

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 932**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2003 E 03791288 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013 EP 1541585**

54 Título: **Antagonista de CXCR4 y uso del mismo**

30 Prioridad:

27.08.2002 JP 2002247843

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

22.05.2013

73 Titular/es:

**BIKINE THERAPEUTICS LTD. (100.0%)
Building 13a, Einstein Street, Science Park Kiryat
Weizmann
70400 Nes Ziona, IL**

72 Inventor/es:

**FUJII, NOBUTAKA;
TAMAMURA, HIROKAZU y
HORI, AKIRA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 403 932 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

Antagonista de CXCR4 y uso del mismo

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a compuestos que tienen acción antagonista de CXCR4 y a medicinas preventivas y/o terapéuticas que contienen tales compuestos para cánceres y artritis reumatoide crónica.

10 TÉCNICA ANTERIOR

Muchas hormonas y neurotransmisores regulan funciones vitales mediante receptores específicos existentes en las membranas celulares.

15 Muchos de estos receptores realizan señalización intracelular mediante la activación de proteína de unión a nucleótidos de guanina acoplados (como puede abreviarse más adelante "proteína G"). Por tanto, estos receptores se denominan conjuntamente receptores acoplados a proteína G (GPCR) o receptores de 7 trans-membrana (7TMR), ya que tienen estructuras comunes que tienen siete dominios trans-citomembrana.

20 Como uno de tales receptores acoplados a proteína G se conoce una proteína receptora humana codificada por el gen CXCR4 [Journal of biological chemistry, vol. 273, 4754 (1998)].

Por tanto, se conoce CXCL12/SDF-1 α , que es un péptido fisiológicamente activo que funciona como ligando del CXCR4 anteriormente mencionado [Science, vol. 261, 600-603 (1993)].

25 Se desvelan ciertos compuestos peptídicos que tienen acción antagonista contra CXCR4 y su actividad anti-VIH se describe en Fujii, publicación internacional WO02/20561, 14 de marzo de 2003.

30 La metástasis del cáncer es uno de los factores críticos que afectan la esperanza de vida de los pacientes. Se informa que la expresión de CXCR4 es potenciada en células de cáncer de mama, etc., y que la expresión de CXCL12/SDF-1 α , que es un ligando de CXCR4, es potenciada en órganos metastatizados por el cáncer (ganglios linfáticos, pulmones, hígados y huesos) [Nature, vol. 410, 50-56 (2001)]. Por tanto, en artritis reumatoide crónica, la infiltración de linfocitos T de memoria positivos para CD4 en fluidos de la cavidad articular afecta la progresión de las afecciones. Se informa que en linfocitos T positivos para CD4 en fluidos de la cavidad articular de pacientes que padecen artritis reumatoide crónica, la expresión de genes CXCR4 es potenciada, y que la expresión de genes CXCL12/SDF-1 α es potenciada en tejidos de la membrana sinovial articular [Journal of Immunology, vol.165, 6590-98 (2000)].

40 Tamamura H. y col. ("Downsizing of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II), with the maintenance of anti-HIV activity and solution structure", Bioorganic & Medicinal Chemistry; vol. 6 (4), 1998: pág. 473-479; "Effective lowly cytotoxic analogs of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II)", Bioorg. Med. Chem.; vol. 6 (2), 1998: pág. 231-238; y "Efficient analogs of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II)", Peptide Science; vol. 1997, 1999: pág. 427-429) informan, entre otros, de un residuo de 18 aminoácidos de longitud, péptido rico en Arg - T22 - que presenta una estructura de hoja β antiparalela mantenida por dos puentes disulfuro. Dicho péptido se une específicamente a la fusina del receptor de quimiocinas CXC y, por tanto, se usa como compuesto anticancerígeno o antirreumatoide.

50 El documento WO 95/10534 resalta variantes de péptidos de taquiplenas y polifemusinas que se cree que son útiles en composiciones farmacéuticas como agente antimicrobiano o antivírico.

El documento WO 01/85196 se refiere a antagonistas de CXCR4 que podrían ser útiles en el tratamiento de citoblastos hematopoyéticos para promover la tasa de multiplicación celular, auto-renovación, proliferación o expansión.

55 El documento WO 99/47158 desvela antagonistas de CXCR4 para el tratamiento de cánceres y enfermedades autoinmunitarias.

El documento WO 01/38352 se refiere a procedimientos para inhibir metástasis de cánceres y en particular a muteínas de antagonistas de receptores de quimiocinas de FSEC, CK β 9 y CK β 11.

60 Hatse S. y col. ("CXC-chemokine receptor 4 as a potential new therapeutic target for neuroblastoma and breast cancer", Int. J. of Cancer; n $^{\circ}$ 13, 2002: pág. 349) sugieren usar antagonistas para CXCR4 en el tratamiento de neuroblastomas y cáncer de mama.

65 Mori T. y col. ("Involvement of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 receptor system in pancreatic cancer"; Gastroenterology; vol. 122 (4), 2002, pág. A490) informan de una función importante de CXCR4 en invasión y

metástasis en cáncer pancreático. Un antagonista de CXCR4 (TN14003) se presenta como posible agente antimetastásico.

5 Tamamura H. y col. ("A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: A strong anti-HIV peptide T140", Biochem. Biophys. Res. Commun.; vol. 253 (3), 1998: pág. 877-882) se refiere a variantes del análogo T140 del péptido polifemusina truncado, variantes que están amidadas en el extremo C y presentan una actividad anti-VIH bastante fuerte, pero al mismo tiempo una citotoxicidad relativamente fuerte.

10 El documento WO 02/20561 desvela variantes del péptido anti-VIH y antagonista de CXCR4 T140 que tienen actividad anti-VIH mejorada y menos citotoxicidad que T140.

15 La presente invención tiene como objetivo proporcionar medios novedosos usando compuestos antagonistas de CXCR4 para la prevención y/o terapia de cánceres y artritis reumatoide crónica. Por tanto, la presente invención proporciona compuestos novedosos, en particular diversos oligopéptidos con estructuras comunes, que tienen actividad preventiva y/o terapéutica para cánceres y artritis reumatoide crónica.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

20 Los inventores de la presente invención se dedicaron a estudiar posibilidades de resolver el problema anteriormente mencionado y, como resultado, han descubierto que los compuestos antagonistas de CXCR4 previamente considerados eficaces como quimioterapéuticos para el SIDA son eficaces para la prevención y/o terapia de cánceres, que incluyen cánceres metastásicos, y artritis reumatoide crónica, y han completado la presente invención mediante más esfuerzos de investigación.

25 La presente invención se refiere a lo siguiente:

Un péptido como se indica por la siguiente fórmula o una sal del mismo:



30 en la que 4F-benzoilo muestra grupo 4-fluorobenzoilo, Arg muestra residuo de L-arginina, Nal muestra residuo de L-3-(2-naftil)alanina, Cys muestra residuo de L-cisteína, Tyr muestra residuo de L-tirosina, Cit muestra residuo de L-citrulina, Lys muestra residuo de L-lisina, DLys muestra residuo de D-lisina, Pro muestra residuo de L-prolina, DCit muestra residuo de D-citrulina, DGlu muestra residuo de ácido D-glutámico, Glu muestra residuo de ácido L-glutámico, 2 residuos de cisteína están combinados por enlace disulfuro intramolecular, NH₂ muestra amidación por grupo amino.

40 En una realización la presente invención se refiere a un producto farmacéutico que contiene el péptido anterior o cualquier sal del péptido.

En otra realización de la presente invención, el péptido anterior o una sal del mismo se usa para la fabricación de medicinas preventivas y/o terapéuticas para cánceres o artritis reumatoide crónica.

45 Según otra realización de la presente invención, el péptido anterior o una sal del mismo se usa para la preparación de un medicamento para inhibir metástasis de cáncer.

En otra realización más, dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama y cáncer pancreático.

50 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el péptido anterior, composición que es útil para el tratamiento y/o la prevención de cancer.

Según otra realización de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de artritis reumatoide crónica, composición que contiene el péptido anterior.

55 Según todavía otra realización de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica para inhibir metástasis de cáncer que contiene el péptido anterior.

60 Los compuestos de péptido de la presente invención tienen potente actividad antagonista de CXCR4 y muestran efectos terapéuticos para cánceres y artritis reumatoide crónica inhibiendo la interacción de CXCR4 y CXCL12/SDF-1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 La FIG. 1 muestra la actividad inhibidora de TE-14005 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12. El eje vertical muestra la migración de células (absorción de la luz: DO 550 nm). Empezando por la

izquierda, muestra el resultado (valor medio \pm desviación estándar, n=2) obtenido respectivamente cuando no se añadió CXCL12 (control negativo), cuando se añadió CXCL12 (control positivo), cuando se añadieron CXCL12 y TE-14005 10 nM, cuando se añadieron CXCL12 y TE-14005 100 nM, cuando se añadieron CXCL12 y TE-14005 1 μ M y cuando se añadieron CXCL12 y TE-14005 10 μ M. * indica la significancia de cada grupo TE-14005 añadido en comparación con el grupo de control positivo (prueba de Williams, $p \leq 0,025$).

La FIG. 2 muestra la actividad inhibidora de TC-14012 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12. El eje vertical muestra la migración de células (absorción de la luz: DO 550 nm). Empezando por la izquierda, muestra el resultado (valor medio \pm desviación estándar, n=2) obtenido respectivamente cuando no se añadió CXCL12 (control negativo), cuando se añadió CXCL12 (control positivo), cuando se añadieron CXCL12 y TC-14012 1 nM, cuando se añadieron CXCL12 y TC-14012 10 nM, cuando se añadieron CXCL12 y TC-14012 100 nM y cuando se añadieron CXCL12 y TC-14012 1 μ M. * indica la significancia de cada grupo TC-14012 añadido en comparación con el grupo de control positivo (prueba de Williams, $p \leq 0,025$).

La FIG. 3 muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de células de leucemia que originan linfocitos T inducida por CXCL12. El eje vertical muestra la migración de células (el número de células). Empezando por la izquierda, muestra el resultado (valor medio \pm desviación estándar, n=2) obtenido respectivamente cuando no se añadió CXCL12 (control negativo), cuando se añadió CXCL12 (control positivo), cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 1 nM, cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 10 nM, cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 100 nM y cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 1 μ M. * indica la significancia de cada grupo 4F-benzoil-TN-14003 añadido en comparación con el grupo de control positivo (prueba de Williams, $p \leq 0,025$).

La FIG. 4 muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12. El eje vertical muestra la migración de células (absorción de la luz: DO 550 nm). Empezando por la izquierda, muestra el resultado (valor medio \pm desviación estándar, n=2) obtenido respectivamente cuando no se añadió CXCL12 (control negativo), cuando se añadió CXCL12 (control positivo), cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 10 nM, cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 100 nM, cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 1 μ M y cuando se añadieron CXCL12 y 4F-benzoil-TN-14003 10 μ M. * indica la significancia de cada grupo 4F-benzoil-TN-14003 añadido en comparación con el grupo de control positivo (prueba de Williams, $p \leq 0,025$).

La FIG. 5 es una figura cromática de tejido de pulmón que muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 en un ratón trasplantado con células humanas de cáncer de mama.

La FIG. 5A muestra los pulmones del grupo de control (grupo de administración de solución salina).
La FIG. 5B son fotografías de los pulmones del grupo de administración de 4F-benzoil-TN-14003.

La FIG. 6 muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de células de Jurkat inducida por SDF-1 α (CXCL12). El eje vertical muestra la migración de células (la relación de células migrantes con la entrada). Empezando por la izquierda, muestra el resultado obtenido respectivamente cuando no se añadió SDF-1 α , cuando se añadió SDF-1 α , cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 10 pM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 100 pM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 1 nM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 10 nM y cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 100 nM.

La FIG. 7 muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de esplenocitos de ratón inducida por SDF-1 α (CXCL12). El eje vertical muestra migración de células (la relación de células migrantes con respecto a la entrada). Empezando por la izquierda, muestra el resultado obtenido respectivamente cuando no se añadió SDF-1 α , cuando se añadió SDF-1 α , cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 10 pM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 100 pM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 1 nM, cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 10 nM y cuando se añadieron SDF-1 α y 4F-benzoil-TN-14003 100 nM.

La FIG. 8 muestra la actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la reacción de DTH de ratón inducida por SRBC. El eje vertical muestra el aumento del espesor de las almohadillas plantares por hinchazón (valor medio \pm margen estándar de error, n=7). Empezando por la izquierda, muestra el resultado cada grupo de administración de PBS (control), grupo de administración de 48 μ g al día de 4F-benzoil-TN-14003, grupo de administración de 24 μ g al día de 4F-benzoil-TN-14003 y grupo de administración de 120 μ g al día de 4F-benzoil-TN-14003. * es $P \leq 0,025$ (comparación con grupo de administración de PBS; prueba de Williams).

La FIG. 9 muestra los efectos de medicinas conocidas contra artritis por colágeno de ratón.

La FIG. 9A muestra fluctuaciones en el peso corporal [eje vertical: aumento de peso corporal (g) (valor medio \pm margen estándar de error, n = 8), eje horizontal: días después del refuerzo];
La FIG. 9B muestra fluctuaciones de la incidencia de la enfermedad [eje vertical: incidencia (%) (n=8), eje horizontal: días después del refuerzo];

La FIG. 9C muestra fluctuaciones de la puntuación de artritis [eje vertical: puntuación de artritis (valor medio \pm margen estándar de error, n=8), eje horizontal: días después del refuerzo];

La FIG. 9D muestra fluctuaciones del espesor del tobillo [eje vertical: espesor del tobillo (mm) (valor medio \pm margen estándar de error, n = 8), eje horizontal: días después del refuerzo]. □ grupo de ratones normales, ■ grupo de no administración de fármaco (control), Δ: grupo de administración de indometacina, ▲ grupo de administración de etotrexato, ● grupo de administración de FK506;

La FIG. 9E muestra cada efecto del fármaco sobre la hinchazón de las patas traseras 2 semanas después del refuerzo [eje vertical: peso de las patas traseras (mg) (cantidad promedio \pm margen estándar de error, n = 8)]; y

La FIG. 9F muestra cada efecto del fármaco sobre el valor de anticuerpo anti-IgG2a de colágeno II bovino 2 semanas después del refuerzo [eje vertical: valor de anticuerpo (A450) (valor medio \pm margen estándar de error, n=8)] [Empezando por la izquierda, muestra grupo de ratones normales, grupo de no administración de fármaco (control), grupo de administración de indometacina (IND), grupo de administración de metotrexato (MTX), grupo de administración de FK506]. ## es $P \leq 0,01$ (comparación con el grupo de ratones normales; prueba de la t), * y ** muestran respectivamente $P \leq 0,05$ y $P \leq 0,01$ (comparación con grupo de no administración de fármaco; prueba de Dunnett).

