



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **330170**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*C07K 14/00 (2006.01)*

*C07K 14/79 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20020950	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.08.31 PCT/GB2000/03378
(22)	Inng.dag	2002.02.27	(85)	Videreføringsdag	2002.02.27
(24)	Løpedag	2000.08.31	(30)	Prioritet	2000.03.09, GB, 0005702 1999.08.31, WO, PCT/GB99/02851
(41)	Alm.tilgj	2002.04.25			
(45)	Meddelt	2011.02.28			
(73)	Innehaver	Lylix Biopharma AS, Forskningsparken, Postboks 6447, 9294 TROMSØ, Norge			
(72)	Oppfinner	John Sigurd Svendsen, 9037 TROMSØ, Norge Øystein Rekdal, 9037 TROMSØ, Norge Mari Wikman, 9037 TROMSØ, Norge Terese Solstad, c/o Biokjemisk avdeling, MH bygget, UiTø, 9037 TROMSØ, Norge Nannan Yang, c/o Biokjemisk avdeling, MH bygget, UiTø, 9037 TROMSØ, Norge			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Fremgangsmåte for fremstilling av et bioaktivt peptid</b>
(56)	Anførte publikasjoner	WO 98/33509 A2
(57)	Sammendrag	

Den foreliggende oppfinnelse dreier seg om en fremgangsmåte for å fremstille et bioaktivt peptid der nevnte peptid er 7 til 25 aminosyrer langt, har minst 3 kationiske aminosyrer, og har evne til å danne en amfipatisk  $\alpha$ -heliks, der nevnte fremgangsmåte omfatter å identifisere en kationisk sektor og oppdele den gjenværende del av peptidet i tre videre sektorer som stort sett er like store, om inkorporering av minst 60% av volumet og lipofilisiteten frembrakt av aminosyre R- gruppene inn i sektorene som flankerer den kationiske sektor, og om anvendelse av peptidene som blir fremstilt i terapi, spesielt i behandling av godartete og ondartete svulster.

Den foreliggende oppfinnelse dreier seg om fremgangsmåter for å fremstille bioaktive peptider. De bioaktive peptidene har evne til å danne en  $\alpha$ -heliks struktur *in vivo* og de relative posisjoner av kationiske og romoppfyllende og lipofile (fettløselige) rester innen peptidets tredimensjonale struktur er slik at det gir både god selektivitet og produksjon av slike peptider. Med andre ord kan selektivitet, et anvendbart terapeutisk vindu, bli fremstilt eller forsterket ved å øke den terapeutiske aktivitet og/eller forminske toksisitet.

Oppfinnelsen beskriver fremgangsmåter for å forsterke aktiviteten (antimikrobiell eller antisvulst) og for å forsterke selektiviteten til peptider (øke det terapeutiske vindu), dette kan oppnåes ved å øke aktiviteten mens toksisiteten ikke blir øket, eller blir øket, men i en mindre grad. Alternativt kan forøket  
5 selektivitet oppnåes ved å redusere toksisitet mens aktivitet mot målceller er uendret eller bare blir lett senket.

Peptider, deres derivater, samt ikke-peptid forbindelser som etterligner disse (peptidomimetika), er terapeutisk viktige klasser av forbindelser. Peptider, vanligvis fragmenter av naturlig forekommende proteiner og peptider, blir utviklet  
10 som antimikrobielle, spesielt antibakterielle midler. En rekke organismer anvender peptider som del av deres vertsforsvarsmekanismer. Antimikrobielle peptider har blitt isolert fra arter så ulike som bakterier og pattedyr (Lehrer, R.I., Liechtenstein A.K. and Ganz, T. (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11, 105-128). Generelt har disse antibiotiske peptider en netto positiv ladning og en tendens til å danne amfifile  $\alpha$ -  
15 helikser eller  $\beta$ -plate strukturer når de interagerer med det ytre fosfolipid bilaget i bakterielle cellemembraner [Besalle, R., Gorea, A., Shalit, J., Metger, J.W., Dass, C., Desiderio, D.M. and Fridkin, M. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 1203-1209]. I de fleste tilfeller er de detaljerte molekylære mekanismer som ligger til grunn for den antibiotiske effekt ukjent, selv om noen peptider som klassifiseres om klasse L  
20 (lytiske) peptider antas å samvirke med bakterielle cellemembraner, sannsynligvis slik at de danner ionekanaler eller porer [Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L. and Huang, H.W. (1996) *Biochemistry* 35, 13723-13728], noe som endrer permeabilitet og leder til cellelyse (oppløsning av cellen).

25 Magaininer er antibakterielle peptider fra hud, funnet hos frosken *Xenopus laevis*, som blir klassifisert som klasse L antibiotika siden de spesifikt gir bakterieoppløsning; andre peptider, for eksempel mastoparaner som er gift fra

bier, mangler denne spesifisitet siden de gir lysis av både eukaryote og prokaryote celler, disse blir kalt klasse L gifter [Tytler, E.M., Anantharamaiah, G.M., Walker, D.E., Mishra, V.K., Palgunachari, M.N. and Segrest, J.P. (1995) *Biochemistry* 34, 4393-4401].

5           Liksom magnaininer og mastoparaner har vertsforsvarspeptider blitt isolert fra møll og fluer (cecropiner) og fra hesteskokrabben. Den direkte effekt som disse vertsforsvarspeptider har i å frastøte rovdyr, for eksempel som gifter, er klar. Søking etter peptider som fremviser antibiotiske egenskaper har ført til identifikasjon av andre proteiner/peptider som ikke ville forventes å ha  
10           celletoksiske egenskaper. Et av disse er laktoferrin, en jerntransportør som også viser en svak antibakteriell effekt.

          I tillegg til å lete etter nye antimikrobielle peptider har det mer nylig blitt forsøkt å forsterke aktiviteten til peptider og proteiner med allerede kjente antimikrobielle egenskaper. Dette har i tilfellet med bovint laktoferrin blitt gjort ved  
15           å fordøye det opprinnelige protein med enzymet pepsin fra magesekk, for derved å fremstille et peptid, laktoferricin B (LFB), som er mye mer aktivt enn det opprinnelige bovine laktoferrin. LFB er et 25 rester langt peptid som tilsvarer restene 17-41 i bovint laktoferrin [Bellamy et al. (1992) *Biochim Biophys. Acta* 1121, pp130 et seq.]. Studier over struktur-aktivitet forhold har blitt utført på  
20           magaininer, og det har for eksempel blitt vist at økning av grad av heliks og kationisk ladning har ført til øket antibakteriell aktivitet [Chen, Y.H., Brown, J.H., Morell, J.L. and Huang, C.M. (1988) *FEBS Lett* 236, 462-466]. Imidlertid resulterer slike sekvensmodifikasjoner ofte i at det også blir en øket hemolytisk toksisitet. Det er derfor et av denne oppfinnelses mål å fremstille peptider og/eller peptidderivater  
25           som har signifikant antimikrobiell aktivitet men fortrinnsvis viser lav toksisitet, dvs. som har liten effekt på normale eukaryote celler, eksemplifisert med lav hemolytisk aktivitet. Selv om røde blodceller ikke er typiske eukaryote celler frembyr de en enkel modell som kan anvendes for å undersøke toksisitet, og er i alle fall en celletype som ikke i noen særlig grad bør bli oppløst av terapeutisk bioaktive  
30           peptider.

          Struktur-aktivitetsstudier av magaininer og andre antimikrobielle peptider har vist betydningen av en netto positiv ladning, amfipatisk egenskap og  $\alpha$ -heliks struktur som viktige strukturelle motiver som bestemmer deres evne til å ødelegge membraner [Blondelle, 1992, Chen 1988]. Forsøk på å forbedre den

antimikrobielle aktivitet og selektivitet til slike peptider, og gjennomsnitt hydrofobt moment, et mål på amfifilisitet, og hydrofobisitet, har blitt studert [Pathak 1995, Dathe 19997, Wieprecht 1997). Generelt viser peptider med forsterket hydrofobisitet og hydrofobisk moment en øket antibakteriell aktivitet, men i de fleste tilfeller viser de også øket hemolytisk aktivitet. Vinkelen som er motstående til den positivt ladete heliks har også blitt studert (Wieprecht 1997) og det ble funnet at en stor vinkel førte til høyere antibakteriell aktivitet, men samtidig redusert selektivitet.

Mer nylig (for eksempel Risso et al., Cell. Immunol. [1998] 107) har en rolle for peptider som antikreft medikamenter, spesielt via deres evne til å oppløse svulstceller, blitt identifisert. Dette gir større problemer med selektivitet siden både målceller og de omgivende celler er eukaryote. Under slike omstendigheter er identifikasjon og forstørrelse av et terapeutisk vindu vanskelig, siden det er færre forskjeller mellom cellemembranene og celleoverflatene i målceller og ikke-målceller. Svulstceller kan vise små variasjoner sammenlignet med deres friske ekvivalenter eller med eukaryote omgivende celler av ulike typer, men disse subtile endringer er ikke godt klarlagt, og mekanismer som tillater å utnytte forskjeller har ikke blitt beskrevet. Det er derfor et spesielt mål for den foreliggende oppfinnelse å frembringe terapeutiske peptider som kan identifiseres eller utvikles som har god antisvulst aktivitet men som har fysiologisk akseptable toksisitetsnivåer, dvs. ikke gir oppløsning eller på annen måte forstyrrer eller ødelegger et betydningsfullt antall friske eukaryote celler.

Svulster kan utvikle resistens mot en bred skala av eksisterende kjemoterapeutiske midler, og det vil derfor være spesielt ønskelig å utvikle et antikreft middel som er aktivt mot celler som har utviklet en slik resistens.

Det har overraskende blitt påvist at den romlige relasjon mellom den kationiske sektor av et peptid og dets romopplyllende og lipofile rester spiller en viktig rolle i peptidets terapeutiske aktivitet og/eller selektivitet.

Den foreliggende oppfinnelse dreier seg om fremstilling av bioaktive peptider som fremviser deres terapeutiske effekt ved å interagere med cellemembranen i målceller. To typer interaksjoner er i denne sammenheng viktige, for det første den positive ladning som peptidet har, som fører til at det blir tiltrukket av visse negativt ladete membranfosfolipider, og for det andre nærvær av romopplyllende og lipofile grupper, som blir antatt å virke sammen med de

hydrofobe deler av fosfolipidene. Således er peptidenes natur amfipatisk, med en positivt ladet region som tiltrekkes av vann, og en lipofil region som frastøtes av vann.

De ulike sidekjeder i de aminosyrene som utgjør peptidet kan fremby  
5 grupper med en kationisk eller lipofil karakter. Blant de genetisk kodete aminosyrer kan lysin, arginin og histidin gi kationiske grupper, dvs. grupper som er positivt ladet ved pH 7,0, og de vil således her vanligvis bli beskrevet som kationiske aminosyrer. Blant de genetisk kodete aminosyrer har valin, leucin, isoleucin, metionin, fenylalanin, tyrosin og tryptofan romopppyllende og lipofile sidekjeder, og  
10 de vil her vanligvis bli beskrevet som voluminøse og lipofile aminosyrer.

Peptidene som kan fremstilles ifølge oppfinnelsens fremgangsmåter har evne til å danne en amfipatisk  $\alpha$ -heliks struktur *in vivo*, og deres aminosyresammensetning og tilnærmete 3-dimensjonale struktur kan enklest bli fremstillet som et  $\alpha$ -heliks hjul, se Fig. 1 som eksempel. En  $\alpha$ -heliks kan være  
15 'høyre-' eller 'venstrehendt', avhengig av om aminosyrene er i D- eller L-formen. I denne oppfinnelse blir begge versjoner planlagt. Spiralhjulet er en todimensjonal representasjon av et tredimensjonalt peptid, som resulterer fra en oppteget sammentrykking av peptidet fra dets spiralform til en sirkel. Sektorene blir altså også vurdert i to dimensjoner, og deres størrelse blir bestemt av vinkelen som står  
20 imot i senter av sirkelen. Når denne måten å plote på blir anvendt kan en eller flere kationiske sektorer, dvs. sektorer anrikt med kationiske aminosyrer, bli identifisert. Vanligvis vil peptider som fremviser den ønskete terapeutiske aktivitet, oftest en lytisk aktivitet, ha en kationisk hovedsektor. Som et eksempel er den kationiske sektor til peptidet i Fig. 1 avmerket.

