavó con ácido clorhídrico acuoso 2 N (2 x 50 ml), agua y bicarbonato sódico acuoso saturado (50 ml), y después se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó mediante un evaporador rotatorio al vacío para dar 3-metilbutanoato de 5,5-dimetil-3-oxociclohex-1-enilo (22,4 g, rendimiento del 100 %) que apareció como un aceite amarillo claro. A una suspensión agitada de cloruro de aluminio (16,0 g, 120 mmol) en diclorometano (100 ml) enfriado en baño de hielo se añadió gota a gota una solución de 3-metilbutanoato de 5,5-dimetil-3-oxociclohex-1-enilo (11,2 g, 50 mmol) durante un periodo de 30 min.

La mezcla de reacción se dejó que se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se vertió lentamente en una mezcla de ácido clorhídrico acuoso al 37 % (50 ml) y hielo (150 g) con enfriamiento en hielo, de modo que la temperatura no superara los 5 °C. Se añadió salmuera (200 ml) a la mezcla y el producto se extrajo con diclorometano (6 x 50 ml, la finalización de la extracción se comprobó mediante TLC). El extracto se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró en un evaporador rotatorio al vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un gradiente de hexanos que iba hasta acetato de etilo:hexanos (1:10) para dar ivDde-OH (10,5 g, 94 %) que apareció como un aceite amarillo claro.

Después se sintetizó *N*-(ivDde)-*D*-serina de la forma siguiente: A una mezcla de ivDde-OH (1,1 g, 5 mmol) y *D*-serina (0,6 g, 5,75 mmol) en metanol (50 ml) se añadió *N*-etilidisopropilamina (3,4 ml, 2,6 g, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó calentando a reflujo durante una noche. El ensayo de TLC (acetato de etilo/hexanos 1:4) no mostró ivDde-OH libre. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se disolvió en agua (40 ml), se enfrió hasta 5-10 °C y se acidificó hasta pH 2 mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico acuoso 2N. La mezcla se agitó durante 30 min y el precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para dar *N*-(ivDde)-*D*-serina (1,5 g, 96 %), como microcristales blancos.

Se preparó éster bencílico de *N*-(ivDde)-*D*-serina de la forma siguiente: A una mezcla de *N*-(ivDde)-*D*-serina (0,93 g, 3 mmol) y bicarbonato sódico (0,34 g, 4 mmol) en DMF (20 ml) se añadió bromuro de bencilo (0,43 ml, 0,62 g, 3,6 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla se concentró al vacío en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en acetato de etilo (40 ml). La solución se lavó con agua y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 40 ml) y agua (40 ml). La fase orgánica se secó sobre carbonato de magnesio y el disolvente se eliminó al vacío en un evaporador rotatorio para dar éster bencílico de *N*-(ivDde)-*D*-serina (1,03 g, 86 %) como agujas blancas.

D. Síntesis de éster propargílico de *N*-(Alloc)-*D*-β-bromoalanina y éster bencílico de *N*-(ivDde)-*D*-β-bromoalanina

Los derivados de β-bromoalanina correspondientes de éster (propargílico) de *N*-(alloc)-*D*-serina y éster (bencílico) de *N*-(ivDde)-*D*-serina se sintetizan disolviendo un equivalente del éster apropiado en diclorometano (o un disolvente aprótico similar) y tratando la solución con un equivalente de tetrabromuro de carbono y trifenilfosfina. La reacción se agita a temperatura ambiente hasta que se complete según se observa por TLC, y el derivado de β-bromoalanina deseado se purifica mediante cromatografía ultrarrápida. Como alternativa, las síntesis se consiguen usando tribromuro de fósforo en un disolvente tal como tolueno o diclorometano seguido de tratamiento básico suave para proporcionar las *D*-β-bromoalaninas deseadas. Aparte de la bromilación, la tosiliación u otros grupos salientes pueden usarse en la etapa de alquilación descrita a continuación para producir la lantionina protegida final.

E. Síntesis de lantioninas 1 y 2

La lantionina 1 se sintetiza a través de la alquilación del éster propargílico de *N*-(alloc)-*D*-β-bromoalanina con (Fmoc)-*L*-cisteína (Figura 5). La lantionina 2 se sintetiza a través de la alquilación del éster bencílico de *N*-(ivDde)-*D*-β-bromoalanina con (Fmoc)-*L*-cisteína (Figura 6).

