



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 991**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01) **C07K 1/00** (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01) **C07K 19/00** (2006.01)
A61K 31/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04714981 .0**

96 Fecha de presentación : **26.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1597585**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Método para preparar un fármaco de interés.**

30 Prioridad: **27.02.2003 EP 03075597**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2011

73 Titular/es: **PEPSCAN SYSTEMS B.V.**
Edelhertweg 15
8219 PH Lelystad, NL

72 Inventor/es: **Timmerman, Peter;**
Beld, Joris;
Meloan, Robert, Hans y
Puijk, Wouter, Cornelis

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 991 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

Método para preparar un fármaco de interés

5 La invención se refiere a métodos para unir una molécula a un soporte, como en la preparación de péptidos cíclicos y peptidomiméticos y la ciclación de péptidos o peptidomiméticos para usarlos, entre otros, en programas de selección de fármacos y en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. En particular, la invención se refiere a la síntesis de sitios de enlace o epítopes discontinuos o conformacionales que se corresponden o interactúan con una molécula de enlace, en particular con respecto a las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando.

10 Las interacciones entre las moléculas de enlace, que en general son biomoléculas, y sus correspondientes ligandos son fundamentales para la vida. A menudo, las células portan o contienen moléculas receptoras que interactúan o se enlazan con una hormona, un péptido, un fármaco, un antígeno o una molécula efectora o con otra molécula receptora; las enzimas se enlazan con su sustrato; las moléculas de anticuerpo se enlazan con un antígeno, los ácidos nucleicos con proteínas y así sucesivamente. Por "interacciona o se enlaza con" se quiere decir que la molécula de enlace y el ligando se aproximan entre sí en el intervalo de las fuerzas moleculares y que cada uno puede influir en las propiedades del otro. Esta aproximación hace que la molécula de enlace y su ligando pasen a través de varias etapas de reconocimiento molecular que comprenden un aumento en los grados de intimidad y efecto mutuo: se enlazan, aunque no siempre irreversiblemente. Las interacciones entre las moléculas de enlace se han analizado amplia y exhaustivamente en el campo de los ensayos de fármacos candidatos con el objetivo último de encontrar fármacos específicos que puedan interactuar o enlazarse con moléculas diana específicas en el cuerpo que intervienen o modulan el desarrollo de la enfermedad.

20 Las moléculas de enlace tienen capacidad para enlazarse porque comprenden diferentes sitios de enlace que permiten el reconocimiento del ligando en cuestión. A su vez, el ligando tiene un sitio de enlace correspondiente y solo cuando los dos sitios de enlace pueden interactuar con complementariedad esencialmente espacial, las dos moléculas pueden enlazarse. Es innecesario decir que, como las moléculas tienen tres dimensiones, los sitios de enlace son de naturaleza tridimensional: a menudo una o más proyecciones o protuberancias en la superficie de uno de los sitios de enlace se corresponden con uno o más huecos o depresiones en el otro, en una disposición de llave-cerradura tridimensional, a veces en una variedad de ajuste inducido. A veces, dicha protuberancia comprende un único bucle de la molécula en cuestión y el sitio de enlace está formado esencialmente solo por esta protuberancia. En este caso, a menudo se considera que estos sitios de enlace comprenden un sitio de enlace lineal o continuo en el que una simple parte lineal de la molécula en cuestión es en esencia la responsable de la interacción de enlace. Esta terminología se utiliza ampliamente para describir, por ejemplo, las reacciones anticuerpo-antígeno en las que el antígeno comprende una parte de la secuencia de la proteína, un péptido lineal. Por lo tanto, a menudo se habla de un epítipo lineal o continuo, por lo que el sitio de enlace (epítipo) de la molécula de antígeno está formado por un bucle de aminoácidos enlazados consecutivamente. Sin embargo, se pueden encontrar sitios de enlace continuos similares (en la presente memoria, epítipo y sitio de enlace se usan de forma intercambiable) con interacciones receptor-antígeno (tal como con un receptor de células T), con interacciones receptor-ligando, tal como con receptores de hormona y sus agonistas o antagonistas, con interacciones receptor-citocina o, por ejemplo, con interacciones enzima-sustrato o receptor-fármaco, con lo que una parte lineal de la molécula se reconoce como un sitio de enlace, y así sucesivamente. Sin embargo, más a menudo, dicha protuberancia o protuberancias y depresiones comprenden varias partes distintas de la molécula en cuestión y son partes combinadas las que forman esencialmente el sitio de enlace. De forma general, dicho sitio de enlace que comprende partes distintas de la molécula en cuestión se considera como un sitio de enlace o epítipo discontinuo o conformacional. Por ejemplo, los sitios de enlace situados en una proteína, que no tiene solo una estructura primaria (la secuencia de aminoácidos de la molécula de proteína) sino también una estructura secundaria y terciaria (el plegamiento de la molécula en hélices alfa o láminas beta y su forma en conjunto), y a veces incluso estructura cuaternaria (la interacción con otras moléculas de proteína), puede comprender en sus protuberancias o depresiones esenciales secuencias de aminoácidos o de péptidos cortos que se sitúan separados en la estructura primaria pero que se pliegan juntos muy cercanos en el sitio de enlace. En sitios de enlace lineales (continuos) los aminoácidos clave que median en los contactos con el anticuerpo se sitúan típicamente en una parte de la estructura primaria que generalmente tiene una longitud que no es mayor que 15 aminoácidos. Los péptidos que cubren estas secuencias tienen afinidades con las proteínas diana que están aproximadamente en el intervalo mostrado con el ligando de proteína intacto.