25 Oppfinnerne har overraskende funnet at konsentrasjon av de voluminøse og lipofile aminosyrer i regionene ved siden av den kationiske sektor forsterker både den terapeutiske aktivitet og de cytotoxiske peptiders selektivitet. Som diskutert i større detalj senere er dette spesielt tydelig når det er ønsket å maksimalisere den fysiologiske effekt av hver voluminøse eller lipofile gruppe.  
30 Regionene ved siden av den kationiske sektor har blitt funnet å være de mest 'aktive' regioner, dvs. de områder der betydningen av hver romopppyllende eller lipofile gruppe er størst. Dersom det derfor er ønsket å redusere toksisiteten til et peptid som har et stort antall voluminøse eller lipofile grupper mens man samtidig

får en lett reduksjon i terapeutisk aktivitet kan det være fordelaktig å inkorporere disse rester langt vekk fra den kationiske sektor.

I et aspekt frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å fremstille et bioaktivt peptid, hvor nevnte peptid er 12 til 25 aminosyrer i  
5 lengde, har minst 3 kationiske aminosyrer og har evne til å danne en amfipatisk  $\alpha$ -Helix, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter identifikasjon av en kationisk sektor og oppdeling av den gjenværende delen av peptidet i tre ytterligere sektorer som er stort sett like store, inkorporering i sektoren rett ovenfor den kationiske sektoren av ikke mer enn en voluminøs og lipofil aminosyre og inkorporering inn i  
10 de to sektorene som flankerer den kationiske sektoren 2 eller flere voluminøse og lipofile aminosyrer.

I et aspekt frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte ifølge krav 1, kjennetegnet ved at en eller flere av de voluminøse og lipofile aminosyrene er tryptofan eller en analog derav.

15 I et aspekt frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, kjennetegnet ved at alle de voluminøse og lipofile aminosyrene er tryptofan eller analoger derav.

I et aspekt frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, kjennetegnet ved at peptidet omfatter  
20 minst 5 kationiske rester.

I et aspekt frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, kjennetegnet ved at peptidet omfatter minst 7 kationiske rester.

Heretter blir sektorene som omgir den kationiske sektor benevnt  
25 'flankerende sektorer', og sektorene som er på motsatt side av den kationiske sektor som den 'motsatte sektor'.

Igjen kan det, som diskutert i større detalj senere, dersom et peptid har et stort antall romopppyllende og lipofile rester, og/eller et stort antall kationiske grupper, være fordelaktig å inkludere en lavere prosentdel av voluminøse og  
30 lipofile rester i de såkalte flankerende sektorer.

Når alle voluminøse og lipofile grupper er like vil prosent volum og lipofilisitet være identisk med proporsjonen av disse voluminøse og lipofile grupper som inkorporeres i de flankerende sektorer, sammenlignet med totalantallet av slike grupper i peptidet. Klassifikasjon av en enhet med volum og lipofilisitet som

tilhørende en av de genetisk kodete lipofile aminosyrer blir beskrevet senere, for eksempel bidrar valin med en enhet og tryptofan med to enheter. Faktisk kan dette systemet bli videre utviklet, slik at tryptofan, den mest voluminøse og lipofile rest, blir vurdert å avgi 2,5 enheter, basert på de to fusjonerte ringstrukturer. R grupper som omfatter to eller flere ringer som ikke er fusjonert, for eksempel bifenylyalanin, er mer romopppyllende og slike grupper kan sies å bidra med 3 volum- og lipofilitets-enheter. Disse prinsipper kan bli anvendt på alle aminosyre R-grupper, enten de er naturlig forekommende (men ikke genetisk kodet) eller modifisert.

Generelt vil aminosyrer som har 3-6 ikke-hydrogenatomer i deres R grupper og ikke har sykliske grupper bidra med 1 enhet, mens aminosyrer som inkorporerer en enkelt syklisk gruppe og ikke har mer enn 8 ikke-hydrogenatomer eller en forgrenet alkylgruppe med 7-9 ikke-hydrogenatomer i R-gruppen vil få en verdi på 2 enheter. To fusjonerte ringer og totalt 9 til 12 ikke-hydrogenatomer vil bidra med 2,5 enheter, og de som har to eller flere separate, ikke-fusjonerte ringer vil bidra med 3 enheter. Tryptofan og dennes analoger blir alle sammen vurdert å bidra med 2,5 enheter.

Det må forstås at når det henvises til innføring av minst 2 aminosyrer inn i de flankerende sektorer menes det at minst 2 voluminøse og lipofile aminosyrer blir innført i de flankerende sektorer mellom dem, og ikke minst 2 i hver flankerende sektor. Det er passende at minst 1 voluminøs og lipofil aminosyre er tilstede i hver av sektorene ved siden av den kationiske sektor.

Produksjon vil delvis bestå av syntese av et peptid som definert over, dette kan enklest foregå via transkripsjon og translasjon av den tilsvarende nukleinsyresekvens, *de novo* syntese, eller modifikasjon av et eksisterende peptid. Syntetiske fremgangsmåter blir diskutert i mer detalj senere.

Ved 'inkorporasjon' menes inklusjon i den forstand at peptidsyntesen blir utført på en slik måte at de spesielle rester blir funnet å være innen de sektorer som defineres i relasjon til det hele, fremstilte peptid.

På grunn av større volum og lipofilitet vil peptidet fortrinnsvis ha minst 2, for eksempel 3 eller flere rester som er utvalgt fra gruppen tyrosin, fenylalanin og tryptofan, der tryptofanrester er særlig foretrukket. Mens peptidet som en helhet kan ha voluminøse og lipofile rester utvalgt fra de 7 aminosyrer som er opplistet over vil den motsatte sektor fortrinnsvis ikke ha mer enn en, fortrinnsvis ingen av

de mest voluminøse og lipofile rester, dvs. tyrosin, fenyilalanin og tryptofan eller deres ikke-genetiske ekvivalenter.

Sett ovenfra kan de to grupper med voluminøse og lipofile aminosyrer vurderes som å bidra med en eller to tilfeldige 'enheter' med henholdsvis volum og lipofilisitet, for eksempel bidrar valin med en enhet og fenyilalanin med to enheter, 5 tyrosin bidrar også med to enheter, mens tryptofan blir bedre vurdert som å bidra med 2,5 enheter. Peptidet som en helhet vil altså ha minst to enheter, fortrinnsvis minst 3, mer fordelaktig 4-8, for eksempel 5 eller 6 enheter med volum og lipofilisitet. Den motsatte sektor vil således fortrinnsvis ikke ha mer enn to, 10 fortrinnsvis en eller færre enheter med volum og lipofilisitet. Vanligvis vil, som forventet, lengre peptider kreve flere enheter volum og lipofilisitet. Peptidene som inkorporerer færre kationiske aminosyrer vil også kreve flere enheter volum og lipofilisitet. Ikke-genetisk kodete ekvivalente aminosyrer kan grupperes på samme måte, vanligvis vil aminosyrer med 5 eller færre ikke-hydrogenatomer i deres R 15 gruppe bidra med bare en enhet, disse aminosyrer vil vanligvis ikke inneholde en ringstruktur, mens større grupper bidrar med 2 enheter og vil vanligvis inneholde en ringstruktur. Enhetene som kommer fra ulike grupper blir diskutert i større detalj over.

Blant de genetisk kodete voluminøse og lipofile aminosyrer er tryptofan 20 spesielt tilpasset anvendelse i den herværende oppfinnelses fremstilling av peptider. Oppfinnerne har observert at peptider som inkorporerer tryptofan har spesielt fordelaktige peptider, dvs. peptider med god terapeutisk aktivitet og god selektivitet. Toksisitet blir ofte målt som et peptids tendens til å oppløse erythrocytter, men et videre viktig aspekt av selektivitet er evnen til å skille mellom 25 svulstceller og ikke-svulstceller av en liknende type, som her representert av modellen med Meth A celler og fibroblaster.

Derfor er tryptofan, og ikke-genetisk kodete analoger og derivater av tryptofan som fremviser liknende 3-dimensjonale konfigurasjoner og hydrofobe egenskaper, foretrukne voluminøse og lipofile aminosyrer i den foreliggende 30 oppfinnelse. Passende tryptofanderivater vil vanligvis omfatte en fusjonert dobbeltringstruktur som fortrinnsvis inneholder en 5-leddet og en 6-leddet ring, der den 6-leddete ring fortrinnsvis er aryl eller alkyl, fortrinnsvis aryl. En eller begge disse ringer kan være moderat substituert med for eksempel C<sub>1-3</sub>, fortrinnsvis C<sub>1-2</sub> alkylgrupper, eventuelt der en eller flere av karbonatomene har blitt byttet ut med

nitrogen, oksygen eller svovel, der ringen er blitt substituert med hydroksylgrupper eller halogener. Imidazolgruppen til tryptofan kan alternativt ha blitt byttet ut med en C2 til C5 kjedet eller forgrenet alkyl gruppe, med en eller flere karbonatomer som evt. tubyttet som diskutert over. Disse tryptofan analoger vil alle bidra med  
5 2,5 volum- og lipofilisitets-enheter.

Som diskutert over og eksemplifisert i Fig. 2 er oppdelingen av peptidet i 4 sektorer, den kationiske sektor, de to sektorer ved siden av den kationiske sektor, her beskrevet som 'flankerende sektorer', og sektoren rett ovenfor den kationiske sektor, benevnt 'den motsatte sektor', sentralt for denne oppfinnelse. Slik  
10 oppdeling har ikke tidligere blitt anvendt, og gir, overraskende nok, en hensiktsmessig ramme for både å planlegge nye peptider og maksimalisere effektivitet og minimalisere toksisitet i kjente peptider.

For enkelthets skyld blir peptidet først tegnet i form av et  $\alpha$ -heliks hjul for å forenkle identifikasjonen av den kationiske sektor. Dette kan utføres med hånd,  
15 bare ved å tegne peptidet på papir, eller ved modellering, eventuelt med datamodellering, eller på enhver annen måte.

Fremgangsmåte for fremstilling vil derfor vanligvis bestå av faser med planlegging og syntese. Planleggingstrinnene kan foregå med hjelp av datamaskin, og dataprogrammer som kan anvendes for eksempel for å konstruere  
20  $\alpha$ -heliks hjul er godt kjent i faget og et passende program er 'Protean and Edit Sequence' fra DNA Star, Inc. Fremgangsmåter for peptidsyntese er godt kjent i faget og blir diskutert i større detalj senere.

Fremgangsmåtene som beskrives her kan tillempes til både modifikasjon av eksisterende peptider, for eksempel for å redusere toksisitet, forsterke selektivitet  
25 eller aktivitet til et kjent lytisk peptid, eller til oppbygging og syntese av et nytt peptid som forventes å ha spesifikke terapeutiske applikasjoner. Oppfinnerne har derfor, som resultat av deres overraskende resultater som dreier seg om måten som de relative posisjoner til kationiske og voluminøse/lipofile aminosyrer påvirker aktivitet og selektivitet, frembrakt en ny strategi for oppbygging og syntese av  
30 peptider med en bred skala av terapeutiske applikasjoner. Spesielt er strategien hensiktsmessig for oppbygging og syntese av lytiske peptider som retter seg mot mikrobielle celler eller svulstceller.

Den overraskende gode selektivitet til disse peptider gjør dem spesielt effektive som anti-svulst peptider. Den foreliggende oppfinnelse gjør det derfor

mulig å modifisere et amfipatisk heliksformet peptid med lav toksisitet ved å tilføre voluminøse og lipofile aminosyrer eller å flytte på de opprinnelige voluminøse og lipofile aminosyrer for å gi forsterket svulstdrepende aktivitet og selektivitet.

Den foreliggende oppfinnelse dreier seg om optimalisering av den terapeutiske effekt til de voluminøse og lipofile grupper som finnes innen peptidet. Det har vanligvis blitt observert at jo større det totale volum av et peptid, for eksempel jo flere voluminøse og lipofile grupper eller jo flere enheter med volum og lipofilitet som er tilstede, jo høyere aktivitet (både toksisk og terapeutisk) viser peptidet. Det er derfor et ønske å anvende de voluminøse grupper på best mulig måte for å maksimere terapeutisk aktivitet og minimalisere toksisk effekter, og den foreliggende oppfinnelse retter seg mot dette behov.