La FIG. 10 muestra la actividad de 4F-benzoil-TN-14003 sobre la artritis inducida por colágeno de ratón.

la FIG. 10A muestra fluctuaciones del peso corporal [eje vertical: peso corporal (g) (valor medio \pm margen estándar de error), eje horizontal: días después del refuerzo],

la FIG. 10B muestra fluctuaciones de la incidencia de enfermedad [eje vertical: incidencia (%), eje horizontal: días después del refuerzo],

la FIG. 10C muestra fluctuaciones de la puntuación de artritis [eje vertical: puntuación de artritis (valor medio \pm margen estándar de error), eje horizontal: días después del refuerzo],

la FIG. 10D muestra las fluctuaciones del espesor del tobillo [eje vertical: espesor del tobillo (mm) (valor medio \pm margen estándar de error), eje horizontal: días después del refuerzo]. □ grupo de ratones normales (n = 8), ■ grupo de no administración de fármaco (control) (n = 12), A: grupo de administración de 4F-benzoil-TN-14003 (n = 11),

la FIG. 10E muestra los efectos de 4F-benzoil-TN-14003 sobre la hinchazón de las patas traseras 2 semanas después del refuerzo [eje vertical: peso de las patas traseras (mg) (valor medio \pm margen estándar de error)], y

la FIG. 10F muestra los efectos de 4F-benzoil-TN-14003 sobre el valor de anticuerpo anti-IgG2a de colágeno II bovino 2 semanas después del refuerzo [eje vertical: valor de anticuerpo (A450) (valor medio \pm margen estándar de error)]. Empezando por la izquierda, muestra grupo de ratones normales (n = 8), grupo de no administración de fármaco (control) (n = 12), grupo de administración de 4F-benzoil-TN-14003 (n = 11)]. ## muestra $P \leq 0,01$ (comparación con el grupo de ratones normales; prueba de la t), y ** muestra $P \leq 0,01$ (comparación con grupo de no administración de fármaco; prueba de la t).

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Los péptidos descritos en esta memoria descriptiva tienen el extremo N (extremo amino) en la extremidad izquierda y el extremo C (extremo carboxilo) en la extremidad derecha según la práctica habitual de notaciones de péptidos.

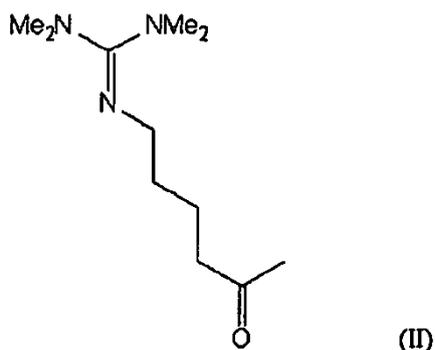
En esta memoria descriptiva y dibujos, las representaciones de aminoácidos, etc., por códigos de brevedad se hacen por el uso de los códigos prescritos por la Comisión de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB o por los códigos habitualmente usados en la técnica relevante. Ejemplos de tales códigos se muestran a continuación. Si un isómero óptico existe con respecto a un aminoácido, representa la forma L, a menos que se especifique expresamente de otro modo.

Gly o G :	glicina
Ala o A :	alanina
Val o V :	valina
Leu o L :	leucina
Ile o I :	isoleucina
Ser o S :	serina
Thr o T :	treonina
Cys o C :	cisteína
Met o M :	metionina
Glu o E :	ácido glutámico
Asp o D :	ácido aspártico
Lys o K :	lisina
Arg o R :	arginina
His o H :	histidina
Phe o F :	fenilalanina
Tyr o Y :	tirosina

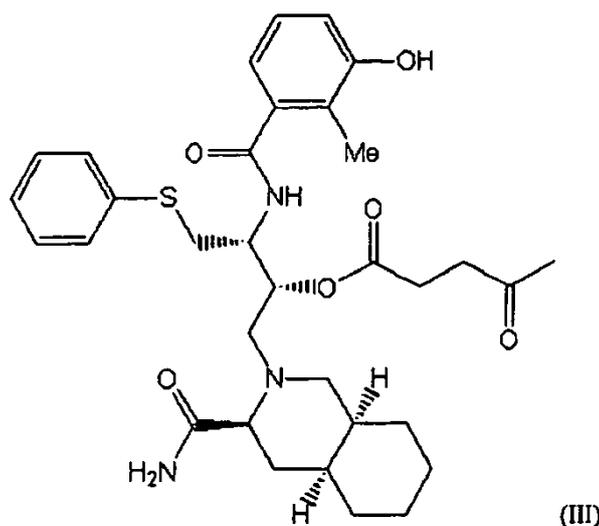
Trp o W:	triptófano
Pro o P:	prolina
Asn o N:	asparagina
Gln o Q:	glutamina
5 pGlu:	ácido piroglutámico
Nal:	3-(2-naftil)alanina
Cit:	citrulina
DLys:	D-lisina
DCit:	D-citrulina
10 DGlu:	ácido D-glutámico
Me:	grupo metilo
Et:	grupo etilo
Bu:	grupo butilo
15 Ph:	grupo fenilo

Los sustituyentes, grupo protector y reactivos frecuentemente usados en esta memoria descriptiva se indican por los siguiente códigos.

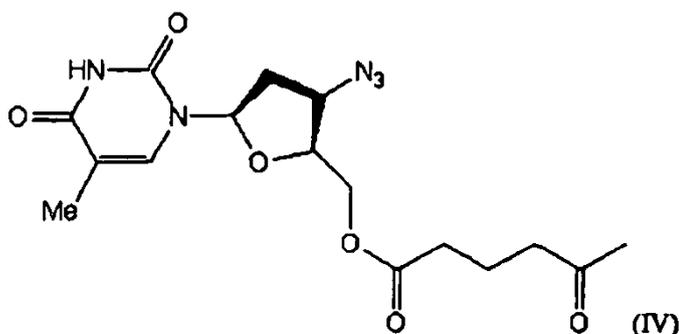
20 BHA:	benzhidrilamina
pMBHA:	p-metilbenzhidrilamina
Tos:	p-toluenosulfonilo
CHO:	formilo
HONB:	N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida
OcHex:	éster ciclohexílico
25 Bzl:	bencilo
Cl ₂ -Bzl:	dicloro-bencilo
Bom:	benciloximetilo
Z:	benciloxicarbonilo
30 Br-Z:	2-bromobenciloxicarbonilo
Boc:	t-butiloxicarbonilo
DCM:	diclorometano
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
DCC:	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
TFA:	ácido trifluoroacético
35 DIEA:	diisopropiletilamina
Fmoc:	N-9-fluorenilmetoxicarbonilo
DNP:	dinitrofenilo
Bom:	terc-butoximetilo
Trt:	tritilo
40 Ac:	acetilo
Guanil:	guanilo
Succinil:	succinilo
Glutaril:	glutarilo
TMguanil:	tetrametilguanilo
45 2F-benzoil:	2-fluorobenzoílo
4F-benzoil:	4-fluorobenzoílo
APA:	5-aminopentanoílo
ACA:	6-aminohexanoílo
desamino-Arg:	2-desamino-arginilo
50 desamino TMG-APA:	la siguiente fórmula (II)



nelfinaviril-succinilo: la siguiente fórmula (III)

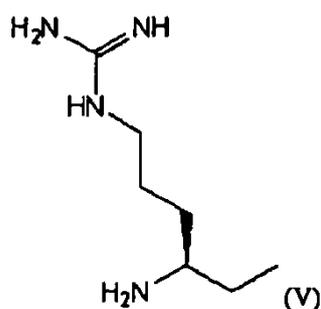


AZT-glutarilo: la siguiente fórmula (IV)



5

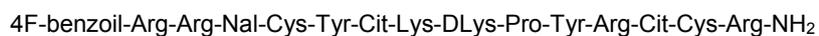
R-CH2: la siguiente fórmula (V)



10

En los aminoácidos de péptido del extremo N, [H-] indica que el grupo terminal amino no está derivatizado, y en los aminoácidos de péptido del extremo C, [-OH] indica que el grupo terminal carboxilo no está derivatizado. La presente invención proporciona medicinas preventivas y/o terapéuticas que contienen compuestos antagonistas de CXCR4 para cánceres y artritis reumatoide crónica. Los "compuestos antagonistas de CXCR4" muestran actividad anticancerígena inhibiendo antagonísticamente la interacción de CXCR4 y su ligando fisiológico CXCL12/SDF-1 α (por ejemplo, actividad inhibidora de la migración, actividad inhibidora de la invasión y actividad antimetastásica, etc.) o actividad de anti-artritis reumatoide crónica (por ejemplo, actividad inhibidora de la migración), y más particularmente incluyen el péptido representado por la siguiente fórmula o una sal del mismo (en lo sucesivo pueden denominarse conjuntamente "péptido(s) de la presente invención"):

15



20

en la que 4F-benzoílo muestra grupo 4-fluorobenzoílo, Arg muestra residuo de L-arginina, Nal muestra residuo de L-3-(2-naftil)alanina, Cys muestra residuo de L-cisteína, Tyr muestra residuo de L-tirosina, Cit muestra residuo de L-citrulina, Lys muestra residuo de L-lisina, DLys muestra residuo de D-lisina, Pro muestra residuo de L-prolina, DCit muestra residuo de D-citrulina, DGlu muestra residuo de ácido D-glutámico, Glu muestra residuo de ácido L-

glutámico, 2 residuos de cisteína están combinados por enlace disulfuro intramolecular, NH₂ muestra amidación por grupo amino.

5 Un péptido de la presente invención incluye un péptido o su sal que contiene la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia del péptido anteriormente mencionado. Aquí, "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" significa la secuencia de aminoácidos cualitativamente idéntica en la actividad del péptido (por ejemplo, la actividad inhibidora sobre la interacción de un ligando y un receptor) o la actividad anticancerígena del péptido (por ejemplo, actividad inhibidora de la migración, actividad inhibidora de la invasión y actividad antimetastásica), o la actividad de anti-artritis reumatoide (por ejemplo, actividad inhibidora de la migración) o similares. Por consiguiente, diferencias cuantitativas son aceptables a cierto grado (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a 100 veces, preferentemente 0,5 a 20 veces, o más preferentemente 0,5 a 2 veces). Por tanto, uno o más de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente pueden tener diferencias, en tanto que tengan cualquiera de las propiedades anteriormente mencionadas. Es decir, cualquier péptido (péptido de variante) resultante de la diferencia en la secuencia de aminoácidos tal como sustitución, 10 deleción o inserción (adición), etc., que provoca cualquier cambio grave (significativo) (es decir, un cambio cualitativamente diferente, o un cambio cualitativamente idéntico, pero cuantitativamente significativamente diferente) en la propiedad fisiológica o propiedad química del péptido original (no variante) se considera que es sustancialmente el mismo que el péptido original (no variante) que no tiene tal diferencia, y la secuencia de aminoácidos de tal péptido de variante se considera que es sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácidos del péptido original (no variante).

Es un hecho muy conocido que generalmente el cambio tal como sustitución, deleción o inserción (adición) de un aminoácido en una secuencia de péptidos no produce frecuentemente un gran cambio (notable) en la propiedad fisiológica o propiedad química de tal péptido. Tal sustitución se ejemplifica por la sustitución de un cierto aminoácido con otro aminoácido de naturaleza similar (propiedad), y generalmente se considera que si la sustitución se hace 25 entre aminoácidos que tienen mayor similitud en sus propiedades, entonces los cambios más pequeños producidos por tal sustitución son en las propiedades de péptidos pre-sustituídos.

Los aminoácidos se clasifican, usando la similitud de sus propiedades en cuanto a uno de los criterios, en las siguientes clases, por ejemplo: (i) aminoácidos no polares (hidrófobos) (ejemplos: alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, etc.); (ii) aminoácidos polares (neutros) (ejemplos: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, etc.); (iii) aminoácidos (básicos) que llevan carga eléctrica positiva (ejemplos: arginina, lisina, histidina, etc.); (iv) aminoácidos (ácidos) que llevan carga eléctrica negativa (ejemplos: ácido aspártico, ácido glutámico, etc.) y, por consiguiente, la sustitución de aminoácidos dentro de cada clase puede ser conservativa con respecto a la propiedad de un péptido (concretamente, sustitución que genera "sustancialmente las mismas" secuencias de aminoácidos).

En otras palabras, "sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos" puede incluir:

- 40 (i) secuencias de aminoácidos en las que 1 o más, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5, aminoácidos se sustituyeron por otros aminoácidos en las secuencias de aminoácidos indicadas en la fórmula anteriormente mencionada (Ia) a (Ij) y (1) a (58);
- 45 (ii) secuencias de aminoácidos en las que 1 a 7, preferentemente 1 a 5, más preferentemente 1 a 3, aminoácidos se delecionaron en las secuencias de aminoácidos indicadas en la fórmula anteriormente mencionada (Ia) a (Ij) y (1) a (58);
- (iii) secuencias de aminoácidos en las que 1 a 15, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5, aminoácidos se añadieron (insertaron) en las secuencias de aminoácidos indicadas en la fórmula anteriormente mencionada (Ia) a (Ij) y (1) a (58); o
- 50 (iv) péptidos que incluyen modificaciones a aminoácidos constitutivos (particularmente, las cadenas laterales de los mismos) entre los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos indicadas en (i), (ii) o (iii) antes, o ésteres de los mismos o sales de los mismos.

Un péptido de la presente invención, si y cuando la sustitución, deleción, inserción (adición), modificación, etc., de (i) a (iv) antes es intencionalmente o casualmente proporcionada en la secuencia de aminoácidos del mismo, puede 55 variarse a un péptido estable al calor o proteasa o un péptido de alta actividad que tiene actividad inhibidora más potenciada. Los péptidos de la presente invención también incluyen estos péptidos de variante o amidas de los mismos, ésteres de los mismos o sales de los mismos.