La β-bromoalanina respectiva se alquila con (Fmoc)-*L*-cisteína de la forma siguiente: un equivalente de la β-bromoalanina se disuelve en diclorometano (o un disolvente aprótico similar) y se trata con (Fmoc)cisteína bajo catalizadores de transferencia de fase tales como bromuro de tetrabutilamonio, yoduro de tetrabutilamonio o Aliquat 336. La cantidad del catalizador necesaria es del 5-50 % molar y puede optimizarse para obtener una buena velocidad de reacción y una formación de producto limpia. La temperatura de reacción también puede optimizarse dentro de un intervalo de 10-50 °C.

El producto así obtenido se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida; y la pureza e identidad del producto se determinan mediante RMN, HPLC, espectrometría de masas y/o TLC. Las rutas sintéticas para las lantioninas 1 y 2 son relativamente sencillas, y se espera que los productos sean estables de modo que pueda lograrse fácilmente el aumento a escala y la síntesis a granel (>10 g).

Ejemplo 2: Síntesis de análogo del antibiótico Nisina A usando lantioninas 1 y 2

A. Síntesis de péptidos en fase sólida del análogo de Nisina A

Un análogo de Nisina A [SEC ID Nº: 2] se sintetiza de acuerdo con la invención como se resume a continuación. El análogo contiene sustituciones con alanina de la deshidrobutarina en posición 33 y de las deshidroalaninas en las posiciones 30 y 2. Pruebas considerables indican que esto no tendrá un efecto significativo sobre el espectro de actividad y la potencia del producto respecto a la Nisina A nativa (Kuipers y col., (1996); Devos y col. (1995), Molecular Microbiology 17, 427-437; Sahl y col. (1995), European Journal of Biochemistry 230, 827-853; Bierbaum y

col. (1996), Applied and Environmental Microbiology 62, 385-392).

A menos que se indique otra cosa, todos los protocolos son la metodología de SPPS de Fmoc convencional descrita en la bibliografía. White (2003) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical Approach, Oxford University Press, Oxford. La Nisina A se sintetiza a partir de su extremo carboxi-terminal de una forma por etapas (véase la Figura 1).

1. El carboxilo de N^α-Fmoc-Lys-N^ε-t-butiloxycarbonil-L-lisina (Resto 1) se une a CLEAR-Acid Resin™ (Peptide International). La resina se comprueba con ninhidrina para verificar la finalización de la reacción.

2. La desprotección del grupo Fmoc situado en la amida de la lisina se consigue usando piperidina al 20 % en DMF a temperatura ambiente.

3. Las etapas anteriores (1-2) de acoplamiento y desprotección se repiten para unir, en orden, alanina, valina, histidina, isoleucina y serina (restos 2 a 6) usando los L-aminoácidos con Fmoc respectivos (disponibles en el mercado). Aminoácidos tales como histidina, lisina y serina tienen grupos t-butilo unidos a sus cadenas laterales reactivas para proteger estos grupos.

4. El siguiente acoplamiento se realiza usando lantionina 1 ortogonal después de lo cual se elimina el grupo Fmoc en la lantionina ortogonal 1 usando piperidina al 20 % en DMF.

5. La histidina con Fmoc (resto 8) se acopla.

6. La histidina con Fmoc se desprotege con piperidina al 20 % en DMF y la histidina se acopla con lantionina ortogonal 2.

7. El grupo propargilo en la lantionina ortogonal 1 se escinde usando dicobaltoctacarbonilo en diclorometano. El extremo amino-terminal con Fmoc de la lantionina ortogonal 2 se desenmascara usando piperidina al 20 % en DMF. El extremo C-terminal desenmascarado de la lantionina ortogonal 1 y el extremo N-terminal desenmascarado de la lantionina ortogonal 2 se acoplan. La síntesis de anillo E se completa en esta etapa.

8. El grupo N(Alloc) de la lantionina 1 se elimina por tratamiento de la resina de peptidilo dos veces con el 20 % molar de Pd(PPh₃)₄ y 20-25 equivalentes de PhSiH₃ en diclorometano durante 15-20 minutos.

9. El extremo N-terminal desenmascarado se acopla con alanina con Fmoc (resto 11). El grupo Fmoc en la alanina se desprotege usando piperidina al 20 % en DMF.

10. El extremo C-terminal restante de la lantionina 2 se desprotege usando un protocolo de hidrogenación por transferencia usando paladio sobre carbón vegetal y ciclohexadieno en diclorometano.

11. El extremo C-terminal desenmascarado de la lantionina 2 y el extremo N-terminal de la alanina (resto 11) se acoplan. La síntesis de los anillos superpuestos E y D se completa en esta etapa. Para comprobar que se sintetiza el producto correcto, se toma una pequeña cantidad de la resina y el péptido se escinde usando un cóctel de escisión (véase a continuación). El péptido resultante se analiza mediante Maldy y CL-EM.