Dette behov kan være spesielt akutt når det er viktig å oppnå hensiktsmessig terapeutisk effekt, men å beholde meget lav *in vivo* toksisitet, slik som ofte er tilfelle når man behandler barn eller kreftpasienter som er svekket av enten deres kreftsykdom og/eller behandlinger som de har mottatt. Maksimalisering av effekten av et lite antall voluminøse og lipofile grupper kan også være viktig i visse medikamentleveringssystemer, for eksempel der det blir ønsket å minimalisere størrelsen og/eller hydrofobisiteten til det tilførte peptid. Det kan også være hensiktsmessig å holde antall lipofile rester på et minimum, siden et høyere antall kan senke graden av  $\alpha$ -helikskonfigurasjon i peptidet, for eksempel har Ala en mye sterkere stabiliserende effekt på  $\alpha$ -heliks enn større lipofile grupper har.

Identifikasjonsprosessen kan involvere aspekter av oppbygning og modifikasjon av et peptid, enten *de novo* eller basert på et kjent peptid, der målet er å forsterke aktiviteten og/eller selektiviteten til det kjente peptid. Prosessen kan bestå av *in vitro* eller *in vivo* testing av peptidet, fulgt av videre modifikasjoner innen de parametre som defineres her der det er nødvendig eller ønskelig, og ny syntese og ny testing før evt. formulering i en farmasøytisk blanding. Prosessen kan bestå av identifikasjon av et peptid, testing av peptidets bioaktivitet, og syntese av et ikke-peptid derivat eller et peptidomimetikum for evt. formulering.

Et viktig trinn er identifikasjon av den kationiske sektor. Den kationiske sektor vil omfatte minst to kationiske aminosyrer, fortrinnsvis 3 eller 4 eller flere kationiske rester. Ikke alle aminosyrene innenfor den kationiske sektor vil være kationiske av natur, men den kationiske sektor vil inneholde ikke mer enn to ikke-

kationiske aminosyrer, fortrinnsvis ikke mer enn en kationisk aminosyre. En umodifisert N-terminal aminosyrer blir vurdert å være en 'kationisk aminosyre' siden N-terminalen er positivt ladet ved pH 7,0. Alternativt har den en anionisk R gruppe, i så fall blir den ikke lenger betraktet som en kationisk aminosyre.

5 Den kationiske sektor vil derfor være den sektor som inkorporerer det største antall kationiske aminosyrer, men som har et maksimum på 2 ikke-kationiske aminosyrer. Identifikasjon av kationiske sektorer innen peptider, spesielt de som danner en amfipatisk  $\alpha$ -heliks, er en teknikk som er godt kjent for dem som er øvet i faget.

10 Vinkelen på den kationiske sektor vil vanligvis variere fra 200 til 60°, fortrinnsvis fra 180 til 90°. Et peptid, når det blir fremstilt i  $\alpha$ -heliks hjulformatet (også benevnt en heliks hjulprojeksjon), kan ha mer enn en samling av kationiske rester dvs. mer enn en 'kationisk sektor'. I dette tilfelle blir den hovedkationiske sektor, dvs. sektoren med det største antall kationiske aminosyrer, tatt som å  
15 representere den kationiske sektor i denne oppfinnelses sammenheng.

Den kationiske sektor vil fortrinnsvis omfatte minst halvparten av alle de kationiske aminosyrer i peptidet. Fortrinnsvis 60%, mer fordelaktig 70%, for eksempel 80%, eller flere av alle kationiske rester vil være i den kationiske sektor. Kravet at peptidet i alle tilfeller kan danne og klassifiseres som en amfipatisk  $\alpha$ -  
20 heliks krever at det må være et visst mønster og konsentrasjon av ulike typer aminosyrerester, som vil forståes av en øvet person.

Dersom den kationiske sektor har en vinkel på for eksempel 180° vil de flankerende og motsatte sektorer hver ha en vinkel på 60°. I et peptid med 12, 18 eller 24 aminosyrer vil derfor hver av disse tre sektorer ha henholdsvis 2, 3, eller 4  
25 rester (den kationiske sektor vil i hvert av disse tilfeller ha 6, 9 eller 12 aminosyrer). Det er klart at antallet aminosyrer i den ikke-kationiske del av peptidet ikke alltid vil være delbart med tre, som gjør det mulig å skissere de andre tre sektorers struktur. I dette tilfelle vil de to flankerende sektorer alltid ha det samme antall rester mens den motsatte sektor kan ha en flere eller en færre rest  
30 enn de to flankerende sektorer. Det er derfor passende å henvise til de tre sektorer utenom den kationiske sektor som å være i hovedsak like store, og det vil ikke alltid være mulig at de skal ha nøyaktig lik størrelse.

Peptidene vil fortrinnsvis ha 12 eller flere aminosyrer, for eksempel være 12 eller 21 aminosyrer lange.

Oppfinnerne har vist at for å fremvise ønsket antimikrobiell og/eller  
antivulst aktivitet er det posisjonen innen den 3-dimensjonale struktur til de  
voluminøse og lipofile aminosyrer, like mye som antallet av slike rester, som er  
viktig. Spesielt har det blitt vist at de foretrukne peptider er de som ikke har et  
5 betydningsfullt antall voluminøse og lipofile rester i regionen motsatt den  
kationiske sektor, dette synes å hjelpe selektivitet, enten ved å øke aktivitet eller  
ved å senke toksisitet. Vurdert på en annen måte er de foretrukne peptider de der  
de fleste voluminøse og lipofile aminosyrerester er i områdene ved siden av den  
kationiske sektor.

10 Peptider med forsterket antibakteriell og/eller antivulst aktivitet og  
fortrinnsvis redusert toksisitet kan fremstilles ved å flytte en voluminøs og lipofil  
aminosyre fra dens posisjon i den opprinnelige peptidsekvens til et område nær  
den kationiske sektor, slik at den totale aminosyresammensetning forblir uendret. I  
stedet for den voluminøse og lipofile aminosyre kan aminosyreresten fra  
15 posisjonen ved siden av den kationiske sektor hvorfra den voluminøse og lipofile  
aminosyre kommer, heller anvendes, eller enhver annen mindre voluminøs og  
lipofil aminosyre. Passende voluminøse og lipofile aminosyrer i ikke-foretrukne  
posisjoner som flyttes inn i regionen ved siden av den kationiske sektor (foretrukne  
posisjon) kan identifiseres med for eksempel en alanin-skanning, som identifiserer  
20 ikke-essensielle aminosyrer, eller ved å studere en heliks hjul-struktur, der ikke-  
foretrukne aminosyrer vanligvis er plassert motsatt et kationisk domene.

I en variasjon av ovennevnte modifikasjon blir en voluminøs og lipofil  
aminosyre tatt fra en ikke-foretrukket posisjon, fortrinnsvis i den motsatte sektor,  
og noe som er funksjonelt ekvivalent med dette blir plassert i en foretrukket  
25 posisjon, dvs. i en flankerende sektor. Aminosyreresten i den nye plass i den  
flankerende sektor vil være voluminøs og lipofil, men kan for eksempel være  
tryptofan eller en modifisert eller ikke-genetisk kodet aminosyre mens den  
utbyttete aminosyre i den kationiske sektor var fenylalanin. Den voluminøse og  
lipofile karakter til resten er således viktigere enn dens nøyaktige struktur.

30 Mens et minimalt antall voluminøse og lipofile aminosyrer er nødvendige for  
og aktivitet kan deres plass relativt til den kationiske sektor avgjøre om peptidet  
har god aktivitet og er selektivt for målcellene, dvs. har lav toksisitet. For peptider  
på 19 aminosyrer eller mer vil generelt minst 7,5 volum- og lipofilisitet-enheter  
totalt kreves (for eksempel tre Trp rester eller lignende). Peptider på 12 til 18

aminosyrer i lengde vil kreve færre enheter, vanligvis 5 eller flere. Viktigere er at det optimale antall enheter også vil avhenge av antall kationiske rester som er tilstede, der færre enheter kreves dersom flere kationiske rester er tilstede. For eksempel kan 7,5 enheter i de flankerende sektorer være optimale når peptidet har 8-10 kationiske rester, men 10 enheter kan være å foretrekke for peptider med 6 eller 7 kationiske rester.

Det er mulig å forsterke aktiviteten til et kjent peptid der voluminøse og lipofile aminosyrer blir rearrangert slik at de er i en posisjon som oppfinnerne har vist forbedrer aktivitetsprofilen til peptidet som en helhet. Dette vil vanligvis involvere flytting fra den motsatte sektor til en flankerende sektor. Som diskutert over kan dette bety at den totale aminosyresammensetning av peptidet forblir uendret. Mer spesielt betyr dette at det totale antall voluminøse og lipofile rester i det modifiserte peptid kan være den samme som i den opprinnelige sekvens. Den opprinnelige sekvens kan være et naturlig forekommende peptid, eller et fragment fra et naturlig forekommende peptid, eller et peptid som er oppbygget eller modifisert for å frembringe antimikrobiell eller annen aktivitet.

Aminosyrer av den samme type, for eksempel kationiske, voluminøse og lipofile (som definert over), anioniske (asparaginsyre og glutaminsyre) eller innen de følgende funksjonelle grupper glycin og alanin eller serin, threonin, asparagin, glutamin og cystein kan byttes ut med andre rester innen den samme klasse uten å endre den funksjonelle sammensetning av peptidet. Prolin kan vurderes å være i en kasse for seg selv og er vanligvis ikke en foretrukket komponent i oppfinnelsens peptider. Ikke-genetisk kodete aminosyrer som faller innenfor disse funksjonelle grupperinger er enkelt tilgjengelige og er kjent for den øvete person.

Under visse omstendigheter kan en modifikasjon som endrer den funksjonelle sammensetning av utgangspeptidet utføres, i tillegg til det å fjerne en voluminøs og lipofil aminosyre fra den motsatte sektor og innføre en voluminøs og lipofil aminosyre i en nærliggende sektor. For eksempel kan antall kationiske eller voluminøse og lipofile aminosyrer bli øket.

Det er mulig å 'stokke' eksisterende aminosyrerester innen peptidet for å optimalisere aktivitet, slik at antall rester innen hver funksjonell kategori forblir den samme eller nesten den samme. Dette kan bli klassifisert som en funksjonell homologi som er avhengig av sammensetningen og ikke av den spesielle rekkefølge i sekvensen, og hvor aminosyrene i de ulike klasser funksjonelt er de

samme. Således har tripeptidet Arg-Trp-Ala en 100% funksjonell homologi med Phe-Lys-Gly. Peptidene vil ha minst 70%, fortrinnsvis en 80%, til og med 90% eller 100% funksjonell homologi med et kjent eller naturlig forekommende peptid som fremviser en antimikrobiell eller antisvulst aktivitet.

5 For enkelthets skyld blir de velkjente aminosyrekoder som anvender tre og en bokstav bli anvendt her.

Passende peptider som kan modifiseres for å frembringe peptidene inkludere alle peptider slik som magaininer, PGLa-analoger, cecropiner, defensiner, melittin, og laktoferrin, og generelt klasse (L) lytiske peptider etc., som  
10 er kjent å fremvise cytotoxisk, spesielt antimikrobiell aktivitet i deres ikke-modifiserte form. Passende peptider inkluderer videre de som ikke er naturlig forekommende, men som har blitt syntetisert og som fremviser cytotoxisk aktivitet, slike peptider inkluderer modelinene. I denne sammenheng inkluderer premodifikasjons-peptidene fragmenter som er fremskaffet ved fordøyelse av  
15 naturlig forekommende proteiner eller peptider. Nye antibakterielle proteiner og peptider blir fremdeles oppdaget, og det antas at den foreliggende oppfinnelses fremgangsmåter har generell anvendbarhet og med rimelig sjanse for å lykkes lett kan anvendes på peptider som foreløpig er uidentifisert, men som etter hvert blir karakterisert som cytotoxiske, spesielt som antimikrobielle.