Además, se desvela un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en la fórmula anterior y el péptido que contiene la secuencia de aminoácidos que comparte la homología de aproximadamente el 50 al 99,9% (preferentemente, del 70 al 99,9%, más preferentemente del 90 al 99,9%) con la secuencia de aminoácidos anterior y que tiene las actividades de sustancialmente la misma naturaleza que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente o sales del mismo. Tales actividades incluyen, por ejemplo, actividades inhibidoras de los péptidos tales como una actividad inhibidora de la unión de un ligando con su receptor, una actividad inhibidora de la señalización. Actividades inhibidoras de "sustancialmente la misma naturaleza" significan que propiedades tales como la actividad inhibidora del ligando que se une al receptor son de la misma naturaleza.

Por tanto, es aceptable, incluso si no se encuentran niveles de eficacia no significativos de la actividad inhibidora de la unión del ligando al receptor, y no importa incluso si hay diferencias en pesos moleculares.

Los péptidos de la presente invención que incluyen el péptido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente pueden producirse por procedimientos convencionalmente conocidos de síntesis de péptidos. Para la síntesis de péptidos puede utilizarse tanto síntesis de péptidos en fase sólida como síntesis en fase líquida. Concretamente, un péptido esperado puede producirse condensando un péptido parcial capaz de constituir un péptido o un aminoácido con porciones restantes y, si el producto tiene un grupo protector, eliminando el grupo protector. Como procedimientos de condensación y eliminación de grupos protectores conocidos están incluidos los siguientes ejemplos (1) a (5):

- (1) M. Bodanszky y M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York (1966).
- (2) Schroeder y Luebke, The Peptide, Academic Press, Nueva York (1965).
- (3) N. Izumiya y col., Peptide Synthesis, Basics and Practice, Maruzen, Tokio (1975).
- (4) H. Yajima y S. Sakakibara, Seikagaku-Jikken-Koza I, Protein Chemistry IV, Tokyo Kagakudojin, Tokio, pp 205 (1977).
- (5) H. Yajima, Zoku-Iyaku-hin-no-Kaihatsu, vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Publishing Co., Tokio (1991).

Como procedimientos prácticos para la síntesis de péptidos pueden facilitarse los siguientes ejemplos:

Generalmente pueden usarse resinas comercialmente disponibles para la síntesis de polipéptidos. Tales resinas incluyen, por ejemplo, resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidroxilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-hidroxibencílico, resina de 4-metilbenzhidroxilamina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetamidometilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, resina de 4-2',4'-dimetoxifenil-Fmoc aminoetilfenoxi, etc. Usando tal resina, un aminoácido con grupo α -amino adecuadamente protegido y grupo funcional de cadena lateral se condensa sobre la resina con la secuencia del polipéptido esperado según procedimientos de condensación convencionalmente conocidos. En la última etapa de la reacción, el polipéptido se quita de la resina y simultáneamente se eliminan diversos grupos protectores, y luego, llevando a cabo reacción de formación de enlaces disulfuro intramoleculares en disolución altamente diluida, se obtiene el polipéptido esperado o amida del mismo. Para la condensación anteriormente mencionada del aminoácido protegido pueden usarse diversos reactivos activados utilizables para la síntesis de polipéptidos, pero es particularmente mejor usar carboxiimididas. Entre tales carboxiimididas están DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, etc. Para la activación por éstos, junto con aditivos inhibidores de la racemización (por ejemplo, HOBt, HOOBt), un aminoácido protegido se añade directamente a la resina, o después de activar el aminoácido protegido como anhídrido de ácido simétrico o éster de HOBt o éster de HOOBt, puede añadirse a la resina de éster.

Los disolventes usados para la activación de aminoácidos protegidos y la condensación con resinas pueden elegirse de entre los disolventes conocidos por ser utilizables para reacciones de condensación de polipéptidos. Por ejemplo, se usan amidas ácidas tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y N-metilpirrolidona, hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno y cloroformo, alcoholes tales como trifluoroetanol, sulfóxidos tales como sulfóxido de metilo, éteres tales como piridina, dioxano y tetrahydrofurano, nitrilos tales como acetonitrilo y propionitrilo, ésteres tales como acetato de metilo y acetato de etilo, o mezclas apropiadas de los anteriores. Un disolvente usado para la activación de un aminoácido protegido o su condensación con resina puede seleccionarse de entre los disolventes conocidos por ser utilizables para condensar reacciones de polipéptidos. La temperatura de reacción se fija apropiadamente dentro del alcance conocido por aplicarse a reacciones formadoras de enlaces de polipéptido, normalmente a -20°C a 50°C . Los derivados de aminoácidos activados se usan normalmente a un exceso de 1,5 a 4 veces. Según el resultado de pruebas que adoptan la reacción de ninhidrina, si la condensación es insuficiente, la repetición de reacciones de condensación sin eliminar grupos protectores puede conducir a condensación suficiente. Si se obtiene condensación suficiente por la repetición de reacciones, los aminoácidos sin reaccionar pueden acetilarse usando anhídrido acético o acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino usado como componentes incluyen, por ejemplo, Z, Boc, terc-pentiloxi-carbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo, Fmoc, etc. El grupo carboxilo puede protegerse, por ejemplo, por esterificación de alquilo (por ejemplo, esterificación de alquilo de cadena lineal, de ramificación o circular de metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, 2-adamantilo, etc.), esterificación de aralquilo (por ejemplo, éster bencílico, éster 4-nitrobencílico, éster 4-metoxibencílico, éster 4-clorobencílico, esterificación de benzhidrido), esterificación de fenacilo, hidracidación de bencilcarbonilo, hidracidación de terc-alilbutoxicarbonilo, hidracidación de tritilo, etc. El grupo hidroxilo de serina puede protegerse, por ejemplo, por esterificación o eterificación. Los grupos adecuados para esta eterificación incluyen, por ejemplo, grupos derivatizados de ácido carboxílico tales como grupo alcanoilo inferior tal como grupo acetilo, grupo aroilo tal como grupo benzoilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo etoxicarbonilo. Los grupos adecuados para eterificación incluyen, por ejemplo, grupo bencilo, grupo tetrahidropiranilo, grupo terc-butilo, etc. Como grupos protectores del grupo OH fenólico de tirosina se usan, por ejemplo, Bzl, Cl2-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z, terc-butilo, etc. Como grupos protectores de imidazol de

histidina se usan, por ejemplo, Tos, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt, Fmoc, etc.

5 Componentes con grupos carboxilo activados incluyen se usan, por ejemplo, anhídrido de ácido correspondiente, azida, éster activo [éster de alcohol (por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftalimida, HOBt)]. Componentes con grupo amino activado incluyen, por ejemplo, la amida fosfórica correspondiente. Como procedimientos para quitar (eliminar) grupos protectores se usan, por ejemplo, reducción catalítica en corriente de aire con hidrógeno en presencia de un catalizador tal como Pd-negro o Pd-carbón, tratamiento ácido por fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético o una mezcla de los mismos, etc., tratamiento con base por diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperadina, etc., y reducción por sodio en amoníaco líquido. La reacción de eliminación por el tratamiento con ácido anteriormente mencionado se hace generalmente a la temperatura de aproximadamente -20°C a 40°C, pero en el tratamiento con ácido es eficaz añadir un agente de atrapamiento de cationes tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditiol, 1,2-etanoditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo usado como grupo protector de imidazol de histidina se elimina por tratamiento con tiofenol. El grupo formilo usado como grupo protector de indol de triptófano se elimina por eliminación de protección por el tratamiento con ácido anteriormente mencionado en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol, etc., y también se elimina por tratamiento alcalino por disolución diluida de hidróxido sódico, amoníaco diluido, etc.

20 Grupo de protección y protector de grupos funcionales que no van a participar en la reacción de componentes, y eliminación de tal grupo protector, y activación de grupos funcionales que van a participar en la reacción, etc., pueden seleccionarse apropiadamente de entre grupos convencionalmente conocidos o medidas convencionalmente conocidas. Como procedimientos alternativos para obtener amidas de polipéptidos hay, por ejemplo, un procedimiento para fabricar, después de amidar y proteger el grupo α -carboxilo del aminoácido del extremo carboxi y luego extender la cadena de péptido a la longitud de cadena deseada sobre el lado del grupo amino, un polipéptido que elimina el grupo protector del grupo α -amino del extremo N de tal cadena de péptido y un polipéptido que elimina el grupo protector del grupo carboxilo del extremo C, y luego estos dos péptidos se condensan en el disolvente mixto anteriormente mencionado. Los detalles de la reacción de condensación son los mismos que se han descrito anteriormente. Después de purificar el polipéptido protegido obtenido por la condensación, el polipéptido bruto deseado puede obtenerse eliminando todos los grupos protectores por el procedimiento anteriormente mencionado. Habiendo purificado este polipéptido bruto usando diversos procedimientos de purificación conocidos, si la fracción principal se liofiliza, puede obtenerse un tipo de amida del polipéptido deseado. Para conseguir un tipo de éster del polipéptido, por ejemplo, preparar un éster de aminoácido condensando el grupo α -carboxilo del aminoácido del extremo carboxi con los alcoholes deseados y luego el tipo de éster del polipéptido deseado puede obtenerse en la misma forma que el tipo de amida del polipéptido.

Después de la reacción, los péptidos de la presente invención pueden purificarse y aislarse combinando procedimientos de purificación usuales tales como extracción con disolvente, destilación, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos, re-cristalización, etc. Si un péptido obtenido por los procedimientos anteriormente mencionados es un tipo libre de sal, puede convertirse en una sal adecuada mediante procedimientos conocidos, o si tal péptido es una sal, puede convertirse en un tipo libre de sal mediante procedimientos conocidos.

Preferentemente, los nuevos péptidos de la presente invención que tienen la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente pueden fabricarse mediante los procedimientos descritos en los ejemplos prácticos mencionados más adelante o procedimientos similares. Por tanto, los péptidos de la presente invención pueden fabricarse mediante los procedimientos descritos en el panfleto de publicación internacional nº 02/20561 o procedimientos similares.

En el supuesto caso de que los péptidos de la presente invención se usen como fármacos humanos o fármacos veterinarios pueden aplicarse usos usuales. Por ejemplo, según se necesite, pueden usarse por la vía oral en las formas de comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, elixires, formulaciones micro-encapsuladas, etc., o por la vía parenteral en las formas inyectables de disoluciones estériles preparadas de agua u otro líquido farmacológicamente aceptable, suspensiones, etc. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden fabricarse como fármacos incorporando vehículos fisiológicamente aceptables, compuesto aromatizante, excipientes, vehículos, conservantes, estabilizadores, aglutinantes en las formas de formulación de dosificación unitaria requeridas para la fabricación farmacéutica generalmente aceptada. La cantidad de cualquier principio activo en tales fármacos debe ser la cantidad óptima dentro del alcance instruido.

Aditivos que pueden incorporarse en comprimidos, cápsulas, etc., incluyen, por ejemplo, aglutinantes tales como gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto y goma arábiga, agentes de dilución tales como celulosa cristalina, agentes de hinchamiento tales como almidón de maíz, gelatina y ácido alginico, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, edulcorantes tales como sacarosa, lactosa o sacarina, y aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza. Si la forma de preparación es cápsulas, pueden contener un vehículo líquido tal como aceite, además de los materiales anteriormente mencionados. La composición estéril para inyección puede formularse según prácticas de fabricación farmacéutica usuales, disolviendo o suspendiendo principios activos o aceites vegetales naturales tales como aceite de sésamo y aceite de copra en vehículos tales como disolventes para inyección.

Como disoluciones acuosas para inyecciones pueden usarse, por ejemplo, disoluciones isotónicas que contienen solución salina fisiológica, glucosa y otros agentes adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol, cloruro sódico, etc.), y también pueden usarse junto con un agente solubilizante adecuado tal como alcohol (por ejemplo, etanol), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), tensioactivo no iónico (por ejemplo, Polisorbate 80™, (HCO-50), etc. Disoluciones aceitosas incluyen aceite de sésamo, aceite de soja, etc., y pueden usarse junto con agentes solubilizantes tales como benzoato de bencilo y alcohol bencílico. También pueden combinarse con un agente de tamponamiento (por ejemplo, disolución de tampón fosfato, disolución de tampón acetato sódico), un agente calmante (por ejemplo, cloruro de benzalconio, clorhidrato de procaína, etc.), un estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol, etc.), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol, etc.), un antioxidante, etc. Una inyección preparada se carga estérilmente en una ampolla.

Las preparaciones farmacéuticas fabricadas como antes son seguras y de baja toxicidad y, por consiguiente, pueden administrarse a, por ejemplo, seres humanos y mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, cobayas, conejos, ovejas, cerdos, vacas, gatos, perros, monos, babuinos, chimpancés, etc.).

La dosis de un péptido de la presente invención se diferencia dependiendo de la condición de enfermedad, etc. La dosis en administración por vía oral es normalmente aproximadamente 0,1 a 1000 mg una vez por 60 kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 1,0 a 500 mg, y más preferentemente aproximadamente 1,0 a 200 mg. La dosis única en administración parenteral por 60 kg de peso corporal se diferencia dependiendo del sujeto de administración, condición de enfermedad, procedimiento de administración, etc.; por ejemplo, en caso de inyección, puede administrarse intravenosamente, normalmente aproximadamente 0,01 a 300 mg, preferentemente aproximadamente 0,1 a 200 mg, y más preferentemente aproximadamente 0,1 a 100 mg una vez. Para otros animales puede administrarse la dosis basada en 60 kg de peso corporal.