12. El ivDde en la lantionina 2 se elimina usando hidrazina al 2-10 % en DMF y el extremo amino-terminal libre resultante se alarga de forma secuencial con lisina, metionina y asparagina protegidas con Fmoc (restos 13, 14 y 15).

13. La lantionina 1 se une al extremo N-terminal desprotegido de las asparaginas. (Sin embargo, puede usarse lantionina 1 o lantionina 2 para completar la síntesis de los anillos C, B y A).

14. El grupo Fmoc de la lantionina 1 se desprotege y se acopla de forma secuencial con glicina con Fmoc, metionina, alanina, leucina y glicina (restos 17 a 21) para formar el anillo C.

15. El grupo propargilo en el extremo C-terminal de la lantionina 1 se elimina usando 1 equivalente de dicobaltoctacarbonilo y se acopla al extremo N-terminal de glicina (resto 21), completando el anillo C.

16. El grupo Alloc en el extremo N-terminal de la lantionina 1 se elimina de acuerdo con el procedimiento descrito en la etapa 8 y se acopla a lisina con Fmoc (resto 23).

17. El extremo N-terminal de la lisina se desprotege y la lantionina 1 se acopla al extremo N-terminal de la lisina.

18. El grupo con Fmoc de la lantionina 1 se desprotege y se acopla de forma secuencial con glicina con Fmoc y prolina con Fmoc (restos 25 y 26).

19. El grupo propargilo en el extremo C-terminal de la lantionina 1 se elimina usando 1 equivalente de dicobaltoctacarbonilo y se acopla al extremo N-terminal desprotegido de la prolina formando de este modo el anillo B.

20. El grupo Alloc en el extremo N-terminal de la lantionina 1 se elimina de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente y se acopla a la lantionina 1.

21. El grupo con Fmoc de la lantionina 1 se desprotege y se acopla de forma secuencial con la leucina, alanina e isoleucina con Fmoc (restos 29 a 31).

22. El grupo propargilo en el extremo C-terminal de la lantionina 1 se elimina usando un equivalente de dicobaltoctacarbonilo y se acopla al extremo N-terminal desprotegido de la isoleucina, formando de este modo el anillo A.

23. El grupo Alloc en el extremo N-terminal de la lantionina 1 se elimina de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente y se acopla de forma secuencial a alanina e isoleucina con Fmoc (restos 33 y 34). Esto completa la síntesis del análogo de Nisina A.

B. Escisión del péptido sintetizado de la resina

Debido a que el péptido sintetizado contiene cantidades significativas de azufre, se usa un cóctel que contiene TFA/tioanisol/agua/fenol/etanoditiol (82,5/5/5/2,5) para escindir el péptido de la resina (White 2003). La resina se lava minuciosamente con diclorometano para eliminar rastros de DMF y otros orgánicos residuales y se trata con el cóctel anterior. La optimización del punto temporal para la escisión se consigue llevando a cabo la reacción en 15-20 mg de la resina, seguido de CL-EM a intervalos de una hora durante hasta 18 horas. Se usan las condiciones optimizadas para aumentar a escala la escisión. El péptido escindido se vierte gradualmente en éter frío, precipitando de este modo el péptido. El péptido precipitado se lava con éter frío y se seca.

C. Purificación del péptido escindido

El péptido se purifica reconstituyéndolo en agua que contiene TFA al 1 %. La solución se somete a HPLC en una columna de fase inversa C-18 usando un gradiente de acetonitrilo:agua y una HPLC de Biorad con un detector Quadtech. Los picos se recogen y se analizan mediante Maldi Tof para confirmar la identidad del producto. Las fracciones que contienen el péptido deseado se recogen y se liofilizan para obtener el producto purificado. La pureza se determina usando HPLC, EM y RMN.

15 Ejemplo 3: Análisis estructural y biológico del análogo de Nisina A purificado

A. Bioensayo del análogo de Nisina A

El antibiótico así sintetizado y purificado, como se muestra en los Ejemplos 1 y 3, se divide en alícuotas y se liofiliza. El producto resultante se pesa y los rendimientos finales se calculan. La actividad biológica del análogo de Nisina A se determina mediante un ensayo de antagonismo diferido, conocido en la técnica, que permite la determinación de las concentraciones mínima inhibitoria y bactericida del análogo de Nisina A (Hillman y col. (1984), *Infection and Immunity* 44, 141-144; Hillman y col. (1998), *Infection and Immunity* 66, 2743-2749). La comparación con la Nisina A nativa permite la determinación de las actividades específicas respectivas. El bioensayo se realiza de la forma siguiente:

Las muestras (20 μ l) de fracciones a ensayar para determinar la actividad de Nisina A se diluyen en serie 2 veces usando acetonitrilo: agua (80:20) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones varían de 20 a 0,08 μ g/ml. Se diluye un cultivo de una noche de la cepa *Micrococcus luteus* ATCC272LS (espontáneamente resistente a estreptomycin 100 μ g/ml) 1:1000 (aproximadamente 10^6 ufc/ml) en caldo con tripticasa de soja (Difco) y se cultiva a 37 °C hasta una $DO_{600} = 0,2$. Se añaden seiscientos microlitros de células a 15 ml de agar blando de caldo con tripticasa de soja (agar al 0,75 %) que se ha enfriado a 45 °C y se vierte sobre la superficie de una gran placa de Petri que contiene agar con tripticasa de soja que contiene estreptomycin 100 μ g/ml (la estreptomycin previene el sobrecrecimiento de contaminantes que puedan estar presentes sin afectar a la capacidad para determinar la cantidad de actividad de Nisina A presente). Después de que el agar blando se haya endurecido, se aplican puntualmente muestras de 5 μ l de las diluciones en serie de 2 veces de las fracciones a ensayar sobre la superficie de las placas y se dejan secar al aire.

Las placas se incuban a 37 °C durante 24 horas y se examinan para determinar zonas de inhibición de crecimiento de la cepa indicadora. El título de la muestra se toma como la inversa de la mayor dilución que produce una inhibición visible del crecimiento de la cepa indicadora *M. luteus*. Como control, se diluye Nisina A auténtica y se aplica puntualmente como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones varían de 20 a 0,08 μ g/ml. Los resultados permiten una determinación de la bioactividad del análogo sintético respecto a la Nisina A nativa como porcentaje basándose en los niveles de pureza de estos compuestos según se estableció en la etapa anterior.

El bioensayo anterior usando la Nisina A sintética y nativa se realiza para al menos una docena de especies, de especies gram positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* multiresistentes a fármacos. También se procesan en paralelo uno o más antibióticos distintos apropiados para la especie diana que se esté ensayando para su comparación.

45 B. Análisis estructural del análogo de Nisina A

La estructura tridimensional del análogo de Nisina A se determina por comparación con la Nisina A nativa usando RMN TOSCY y NOESY. Se preparan muestras (3-5 mM) de la Nisina A sintética y nativa en H_2O/D_2O /sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico-D4 (TSP) (90,0:9,9:0,1 %) en un volumen total de 700 μ l. Los datos de RMN se recogen en un espectrómetro Bruker Avance con criosonda de 600 MHz a 25 °C y la frecuencia de vehículo se centra en la resonancia del agua, que se suprime mediante presaturación durante un retraso de relajación de 1,5 s. Los experimentos de TOCSY se adquieren con un tiempo de mezcla de 60 ms usando la secuencia MLEV-17 (Bax y Davis (1985), *Journal of Magnetic Resonance* 65, 355-360). Los experimentos de NOESY se adquieren con tiempos de mezcla de 200 ms, 400 ms y 450 ms. Los tiempos de retraso para crear o reenforzar la coherencia antifase en los experimentos de HMQC y HMBC se ajustan a 3,5 ms (acoplamiento de 140 Hz) y 60 ms

(acoplamiento de 8,5 Hz), respectivamente.

Todos los datos bidimensionales se recogen con 2048 puntos complejos en la dimensión de adquisición y con entre 256 y 512 puntos complejos para las dimensiones indirectas. Se consigue una detección indirecta sensible de fase para todos los experimentos usando el procedimiento de States-TPPI (Marion y col. (1989), *Journal of magnetic Resonance* 85, 393-399). Los desplazamientos químicos ^1H se refieren a TSP. Los datos se procesan con NMRpipe (Delaglio y col. (1995), *Journal of Biomolecular NMR* 6, 277-293) por eliminación primero de la señal del agua residual por deconvolución, multiplicación de los datos en ambas dimensiones mediante una función coseno cuadrado o una función coseno cuadrado con un desplazamiento de 60° (para la dimensión ^1H de HMBC), llenado de ceros una vez, transformación de Fourier y corrección por las medidas basales. Los datos se analizan con el programa informático interactivo NMRView (Johnson y Blevins (1994), *Journal of Biomolecular Nmr* 4, 603-614). Las resonancias ^1H se asignan de acuerdo con procedimientos convencionales (Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids.*, Wiley, Nueva York) usando experimentos de TOCSY (Braunschweiler y Ernst (1983), *Journal of Magnetic Resonance* 53, 521-528) y NOESY (Kumar y col. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1-6). Se usan experimentos de HMQC (Bax y col. (1983), *Journal of Magnetic Resonance* 55, 301-315; Muller (1979), *Journal of the American Chemical Society* 101, 4481-4484) y HMBC (Bax y Summers (1986), *Journal of the American Chemical Society* 108, 2093-2094) para aclarar algunas áreas de ambigüedad en los espectros de TOCSY y NOESY.