20 I tilfellet med antisvulstmidler er god selektivitet både spesielt viktig og vanskelig å oppnå på grunn av likhetene mellom mål- og ikke-målceller. Det har blitt funnet at peptidene som har redusert toksisitet, men som fremdeles har en rimelig antibakteriell og antisvulst aktivitet (dvs. med øket selektivitet) kan fremstilles ved å bytte ut en ikke-essensiell, meget voluminøs og lipofil aminosyre  
25 slik som tryptofan eller fenylalanin med en mindre voluminøs og lipofil aminosyre som for eksempel isoleucin eller leucin, eller til og med alanin eller lysin. Vanligvis vil en "ikke-essensiell" voluminøs eller lipofil aminosyre i heliksen være plassert på den motsatte side fra den kationiske sektor (d.v.s. i den motsatte sektor), slike ikke-essensielle voluminøse og lipofile aminosyrer kan identifiseres ved å anvende  
30 et heliks hjul-diagram eller ved en 'alaninskanning'. Disse peptider bør likevel bevare minst to, fortrinnsvis minst tre voluminøse og lipofile aminosyrer, som definert her. Vurdert som volum- og lipofilisitetsheter vil peptidene fortrinnsvis ha 5, fortrinnsvis minst 7, for eksempel 7,5 eller flere volum- og lipofilisitets-

enheter, som fortrinnsvis blir funnet å være i sektorene som ligger ved siden av den kationiske sektor.

Indolici(di)n er et naturlig forekommende, tryptofant-rikt peptid som enkelt kan modifieres på denne måte for å senke dets toksisitet. Den hemolytiske  
5 aktivitet til et peptid kan enkelt bli redusert på denne måte. Toksisitet, målt som en tendens til å hemme eller oppløse fibroblastceller, kan reduseres ved å bytte ut en voluminøs og lipofil gruppe med en rest som ikke er voluminøs og lipofil, for eksempel alanin.

Andre passende steder der en voluminøs og lipofil aminosyre kan  
10 inkorporeres er posisjoner ved eller nær ved, fortrinnsvis nær ved, en eksisterende lipofil aminosyre. Nærhet blir vurdert i relasjon til peptidets sekundær-, ikke til primærstrukturen. Fremgangsmåtene som er nødvendige for å utføre en alanin-skanning og for å konstruere heliske hjul er godt kjent i faget.

Spesielt interessante effekter med henblikk på selektivitet har blitt observert  
15 med peptider som inkorporerer en eller flere dobbeltfusjonerte ringers voluminøse og lipofile grupper, som tryptofan. Aminosyre R-grupper som består av to-fusjonerte ringer med liten eller ingen substitusjon vil vanligvis bidra med 2,5 volum- og lipofilisitetsheter, som diskutert over. Effektene har blitt studert med en serie modellpeptider basert på en (KAAKAA)<sub>3</sub> sekvens. Det har blitt vist at når  
20 det gjelder peptider med 3 tryptofanrester bør disse være plassert i sektorene som er ved siden av den kationiske sektor. Dersom slikt peptid inneholder fire tryptofanrester bør disse være plassert enten i den motsatte sektor eller i de regioner i de flankerende sektorer som ikke er like ved siden av den kationiske sektor.

25 Dette antyder at et peptid vil ha et terskelnivå av volum og lipofilisitet, og over denne verdi er det ønskelig å plassere voluminøse og lipofile rester vekk fra de mest aktive regioner i peptidet, dvs. de som er ved siden av, spesielt rett ved siden av, den kationiske sektor. Som det vil forstås av den øvete person vil denne terskelverdi variere, avhengig av peptidets lengde, men mer spesielt  
30 avhengig av antall kationiske rester, og grad av volum og lipofilisitet som fremvises av de ulike grupper.

Tryptofan er spesielt hensiktsmessig i oppbygging av peptider som inkorporerer god selektivitet for svulstceller, siden denne aminosyre er naturlig forekommende og derfor kan ha blitt inkorporert i en prosess som bygger på

transkripsjon og translasjon av peptidproduktet, for eksempel ved hjelp av bakterielle fermenteringssystemer. Den kan også lett omsettes av kroppen uten at det oppstår potensielt farlige toksiske nedbrytningsprodukter.

Ikke desto mindre blir det forstått at peptider kan fremstilles via 'syntetiske' måter som ikke baserer seg på de normale mekanismer for transkripsjon og translasjon av gener, og i disse molekyler kan aminosyrer som ikke er genetisk kodet bli inkorporert. I tillegg kan peptider som fremstilles av for eksempel bakterier gjennomgå post-translasjonelle modifikasjoner.

Tryptofan analoger er en gruppe molekyler som fremviser lignende tredimensjonale strukturer som tryptofan har, samt også andre lignende egenskaper i relasjon til lipofilisitet og polaritet. Lipofilisitet kan måles på flere ulike måter som er kjent i faget, spesielt er den eksperimentelle bestemmelse av en fordelingskoeffisient i et vann:oktanol system kjent. Fordelingskoeffisienten  $P$  (eller  $\log P$ ) blir definert som konsentrasjonen av en forbindelse i oktanol-fasen delt på konsentrasjonen i vannfasen. Indolgruppen i Trp har en  $\log P$  på 2,14, og sidekjeden til Trp analoger vil fortrinnsvis ha  $\log P$  verdier på 1,5 til 3,5, mer fordelaktig 1,8 til 2,5. Disse analoger vil inkorporere en to-fusjonert-ring struktur, der en ring fortrinnsvis er en aromatisk C6 ring, for eksempel som i benzothierylalanin, den andre ring kan være en 5- eller 6-leddet ring som hensiktsmessig også kan være aromatisk, for eksempel som i 2- eller 1-naftylalanin, eller en 5- eller 6-leddet ikke-aromatisk gruppe der et eller flere karbonatomer eventuelt er byttet ut med oksygen, nitrogen, eller svovel. De to-fusjonerte ringer kan være substituert med metyl, hydroksyl eller halogengrupper, men vil fortrinnsvis være usubstituerte.

I de peptider som har mindre kationiske sektorer, for eksempel 15mer-peptidet KKWAKKAWKWAKKAW som bare har 7 rester som danner den kationiske sektor, sammenlignet med 9 rester i 21mer-peptidet beskrevet over, er en større grad av volum og lipofilisitet ønskelig for å oppnå optimal terapeutisk aktivitet og selektivitet. I overensstemmelse med dette ga fire tryptofan rester tilstede i de flankerende regioner utmerkede resultater. Det er derfor en balanse, slik at dersom et peptid er meget kationisk og derfor har en meget sterk affinitet for negativt ladete fosfolipider i cellemembraner er det ønskelig med et mindre totalt antall voluminøse og lipofile grupper for å oppnå optimal selektivitet. Det kan eventuelt bli nødvendig å plassere noe av volumet og lipofilisiteten i de mindre

aktive regioner, dvs. i regionene motsatt den kationiske sektor, for å redusere effekt av de voluminøse og lipofile grupper, for eksempel for å redusere toksisitet. Dersom et molekyl har færre kationiske rester kan det være nødvendig å plassere alle de voluminøse og lipofile rester i de mest aktive regioner i peptidet, ved siden  
5 av den kationiske sektor. Resultatene og prinsippene som diskuteres her tillater den øvete person å optimalisere aktivitet og selektivitet i det utvalgte peptidsystem.

Mest hensiktsmessig blir de gjenværende deler av peptidet delt opp i tre videre sektorer som har stort sett lik stor størrelse, der nevnte peptid fortrinnsvis  
10 inkorporer to, mer hensiktsmessig tre tryptofanrester eller analoger av disse i de flankerende sektorer, der minst en og mer fordelaktig to av disse rester er plassert umiddelbart ved siden av den kationiske sektor, eller med fem eller fortrinnsvis fire tryptofan rester eller analoger av disse i sektoren plassert på motsatt side av den kationiske sektor, eller fire eller fem rester fordelt mellom de tre ikke-kationiske  
15 sektorer, forutsatt at ingen av disse rester er i posisjoner som er umiddelbart ved siden av den kationiske sektor. Fortrinnsvis er ikke mer enn en, mer fordelaktig ingen av disse rester bare en posisjon unna den kationiske sektor (forutsatt antagelsen om at den totale størrelse på peptidet tillater dette). De gjenværende rester blir fortrinnsvis utvalgt fra glycin, alanin eller valin, fortrinnsvis glycin eller  
20 alanin.

Det har videre blitt observert at når det gjelder meget store, voluminøse og lipofile aminosyrer, f.eks. bifenylyalanin, er posisjonen i det heliske hjul mindre viktig, og peptider med aminosyrer som hver bringer tre volum- og lipofilisitetsheter kan fremvise god selektivitet enten de er plassert i de  
25 flankerende eller de motstående sektorer.

I tilfellet med LFB(17-31), et 15 aminosyrefragment fra LFB med sekvensen Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala, ble ikke-essensielle aminosyrer, bestemt med et alanin-skan, funnet å være Cys (3), Gln (7) og Gly (14). Her er nummereringen i absolutte begreper og relatert til peptidet  
30 selv. Analoger av LFB(17-31), der disse aminosyrer blir byttet ut med ikke-genetiske voluminøse og lipofile aminosyrer, kan være spesielt effektive. For å modifisere magaininpeptider slik som magainin 2 kan inkorporering av ikke-genetiske voluminøse og lipofile aminosyrer i posisjonene Phe(16) og Glu(19) være spesielt effektive.

Disse modifikasjoner illustrerer de generelle prinsipper som er beskrevet over, dvs. at peptidet kan vurderes som om det omfatter ulike sektorer, og, overraskende nok, at sektoren ved siden av den kationiske sektor er en foretrukket region for voluminøse og lipofile rester, og videre at regionen rett ovenfor den kationiske sektor bør inneholde få eller ingen voluminøse og lipofile rester.

Tryptofan utbyttingene i Eksempel 2 indikerer betydningen av å ha en voluminøs og lipofil rest, her Trp, i regionene som er ved siden av den kationiske sektor med hensyn til både terapeutisk aktivitet (syklisk aktivitet mot Meth A celler) og selektivitet, dvs. evne til å målretting mot svulstceller heller enn fibroblaster eller røde blodceller. Som kan sees i Fig. 1 er posisjon 3 motsatt den kationiske sektor, og posisjonene 9 og 11 er ved siden av den kationiske sektor.

Det må forstås at alle oppfinnelsens peptider som beskrives her kan inkorporere ikke-genetisk kodete aminosyrer og peptider som har blitt modifisert, for eksempel ved N- eller C-terminalen, vanligvis ved amidering eller eterifisering av C-terminalen. De voluminøse og lipofile samt kationiske aminosyrer kan derfor bli frembrakt via ikke-genetisk kodete, men naturlig forekommende aminosyrer, av ikke-naturlig forekommende aminosyrer, eller aminosyrer som har blitt modifisert. Eksempler på ikke-genetiske voluminøse og lipofile aminosyrer inkluderer adamantylalanin, 3-benzothienylalanin, 4,4'-bifenylalanin, 3,3-difenylalanin, homofenylalanin, 2,6-diklorbenzyltyrosin, sykloheksyltyrosin, 7-benzyloksytryptofan, tri-*tert*-butyltryptofan, homotryptofan, 3-(-antraceny)-L-alanin, L-*p-iso*-propylfenylalanin, L-tyroksin, og 3,3',5-triiodo-L-tyronin. Modifiserende grupper som frembringer voluminøse og lipofile aminosyrer inkluderer Pms (2,2,5,7,8-pentametylkroman-6-sulfonyl), Mtr (4-metoksy-2,3,6-trimetylbenzensulfonyl) og Pbf (2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuransulfonyl), som enkelt kan øke volum og lipofilisitet i de aromatiske aminosyrer, for eksempel Phe, Trp og Tyr. Tert-butyl gruppen er også en vanlig beskyttende gruppe for en lang rekke aminosyrer, og har evne til å frembringe ikke-genetiske voluminøse og lipofile aminosyrer, spesielt når aromatiske rester blir modifisert. Z-gruppen (karboksybenzyl) er videre en beskyttende gruppe som kan anvendes til å øke volumet og lipofilisiteten til en aminosyre.

Det er nå ganske vanlig i faget å bytte ut peptid- eller proteinbaserte aktive forbindelser, for eksempel terapeutiske peptider, med peptidomimetika med funksjonelt ekvivalent aktivitet. Generelt vil slike forbindelser ganske enkelt bytte ut

$(-C(R)CONH)_n$  ryggraden til peptidet med en alternativ fleksibel lineær ryggrad, for eksempel en  $(-C(R)NHCO)_n$  eller  $(-C(R)CH_2CH_2)_n$ , eller en ikkelineær ryggrad (for eksempel basert på en streng med fusjonerte sykloheksan ringer).