Los péptidos de la presente invención tienen una actividad anticancerígena, es decir, una actividad para inhibir el movimiento de células cancerosas y una actividad inhibidora de metástasis de cáncer. Es decir, los péptidos de la presente invención, como se ha visto claramente en los ejemplos prácticos mencionados más adelante, pueden usarse como fármacos para la prevención y terapia de cánceres, especialmente metástasis de cáncer, ya que tienen una actividad inhibidora de metástasis de cáncer. Por consiguiente, los péptidos de la presente invención como fármacos anticancerígenos son útiles para la mejora, prevención y terapia de cáncer oral, cáncer de garganta, cáncer de labio, cáncer lingual, cáncer gingival, cáncer nasofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer del intestino grueso que incluye cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer nasal, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de tejido blando, cáncer de piel, melanoma, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de pene, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer cerebral, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia, etc. Por tanto, los péptidos de la presente invención tienen una actividad anti-artritis reumatoide crónica, es decir, un efecto inhibidor sobre el movimiento de linfocitos T. En otras palabras, los péptidos de la presente invención, como se ha observado claramente en los ejemplos prácticos mencionados más adelante, pueden usarse como fármacos para la prevención y terapia de artritis reumatoide crónica, ya que tienen una acción inhibidora sobre el movimiento de linfocitos T. Por tanto, los péptidos de la presente invención son útiles como fármacos para la mejora, prevención y terapia de artritis reumatoide crónica.

Es muy sabido que los compuestos antagonistas de CXCR4 tienen una actividad antivírica. Por consiguiente, sería obvio para la industria relacionada que los péptidos de la presente invención pudieran usarse como fármacos preventivos y terapéuticos para enfermedad infecciosa vírica (por ejemplo, SIDA, SRAG, etc.).

El uso de los péptidos de la presente invención como fármacos anticancerígenos puede hacerse concomitantemente con otros fármacos anticancerígenos (por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos, fármacos inmunoterapéuticos, o fármacos que inhiben la actividad de factores de crecimiento celular y sus receptores), etc. (denominados más adelante "fármacos concomitantes").

Un péptido de la presente invención presenta una actividad anticancerígena beneficiosa cuando se usa en una forma de preparación única, pero la actividad puede potenciarse adicionalmente cuando se usa junto con uno o más de los fármacos concomitantes anteriormente mencionados (uso concomitante de múltiples fármacos).

Como dichos "fármacos quimioterapéuticos" pueden ejemplificarse fármacos alquilantes, antimetabolitos, antibióticos anticancerígenos y fármacos anticancerígenos derivados de plantas.

Incluidos en los ejemplos de "fármacos alquilantes" están mostaza nitrogenada, clorhidrato de N-óxido de mostaza nitrogenada, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, carbocina, tosilito de improsulfano, busulfano, clorhidrato de nimustina, mitobronitol, melfalano, dacarbazina, ranimustina, fosfato de sodio de estramustina, trietilenmelamina, carmustina, lomustina, estreptozocina, pipobromano, etoglúcido, altretamina, ambamustina, clorhidrato de dibrospidio, fotemustina, prednimustina, pumitepa, ribomustina, temozolomida, treosulfano, trofosfamida, zinostatina estimalámero, carbocina, adzelecina, cistemustina, bizelesina, complejo de platino (carboplatino, cisplatino, miboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, etc.).

“Antimetabolitos” incluyen, por ejemplo, mercaptopurina, ribósido de 6-mercaptopurina, tioinosina, metotrexato, enocitabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, clorhidrato de ancitabina, agentes de 5-FU (por ejemplo, fluorouracilo, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, galocitabina, emitefur, etc.), aminopterina, leucovorina de calcio, tabloid, butocina, folinato de calcio, levofolinato de calcio, cladribina, emitefur, fludarabina, gemcitabina, hidroxycarbamida, pentostatina, piritrexim, idoxuridina, mitoguzaon, tiazofurina, ambamustina y gemcitabina.

“Antibióticos anticancerígenos” incluyen, por ejemplo, agentes anticancerígenos de antraciclinas (clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de daunorubicina, clorhidrato de aclarubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de epirubicina, etc.), actinomicina D, actinomicina C, mitomicina C, cromomicina A3, clorhidrato de bleomicina, sulfato de bleomicina, sulfato de pleomicina, neocarzinostatina, mitramicina, sarcomicina, carzinofilina, mitotano, clorhidrato de zorbicina, clorhidrato de mitoxantrona y clorhidrato de idarubicina.

“Agentes anticancerígenos derivados de plantas” incluyen, por ejemplo, agentes anticancerígenos de alcaloides de la vinca (sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, vinorelbina, etc.), agentes anticancerígenos de taxano (paclitaxel, docetaxel, etc.), etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido y vinorelbina.

Los “factores de crecimiento celular” en dichos “fármacos que inhiben la actividad de factores de crecimiento celular y sus receptores” puede ser cualquier material que promueva el crecimiento de células, e incluyen un factor que presenta su actividad a baja concentración por la interacción con su receptor en el péptido de menos de 20.000 de peso molecular. Específicamente, incluyen (1) EGF (factor de crecimiento epidérmico) o un material que tiene sustancialmente la misma actividad que EGF (por ejemplo, EGF, ligando de HER2, etc.), (2) insulina o un material que tiene sustancialmente la misma actividad que la insulina [por ejemplo, insulina, IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) -1, IGF-2, etc.], (3) FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) o un material que tiene sustancialmente la misma actividad que FGF [por ejemplo, FGF ácido, FGF básico, KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), FGF-10, etc.], (4) otros factores de crecimiento celular [por ejemplo, CSF (factor estimulante de colonias), EPO (eritropoyetina), IL-2 (interleucina-2), NGF (factor de crecimiento nervioso), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF β (factor de crecimiento transformante β), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), etc.].

Dichos “receptores de factores de crecimiento celular” pueden ser cualquier receptor que tenga la capacidad de unión con los factores de crecimiento celular anteriormente mencionados. Específicamente incluyen receptor de EGF, HER2, receptor de insulina, receptor de IGF, receptor 1 de FGF o receptor 2 de FGF, receptor de HGF (c-met), receptor de VEG, receptor de SCF (c-kit).

Dichos “fármacos que inhiben la actividad de factores de crecimiento celular” incluyen herceptina (anticuerpo para HER2), GLEEVEC (c-met, c-kit, inhibidor de ab1), Iressa (inhibidor de receptores de EGF), etc.

Además de los fármacos anteriormente mencionados, puede usarse inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecan, topotecan, etc.), inhibidor de la topoisomerasa II (por ejemplo, sobuzoxano, etc.), inhibidor de la angiogénesis, etc.

En el caso de uso de un péptido de la presente invención como fármaco preventivo y/o terapéutico, puede usarse concomitantemente con otro(s) fármaco(s) preventivo(s) y/o terapéutico(s) para artritis reumatoide. Fármacos de tal uso concomitante incluyen, por ejemplo, esteroides antiinflamatorios (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona, metil-prednisolona, dexametasona, betametasona, etc.), fármacos antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos (por ejemplo, indometacina, diclofenac, loxoprofeno, ibuprofeno, aspirina, piroxicam, sulindac, etc.), o formulaciones de ácido hialurónico (por ejemplo, hialuronato de sodio, etc.), inhibidores de la COX-II, etc.

Los péptidos de la presente invención presentan un actividad anti-artritis reumatoide crónica eficaz en forma de preparación única, pero el efecto puede potenciarse adicionalmente por el uso concomitante (uso de múltiples fármacos) junto con uno o más de los fármacos concomitantes anteriormente mencionados.

En el uso concomitante de los péptidos de la presente invención y fármacos concomitantes, el tiempo de administración de los péptidos de la presente invención y un fármaco concomitante no está limitado, y un péptido de la presente invención y un fármaco concomitante pueden administrarse al sujeto al mismo tiempo o en momentos diferentes. La dosis de un fármaco concomitante puede seguir la dosis usual clínicamente adoptada, y puede determinarse apropiadamente dependiendo del sujeto de administración, vía de administración, condiciones de enfermedad, combinación, etc.

El modo de administración de un péptido de la presente invención y un fármaco concomitante no está particularmente limitado, y es aceptable si un polipéptido de la presente invención o una sal del mismo y un fármaco concomitante se combinan en el momento de administración. Tal modo de administración puede ser, por ejemplo, (1) la administración de una única preparación formulada por la combinación simultánea de un péptido de la presente invención y un fármaco concomitante, (2) la administración simultánea por la misma vía de administración de dos fármacos diferentes - siendo uno un fármaco formulado usando un péptido de la presente invención y siendo el otro un fármaco concomitante, (3) la administración por la misma ruta en momentos diferentes de dos fármacos

5 diferentes - siendo uno un fármaco formulado usando un péptido de la presente invención y siendo el otro un fármaco concomitante, (4) la administración simultánea por diferentes vías de dos fármacos diferentes - siendo uno un fármaco formulado usando un péptido de la presente invención y siendo el otro un fármaco concomitante, (5) la administración por diferentes vías en momentos diferentes de dos fármacos diferentes - siendo uno un fármaco formulado usando un péptido de la presente invención y siendo el otro un fármaco concomitante (por ejemplo, la administración de un péptido de la presente invención seguido de un fármaco concomitante, o viceversa), etc. Estos modos de administración se denominan en conjunto más adelante "fármaco(s) concomitante(s) de la presente invención".

10 Cualquier fármaco concomitante de la presente invención tiene baja toxicidad y, por consiguiente, puede administrarse con seguridad por vía oral o parenteralmente (por ejemplo, local, recto, vena, etc.) en forma de composiciones farmacéuticas preparadas mezclando un péptido de la presente invención y/o el fármaco concomitante anteriormente mencionado con un vehículo farmacológicamente aceptable según un procedimiento conocido en la técnica. Tales composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos de azúcar y comprimidos recubiertos de película), polvos, gránulos, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), disoluciones, inyecciones, supositorios, formulaciones de liberación sostenida, etc. Una inyección puede administrarse al interior o sitio proximal de un tumor o directamente a la lesión por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorgánica, intranasal, intradérmica, por goteo en el ojo, intracerebral, intrarrectal, intravaginal o intraperitoneal.

20 Vehículos farmacológicamente aceptables idénticos a aquellos usados para las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas de la presente invención pueden usarse en la fabricación de los fármacos concomitantes de la presente invención.

25 La relación de combinación de cualquiera de los péptidos de la presente invención y un fármaco concomitante que pertenece a los fármacos concomitantes de la presente invención puede determinarse apropiadamente dependiendo del sujeto que va a administrarse, vías para administración, condiciones de enfermedad, etc.

30 El contenido de un fármaco concomitante que pertenece a los fármacos concomitantes de la presente invención varía dependiendo de las formas de preparación del fármaco. Tiene normalmente aproximadamente del 0,01 al 100% en peso en la preparación completa, o preferentemente aproximadamente del 0,1 al 50% en peso, o lo más preferentemente de aproximadamente el 0,5 al 20% en peso.

35 El contenido de un aditivo tal como un vehículo en los fármacos concomitantes de la presente invención varía dependiendo de las formas de preparación del fármaco. Tiene normalmente de aproximadamente el 1 al 99,9% en peso en la preparación completa, o preferentemente de aproximadamente el 10 al 90% en peso.

40 La presente invención se describe en más detalle por los siguientes ejemplos prácticos que, sin embargo, no limitarán el alcance de la presente invención. De los ejemplos de fabricación, sólo el Ejemplo de fabricación 54 forma parte de la presente invención.

Ejemplo de fabricación 1: Fabricación del polipéptido TC 14003

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14003)

45 1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con TC14003:

50 Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina Alko unido a la primera arginina de la posición 14 (Fmoc-Arg(Pbf) - resina Alko) por 20% de piperidina/DMF, se añadió Fmoc-Cys(Trt)-OH (2,5 eq) de la posición 13, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)).

2. Introducción de aminoácidos de la posición 12 a la posición 1:

55 Similarmente a lo anterior, residuos de Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, DLys(Boc), Lys(Boc), Cit, Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg (Pbf), Arg(Pbf) se introdujeron secuencialmente en la resina dando la resina de polipéptido protegida.

3. Desprotección y escisión del polipéptido de la resina y purificación:

60 Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanodiol (300 eq)) a 25°C durante 2 horas. La resina se separó por filtración de la mezcla de reacción, se lavó dos veces con TFA, la mezcla del filtrado y la disolución de lavado se sometió a concentración a vacío, el residuo restante se añadió a éter seco enfriado en agua, la precipitación resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se lavó con éter frío, se disolvió en ácido acético 1 N y se diluyó con agua destilada.

65

4. Ciclado por oxidación con aire:

La disolución en diluida agua del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C18 AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

Ejemplo de fabricación 2: Fabricación de TC14005

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC 14005)

TC14005 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, DLys (Boc) se sustituyó por DCit de la posición 8 y Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 3: Fabricación de TC 14011

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14011)

TC14011 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, DLys (Boc) se sustituyó por DCit de la posición 8 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 4: Fabricación de TC14013

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (TC14013)

TC14013 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 5: Fabricación de TC14015

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14015)

TC14015 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 6: Fabricación de TC14017

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14017)

TC14017 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, DLys (Boc) se sustituyó por DCit de la posición 8, Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6 y Arg(Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 7: Fabricación de TC14019

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (TC14019)

TC14019 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11, DLys(Boc) se sustituyó por DCit de la posición 8 y Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 8: Fabricación de TC14021

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (TC14021)

TC14021 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11, Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6 y Arg(Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 9: Fabricación de TC14012

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14012)

1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con TC14012:

Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de Fmoc-amida Rink por 20% de piperidina/DMF, se añadió Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,5 eq) correspondiente a la posición 14, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)).

5 2. Introducción de aminoácidos de la posición 13 a la posición 1:
 Similarmente a lo anterior, los residuos Cys(Trt), Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, DCit, Lys(Boc), Cit, Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg(Pbf), Arg(Pbf) se introdujeron secuencialmente en la resina de amida Rink, y se obtuvo la resina de polipéptido protegida.

3. Desprotección y escisión del polipéptido de la resina y purificación:

15 Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas. La resina se separó por filtración de la mezcla de reacción, se lavó por TFA dos veces, la mezcla del filtrado y la disolución de lavado se sometió a concentración a vacío, el residuo restante se añadió a éter seco enfriado en agua, la precipitación resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se lavó con éter frío, se disolvió en ácido acético 1 N y se diluyó con agua destilada.