Los restos de lisina, isoleucina, leucina, glicina y asparagina tienen patrones de espín de resonancia ^1H distintos y fácilmente caracterizados, que hace que sean fáciles de asignar en los experimentos de TOCSY y NOESY bidimensionales. Estos restos se identifican primero. Los patrones de enlace tioéter se verifican mediante patrones de conectividad de NOE de protones beta de largo alcance. Los NOE de largo alcance son presumiblemente identificables entre los restos en las posiciones 3 y 7, 8 y 11, 13 y 19, 23 y 26 y 25 y 28. Se usan NOE de largo alcance ($>i^{+2}$) para el modelado tridimensional, como se describe en Smith y col., 2002 (*Structural and Functional Characterization of the Lantibiotic Mutacin 1140*, University of Florida, Gainesville).

Se miden las intensidades de picos cruzados de NOE en el NMRView. Las distancias se calibran usando la relación $r_{ab}^6 = r_{cal}^6 (V_{cal}/V_{ab})$, en la que r_{ab} es la distancia entre los átomos a y b , V_{ab} es el volumen de picos cruzados de a a b de NOESY, r_{cal} es una distancia conocida y V_{cal} es el volumen correspondiente del pico cruzado de calibración de NOESY. La distancia usada para las calibraciones son los protones beta de la isoleucina. Sólo los picos cruzados de NOE inter-resto se usan como restricciones de la distancia en los cálculos. Los pozos de energía se definen usando una constante de fuerza superior e inferior de $1 \text{ kcal/mol}/\text{Å}^2$.

Todo el modelado conformacional se realiza usando el software InsightII (Accerlys, San Diego, CA). Las simulaciones dinámicas moleculares se procesan al vacío a 500 K con una constante dieléctrica de 4,0 usando el campo de fuerza cvff con términos cruzados, potenciales de Morse y distancias límite de 40 Å . El péptido se construye usando la función de construcción en InsightII. Inicialmente, el péptido lineal se minimiza, y después se procesan dinámicas moleculares no restringidas durante 10 ps. Después de esto, sólo se añaden las restricciones de distancia de $i + 2$ o superiores. Las simulaciones de dinámica molecular se interrumpen periódicamente cuando se cumplen restricciones de distancia de $i + 2$ o superiores entre los restos que componen cada anillo de tioéter. El anillo A se forma primero, seguido del anillo B y del anillo C, y después los anillos entrelazados D y E. Una vez que se forman los anillos de tioéter, se añaden restricciones de distancia $i + 1$ a las restricciones de distancia $i + 2$ o superiores, y la simulación de la dinámica molecular se procesa durante 5 ns a 500 K con una constante dieléctrica de 4,0 usando un campo de fuerza cvff con términos cruzados y potenciales de Morse. Después se procesan simulaciones de dinámica molecular durante otros 20 ns con todas las restricciones.

Se escriben archivos de historial de la dinámica cada 10 ps. Se minimiza la energía de doscientas estructuras del archivo de historial comenzando en 1 ns y separadas cada 100 ps con todas las restricciones de RMN usando 2000 etapas de descenso más pronunciado, seguido de gradientes de conjugado y Newton-Raphson hasta que se alcanza el gradiente de raíz cuadrática media (RMS) de la energía de $0,01 \text{ kcal/mol}/\text{Å}$. Las 200 estructuras de energía minimizada se comprueban para determinar violaciones de restricción de RMN usando el software PROCHECK-NMR (Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. y Thornton, J. M. (1996) *AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*, *Journal of Biomolecular Nmr.* 8, 477-486). Las estructuras de energía minimizada se agrupan en familias usando el programa XCluster (Shenkin, P. S. y McDonald, D. Q. (1994) *Cluster-Analysis of Molecular-Conformations*, *Journal of Computational Chemistry.* 15, 899-916). Las conformaciones se comparan con las estructuras nativas de Nisina A determinadas por VanDeVen y col., 1991 (*European Journal of Biochemistry* 202, 1181-1188).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hillman, Jeffrey D
 Orugunty, Ravi s
 Smith, James
 5

<120> Tecnología de lantionina ortogonal protegida de forma diferencial
 <130> 05-654-C