Tiltross for endringer i ryggraden blir de tilhengende funksjonelle grupper (sidekjedene i det opprinnelige peptid) presentert på en tilsvarende måte, noe som tillater forbindelsen å fremvise lignende antibakterielle og antisvulst aktiviteter. Derfor er det typisk at disse peptidomimetika har evne til å representere ekvivalenten av et  $\alpha$ -heliks hjul, og vil også ha den ekvivalente heliks/sylindriske fremvisning av vedhengende funksjonelle grupper.

Ulike molekylære bibliotek og kombinatorisk-kjemiske fremgangsmåter som eksisterer er tilgjengelige for å lette identifikasjonen, seleksjonen og/eller syntesen av slike forbindelser med standard fremgangsmåter (Kieber-Emons, T. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8:435-441).

Begrepet "cytotoksisk" skal dreie seg om ikke bare en aktivitet mot prokaryote, men også mot eukaryote celler. Selv om det i visse omstendigheter er ønskelig å ha et peptid som har en god antibakteriell aktivitet, men som ikke løser opp eller på annen måte ødelegger pasientens egne celler har peptidene innenfor oppfinnelsens område blitt vist å ha en antisvulst-aktivitet. Den antisvulst aktivitet som disse peptider viser, og medikamenter som inneholder dem, representerer videre aspekter av den foreliggende oppfinnelse. Antisvulst aktivitet inkluderer destruksjon eller reduksjon av størrelse eller antall av godartete eller ondartete svulster, og prevensjon eller reduksjon av spredning.

Peptider som er fremstilt med oppfinnelsens fremgangsmåter kan anvendes i terapi, spesielt for å destruere eller redusere godartete eller ondartete svulster i antall eller størrelse eller å forhindre eller redusere spredning. Peptider fremstilt med oppfinnelsens fremgangsmåter kan anvendes for produksjon av et medikament som skal destruere eller redusere godartete eller ondartete svulster i antall eller størrelse eller forhindre eller redusere spredning.

Den antibakterielle aktivitet som peptider har kan manifestere seg på en rekke måter. Visse modifikasjoner kan resultere i peptider som er bakteriostatiske (hindrer vekst av bakterier), og andre i peptider som er bakteriocide (dreper bakterier). Heldigvis er de fleste av oppfinnelsens fremstilte peptider bakteriocide. Begrepet "tilføre" henviser på å eksponere bakteriene overfor et peptid slik at dette effektivt kan hemme, drepe eller oppløse bakterier, binde endotoksin (LPS), eller

permeabilisere Gram-negative bakteriers ytre membraner. Tilføring kan være *in vitro*, for eksempel ved å tilsette peptidet til en bakteriekultur for å teste følsomheten hos bakteriene overfor peptidet. Tilførsel kan være *in vivo*, for eksempel ved å tilsette peptidet til et individ med en bakteriell sykdom, slik som

5 septisk sjokk ('blodforgiftning'). "Inhibisjon" eller "effektiv hemmende (inhibitoriske) mengde" henspiller på den mengde peptid som kreves for å fremkalle en bakteriostatisk eller baktericidal effekt. Eksempler på bakterier som kan hemmes inkluderer *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. typhimurium* og *S. aureus*.

Fremgangsmåten for å hemme vekst av bakterier kan videre inkludere tilsetning

10 av antibiotika for å oppnå kombinasjons- eller synergistisk terapi. Den passende type antibiotika som tilføres vil vanligvis avhenge av følsomheten til bakteriene, bl.a. av om bakterien er Gram positiv eller –negativ, og vil lett bestemmes av enhver med øvelse i faget.

Ved syntetisering av peptidene vil de reaktive gruppene som er tilstede (for eksempel amino, thiol og/eller karboksyl) bli beskyttet under den totale syntese.

15 Det avsluttende trinn i syntesen vil derfor være å fjerne beskyttelsen på et beskyttet derivat fra oppfinnelsen.

Under oppbyggingen av peptidet kan man i prinsippet begynne enten ved C-terminalen eller N-terminalen, selv om den C-terminale begynnelsesprosedyre

20 blir foretrukket. De ikke-genetiske aminosyrer kan inkorporeres på dette trinn siden sekvensen er ekstendert, eller som et resultat av post-syntetiske modifikasjoner.

Syntesen kan gjennomføres på et fast underlag og slike underlag er godt kjent i faget.

En lang rekke beskyttelsesgrupper for aminosyrer er kjent, og passende

25 aminbeskyttelsesgrupper kan inkludere karbobenzoksy (også benevnt Z) t-butoksykarbonyl (også benevnt Boc), 4-metoksy-2,3,6-trimetylbenzen sulfonyl (Mtr) og 9-fluorenylmetoksykarbonyl (også benevnt Fmoc). Det vil forståes at når peptidet blir bygget opp fra den C-terminale ende vil en amin-beskyttende gruppe være tilstede på  $\alpha$ -aminogruppen på hver ny rest som tilføres, og det vil være

30 nødvendig å fjerne denne gruppe selektivt før det neste koplingstrinn.

Karboksylbeskyttende grupper som for eksempel kan anvendes inkluderer lett kløvbare estergrupper slik som benzyl (Bzl), p-nitrobenzyl (ONb), pentaklorofenyl (OPCIP), pentafluorofenyl (Opfp) eller t-butyl (OtBu) grupper samt

også koplingsgruppene på faste underlag, for eksempel metylgruppene koplet til polystyren.

Thiolbeskyttende grupper inkluderer p-metoksybenzyl (Mob), trityl (Trt) og acetamidometyl (Acm).

5 En lang rekke fremgangsmåter eksisterer som kan anvendes for å fjerne amin- og karboksylbeskyttende grupper. Disse må imidlertid være i overensstemmelse med syntesestrategien som planlegges. Beskyttelsesgruppene for sidekjedene må være stabile under de betingelser som anvendes for å fjerne de temporære  $\alpha$ -aminogrupper før det neste påkoplingstrinn.

10 Beskyttelsesgruppene for aminer, som Boc, og grupper for beskyttelse av karboksyler, som tBu, kan fjernes samtidig med syrebehandling, for eksempel med trifluoreddiksyre. Thiol-beskyttende grupper som Trt kan selektivt fjernes ved å anvende et oksyderende middel som jod. Syntesen kan anvende aminosyrederivater med den følgende formel: Fmoc-aminosyre-Opfp.

15 Oppfinnelsens fremstilte peptider kan presenteres i de konvensjonelle farmakologiske tilførselsformer som tabletter, dekkete tabletter, nesesusj, løsninger, emulsjoner, liposomer, pulvere, kapsler eller langtidsfrisettende former. Oppfinnelsens fremstilte peptider er spesielt hensiktsmessige til bruk i lokal tilførsel, for eksempel i behandling av diabetiske sår. Vanlige farmasøytiske  
20 eksipienter, samt de vanlige fremgangsmåter for produksjon, kan anvendes for å fremstille disse former. Tabletter kan for eksempel fremstilles ved å blande den/de aktive ingrediens(er) med kjente eksipienter, som for eksempel med fortynningsmidler, som kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller laktose, oppløsnere som maisstivelse eller alginsyre, bindere som stivelse eller gelatin, smørende  
25 midler som magnesium stearat eller talkum, og/eller midler for å fremskaffe langvarig frisetting, som karboksypolymetylen, karboksymetylcellulose, celluloseacetatfat, eller polyvinylacetat.

Tablettene kan om ønsket bestå av flere lag. Dekkete tabletter kan fremstilles ved å dekke kjerner, fremskaffet på en lignende måte som tablettene,  
30 med midler som vanligvis benyttes for å dekke tabletter, for eksempel polyvinyl pyrrolidon eller skjellakk, gummiarabicum, talkum, titaniumdioksyd eller sukker. For å fremskaffe forlenget frisetting, eller for å unngå uforlikelighet kan kjernen også bestå av flere lag. Tablettdekket kan også bestå av flere lag for å oppnå

vedvarende frisetting, i dette tilfelle kan eksipientene, som nevnt over for tabletter, bli anvendt.

Organ-spesifikke bærersystemer kan også anvendes.

Injeksjonsløsninger kan for eksempel bli produsert på den vanlige måte, slik  
5 som ved tilsetning av konserveringsmidler som p-hydroksybenzoat, eller stabiliserende midler som EDTA. Løsningene blir deretter fylt i injeksjonsflasker eller ampuller.

Nesedusjer som er en foretrukket tilførselsform kan formuleres på samme måte i vandige løsninger og pakkes i dusjbeholdere, enten med en aerosol  
10 drivgass eller bli utstyrt med utstyr som tillater manuell kompresjon. Kapsler som inneholder en eller flere aktive ingredienser kan for eksempel fremstilles ved å blande de aktive ingredienser med inerte bærere, som laktose eller sorbitol, og fylling av blandingen inn i gelatinkapsler.

Passende stikkpiller kan for eksempel bli fremstilt ved å blande den aktive  
15 ingrediens eller de aktive ingredienskombinasjoner med de vanlige bærere som anvendes for dette formål, slik som naturlige fettstoffer eller polyetylenglykol eller derivater av dette.

Doseringsenheter som inneholder peptidene fremstilt heri kan inneholde fortrinnsvis 0,1-10 mg, for eksempel 1-5 mg av peptidene. De farmasøytiske  
20 blandinger kan i tillegg inneholde ytterligere andre aktive ingredienser, deriblant andre cytotoksiske midler slik som andre antimikrobielle peptider. Andre aktive ingredienser kan inkludere ulike typer antibiotika, cytokiner som for eksempel IFN- $\gamma$ , TNF, CSF, og vekstfaktorer, immunomodulatorer, kjemoterapeutika, for eksempel cisplatin eller antistoff.

25 Peptidene, når de anvendes i lokale blandinger, kan være tilstede i mengder på minst 0,1% per vekt. I de fleste tilfeller er det ikke nødvendig å anvende peptidet i mengder som er over 1,0 % per vekt.

Antisvulst peptider kan tilføres i kombinasjon, muligens i synergistisk kombinasjon med andre aktive midler eller terapiformer, for eksempel kan tilførsel  
30 av et peptid ifølge denne oppfinnelse bli kombinert med kjemoterapi, immunoterapi, kirurgi, strålingsbehandling, eller med tilførsel av andre antisvulst peptider.

Når det anvendes slike blandinger via systemisk tilførsel (intramuskulær, intravenøs, intraperitoneal tilførsel) er det aktive peptidet tilstede i en mengde som

gir et serumnivå av peptidet på minst omtrent 5 µg/ml. Vanligvis behøver ikke serumnivået av peptidet overskride 500 µg/ml. Et foretrukket serumnivå er omtrent 100 µg/ml. Slike serumnivåer kan oppnåes ved å inkorporere peptidet i en blanding som blir tilført systemisk i en dose på fra omtrent 1 til omtrent 10 mg/kg.

5 Vanligvis behøver ikke peptid(ene) bli tilført i en dose som overstiger 100 mg/kg.

Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet med henvisning til de følgende eksempler, der:

Figur 1 viser en heliks hjul-representasjon av peptidet LFB 14-31m.

10 Figur 2 viser en heliks hjul-representasjon av peptidet LFB 14-31m som har blitt delt inn i de fire sektorer ifølge oppfinnelsen.

Figur 3 viser heliks-formete hjul til de to KA18 peptider trisubstituert med tryptofan.

15 Figur 4 (a) viser heliks-hjul projeksjoner av (KAAKAA)<sub>3</sub> peptidet og (b) det samme peptid substituert med tre tryptofan rester eller (c) fire tryptofan rester.

#### EKSEMPLER:

Peptidene ble syntetisert med anvendelse av Fmoc-baserte kjemiske fremgangsmåter på en helautomatisert Milligen 9050 Syntesemaskin, og rensing og analyse ble utført med bruk av HPLC og elektrodusj massespektrometri (VG Quattro Quadropole).

20

#### MIC (Minimum inhibitoriske konsentrasjon) tester

De bakterielle stammer om ble anvendt var: *Escherichia coli* ATCC 25922 og *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Alle stammer ble lagret ved -70°C. Bakteriene ble dyrket i 2% Bacto Peptonvann (Difco 1807-17-4). Alle tester ble utført på bakterier som var i midt-logaritmisk vekstfase. Bbestemmelse av den minimale inhibitoriske konsntrasjon (MIC) for peptidene med henblikk på de bakterielle stammer ble utført i 1% Bacto Peptonvann. En standard mikroforynnings fremgangsmåte med et inokulum på  $2 \times 10^6$  CFU/ml ble anvendt.