55 En los sitios de enlace conformacionales (discontinuos) los restos clave están distribuidos en general a lo largo de dos o más regiones de enlace que a menudo están separadas en la estructura primaria. Mediante el plegamiento, estas regiones de enlace pueden juntarse en la superficie de la proteína para formar un sitio de enlace compuesto. Incluso si el sitio de enlace completo media una interacción de afinidad elevada, los péptidos que cubren solo una región de enlace, como los sintetizados en un barrido lineal de péptidos solapantes, generalmente tienen afinidades muy pequeñas que a menudo no se pueden medir, por ejemplo mediante experimentos normales de ELISA o Biacore.

60 El descubrimiento del papel fisiológico de un gran número de péptidos hizo que investigadores de todo el mundo se dedicaran al diseño y la síntesis de peptidomiméticos (o moléculas similares a péptidos) como fármacos candidatos o herramientas de diagnóstico. Como los péptidos naturales raramente pueden ser usados terapéuticamente como

fármacos debido a los problemas asociados con su baja absorción, rápido metabolismo y pequeña biodisponibilidad oral, muchos esfuerzos dirigidos a modificar la secuencia natural de aminoácidos de los péptidos bioactivos obtuvieron el efecto orientado deseado. Las técnicas bioquímicas modernas han identificado un gran número de péptidos que tienen actividades farmacológicas potentes. Sin embargo, como los péptidos no son por lo general activos oralmente y presentan una semivida *in vivo* corta, su utilización directa como fármacos generalmente no es viable. Además, las interacciones de muchos péptidos con sus dianas macromoleculares (receptores, enzimas, anticuerpos) dependerán de la adopción de una conformación particular. Consecuentemente, el diseño de péptidos restringidos conformacionalmente y el reemplazo parcial de péptidos con unidades bioisotéricas que mimetizan estos sitios de enlace de péptidos se han convertido en uno de los objetivos contemporáneos de la química médica. Los péptidos sintéticos no naturales (o pseudopéptidos o peptidomiméticos) tienen la ventaja de proporcionar funcionalidades nuevas que pueden evitar procesos naturales en el cuerpo. Por ejemplo, se hace posible realizar funciones que no son disponibles con los materiales naturales, tales como enlazarse y penetrar en las membranas celulares y resistir la degradación por enzimas.