4. Ciclado por oxidación con aire:

25 La disolución en agua diluida del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C18 AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

30 Ejemplo de fabricación 10: Fabricación de TC14014

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14014)

35 TC14014 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11 y DCit se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 11: Fabricación de TC 14016

40 H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14016)

40 TC14016 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, DCit se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Arg(Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

45 Ejemplo de fabricación 12: Fabricación de TC14018

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14018)

50 TC14018 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6 y Arg(Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 13: Fabricación de TC 14020

55 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14020)

55 TC14020 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11 y Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

60 Ejemplo de fabricación 14: Fabricación de TC14022

H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14022)

65 TC14022 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, Arg (Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 11, DCit se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8, Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la

posición 6 y Arg(Pbf) se sustituyó por Cit de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 15: Fabricación de TA14001, TA14005 - TA14009, TC14001 y TC14004

- 5 H-Ala-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14001)
 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Ala-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14005)
 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Ala-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14006)
 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DAla-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14007)
 10 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Ala-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14008)
 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Ala-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TA14009)
 H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TC14001)
 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Cit-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TC14004)
- 15 TA14001, TA14005 - TA14009, TC14001 y TC14004 enumerados anteriormente pueden fabricarse por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1 ó 9 con sustituciones de aminoácidos.

Ejemplo de fabricación 16: Fabricación de AcTC14003, AcTC14005, AcTC14011-AcTC14022

- 20 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14003)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14005)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14011)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14013)
 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14015)
 25 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14017)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14019)
 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-OH (AcTC14021)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTC14012)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit -Cys-Arg-NH₂ (AcTC14014)
 30 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTC14016)
 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTC14018)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTC14020)
 Ac-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTC14022)
- 35 TC14003, TC14005, TC14011 - TC14022 acetilados se fabricaron por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 1 a 14. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq) /DMF, y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 2 horas (siendo en el caso del extremo C ácido carboxílico) o durante 3 horas (siendo en el caso del extremo C amida).
- 40

Ejemplo de fabricación 17: Fabricación del polipéptido TE14005

- 45 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TE14005)
1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con TE14005:
- Después de eliminar el grupo Fmoc de Fmoc-Arg(Pbf)-resina Alko (0,74 mmol/g), 270 mg (0,2 mmoles) unidos a la primera arginina de la posición 14 por 20% de piperidina/DMF, se añadió Fmoc-Cys(Trt)-OH (2,5 eq) correspondiente a la posición 13, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)).
- 50
2. Introducción de aminoácidos de la posición 12 a la posición 1:
- 55 Similarmente a lo anterior, los residuos de Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, DGlu(0-t-Bu), Lys(Boc), Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg(Pbf), Arg(Pbf) se introdujeron secuencialmente en la resina, y se obtuvo la resina de polipéptido protegida.
3. Desprotección y escisión del polipéptido de la resina y purificación:
- 60 Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida (200 mg) por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se trató por 10 ml de mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 2 horas. La resina se separó por filtración de la mezcla de reacción, se lavó dos veces con 1 ml de TFA, la mezcla del filtrado y la disolución de lavado se sometió a concentración a vacío, el residuo restante se añadió a 30 ml de éter seco enfriado
- 65

con agua, el sedimento resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se purificó con éter frío, se disolvió en 50 ml de ácido acético 1 N y se diluyó a 250 ml con agua destilada.

5 4. Ciclado por oxidación con aire:

La disolución en agua diluida del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C18 AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

Rendimiento: 24,1 mg (7 sal de AcOH) (21,3%)

$[\alpha]_{D23,6} = -5,36$ (c 1,12, H₂O)

Espectro de masas por pulverización iónica (IS-MS): C₈₉H₁₃₆N₃₂O₂₀S₂

Valor calculado: 2038,38 Valor de medición real: 2038

(espectrometría de masas de triple etapa API-III E (Sciex))

Ejemplo de fabricación 18: Fabricación del polipéptido TE14001

20 H-OGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-CR-Cys-Arg-OH (TE14001)

TE14001 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Arg(Pbf) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 1, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

25

Ejemplo de fabricación 19: Fabricación del polipéptido TE14002

H-Arg-Glu-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TE14002)

30 TE14002 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Arg(Pbf) se sustituyó por Glu(O-t-Bu) de la posición 2, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

35

Ejemplo de fabricación 20: Fabricación del polipéptido TC14003

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TE14003)

TE 14003 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Arg(Pbf) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 6, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

40

Ejemplo de fabricación 21: Fabricación del polipéptido TE14004

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Glu-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TE14004)

45

TE14004 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Lys(Boc) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 7, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

50

Ejemplo de fabricación 22: Fabricación del polipéptido TE14006

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Glu-Cit-Cys-Arg-OH (TE14006)

TE14006 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys (Boc) de la posición 8 y Arg(Pbf) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 11, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

55

Ejemplo de fabricación 23: Fabricación del polipéptido TE14007

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Glu-OH (TE14007)

60

TE14007 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, en lugar de Fmoc-Arg(Pbf)-resina Alko unido a la primera arginina de la posición 14 se usó Fmoc-Glu(O-t-Bu)-resina Alko unido a ácido glutámico de la posición 14 y, por tanto, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

65

Ejemplo de fabricación 24: Fabricación del polipéptido TE14011

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TE14011)

5 1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con TE14011:

Después de eliminar el grupo Fmoc de Fmoc-resina de amida Rink por 20% de piperidina/DMF, se añadió Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,5 eq) correspondiente a la posición 14, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem. 34: 595 (1970)).

2. Introducción de aminoácidos de la posición 13 a la posición 1:

Similarmente a lo anterior, el residuo Cys(Trt), Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, OGlu(O-t-Bu), Lys(Boc), Cit, Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg(Pbf), Arg(Pbf) se introdujo secuencialmente en la resina de amida Rink, y se obtuvo la resina de polipéptido protegida.

3. Desprotección y escisión de polipéptido de la resina y purificación:

Después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanodiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas. La resina se separó por filtración de la mezcla de reacción, se lavó dos veces con TFA, la mezcla del filtrado y la disolución de lavado se sometió a concentración a vacío, el residuo restante se añadió a éter seco enfriado en agua, la precipitación resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se purificó con éter frío, se disolvió en ácido acético 1 N y se diluyó con agua destilada.

4. Ciclado por oxidación con aire:

La disolución en agua diluida del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C1B AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

Ejemplo de fabricación 25: Fabricación del polipéptido TE14012

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TE14012)

TE14012 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DCit de la posición 8 y Cit se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 6, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 26: Fabricación del polipéptido TE14013

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-DGlu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TE14013)

TE14013 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, Cit se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 6 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 27: Fabricación del polipéptido TE14014

H-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TE14014)

TE14014 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, Arg(Pbf) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 1 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 28: Fabricación del polipéptido TE14015

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-OGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TE14015)

TE14015 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, Tyr(t-Bu) se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 10 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 29: Fabricación del polipéptido TE14016H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-OGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ (TE14016)

5 TE14016 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, Cit se sustituyó por DGlu(O-t-Bu) de la posición 12 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 30: Fabricación del polipéptido AcTE14014 - AcTE14016

10 Ac-DGlu-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14014)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-CH-Lys-DGlu-Pro-DGlu-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14015)
 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-DGlu-Cys-Arg-NH₂ (AcTE14016)

15 Se fabricaron TE14014 - TE14016 acetilados por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 27 - 29. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq) /DMF, y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 31: Fabricación del polipéptido TF1

20 Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF1: AcTE14011)

25 TF1 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq) /DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 2 horas (siendo en el caso del extremo C ácido carboxílico) o durante 3 horas (siendo en el caso del extremo C amida).

Ejemplo de fabricación 32: Fabricación del polipéptido TF2Guanil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF2: guanil-TE14011)

35 TF2 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24.

40 Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se guaniló por tratamiento con 1H-pirazol-1-carboxamida (5 eq)-N,N-diisopropiletilamina (10 eq) /DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 33: Fabricación del polipéptido TF3TMguanil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF3: TMguanil-TE14011)

45 TF3 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se tetrametilguaniló por tratamiento con 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrafluoroborato de tetrametiluronio (5 eq) /DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 34: Fabricación del polipéptido TF4TMguanil-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-OGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF4: TMguanil-TE14011 (2-14))

55 TF4 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, no se condensó la arginina de la posición 1.

Ejemplo de fabricación 35: Fabricación del polipéptido TF5

60 4F-benzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHp (TF5: 4F-benzoil-TE14011)

TF5 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se condensó con ácido 4-fluorobenzoico (2,5 eq) por el procedimiento de DIPCDI-HOBt, y se

trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 36: Fabricación del polipéptido TF6

2F-benzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF6: 2F-benzoil-TE14011)

TF6 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por grupo protector por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se condensó con ácido 2-fluorobenzoico (2,5 eq) por el procedimiento de DIPCDI-HOBt y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 37: Fabricación del polipéptido TF7

APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF7: APA-TE14011 (2-14))

TF7 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, en lugar de Arg(Pbf) de la posición 1, Fmoc-ácido aminopentanoico se introdujo después de la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 38: Fabricación del polipéptido TF8

Desamino-R-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF8: desamino-R-TE14011 (2-14))

TF8 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, en lugar de Arg(Pbf) de la posición 1, Fmoc-ácido 5-aminopentanoico se introdujo después de la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Además, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se guaniló por tratamiento con 1H-pirazol-1-carboxamidina (5 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 39: Fabricación del polipéptido TF9

Guanil-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF9: guanil-TE14011 (2-14))

TF9 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 32. Sin embargo, no se condensó la arginina de la posición 1.

Además, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se guaniló por tratamiento con 1H-pirazol-1-carboxamidina (5 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 40: Fabricación del polipéptido TF10

Succinil-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF10: succinil-TE14011 (2-14))

TF10 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, no se condensó la arginina de la posición 1.

Por tanto, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se hemisucciniló por tratamiento con anhídrido succínico (5 eq)/piperidina y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 41: Fabricación del polipéptido TF11

Glutaril-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF11: glutaril-TE14011 (2-14))

TF11 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 40. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se hemiglutariló por tratamiento con anhídrido glutárico (5 eq)/piperidina y se trató con mezcla de

TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 42: Fabricación del polipéptido TF12

5 DesaminoTMG-APA-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF12: desaminoTMG-APA-TE 14011 (2-14))

10 TF12 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, en lugar de Arg(Pbf) de la posición 1, Fmoc-ácido 5-aminopentanoico se introdujo después de la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

15 Además, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se tetrametilguaniló por tratamiento con tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (5 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas .

Ejemplo de fabricación 43: Fabricación del polipéptido TF15

20 R-CH₂-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF15: R-CH₂NH-RTE 14011)

TF15 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, en la posición 1, Fmoc-Arg(Pbf)-H (aldehído) se condensó por amidación reductora (NaB(CN)H₃ (3 eq), AcOH (1 eq)/DMF) en lugar de la condensación de Fmoc-Arg(Pbf)-OH después de la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 2.

25 Ejemplo de fabricación 44: Fabricación del polipéptido TF17

H-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF17) (TF17: TE14011 (2-14))

30 TF17 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, no se condensó la arginina de la posición 1.

Ejemplo de fabricación 45: Fabricación del polipéptido TF18

35 TMguanil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF18: TMguanil-TC14012)

40 TF18 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se tetrametilguaniló por tratamiento con tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (5 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo de fabricación 46: Fabricación del polipéptido TF19

45 ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TF219: ACA-TC 14012)

TF19 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, a continuación de Arg(Pbf) de la posición 1, Fmoc-ácido 6-aminohexanoico se introdujo después de la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

50 Ejemplo de fabricación 47: Fabricación del polipéptido TF20

ACA-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH (TF20: ACA-T140)

55 TF20 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 17. Sin embargo, DGlu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Arg (Pbf) se sustituyó por Fmoc-ácido 6-aminohexanoico de la posición 1, respectivamente, después de la introducción de los aminoácidos de la posición 12 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 48: Fabricación del polipéptido TZ14011

60 H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-OLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TZ14011)

65 TZ14011 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 24. Sin embargo, OGLu(O-t-Bu) se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 y Lys (Boc) se sustituyó por Arg (Pbf) de la posición 7, respectivamente, durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 49: Fabricación del polipéptido AcTZ14011

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Arg-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTZ14011)

5 AcTZ14011 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 48. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

10 Ejemplo de fabricación 50: Fabricación del polipéptido TN14003

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TN14003)

15 TN14003 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, DCit se sustituyó por DLys(Boc) de la posición 8 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

Ejemplo de fabricación 51: Fabricación del polipéptido TN14005

H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (TN14005)

20 TN 14005 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 9. Sin embargo, Cit se sustituyó por Arg(Pbf) de la posición 6 durante la introducción de los aminoácidos de la posición 13 a la posición 1.

25 Ejemplo de fabricación 52: Fabricación del polipéptido AcTN14003

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTN14003)

30 AcTN14003 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 50. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

35 Ejemplo de fabricación 53: Fabricación del polipéptido AcTN14005

Ac-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (AcTN14005)

40 AcTN14005 se fabricó por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 51. Sin embargo, después de eliminar el grupo Fmoc de la resina de polipéptido protegida por tratamiento con 20% de piperidina/DMF, la resina de polipéptido resultante se acetiló por tratamiento con anhídrido acético (100 eq)-piridina (100 eq)/DMF y se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas.

45 Ejemplo de fabricación 54: Fabricación del polipéptido 4F-benzoil-TN14003

4F-benzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (4F-benzoil-TN14003)

1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con 4F-benzoil-TN14003:

50 Después de eliminar el grupo Fmoc de Fmoc-resina de amida Rink (0,34 mmol/g) 2,94 g (1 mmol) por 20% de piperidina/DMF, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,5 eq) se añadió correspondiente a la posición 14, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem. 34: 595 (1970)).

55 2. Introducción de aminoácidos de la posición 13 a la posición 1:

60 Similarmente a lo anterior, los residuos de Cys(Trt), Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, DLys(Boc), Lys(Boc), Cit, Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg(Pbf), Arg(Pbf) se introdujeron secuencialmente en la resina de amida Rink, ácido 4-fluorobenzoico (2,5 eq) se condensó en el último extremo N por el procedimiento de DIPCDI-HOBt y se obtuvo la resina de polipéptido protegida.