10 <150> US 60/708.086
 <151> 12-08-2005

15 <150> US 60/808.907
 <151> 26-05-2005

<160> 2
 <170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> xaa es Dhb

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (S)..(5)
 <223> xaa es Dha

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Abu

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Abu

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Abu

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Abu

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> xaa es Dha
 <400> 1

Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys Xaa Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Met Gly Ala Asn Met Lys Xaa Ala Xaa Ala His Ala Ser Ile His Val
 20 25 30

Xaa Lys

5 <210>2
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 2

Ile Ala Ala Ile Ala Leu Ala Ala Pro Gly Ala Lys Ala Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Met Gly Ala Asn Met Lys Ala Ala Ala Ala His Ala Ser Ile His Val
 20 25 30

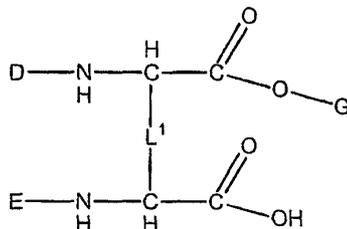
Ala Lys

15

REIVINDICACIONES

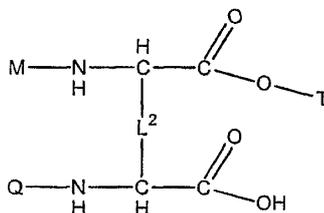
1. Un procedimiento de síntesis de un polipéptido con puentes intramoleculares que comprende dos puentes intramoleculares superpuestos, que comprende:

- 5 a) unir covalentemente el extremo carboxi-terminal libre de un primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial de fórmula



10 con un soporte sólido o con el extremo amino-terminal libre de un aminoácido o polipéptido opcionalmente unido a un soporte sólido, y en el que L^n representa cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente, en el que D, E y G son grupos protectores, cada uno de los cuales se elimina selectivamente en condiciones de reacción diferentes, y en el que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector D son diferentes de las de la eliminación del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica;

- 15 b) eliminar el grupo protector E para formar un extremo amino-terminal libre;
 c) añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
 d) opcionalmente repetir c) una o más veces;
 e) unir covalentemente el extremo carboxi-terminal libre de un segundo puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial de fórmula



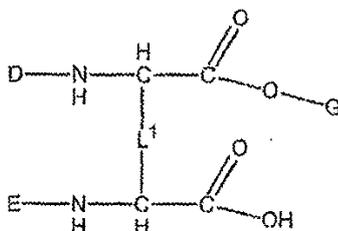
20 con el extremo amino-terminal libre, en el que L^n es como se ha definido anteriormente, en el que M, Q y T son grupos protectores, cada uno de los cuales se elimina selectivamente en condiciones de reacción diferentes, en el que D y M se eliminan solamente en condiciones diferentes, en el que G y T se eliminan solamente en condiciones diferentes, en el que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector M son diferentes de las de la eliminación del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica, y en el que E y Q se eliminan en condiciones diferentes de las que eliminarán D y de las que eliminarán M;

- 25 f) eliminar el grupo protector Q para formar un extremo amino-terminal libre;
 g) opcionalmente añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
 30 h) opcionalmente repetir g) una o más veces;
 i) eliminar el grupo protector G del primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo carboxi-terminal libre;
 j) acoplar el extremo carboxi-terminal libre al extremo amino-terminal libre;
 k) eliminar el grupo protector D del primer puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo amino-terminal libre;
 35 l) opcionalmente, añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
 m) opcionalmente repetir l) una o más veces;
 n) eliminar el grupo protector T del segundo puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial formando un extremo carboxi-terminal libre;
 40 o) acoplar el extremo carboxi-terminal libre al extremo amino-terminal libre;
 p) eliminar el grupo protector M del segundo puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial para formar un extremo amino-terminal libre; y
 q) opcionalmente añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger

el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre; y
r) opcionalmente repetir q) una o más veces.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:

- 5 a) eliminar al grupo protector amino-terminal del polipéptido unido al soporte sólido para formar un extremo amino-terminal libre;
b) acoplar un puente intramolecular ortogonal protegido de forma diferencial de fórmula



10 con el extremo amino-terminal libre, en el que L^n representa cadenas laterales de aminoácidos unidas covalentemente, en el que D, E y G son grupos protectores, cada uno de los cuales se elimina selectivamente en condiciones de reacción diferentes, y en el que las condiciones de reacción para la eliminación del grupo protector D son diferentes de las de la eliminación del grupo protector de amino de los aminoácidos del resto de la cadena polipeptídica;

- c) eliminar el grupo protector E para formar un extremo amino-terminal libre;
15 d) añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
e) opcionalmente repetir d) una o más veces;
f) eliminar el grupo protector G para formar un extremo carboxilo-terminal libre;
g) acoplar el extremo carboxilo-terminal libre de f) al extremo amino-terminal libre;
20 h) eliminar el grupo protector D para formar un extremo amino-terminal libre;
i) opcionalmente, añadir un aminoácido amino-prottegido al extremo amino-terminal libre y después desproteger el aminoácido para dar un nuevo extremo amino-terminal libre;
j) opcionalmente repetir i) una o más veces; y
k) opcionalmente repetir las etapas b)-j).