30 Alle analyser ble utført i triplikat. Siden peptidene er positivt ladet og derfor kanskje kan binde til plastikkbrønnene kontrollmålte vi de virkelige konsentrasjoner av peptidene i løsningen med HPLC. Det var ingen forskjell mellom

konsentrasjonen i peptidene før og etter tilsetning av løsningen til plastikkbrønnene.

#### Antisvulst-aktivitet

5 Meth A er en ikke-invasiv sarkomcellelinje fra mus [Sveinbjørnsson et al., (1996) BBRC 223:643-649] som er syngen med Balb/c og som ble vedlikeholdt *in vitro* i RPMI 1640 med 2% føtalt kalveserum. Celler ( $4 \times 10^6$ ) ble tilsatt 96-brønns dyrkingsplater (Costar) i et volum på 0,1 ml RPMI 1640 medium. Peptidløsninger (0,1 ml) ble tilsatt, og platene ble inkubert ved 37°C i 30 minutter, 4 timer eller 24  
10 timer. Cytotoksisiteten ble målt ved å anvende MTT fremgangsmåten (Mosmann et al., J. Immunol. (1986) 136, 2348-2357).

#### Fibroblast analyse

MRC-5 cellene som skulle anvendes i analysen ble dyrket til  
15 sammenflytning i MEM som inneholdt 10% FBS, 1% L-glutamin og 0,1% penicillin og streptomycin. Cellene ble vasket med PBS og deretter trypsinisert ved bruk av 2 ml trypsin (i en 80 ml dyrkingskolbe). Etter at cellene hadde løsnet fra veggen, vanligvis etter ca. tre minutters inkubering, ble 5 ml medium med FBS tilsatt. Cellene ble resuspendert og telt. Cellene ble så overført til et sentrifugerør og  
20 sentrifugert ved 1500 r.p.m. (omdreininger pr. minutt) i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert til en konsentrasjon på  $1 \times 10^5$  celler/ml. 100 µl cellesuspensjoner ble overført til hver brønn i en 96-brønns mikrotiterplate, og inkubert i 24 timer for å tillate cellene å feste seg.

Etter inkubasjonen ble mediet med serum fjernet ved å snu platen opp-ned  
25 mot et filtrerpapir. 100 µl medium uten serum og L-glutamin (analysemedium) ble tilsatt hver brønn og deretter fjernet, som tidligere beskrevet. Dette ble gjort for å fjerne ethvert spor av serum. Cellene ble stimulert med tilsetning av 100 µl med ulike konsentrasjoner av peptider som var fortynnet med analysemedium til hver brønn. Resten av analysen ble utført som tidligere beskrevet for methA, med  
30 unntak av at 80 µl og ikke 130 µl volum ble fjernet etter 2 timers inkubering etter MTT tilsetning.

### Hemolytisk analyse

De hemolytiske aktiviteter til peptidene ble bestemt ved å anvende ferske humane røde blodceller (erytrocytter, RBC). 8 ml blod ble tatt fra en frisk donor. 4 ml blod ble overført til et polykarbonatrør som inneholdt heparin til  
5 sluttkonsentrasjon på 10 U/ml, og de gjenværende 4 ml blod ble overført til et glassrør som inneholdt EDTA med sluttkonsentrasjon på 15% EDTA. Erytrocyttene ble isolert fra det heparin-behandlede blod ved sentrifugering ved 1500 rpm i 10 min, og vasket tre ganger med fosfat-bufret saltvann (PBS) for å fjerne plasma og 'buffy coat'. Cellebunnfallet ble resuspendert i PBS for å oppnå  
10 sluttvolum på 4 ml. Peptidet ble fortynnet til konsentrasjoner på henholdsvis 2 mg/ml og 0,1 mg/ml. Peptidet ble videre fortynnet til konsentrasjonene som vises i Tabell 1. Til hvert rør ble først PBS tilsatt, fulgt av RBC og peptidløsninger. Hematokrittverdien (volum RBC/totalvolum x 100) i blod som var behandlet med EDTA ble bestemt etter 30 min med Sysmex K-1000, og de resuspenderte RBCer  
15 ble så fortynnet til 10% hematokritt. RBCer i PBS (1%) med og uten peptider (Table 18) ble inkubert i en ryster ved 37°C i en time, og så sentrifugert ved 4000 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble overført nøyaktig til nye polykarbonatrør, og absorbans ved 540 nm ble målt. Basalnivå hemolyse ble definert som hemoglobin frigitt i nærvær av PBS, og 100% hemolyse ble definert som hemoglobin frigitt i  
20 nærvær av 0,1 % Triton X-100.

### Eksempel 1

Prinsippene som diskuteres her ble anvendt i oppbyggingen, syntese og testing av peptider som var basert på en perfekt amfipatisk heliks-konformasjon  
25 som bare omfattet alanin og lysinrester. Sekvensen av startpeptidet var søm følger: KAAK KAAK KAAK KAAK, referert til som "KA18". Modifikasjoner til dette peptid for å innføre en eller flere voluminøse og lipofile rester ble utført ved å substituere Ala i flankesektor posisjonene 7, 9 eller 16 eller i motsatt-sektor posisjonene 6, 10 eller 17. Heliks hjul-fremstillinger av de to trisubstituerte KA18  
30 peptider blir vist i Figur 3.

Antisvulst aktivitet ble testet på MethA celler, og toksisitet på røde blodceller og normale fibroblaster. Resultatene blir vist i Tabell 1, nedenfor, og

viser betydningen av voluminøse og lipofile grupper i de flankerende, men ikke i de motsatte sektorer.

Peptid	IC <sub>50</sub> MethA μM	IC <sub>50</sub> fibroblast μM	EC <sub>50</sub> RBC μM
KA 18W <sub>10</sub>	>234	>234	>467
KA 18W <sub>16</sub>	>234	>234	>467
KA W <sub>7,16</sub>	>222	>222	>444
KA 18W <sub>6,10,17</sub>	≥211	>211	>422
KA 18W <sub>7,9,16</sub>	32	>211	>422

5

### Eksempel 2

Som et modellpeptid valgte vi en analog av laktoferricin B, et antimikrobielt peptid avledet fra bovint laktoferrin. Basert på sekvens 14-31 fra bovint laktoferrin ble dette peptid modifisert for å gi en ideell amfipatisk heliks-struktur med en trang kationisk sektor. LFB (14-31) er LFB 14-31A<sub>2,6,10,17</sub>F<sub>7</sub>K<sub>16</sub>L<sub>14</sub>R<sub>4</sub> (full sekvens er PAWRKAFRWAWRMLKAA). I denne studie ble en, to eller alle tre Trp restene i sekvensen byttet ut med andre aminosyrer, og den antibakterielle antisyvst og hemolytiske aktivitet ble målt, samt også evne til å hemme fibroblaster.

15 Resultater

Sekvensene av de syntetiserte peptider og aktivitetsresultatene blir sammenfattet i

**Tabell 2.**

Substitusjon	Peptid	Meth A IC <sub>50</sub> (μM) (4 timer)	Mic- E. coli (μM)	Mic-S. aureus (μM)	RBS EC <sub>50</sub> (μM)	Fibroblast IC <sub>50</sub> (μM)
LFB (14-31)	LFB 14-31 A <sub>2,6,10,17</sub> F <sub>7</sub> K <sub>16</sub> L <sub>14</sub> R <sub>4</sub>	6,6 (J)	2/4	2	110	17
<b>Alanin</b>						
W3->A3	LFB 14-31	24,1	6,9	4,6	>463	190

	$A_{2,3,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$					
W9->A9	LFB 14-31 $A_{2,6,9,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	16,2	4,6	2,4	382	46,3
W11->A11	LFB 14-31 $A_{2,6,10,11,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	11,1	4,6	>1,2	278	46,3
W9,11 ->A9,11	LFB 14-31 $A_{2,6,9,10,11,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	110,1	14,7	14,7	>489	>489
<b>Isoleucin</b>						
W3->I3	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	9	2/4	2/4	323	20
W9->I9	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	12	5	<1	155	26
W11->I11	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	6	2/5	<1	663,6	15
W9,11 ->I9,11	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	22	35	19	284	26
W3,9->I3,9	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	36	5	5	>470	108
W3,11 ->I3,11	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	16	2,5	5	413	45
W3,9,11 ->I3,9,11	LFB 14-31 $A_{2,6,10,17}F_7K_{16}L_{14}R_4$	47	2,5	10	>487	280

IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> verdiene er konsentrasjonene av peptid som var nødvendige for å avlive 50% av cellene. Alle peptidene ble funnet å være homogene under analytisk HPLC, og har den forventete molekylstørrelse som bestemt ved FAB-MS.

5

### Modellering av peptidene

Dette peptid ble valgt som startsekvens i denne studie fordi den har en høy biologisk aktivitet mot MethA, bakterieceller, RBC og mot fibroblaster. Fig. 1 viser den heliske hjulfremstilling av peptidsekvensen. Initialt ble en etter en av de tre Trp-rester i posisjon 3, 9 og 11 byttet ut med henholdsvis Ala og Ile. I peptidene som fikk Ile tilført gikk vi også til et videre skritt for å studere substitusjon av Trp, og tre videre peptider ble syntetisert for å studerer alle kombinasjonene av substitusjoner som var mulig.

10

## Biologisk aktivitet av peptidene

### Antisvulst-aktivitet

Alle Ala-substituerte peptider viste senket aktivitet sammenlignet med LFB(14-31)m. Det mest aktive, (14-31)mA11, med en IC<sub>50</sub> på 11 µM, har en 1,5  
5 gangs nedgang i aktivitet. Nedgangen i aktivitet var mest tydelig når to av de tre Trp, i posisjon 9 og 11, ble byttet ut. De mest aktive av Ile-substituerte peptider var (14-31)mI11, med en IC<sub>50</sub> på 6 µM. Det er derfor klart at aktiviteten til dette peptid er lett øket, sammenlignet med LFB (14-31)m. I Ile-substituerte peptider synes  
10 også aktiviteten å være senket med to substitusjoner, selv om det bare er svak effekt, sammenlignbart med resultatene til Ala og substitusjonspeptider.

### Antibakteriell aktivitet

Sammenlignet med LFB(14-31)m hadde alle Ala utbyttingspeptidene lavere  
15 aktivitet mot *E. coli*, tilsvarende resultatene som ble oppnådd med MethA. (14-31)mA9,11, som var den analog som hadde lavest aktivitet mot MethA, hadde også den laveste aktivitet mot bakteriene.

Ile utbyttingspeptidene viste lignende antibakteriell aktivitet sammenlignet med LFB(14-31)m, og det var ingen tydelige forskjeller mellom de ulike  
20 substitusjonsanaloger. Til og med (14-31)mI3,9,11, som hadde redusert MethA aktivitet, viste uendret antibakteriell aktivitet.

### Hemolytisk aktivitet

Ideelt sett burde antimikrobielle/antisvulst peptider ha meget lav hemolytisk  
25 aktivitet, eller så burde det terapeutiske vindu mellom de antimikrobielle/antisvulst-aktivitetene og den hemolytiske aktivitet være betydelig, dersom peptidene skulle kunne vurderes som mulige terapeutika. Med unntak av en hadde alle LFB (14-31)m analogene (unntakett var (14-31)mI11) lavere hemolytisk aktivitet enn LFB(14-31)m, noe som indikerer at Trp gir viktige bidrag til effekten på røde  
30 blodceller. I Ala-utbyttingspeptidene hadde (14-31)mA9 og (14-31)mA11 de høyeste aktiviteter, mens (14-31)mA3 og (14-31)mA9,11 hadde de laveste aktiviteter.

### Cytotoksisitet

LFB(14-31)m ble funnet å være meget toksisk mot fibroblaster, og det er således ikke noen selektivitet mellom disse celler og MethA cellene. Ala-  
 utbyttingspeptidene varierer svært i aktivitet, selv om ingen av dem er mer  
 5 cytotoksiske enn LFB(14-31)m. For eksempel har LFB(14-31)mA9,11, selv om  
 analogen bare er moderat aktiv mot MethA, ingen cytotoksisk effekt på røde  
 blodceller og fibroblaster. LFB(14-31)mA3 viser god aktivitet mot MethA celler og  
 liten toksisitet mot fibroblaster. Fjernelse av W3 i den motsatte sektor førte derfor  
 til den høyeste grad av selektivitet.