La elección de fármacos candidatos se realiza actualmente a menudo en una escala de alto rendimiento, en la que redes de compuestos candidatos, tales como bibliotecas de péptidos o moléculas de ácidos nucleicos unidas a soportes sólidos se ponen en contacto con moléculas diana que se cree que son pertinentes para uno o más aspectos de una enfermedad que se está estudiando. El enlace de dicha molécula diana a dicho compuesto candidato se observa entonces como un posible blanco o lleva a la identificación de un sitio de enlace de una molécula diana y, simultáneamente, hacia la identificación de un compuesto candidato, de entre los múltiples diferentes compuestos presentes en la red, que tiene un sitio de enlace que, más o menos, presenta relevancia para la interacción con dicha molécula diana. Sin embargo, haber identificado un prototipo molecular no significa de ninguna manera que se haya elegido un compuesto farmacológico definitivo adecuado para la interacción con dicha molécula diana. En primer lugar, el sitio de enlace identificado puede coincidir o ser relevante solo parcialmente para la molécula en cuestión y pueden ser necesarias varias rondas o modificaciones antes de que se haya identificado una mejor coincidencia y, por lo tanto, un sitio de enlace más apropiado. Además, considerando que todos los ensayos se han realizado hasta ahora únicamente en un formato de red, o al menos con moléculas unidas a un soporte sólido, no se ha prestado todavía atención al hecho de que el fármaco debe ser administrado en disolución, fuera del soporte sólido sobre el que se ha identificado su prototipo molecular. Como las moléculas a menudo cambian o se comportan de forma muy diferente en disolución, al perder los impedimentos específicos que sufren cuando están unidas a una fase sólida, muchos prototipos moleculares prometedores pierden su atracción como fármacos candidatos cuando se ensaya la interacción con su molécula diana en disolución, necesiéndose de nuevo varias rondas o modificaciones antes de que su candidatura como fármaco pueda ser establecida posteriormente.

La mimetización de los sitios de enlace de proteínas complejas, por ejemplo, TNF-alfa, la familia CD (antígenos cúmulo de diferenciación), y de las citocinas, o de los sitios de enlace de proteínas, como anticuerpos o receptores de superficie celulares, por medio de péptidos sintéticos o unidades bioisotéricas equivalentes es en la actualidad una de las áreas más activas en la ciencia de las proteínas y el desarrollo de fármacos. Muchas proteínas ejercen su actividad biológica a través de interacciones que implican regiones relativamente pequeñas de sus superficies expuestas. Las moléculas que mimetizan estos epítipes de superficie tienen, por lo tanto, un gran interés ya que pueden proporcionar un medio de mimetizar la actividad biológica de la proteína completa con una molécula sintética relativamente pequeña. Los péptidos lineales pequeños no son ideales para este objetivo debido a su flexibilidad inherente y susceptibilidad para la degradación proteolítica. En su lugar, se prefiere restringir cadenas lineales de péptidos por ciclación obteniendo estructuras secundarias biológicamente relevantes. Por lo tanto, el reto para el desarrollo de moléculas de enlace exitosas se relaciona en primer lugar con fijar la secuencia del péptido esencial en la conformación y orientación correctas sobre una plataforma o soporte. Conferir rigidez conformacional a un solo péptido lineal, como mediante las estrategias de ciclación de esqueleto o de cadena lateral, ha dado lugar a numerosos ciclopéptidos con actividades subnanomolares. Varios procedimientos para obtener dichos péptidos monocíclicos han resultado bastante bien y los procedimientos para su síntesis también están disponibles. Se han desarrollado varios procedimientos para obtener vías sintéticas eficaces para obtener soportes para preparar péptidos monocíclicos, junto con métodos para su incorporación en peptidomiméticos usando la síntesis de péptidos en fase sólida. Entre los distintos enfoques usados para preparar péptidos monocíclicos, varios han empleado péptidos que contienen pares de restos de cisteína lo que permite la subsiguiente ciclación mediante la formación de un enlace de disulfuro (véanse, por ejemplo, los documentos US-3929758, US-4528722, US-526124, US-5169833, US-4518711, WO-9109051 y WO-9108759).

Como otro ejemplo, la solicitud de patente europea EP0467699 describe un procedimiento para preparar péptidos cíclicos derivados del VIH. Los péptidos cíclicos se preparan en un procedimiento en dos etapas: en primer lugar, se sintetiza un péptido lineal que contiene dos cisteínas en cada extremo sobre una fase sólida usando la química habitual con 9-fluorenil-metiloxycarbonilo (Fmoc) y grupos protectores de cadena lateral lábiles en medio ácido que son compatibles con la química del Fmoc.

En una segunda etapa, el péptido lineal se cicla a continuación, bien en disolución o bien con el péptido todavía unido a la resina. En ambos casos el péptido se trata con dibromuro de orto-xilileno o con un reactivo de dibromuro con un alquilo inferior ramificado, con lo que los grupos sulfhidrilo libres de las dos cisteínas reaccionan con el dibromuro para formar una estructura cíclica que contiene dos enlaces de tioéter no lábiles. La segunda reacción se

realiza en un disolvente orgánico, preferiblemente DMF, en condiciones de dilución elevada en presencia de un exceso grande (~ 5 equivalentes) de una amina terciaria, preferiblemente trietilamina. Las reacciones de ciclación descritas en el documento EP0467699 transcurren durante al menos 7,5 horas o más.