25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los puentes intramoleculares ortogonales protegidos de forma diferencial son lantioninas.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido con puentes intramoleculares es un lantibiótico.

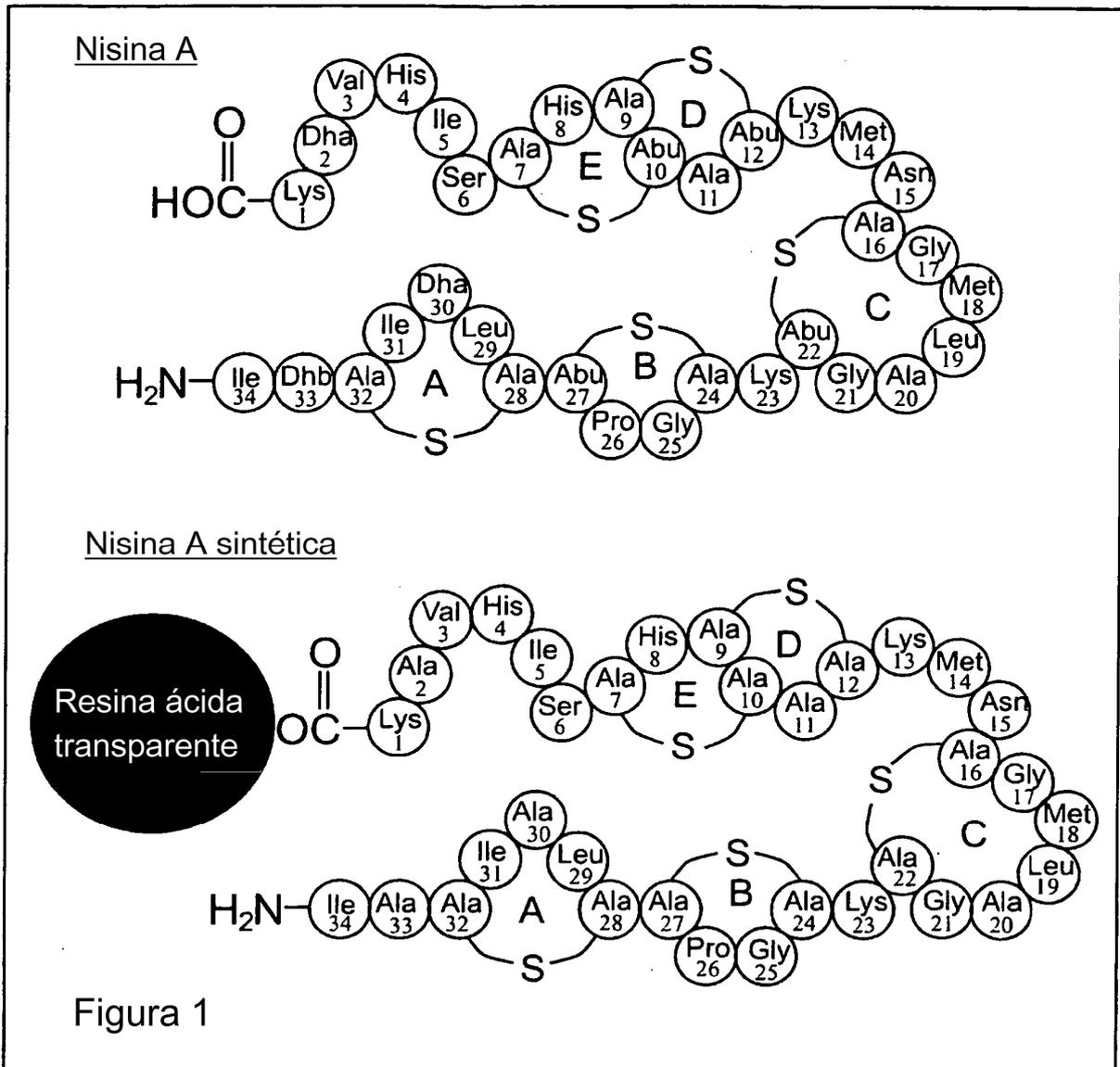
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que D, E, M y Q se seleccionan de Fmoc, Alloc e IvDde.