10

### Eksempel 3

Peptidene i Tabell 3 nedenfor ble fremstilt og testet som beskrevet i det  
 forrige eksempel.

15 Modell peptidet (KAAKAA)<sub>3</sub> har 9 lysin-rester og 12 alanin-rester og dets  
 amfipatiske hjulkonfigurasjon blir vist i Fig. 4a. Dette *de novo* oppbyggete  
 antimikrobielle peptid med lav toksisitet mot pattedyr ble valgt fra litteraturen  
 (Javadpour et al., J. Med. Chem. 1996, 39:3107-3113). MIC'ene for dette peptid  
 mot *E. coli* og *S. aureus* var 8 µM, mens det ikke fremviste noen målbar aktivitet  
 20 mot fibroblaster eller humane røde blodceller.

**Tabell 3**

KA-peptid	Forkort.	Posisjon	Meth A IC <sub>50</sub>	Fib IC <sub>50</sub>	RBC EC <sub>50</sub>	MIC S.aur	MIC E.coli	IC <sub>50</sub> Fib/ MethA
<b>2W</b>								
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>9,16</sub>	KA 7	2F	>222	>444	>444	150	5	
<b>3W</b>								
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>7,9,16</sub>	KA3 <sub>2</sub>	1+2F	28	>422	>422	15	5	>15
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>2,9,16</sub>	KA5	3F	15	302	>422	20	5	20
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>6,10,17</sub>	KA3 <sub>1</sub>	3O	147	>422	>422	35	10	>3
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>2,3,20</sub>	KA15	1+2F	16	246	>422	10	7,5	15
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>7,10,17</sub>	KA23	1F+2O	110	>422	>422			>4

(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>7,16,17</sub>	KA24	1+1F+1	29	>422	>422			>15
<b>4W</b>								
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>7,9,14,16</sub>	KA4	2+2F	5	30	>402	2,5	2,5-	6
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>2,3,20,21</sub>	KA19	2+2 YF	19	374	>402			20
(KAAKAA) <sub>3</sub> W <sub>2,9,16,20</sub>	KA8	4F	4	23	>402	5	5	6
(KAAKAA) <sub>3</sub>	KA6	4O	18	>402	>402	20	7,5	>22
<b>4F</b>								
(KAAKAA) <sub>3</sub> F <sub>2,9,16,20</sub>	KA17	4F	37	>429	>429	10	5-	>12

<b>Bip</b>								
(KAAKAA) <sub>3</sub> Bip <sub>9,16</sub>	KA27	2F	24	>429	>429			>18
<b>18-mer</b>								
KKAWKWAKKAWKWAKKA	KA18	2+2F	8	115	>451			14
<b>15-mer</b>								
KKWAKKAWKWAKKAW	KA22	2+2F	30	>514	>514			>17
WKWAKKAWKWAKKAA	KA21	2+2F	32	>530	>530			>17
WKWAKKAAKWAKKAA	KA20	2+2F	140	307	>546			2
<b>Ornitin</b>								
(OAAOAAA) <sub>3</sub> W <sub>7,9,14,16</sub>	KA14	2+2F	5	60	>424	5	7,5- 10	12

- 5 O = ornitin; Bip = bifenylyalanin; Y = indikerer at restene, selv om de er i de flankerende sektorer, ikke er like ved siden av den kationiske sektor.

Søylen market "posisjon" indikerer antall og posisjon av rester i enten F = flankerende eller O = motsatt sektor. Et mål for selektivitet blir vist ved Fib

- 10 IC<sub>50</sub>/Meth A IC<sub>50</sub> ratio.

- 15 Disse resultater viser at minst tre Trp rester var nødvendige for å oppnå en signifikant lytisk effekt mot svulstcellene fremkalt av de 21-aminosyre peptider som ble testet. Til tross for at den lytiske effekt mot svulstceller er bedre med fire Trp rester er den toksiske effekt, målt med den lytiske effekt på fibroblaster også

betydelig øket, slik at tre Trp rester gir bedre selektivitet enn fire Trp rester i de 21-aminosyre peptider som ble testet her. Tydeligvis vil optimalt og minimalt antall av voluminøse og lipofile grupper i et gitt peptid avhenge av peptidets lengde og størrelsen på de spesifikke voluminøse og lipofile grupper. Slik optimalisering kan  
 5 lett utføres av den øvete person på basis av de retningslinjer som gies her.

Grad av selektivitet som er funnet er overraskende og terapeutisk meget lovende.

10 Fenylalanin er mindre voluminøst og lipofilt enn tryptofan, og her er fire eller flere rester krevet for å oppnå cytolytisk aktivitet i 21-aminosyre peptidet. I motsetning til dette gir bifenyalanin, som er større og mer lipofilt enn tryptofan, selektivitet når bare to rester er tilstede.

15 De følgende peptider har også blitt fremstilt:

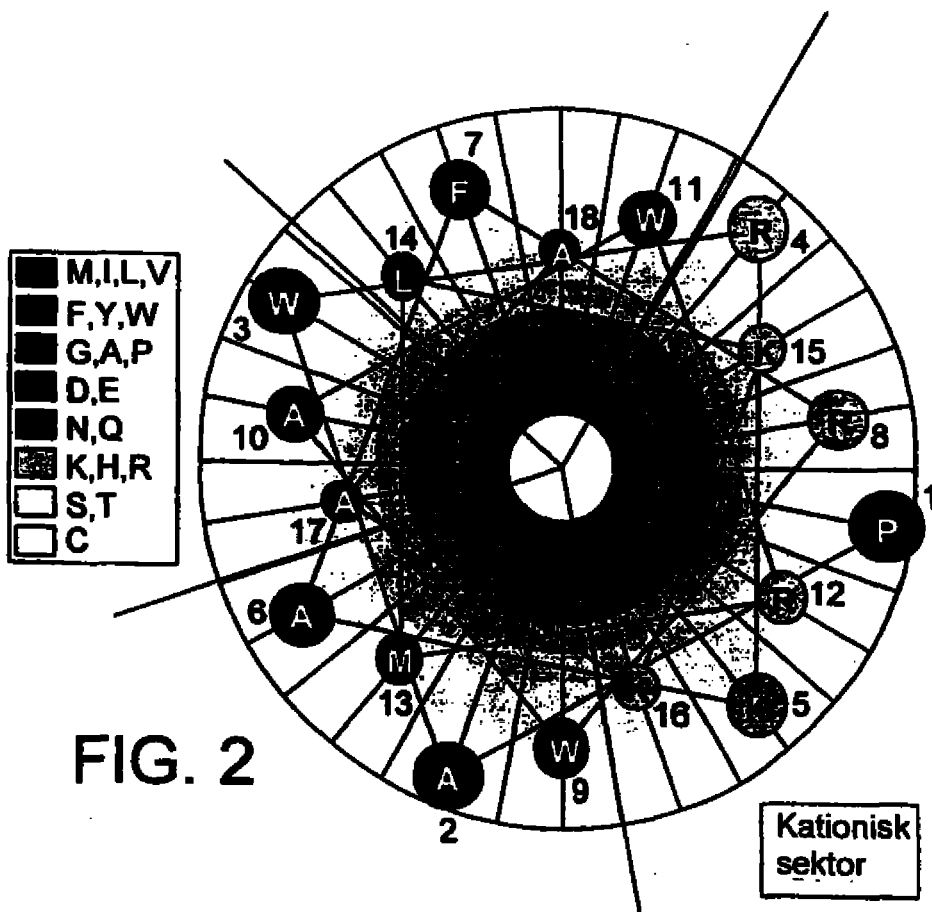
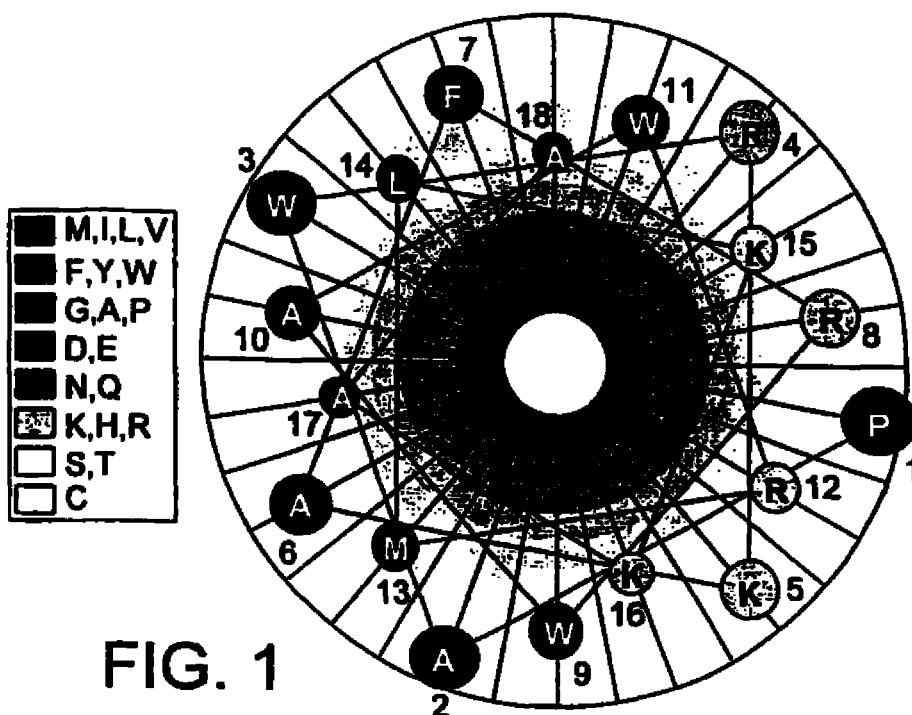


20 Nærvær av lysin rester som donor av kationiske egenskaper er tydeligvis ikke essensielt, siden et peptid der alle lysinrester er byttet ut med ornitin viser god aktivitet. Faktisk har den kortere sidekjede i ornitinrestene forsterket selektiviteten, sammenlignet med lysin.

## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for å fremstille et bioaktivt peptid, hvor nevnte peptid er 12 til 25 aminosyrer i lengde, har minst 3 kationiske aminosyrer og har evne til å
- 5 danne en amfipatisk  $\alpha$ -Helix, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fremgangsmåten omfatter identifikasjon av en kationisk sektor og oppdeling av den gjenværende delen av peptidet i tre ytterligere sektorer som er stort sett like store, inkorporering i sektoren rett ovenfor den kationiske sektoren av ikke mer enn en voluminøs og lipofil aminosyre og inkorporering inn i de to sektorene som flankerer den
- 10 kationiske sektoren 2 eller flere voluminøse og lipofile aminosyrer.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t en eller flere av de voluminøse og lipofile aminosyrene er tryptofan eller en analog derav.
- 15 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t alle de voluminøse og lipofile aminosyrene er tryptofan eller analoger derav.
4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t peptidet omfatter minst 5 kationiske rester.
- 20 5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d a t peptidet omfatter minst 7 kationiske rester.
- 25