3. Desprotección y escisión del polipéptido de la resina y purificación:

65 La resina de polipéptido protegida (1 mmol) se trató por 270 ml de mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas. La resina se separó por filtración de la mezcla de reacción, se lavó dos veces con 5 ml de TFA, la mezcla del filtrado y la

disolución de lavado se sometió a concentración a vacío. El residuo restante se añadió a 300 ml de éter seco enfriado en agua, el sedimento resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se purificó con éter frío, se disolvió en 500 ml de ácido acético 1 N y se diluyó a 2,5 l por agua destilada.

5

4. Ciclado por oxidación con aire:

La disolución en agua diluida del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C18 AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

10

Rendimiento: 551,5 mg (6 sal de TFA) (19,4%)

$[\alpha]_{D28,6} = -10,25$ (c 0,39, H₂O)

15

Espectro de masas por pulverización iónica (IS-MS): C₉₇H₁₄₄FN₃₃O₁₉S₂

Valor calculado: 2159,52 Valor de medición real: 2161

(espectrometría de masas de triple etapa API-IIIIE (Sciex))

Ejemplo de fabricación 55: Fabricación del polipéptido 4F-benzoil-TE14011-Me

20

4-fluorobenzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHMe (4F-benzoil-TE14011-Me)

25

1. Síntesis de la resina de polipéptido protegida con 4F-benzoil-TE14011-Me:

Se añadió 4-sulfamilbutiril-resina AM NovaGel a Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4 eq) correspondiente a la posición 14 y, en CHCl₃, la reacción de condensación por procedimiento con PyBOP (3 eq)-DIPEA (6 eq) se realizó a 0°C (esta reacción de condensación se repitió dos veces). Después de eliminar el grupo Fmoc por 20% de piperidina/DMF se añadió Fmoc-Cys(Trt)-OH (2,5 eq) correspondiente a la posición 13, y la reacción de condensación por el procedimiento de DIPCDI-HOBt se realizó en DMF. El grado de progreso de la reacción de condensación se monitorizó por la prueba de ninhidrina de Kaiser, E. y col. (Anal. Biochem., 34: 595 (1970)).

30

Similarmente a lo anterior para la introducción de aminoácidos de la posición 12 a la posición 1, los residuos de Cit, Arg(Pbf), Tyr(t-Bu), Pro, DGlu(O-t-Bu), Lys(Boc), Cit, Tyr(t-Bu), Cys(Trt), Nal, Arg(Pbf), Arg(Pbf) se introdujeron secuencialmente en la resina de sulfamilbutirilo, se condensó ácido 4-fluorobenzoico (2,5 eq) en el último extremo N por el procedimiento de DIPCDI-HOBt dando la resina de polipéptido protegida.

35

2. Alquilamidación del extremo C, desprotección y escisión del polipéptido de la resina y purificación:

La resina de polipéptido protegida se cianometiló por tratamiento con ICH₂CN (40 eq), DIPEA (10 eq)/NMP (48 horas), luego se trató con metilamina (exceso) en THF/DMF y el polipéptido metilamidado del extremo C protegido se aisló de la resina. El polipéptido protegido se trató con mezcla de TMSBr 1 M-tioanisol/TFA (ácido trifluoroacético) (en presencia de m-cresol (100 eq), etanoditiol (300 eq)) a 25°C durante 3 horas. La disolución de reacción se sometió a concentración a vacío, el residuo restante se añadió a éter seco enfriado en agua, el sedimento resultante se separó del líquido del sobrenadante por sedimentación centrífuga y decantación. El residuo obtenido se purificó con éter frío, se disolvió en ácido acético 1 N y se diluyó con agua destilada.

45

3. Ciclado por oxidación con aire:

La disolución en agua diluida del polipéptido anteriormente mencionado se ajustó a pH 7,5 por agua amoniacal concentrada y se cicló por oxidación con aire ventilado. Esta disolución en agua se purificó por HPLC preparativa (columna COSMOSIL 5C18 AR-II: acetonitrilo-agua) y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, eluato: AcOH 0,1 N), se obtuvo un péptido de un solo pico y se liofilizó. La pureza se confirmó por HPLC.

50

Ejemplo de fabricación 56: Fabricación del polipéptido 4F-benzoil-TE14011-Et

55

4-Fluorobenzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHEt (4F-benzoil-TE14011-Et)

Se fabricó 4F-benzoil-TE14011-Et por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 55. Sin embargo, la metilamina se sustituyó por etilamina.

60

Ejemplo de fabricación 57: Fabricación del polipéptido 4F-benzoil-TE14011-iPr

65

4-Fluorobenzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NHiPr (4F-benzoil-TE14011-iPr)

Se fabricó 4F-benzoil-TE14011-iPr por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 55. Sin embargo, la metilamina se sustituyó por isopropilamina.

Ejemplo de fabricación 58: Fabricación del polipéptido 4F-benzoil-TE14011-tiramina

5 4-Fluorobenzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-tiramina (4F-benzoil-TE14011-tiramina)

Se fabricó 4F-benzoil-TE14011-tiramina por el mismo procedimiento que el Ejemplo de fabricación 55. Sin embargo, la metilamina se sustituyó por tiramina (p-hidroxifeniletilamina).

10 Ejemplo experimental 1: Actividad inhibidora de los péptidos de la presente invención contra la unión de CXCL12 al receptor CXCR4

15 50 µl de células de leucemia de linfocitos T humanas de Jurkat (6×10^6 células/ml) suspendidas en tampón (disolución PBS con Dulbecco (pH 7,0) que contenía 0,5% de BSA, HEPES 20 mM), 25 µl de compuestos de prueba (Tabla 1: siendo cada compuesto sintetizado en forma de sal de acetato) se diluyeron con tampón y respectivamente se dispensaron 25 µl de disolución de 125I-CXCL12 200 pM a cada pocillo de la placa, y se sometieron a reacción de fijación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la reacción se hizo succión hacia la disolución de reacción por placa de filtración GF/C de 96 pocillos, y se midió la radiactividad de cada pocillo por Top count. La actividad inhibidora de cada compuesto de prueba se midió como el índice de radiactividad del 100% cuando no se añadió el compuesto de prueba y el 0% cuando se añadió 100 nM de CXCL12 marcado con no radioisótopo. El resultado se indica en la siguiente Tabla 1.

Nº	CI ₅₀ (nM)	Nº	CI ₅₀ (nM)	Nº	CI ₅₀ (nM)
TE14002	680	TF1	11	TF11	630
TE14003	5	TF2	3,3	TF12	4,6
TE14004	6,8	TF3	9,6	TF13	21
TE14005	2,2	TF4	9,9	TF14	49
TE14006	5,6	TF5	2,8	TF15	95
TE14011	2,9	TF6	3,9	TF17	79
TE14012	5,4	TF7	5,7	TF18	8
TE14013	9,3	TF8	8,2	TF19	4,5
4F-benzoil-TN14003	0,99	TF9	250	TF20	3,5
		TF10	48		

25 Los resultados indicados en la Tabla 1 muestran que los compuestos tienen potente actividad inhibidora de la unión.

Ejemplo experimental 2: Actividad inhibidora de TE-14005 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12

30 Se trató filtro Transwell (filtro de policarbonato, 8 µm de diámetro, Costar Company) a 37°C durante 6 horas en 10 µg/ml de disolución de fibronectina y se secó al aire. Se añadieron 100 nM de CXCL12 (R&D System Company) y 600 µl/pocillo de tampón A (0,1% de albúmina de suero bovino, DMEM (GibcoBRL) que contenía HEPES 12 mM) que contenía el compuesto de prueba a la cámara inferior de Transwell. El compuesto de prueba y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (compradas de la Colección americana de cultivos tipo) y 100 µl/pocillo de tampón A que contenía 2×10^6 células/ml se añadieron a la cámara superior. Después de 15 horas de incubación a 37°C en estufa de incubación con 5% de CO₂, la superficie superior del filtro se limpió y la célula se eliminó, y luego la célula sobre la superficie inferior del filtro se fijó y se tiñó con disolución al 25% de metanol que contenía 0,5% de violeta cristal (Wako Pure Chemical Ind.), se lavó con agua destilada y se secó al aire. La absorción a 550 nm se midió cortando parte del filtro, añadiendo citrato de sodio 0,1 M/disolución al 50% de etanol y eluyendo cristal violeta. El resultado se indica en la FIG. 1. El control (-) indica la migración cuando no se añadió CXCL12. Añadiendo CXCL12 se potenció la migración de células MDA-MB-231. Esta migración inducida por CXCL12 de células MDA-MB-231 se inhibió por 10 nM del antagonista, TE14005.

45 Ejemplo experimental 3: Actividad inhibidora de TC14012 y TN14003 contra la unión de CXCL12 al receptor CXCR4

50 50 µl de células de leucemia de linfocitos T humanas de Jurkat (6×10^6 células/ml) suspendidas en tampón (disolución PBS con Dulbecco (pH 7,0) que contenía 0,5% de BSA, HEPES 20 mM), 25 µl de compuestos de prueba (Tabla 2: siendo cada compuesto sintetizado en forma de sal de acetato) diluidos con tampón y 25 µl de disolución de ¹²⁵I-CXCL12 200 pM se dispensaron respectivamente a cada pocillo de la placa, y se sometieron a reacción de fijación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la reacción se hizo succión hacia la disolución de reacción por placa de filtración GF/C de 96 pocillos, y se midió la radiactividad de cada pocillo por Top count. La actividad inhibidora de cada compuesto de prueba se midió como el índice de radiactividad del 100% cuando no se añadió el compuesto de prueba y el 0% cuando se añadió 100 nM de CXCL12 marcado con no radioisótopo. El resultado se indica en la siguiente Tabla 2.

55

Nº	CI ₅₀ (nM)
TC14012	2,7
TN14003	2,6

El resultado indicado en la Tabla 2 muestra que los compuestos tienen potente actividad inhibitora de la unión.

5 Ejemplo experimental 4: Actividad inhibitora de TC-14012 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12

Se trató filtro Transwell (filtro de policarbonato, 8 µm de diámetro, Costar Company) a 37°C durante 6 horas en 10 µg/ml de disolución de fibronectina y se secó al aire. Se añadieron 100 nM de CXCL12 (R&D System Company) y 600 µl/pocillo de tampón A (0,1% de albúmina de suero bovino, DMEM (GibcoBRL) que contenía HEPES 12 mM) que contenía el compuesto de prueba a la cámara inferior del Transwell. El compuesto de prueba y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (compradas de la Colección americana de cultivos tipo), y 100 µl/pocillo de tampón A que contiene 2x10⁶ células/ml, se añadieron a la cámara superior. Después de 15 horas de incubación a 37°C en estufa de incubación con 5% de CO₂, la superficie superior del filtro se limpió y la célula se eliminó, y luego la célula sobre la superficie inferior del filtro se fijó y se tiñó con disolución al 25% de metanol que contenía 0,5% de cristal violeta (Wako Pure Chemical Ind.), se lavó con agua destilada y se secó al aire. La absorción a 550 nm se midió cortando parte del filtro, añadiendo citrato de sodio 0,1 M/disolución al 50% de etanol y eluyendo cristal violeta. El resultado se indica en la FIG. 2. El control (-) indica la migración cuando no se añadió CXCL12. Añadiendo CXCL12 se potenció la migración de células MDA-MB-231. Esta migración inducida por CXCL12 de células MDA-MB-231 se inhibió por 10 nM del antagonista, TE14005.

25 Ejemplo experimental 5: Actividad inhibitora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de células de leucemia derivadas de linfocitos T inducida por CXCL12

30 30 nM de CXCL12 (R&D System Company) y 600 µl/pocillo de tampón A (0,1% de albúmina de suero bovino, DMEM (GibcoBRL) que contenía HEPES 12 mM) que contenía el compuesto de prueba se añadieron a la cámara inferior del filtro Transwell (filtro de policarbonato, 8 µm de diámetro, Costar Company). El compuesto de prueba y las células SUP-T1 de leucemia derivadas de células humanas (compradas de la Colección americana de cultivos tipo), y 100 µl/pocillo de tampón A que contenía 2x10⁶ células/ml, se añadieron a la cámara superior.

35 Después de 4 horas de incubación a 37°C en estufa de incubación con 5% de CO₂, el número de células que se movió a la cámara inferior se contó por un contador Coulter. El resultado se indica en la FIG. 3. El control (-) indica la migración cuando no se añadió CXCL12. El control (+) indica la migración cuando se añadió CXCL12. Añadiendo CXCL12 se potenció la migración de células SUP-T1. Esta migración de células SUP-T1 inducida por CXCL12 se inhibió por 10 nM del antagonista, 4F-benzoil-TN-14003. De lo anterior, 4F-benzoil-TN-14003, que inhibe el movimiento de linfocitos T a bajas concentraciones, se considera útil como fármaco inhibidor para artritis reumatoide crónica.

40 Ejemplo experimental 6: Actividad inhibitora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración de células de cáncer de mama inducida por CXCL12

45 Se trató filtro Transwell (filtro de policarbonato, 8 µm de diámetro, Costar Company) a 37°C durante la noche en 10 mg/ml de disolución de fibronectina y se secó al aire. Se añadieron 100 nM de CXCL12 (R&D System Company) y 600 µl/pocillo de tampón A (0,1% de albúmina de suero bovino, DMEM (GibcoBRL) que contenía HEPES 12 mM) que contenía 4F-benzoil-TN-14003 a la cámara inferior de Transwell. 4F-benzoil-TN-14003 y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (compradas de la Colección americana de cultivos tipo), y 100 µl/pocillo de tampón A que contenía 2x10⁶ células/ml, se añadieron a la cámara superior. El compuesto de prueba y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (compradas de la Colección americana de cultivos tipo), y 100 ml/pocillo de tampón A que contenía 2x10⁸ células/ml, se añadieron a la cámara superior. Después de 15 horas de incubación a 37°C en estufa de incubación con 5% de CO₂, la superficie superior del filtro se limpió y la célula se eliminó, y luego la célula sobre la superficie inferior del filtro se fijó y se tiñó con disolución al 25% de metanol que contenía 0,5% de cristal violeta (Wako Pure Chemical Ind.), se lavó con agua destilada y se secó al aire. La absorción a 550 nm se midió cortando parte del filtro, añadiendo citrato de sodio 0,1 M/disolución al 50% de etanol y eluyendo cristal violeta. El resultado se indica en la FIG. 4. El control (-) indica la migración cuando no se añadió CXCL12. El control (+) indica la migración cuando se añadió CXCL12. Añadiendo CXCL12 se potenció la migración de células MDA-MB-231. Esta migración inducida por CXCL12 de células MDA-MB-231 se inhibió por 10 nM del antagonista, 4F-benzoil-TN-14003.