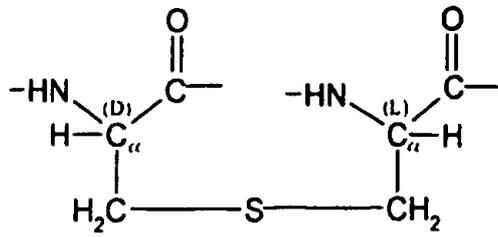
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que G y T se seleccionan del grupo que consiste en éster propargílico y éster bencílico.

30 7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que los puentes intramoleculares se seleccionan del grupo que consiste en β -metil lantionina (MeLan), S-[(Z)-2-aminovinil]-D-cisteína (AviCys) y S-[(Z)-2-Aminovinil]-2-metil-D-cisteína.

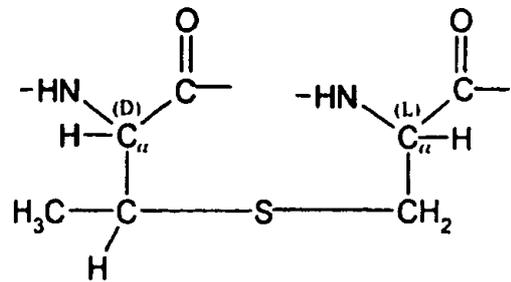
35 8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el lantibiótico se selecciona del grupo que consiste en Nisina A, Nisina Z, Subtilina, Ericina S, Ericina A, Estreptina, Epidermina, [Val1-Leu6]-epidermina, Galidermina, Mutacina 1140, Mutacina B-Ny266, Mutacina III, Mutacina I, Pep5, Epilancina K7, Epicidina 280, Lacticina 481, Variacina, Mutacina II, Estreptococina A-FF22, Salivaricina A, [Lys2-Phe7]-salivaricina A, Plantaricina C, Sublancina 168, Butirivibriocina OR79A; Cinamicina, Duramicina, Duramicina B, Duramicina C, Curamicina C, Ancovenina, Mersacidina, Actagardina, Ala(0)-actagardina, Subtilocina A, Lacticina 3147A1, Lacticina 3147A2, Estafilococina C55 α , Estafilococina C55 β , Plantaricina W α , Plantaricina W β , Citolisina L $_L$ y Citolisina L $_S$.

40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el lantibiótico es Nisina A o un análogo de la misma.

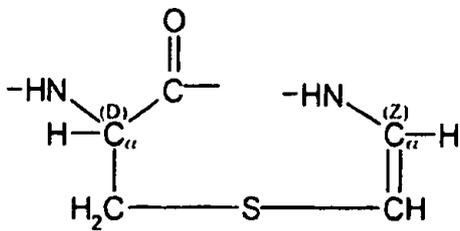




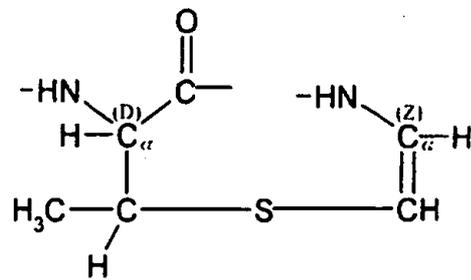
lantionina: Lan



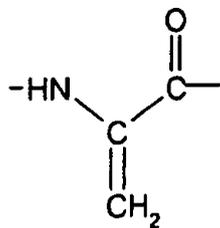
β - metil lantionina : MeLan



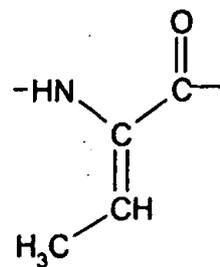
S-[(Z)-2- aminovinil]-D-cisteina : AviCys



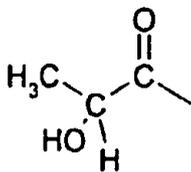
S-[(Z)-2- aminovinil]-2- metil -D- cisteina : AviCys



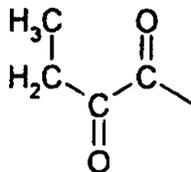
2,3-dideshidroalanina: Dha



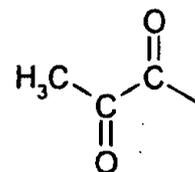
(Z)-2,3- dideshidrobutirina ; Dhb



hidroxipropionilo



2-oxobutirilo



2-oxopropionilo

Figura 2 .