1/5



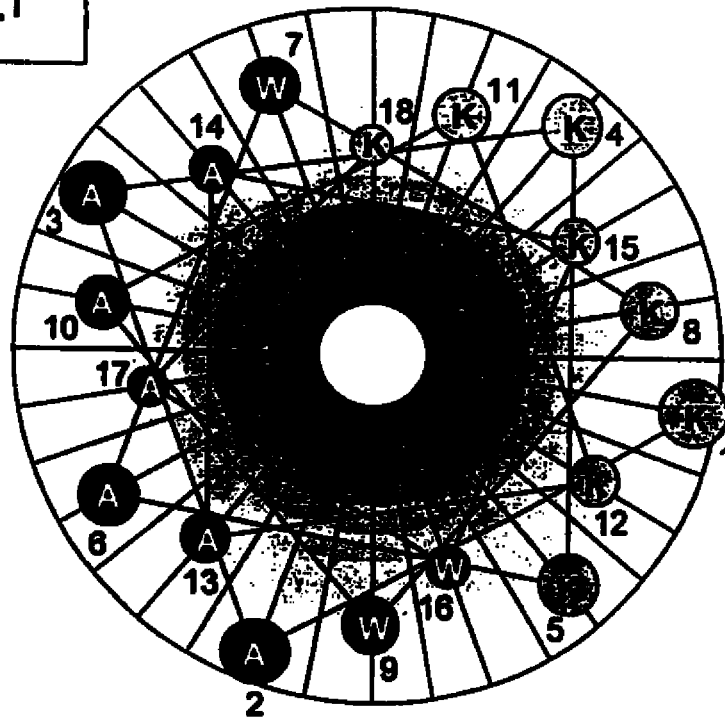
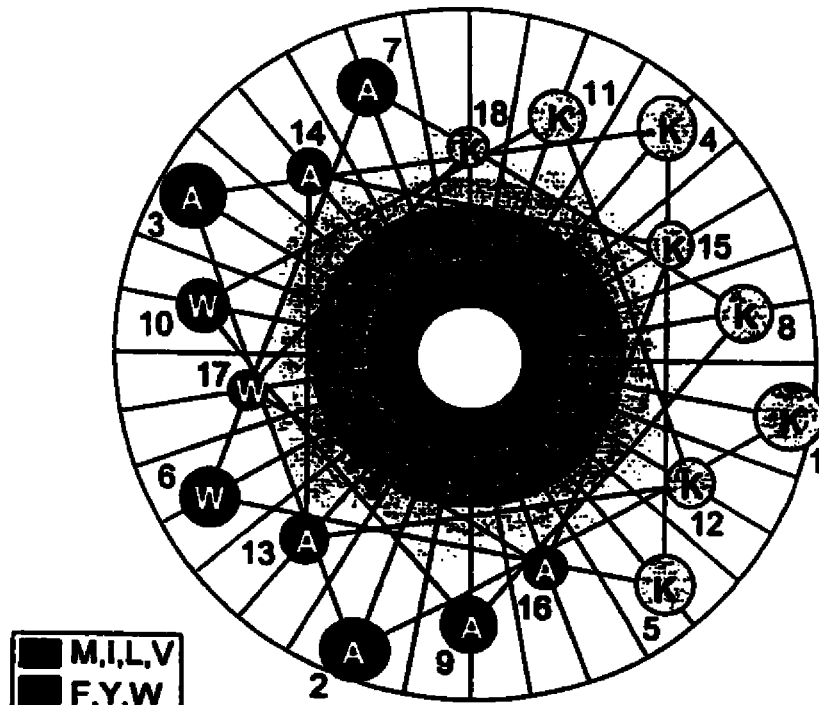


FIG. 3

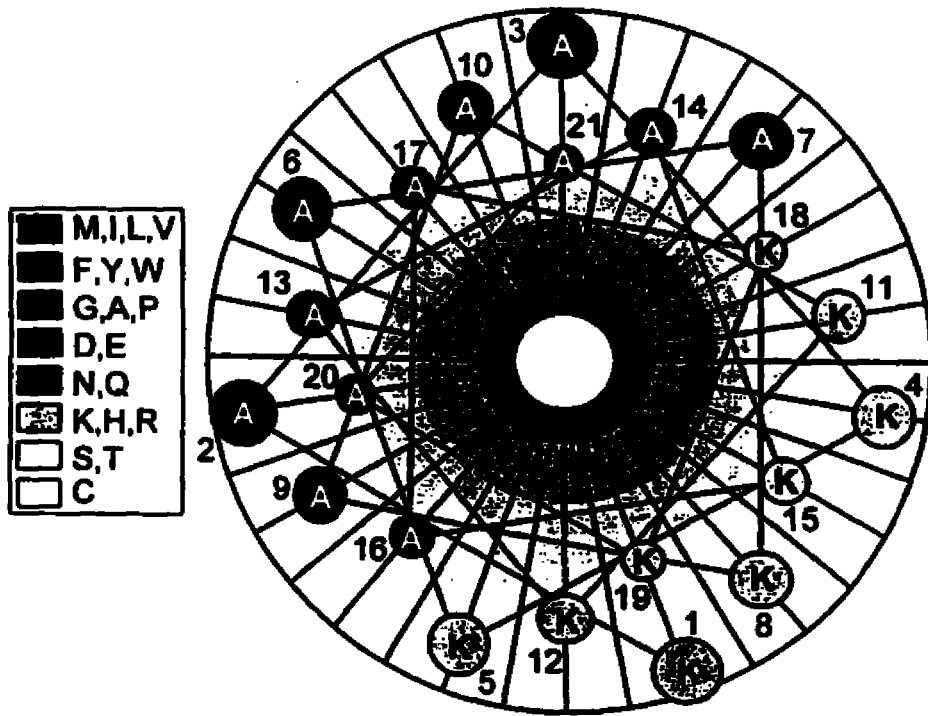


FIG. 4(a)

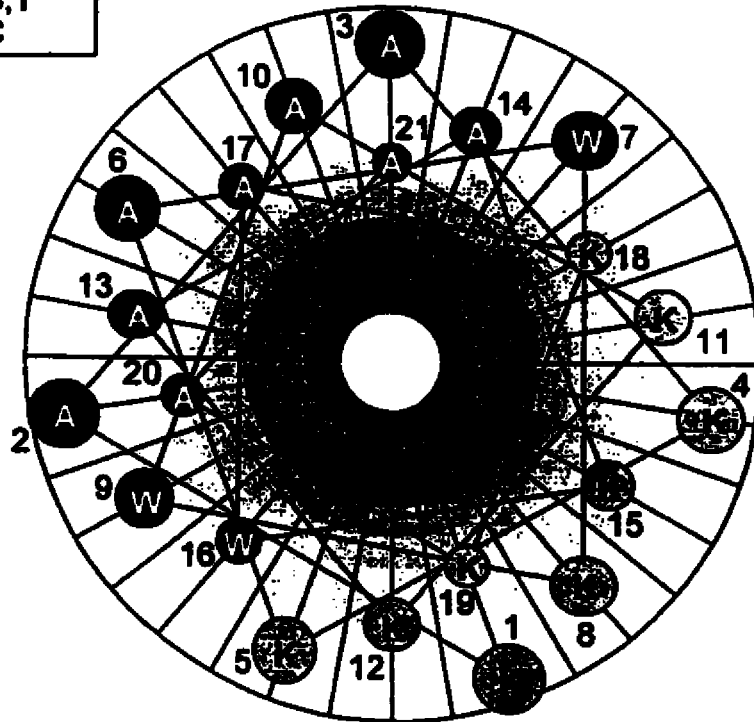
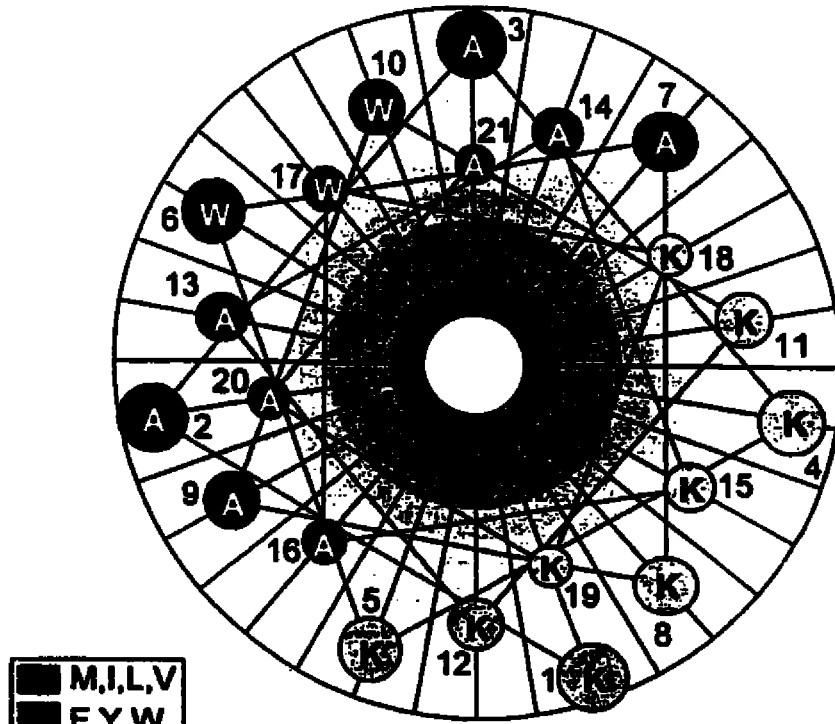


FIG. 4(b)

5 / 5

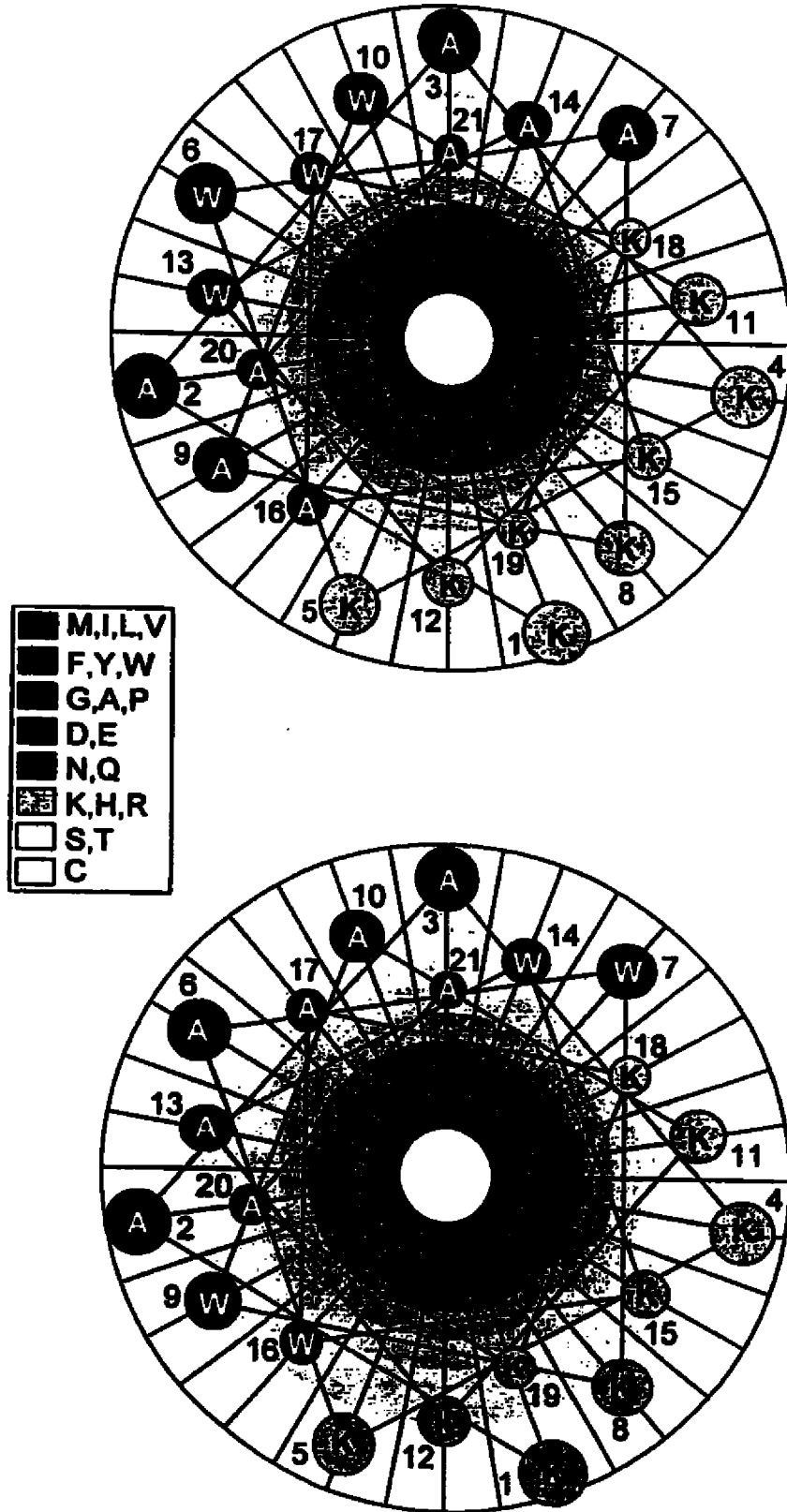


FIG. 4(c)