55 Ejemplo experimental 7: Actividad antimetastásica de 4F-benzoil-TN-14003

60 Células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 (10⁶ células) se implantaron intravenosamente en las colas de ratones CB-17 SCID hembra de cinco semanas (Crea Japan, Inc.). 4F-benzoil-TN-14003 se preparó a 80 mg/ml en solución salina fisiológica, se incluyó en bombas osmóticas de liberación sostenida (bomba Alzet, Alza Corporation, usable para liberación sostenida de 2 semanas; la dosis fue equivalente a 18,2 mg/kg/día) y se cargó

intradérmicamente a los lomos de los ratones en la fecha inmediatamente precedente a la implantación. Además, 14 días después de la implantación, las bombas Alzet que contenían una dosis igual del fármaco se cargaron adicionalmente. Al grupo de control, las bombas Alzet inyectadas con solución salina fisiológica se cargaron adicionalmente. 28 días después de la implantación, los ratones se diseccionaron, se inyectaron aproximadamente 2 ml de disolución al 0,2% de azul de Evans por las tráqueas y se tiñeron los pulmones. Los pulmones se extirparon, se empaparon en líquido de Bouin, se tiñeron y se fijaron. Por observación visual de foco metastásico (porción teñida de amarillo), la evaluación se realizó para determinar si el compuesto presentó actividad antimetastásica más evidente o no. El resultado se indica en la FIG. 5. En los pulmones del grupo de control, las porciones teñidas de amarillo se observaron uniformemente, y se observó metástasis de pulmón. Por otra parte, en el grupo de administración de 4F-benzoil-TN-14003, los especímenes teñidos de amarillo fueron menos. Comparativamente, la metástasis se inhibió por 4F-benzoil-TN-14003.

Ejemplo experimental 8: Actividad inhibidora de 4F-benzoil-TN-14003 contra la migración inducida por CXCL12 de líneas celulares humanas (Jurkat) y esplenocitos de ratón

1. Efectos sobre la reacción de migración de líneas celulares de linfocitos T:

RPMI-1640 y suero bovino fetal (SBF) se compraron de BioWhittaker, disolución de penicilina-estreptomina, RPMI-1640 (sin rojo de fenol) y HEPES de Invitrogen, BSA de Sigma y SDF-1 α humano (CXCL12) de Genzyme. Las líneas celulares de linfocitos T humanos Jurkat se compraron de ATCC y se incubaron en RPMI-1640-10% de SBF. 4F-benzoil-TN14003 se disolvió en PBS y se usó para los experimentos.

La reacción de migración se realizó usando Transwell de 24 pocillos (Costar, membrana de policarbonato, tamaño de poro 5 μ m). Se añadieron 600 μ l de SDF-1 α (concentración final 1 ng/ml) a la capa inferior de Transwell, 5x10⁵ células (200 μ l) se añadieron al inserto, y se hizo reaccionar a 37°C durante 4 horas. Las células se pre-incubaron con fármacos a 37°C durante 30 minutos. La reacción de migración se hizo en medio de cultivo RPMI-1640 que contenía 20 mmol/l de HEPES, 0,5% de BSA. Las células migradas a la capa inferior se recuperaron, y el número de células se contó por un contador Coulter. La tasa inhibidora (%) contra la migración por el fármaco de cada concentración se calculó por la siguiente fórmula, y el valor de CI₅₀ se calculó a partir de tal tasa inhibidora.

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{el número de células migradas en presencia de un fármaco de cada concentración} - \text{el número de células migradas sin SDF-1}\alpha}{\text{el número de células migradas sin un fármaco} - \text{el número de células migradas sin SDF-1}\alpha} \right)$$

Como resultado, como se indica en la FIG. 6, las células Jurkat presentaron una fuerte reactividad de la migración de células contra SDF-1 α . 4F-benzoil-TN14003 inhibió esta reacción de un modo dependiente de la dosis, y su valor de CI₅₀ fue 0,65 nmol/l.

2. Efectos sobre la reacción de migración de esplenocitos de ratón:

Se aislaron bazo de ratones BALB/c (macho, Charles River Japan, Inc.), se convirtieron en suspensiones individuales de células y se prepararon esplenocitos triturando glóbulos rojos.

SDF-1 α (Peprotech, concentración final 100 ng/ml) se añadió a la capa inferior de Transwell (tamaño de poro 5 μ m), se añadieron 1x10⁶ /pocillo de las células (100 μ l) al inserto y se hicieron reaccionar a 37°C durante 2,5 horas. Las células se incubaron con el fármaco a 37°C durante 30 minutos. La reacción de migración se hizo en el medio de cultivo RPMI-1640 que contenía 20 mmol/l de HEPES, 0,5% de BSA. El número de células migradas a la capa inferior se contó por un contador Coulter. Similarmente a la condición precedente se calcularon la tasa inhibidora contra la migración por el fármaco de cada concentración y el valor de CI₅₀.

Como resultado, como se indica en la FIG. 7, 4F-benzoil-TN14003 inhibió la fuerte reactividad de migración de esplenocitos de ratón inducida por SDF-1 de un modo dependiente de la dosis. Su valor de CI₅₀ fue 0,54 nmol/l, y presentó actividad inhibidora comparable al caso de las células humanas. Esto significa a su vez que se identificó poca diferencia de especies entre seres humanos y ratones con respecto a este péptido.

Ejemplo experimental 9: Efectos de 4F-benzoil-TN-14003 sobre la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en ratones

Se compró sangre conservada de oveja de Nippon Bio-Supp. Center. La sangre conservada de oveja se purificó dos veces en solución salina fisiológica, se suspendió en solución salina fisiológica y se usó como glóbulos rojos de oveja (SRBC). Como se considera que el valor a DO541 nm de oxihemoglobina en el momento de la hemolización de 1,0x10⁹ células/ml de suspensión de SRBC por 14 partes de agua destilada es casi 0,700, entonces se fijó la densidad de SRBC.

2x10⁷ células/50 µl de SRBC se administraron subcutáneamente a los tobillos de las patas traseras izquierdas de ratones BALB/c (macho, 6 semanas de edad, Charles River Japan, Inc.) y se sensibilizaron. Después de 5 días, 10⁸ células/50 µl de SRBC se administraron subcutáneamente a los tobillos de las patas traseras derechas y se indujo la reacción de DTH. Inmediatamente antes de y 24 horas después de la inducción de antígenos, el espesor de los tobillos de las patas traseras derechas se midió por un micrómetro digital (Mitutoyo Corporation CD-15B), y el aumento (mm) en el espesor de los tobillos se adoptó como el indicador de reacción de DTH.

4F-benzoil-TN14003 se disolvió en PBS, y se administró continuamente usando bombas osmóticas Alzet (Alza, 0,5 µl/h, tipo persistente de 7 días). Las bombas osmóticas se implantaron intradérmicamente a los lomos bajo anestesia con éter el día antes de la sensibilización. Como control, las bombas inyectadas con PBS se implantaron similarmente. 4F-benzoil-TN14003 se administró a las dosis de 4,8, 24 y 120 µg/día.

Los datos se expresaron como valor medio ± margen estándar de error (n=7). Por la prueba de Williams, p≤0,025 se valoró como significativo.

Como resultado, como se indica en la FIG. 8, 4F-benzoil-TN14003 (4,8, 24 y 120 µg/día) inhibió el edema de las almohadillas plantares dependientemente de la dosis y significativamente, y las tasas inhibitoras fueron 9, 31 y 51%, respectivamente. Esto sugiere que CXCR4 desempeña una función importante en la inmunidad celular tal como reacción de DTH.

Ejemplo experimental 10: Efectos terapéuticos de 4F-benzoil-TN-14003 sobre la artritis inducida por colágeno en ratones

FK-506 se purificó mediante un procedimiento conocido (Kino T. y col., J. Antibiot., 1987 40(9): 1249-55). Se compró metotrexato de Wako Pure Chemical Ind., indometacina de Sigma, colágeno de tipo II bovino de Collagen Research Center (Tokio, Japón), adyuvante completo de Freund (FCA de Difco) y anticuerpo anti-IgG2a de ratón de Zymed, respectivamente.

Se disolvió colágeno de tipo II bovino a 2 mg/ml de concentración por 0,05 mol/l de disolución de ácido acético, se preparó emulsión con un volumen igual de FCA. Se inyectaron 50 µl de la emulsión intradérmicamente en la base de la cola de ratón DBA/1JN (macho, 6 semanas de edad, Charles River Japan, Inc.) y se sensibilizó. 21 días después de la inyección, se hizo inmunización adicional similarmente. Durante 2 semanas después de la inmunización adicional se midieron los pesos corporales y el espesor de las patas traseras y se hizo la puntuación de artritis. Las puntuaciones de artritis se puntuaron a 0-3 puntos de cada extremidad, y se evaluaron por el total de la misma (siendo 12 los puntos completos; 0, normal; 1, hinchazón leve o hinchazón de un único dedo; 2, hinchazón moderada o hinchazón de varios dedos; 3, hinchazón grave). Dos semanas después de la inmunización se recogieron cuatro extremidades y sueros.

Después de bloquear por recubrimiento el colágeno de tipo II bovino (10 µg/ml de disolución de PBS) sobre la inmunoplaqueta se añadieron 100 µl de suero de ratón diluido 1000 veces, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de purificarlo se añadió anticuerpo anti-IgG2a de ratón (dilución de 1000 veces). Después de purificarlo se añadió TMB, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió H₂SO₄ de igual cantidad y se midió a 450nm.

Se suspendieron indometacina (1 mg/kg), metotrexato (3 mg/kg) y FK-506 (10 mg/kg) al 0,5% de metilcelulosa, y se administraron por vía oral cada día durante 2 semanas desde el día de la inmunización adicional a la dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal. Se administró por vía oral disolución de metilcelulosa al 0,5% de igual dosis al grupo de control. 4F-benzoil-TN14003 se disolvió en PBS, y se administró continuamente usando bombas osmóticas Alzet (Alza, 0,5 µl/h, 2 semanas). Las bombas osmóticas se implantaron intradérmicamente a los lomos de los ratones bajo anestesia con éter el día antes de la inmunización adicional. Como control se implantaron similarmente bombas inyectadas con PBS. La evaluación de cada fármaco se hizo para el valor obtenido 2 semanas después de la inmunización adicional.

Los datos se expresaron como valor medio ± margen estándar de error (n=8-12). La comparación entre 2 grupos se hizo por la prueba de la t de Student, p≤0,05 se valoró como significativo. La comparación múltiple se hizo por la prueba de Dunnett, p≤0,05 se valoró como significativo.

Como resultado, toda la indometacina (1 mg/kg, p.o.), metotrexato (3 mg/kg, p.o.) y FK-506 (10 mg/kg, p.o.) inhibió significativamente la hinchazón de las patas traseras, y presentó actividad inhibitora significativa o evidente contra la puntuación de artritis (FIG. 9).

4F-benzoil-TN14003 (120 µg /día) presentó actividad inhibitora significativa contra la hinchazón de las patas traseras, la puntuación de artritis y la pérdida de peso corporal. También mostró una tendencia inhibitora contra el aumento del valor de anticuerpos anti-IgG2a específicos para colágeno de tipo II (FIG. 10). Estos efectos inhibitorios fueron equivalentes a o mejores que aquellos de los fármacos conocidos anteriormente mencionados.

Aplicabilidad industrial

Los compuestos peptídicos de la presente invención que tienen actividad antagonista de CXCR4 pueden inhibir la interacción de CXCR4 y CXCL12/SDF-1 y, por consiguiente, pueden inhibir la reacción de migración de células cancerosas de cánceres que expresan CXCR4, por ejemplo, cáncer oral, cáncer de garganta, cáncer de labio, cáncer lingual, cáncer gingival, cáncer nasofaríngeo, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer del intestino grueso que incluye cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer nasal, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de tejido blando, cáncer de piel, melanoma, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de pene, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer cerebral, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia, etc., y son útiles como fármacos para la prevención y/o terapia de estos cánceres. Por tanto, los compuestos peptídicos de la presente invención pueden inhibir la reacción de migración de inmunocitos inducida por CXCL12/SDF-1 α y son útiles como fármacos para la prevención y/o terapia de artritis reumatoide crónica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de la siguiente fórmula o una sal del mismo:

5 4F-benzoil-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂

10 en la que 4F-benzoílo muestra grupo 4-fluorobenzoílo, Arg muestra residuo de L-arginina, Nal muestra residuo de L-3-(2-naftil)alanina, Cys muestra residuo de L-cisteína, Tyr muestra residuo de L-tirosina, Cit muestra residuo de L-citulina, Lys muestra residuo de L-lisina, DLys muestra residuo de D-lisina, Pro muestra residuo de L-prolina, 2 residuos de cisteína están combinados por enlace disulfuro intramolecular, NH₂ muestra amidación por grupo amino.

2. Un producto farmacéutico que contiene el péptido según la reivindicación 1 o una sal del péptido.

15 3. Uso de un péptido según la reivindicación 1 o una sal del mismo para la fabricación de medicinas preventivas y/o terapéuticas para cánceres o artritis reumatoide crónica.

20 4. Uso de un péptido según la reivindicación 1 o una sal del mismo para la preparación de un medicamento para inhibir metástasis de cáncer.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama y cáncer pancreático.

25 6. Una composición farmacéutica que contiene un péptido según la reivindicación 1 para el tratamiento y/o la prevención de cáncer.

7. Una composición farmacéutica que contiene un péptido según la reivindicación 1 para el tratamiento y/o la prevención de artritis reumatoide crónica.

30 8. Una composición farmacéutica que contiene un péptido según la reivindicación 1 para inhibir metástasis de cáncer.