5 Las condiciones de reacción usadas en el documento EP0467699 no permiten la presencia de aminoácidos K, W, H, Y, D y E de cadena lateral no protegidos ya que los grupos funcionales de cadena lateral reaccionan inevitablemente con los dibromuros del xilileno o del alquileno usados para la ciclación de las cisteínas libres. Las reacciones con péptidos que contienen uno de estos aminoácidos solo se pueden realizar con las cadenas laterales en forma totalmente protegida.

10 Por el contrario, la síntesis de peptidomiméticos unidos a un soporte con múltiples péptidos o segmentos de péptido, por ejemplo mimetizando epítopes o sitios de enlace discontinuos, se ha enfrentado a dificultades técnicas desde hace tiempo. No solo los múltiples péptidos o segmentos de péptido deben fijarse sobre un soporte molecular, sino que además deben encontrarse de una forma estructuralmente coordinada para ser eficaces como compañeros de enlace. Se han dedicado numerosos esfuerzos a la síntesis de constructos de péptidos restringidos conformacionalmente que consisten en segmentos de péptido con múltiples bucles. Sin embargo, solo existen unos pocos ejemplos en los que se obtiene la fijación conformacional de múltiples bucles de péptido restringidos sobre una plataforma (sintética). Uno de los principales problemas es que la química adecuada dista mucho de ser sencilla. Los enfoques actuales requieren siempre esencialmente múltiples esquemas de protección/desprotección con el fin de acoplar de forma controlada más de un péptido o segmento de péptido diferente sobre una molécula del soporte con grupos funcionales. Una molécula de soporte con grupos funcionales se refiere a una molécula que actúa como soporte o soporte para otra molécula en la que dicho soporte se proporciona con múltiples grupos funcionales, generalmente diferentes, a través de los que la otra u otras moléculas se pueden unir. Por ejemplo, el enlace de un péptido a través de su grupo amino N-terminal a un soporte o un soporte con grupos funcionales requiere la protección de todos las cadenas laterales de aminoácidos que también contienen un grupo amino reactivo, como los restos lisina o arginina, con el fin de evitar el acoplamiento no deseado al soporte de dicha cadena lateral. De forma análoga, los aminoácidos ácidos deben ser protegidos cuando se usa un procedimiento de acoplamiento a través de los grupos carboxilo C-terminales de un péptido sintético. Después de completar un producto, se deben realizar etapas adicionales de desprotección o de escisión porque los grupos protectores de las cadenas laterales deben ser eliminados para recuperar los aminoácidos originales. Frecuentemente, dependiendo de la naturaleza del grupo protector, la eliminación de cada tipo de grupo protector requiere de un protocolo diferente que implica, por ejemplo, diferentes disoluciones tampón, disolventes y productos químicos. Como consecuencia, es necesario un procedimiento largo y tedioso para ser capaces de aislar el producto deseado en cantidades mensurables cuando se usan los procedimientos disponibles hasta el momento. Además, un problema adicional cuando se trabaja con soportes totalmente sintéticos es la necesaria inserción selectiva de grupos funcionales, lo que en última instancia lleva a procedimientos de múltiples etapas a menudo, de forma decepcionante, con bajos rendimientos.