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

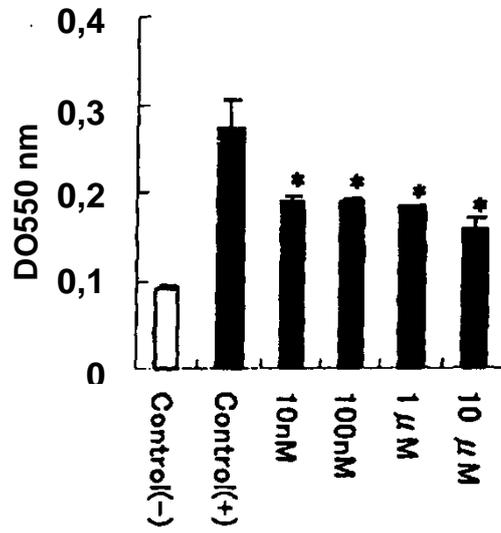


Fig. 2

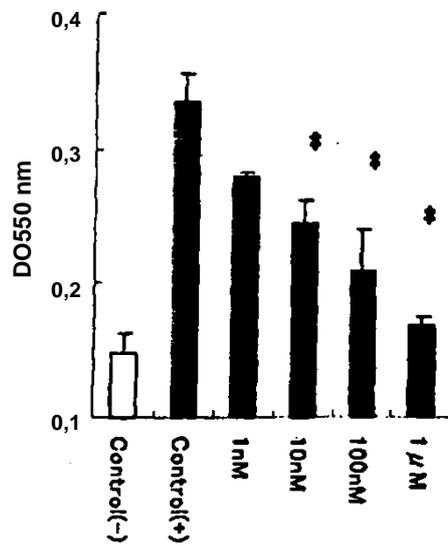


Fig. 3

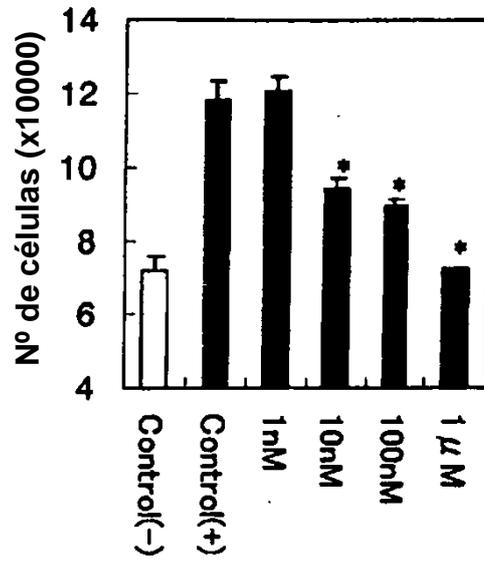


Fig. 4

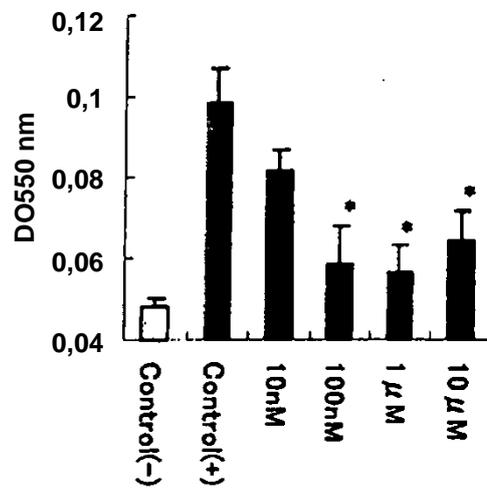


Fig. 5 A

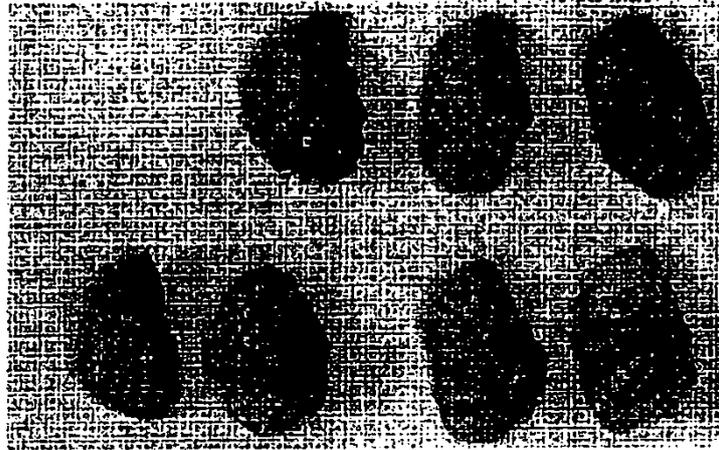


Fig. 5 B

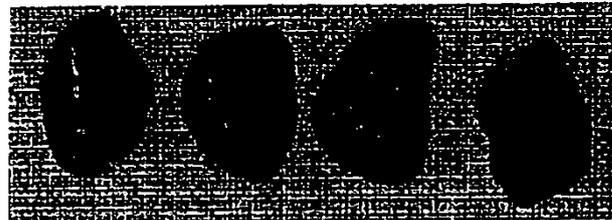


Fig. 6

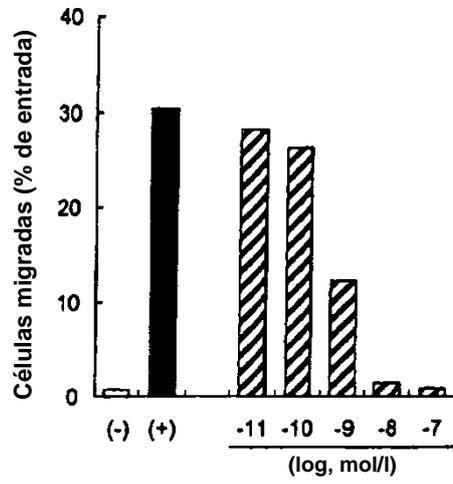


Fig. 7

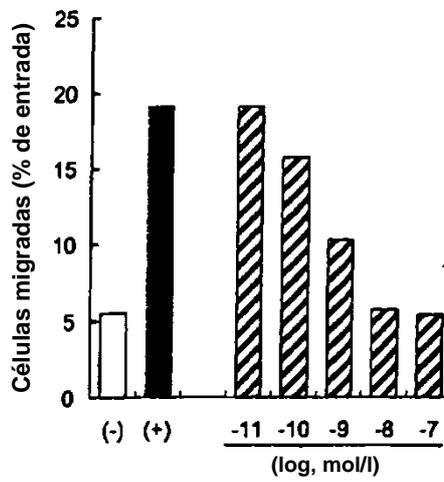


Fig. 8

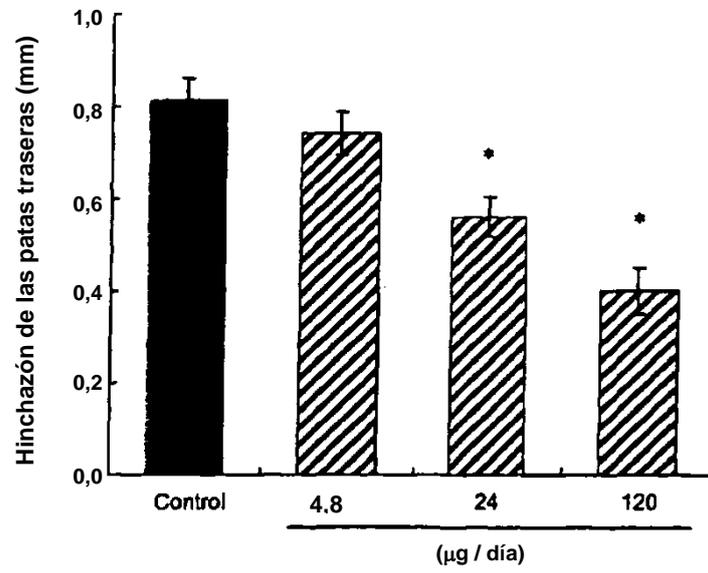


Fig. 9 A

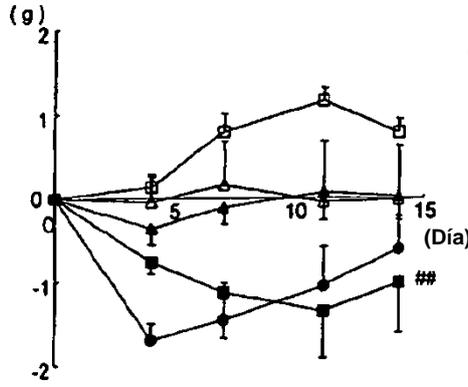


Fig. 9 B

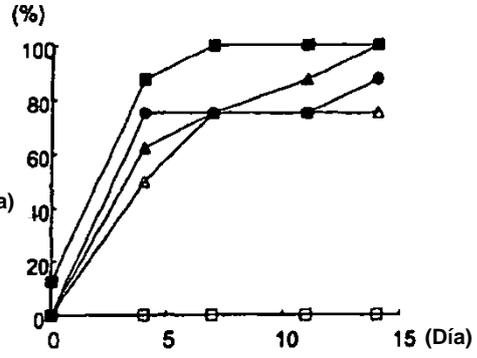


Fig. 9 C

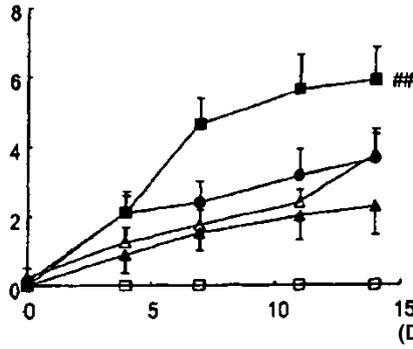


Fig. 9 D

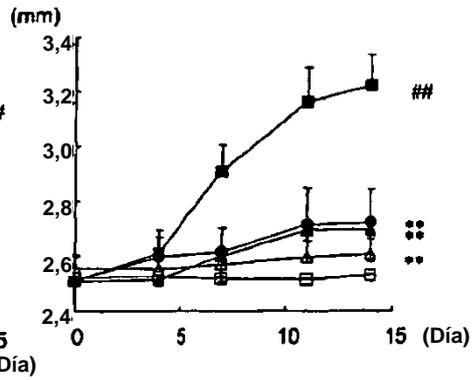


Fig. 9 E

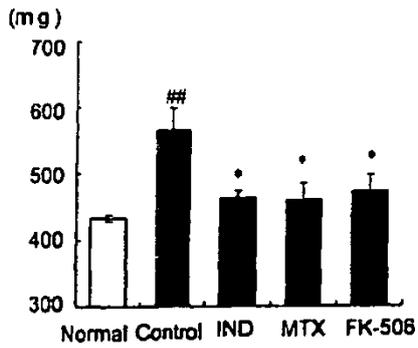


Fig. 9 F

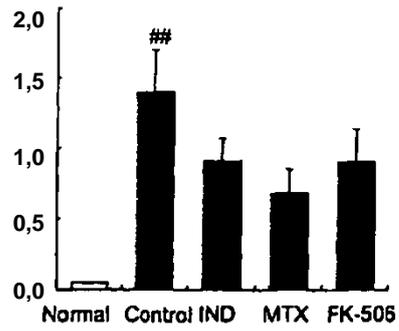


Fig. 1 0 A

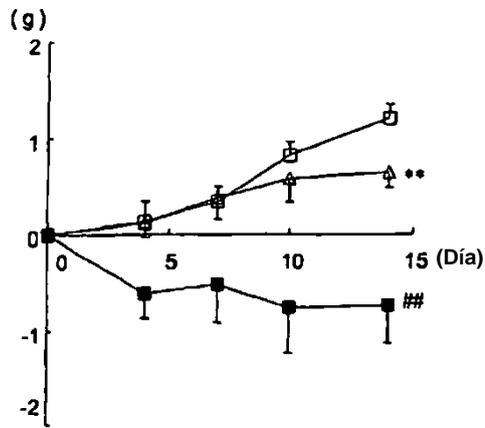


Fig. 1 0 B

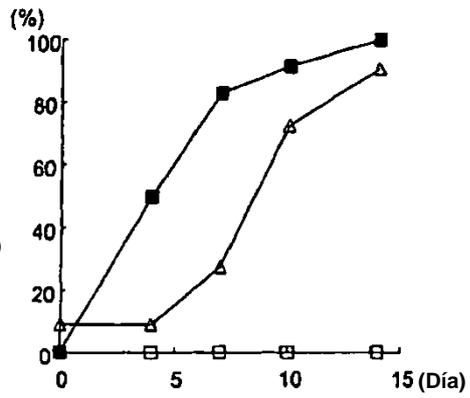


Fig. 1 0 C

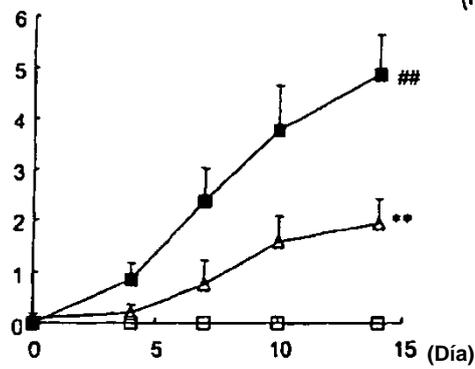


Fig. 1 0 D

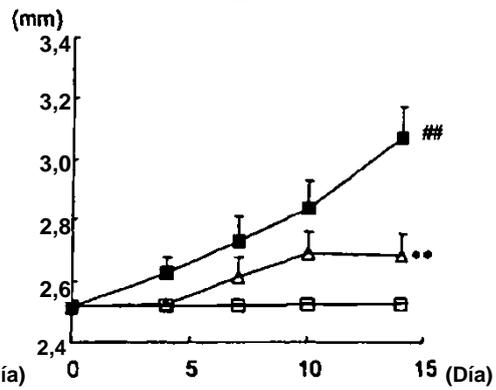


Fig. 1 0 E

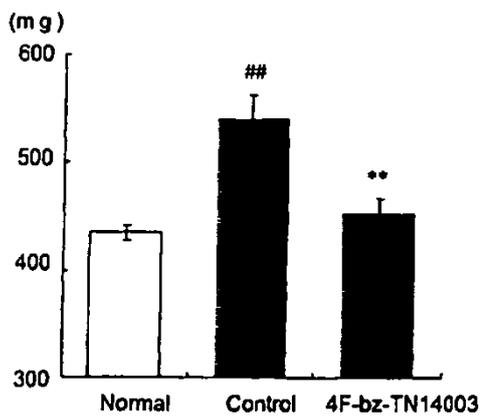


Fig 1 0 F