La invención proporciona un método para seleccionar un compuesto farmacológico candidato entre una biblioteca de compuestos, en la que el enlace de una molécula diana, y opcionalmente el efecto de dicho enlace, se determina con dicho compuesto candidato enlazado a un soporte sólido y, opcionalmente, también se determina con dicho compuesto candidato no enlazado a un soporte sólido, por ejemplo en disolución, en un bioensayo o en un experimento animal, y tal que puede ser de interés determinar los efectos del enlace a la molécula diana, tal como una molécula de receptor o de anticuerpo que se esté estudiando. Esto permite analizar compuestos candidatos en diferentes condiciones, eludiendo el hecho de que la mayoría de las moléculas cambian esencialmente o se comportan de forma bastante diferente en disolución, habiendo perdido las restricciones específicas que tienen cuando están unidos a una fase sólida. Ahora se pueden detectar prototipos moleculares que pueden no perder su atracción como fármacos candidatos cuando se analiza la interacción con su molécula diana en disolución, omitiendo o reduciendo de este modo la necesidad de varias rondas o modificaciones antes de que su candidatura como fármaco pueda ser establecida posteriormente. El método proporcionado en la presente memoria comprende elegir dicho compuesto candidato entre compuestos que se componen de una molécula de soporte invariable a la que se está unido un péptido que varía. Eligiendo una molécula de soporte invariable y ensayando sitios de enlace variables unidos a dicho soporte, el método proporcionado por la presente memoria conserva la atractiva flexibilidad de la química combinatoria. Por otra parte, sin embargo, la invención proporciona dicho soporte con sitios de enlace unidos que tienen una naturaleza relativamente restringida, los sitios de enlace se comportan de forma similar cuando se analizan sobre un soporte sólido que cuando se analizan, por ejemplo, en disolución. Preferiblemente, el enlace de dicha molécula diana con dicho compuesto candidato está determinado, por supuesto, por la red proporcionada con una biblioteca de compuestos compuesta por soportes invariables y péptidos, permitiendo una selección rápida de prototipos moleculares prometedores entre muchos compuestos de ensayo a la vez. Se prefiere que dicha molécula de soporte esté unida a través de al menos dos enlaces a dicho péptido, para una mayor restricción y por lo tanto una similitud esencial de los sitios de enlace ensayados bien unidos al soporte sólido o bien en forma libre, tal como en la red y en disolución. En un modo de realización preferido, la invención proporciona un método que comprende elegir una molécula de soporte invariable con al menos un primer y un segundo grupo reactivo y que proporciona al menos un péptido capaz de reaccionar con al menos dichos primer y segundo grupos reactivos, como se detalla más a fondo a continuación. Incluso se prefiere que dicho al menos primer y segundo grupo reactivo sean idénticos. La invención es aplicable a moléculas con sitio de enlace potenciales de naturaleza

variada, tal como moléculas de ácido nucleico o de hidrocarburos. Sin embargo, se prefiere que dicha molécula con sitio de enlace potencial sea principalmente de naturaleza peptídica. Por facilidad de enlace, se prefiere que dicho péptido comprenda un péptido con un grupo funcional SH- e incluso es más preferido que al menos un enlace entre el soporte y el péptido comprenda un enlace de tioéter. En un modo de realización adicionalmente preferido dicha molécula de soporte invariable comprende un compuesto (hetero)aromático, en particular con al menos dos sustituyentes halobencílicos, tal como un halometilareno, en particular un bis(bromometil)benceno, un tris(bromometil)benceno, un tetra(bromometil)benceno o uno de sus derivados. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto farmacológico elegido por un método según la invención.

Además, la invención proporciona una composición que comprende al menos una molécula de soporte unida al menos a un péptido, en la que dicha molécula de soporte comprende un compuesto (hetero)aromático. Se prefiere que dicha molécula de soporte se pueda obtener a partir de un halometilareno, tal como un bis(bromometil)benceno, un tris(bromometil)benceno, un tetra(bromometil)benceno o uno de sus derivados. Sin embargo, también pueden usarse los soportes no aromáticos con al menos dos grupos reactivos proporcionados. Como se describe en la presente memoria, se prefiere que dichas moléculas con sitio de enlace potenciales sean principalmente de naturaleza peptídica, tal como un péptido con un grupo funcional SH. Preferiblemente, dicha composición comprende al menos una molécula de soporte que está unida al menos a un péptido con al menos un enlace de tioéter. Dicho compuesto es útil en un método para seleccionar un compuesto farmacológico candidato.

En un modo de realización preferido, la invención proporciona un método para seleccionar un compuesto farmacológico candidato adecuado, por ejemplo un compuesto capaz de enlazarse con un molécula diana, tal como un anticuerpo, un receptor u otra molécula de enlace deseada, entre una biblioteca de compuestos en la que dicho enlace de dicha molécula diana con dicho compuesto candidato se determina, en primer lugar preferiblemente, sobre un soporte sólido proporcionado con dicho compuesto candidato o, preferiblemente, sobre una red proporcionada con dicha biblioteca de compuestos, y también se determina con dicho compuesto candidato no enlazado a un soporte sólido, comprendiendo dicho método elegir dicho compuesto candidato entre compuestos que se componen de una molécula de soporte invariable a la que se une un péptido variable, preferiblemente mediante al menos dos enlaces, permitiendo dicho enlace la presentación de dicho péptido en una forma restringida que permite la interacción de dicho péptido con dicha molécula diana en una forma esencialmente similar, sea cuando dicho compuesto está presente sobre un soporte sólido o no, tal como en disolución, o al menos libre de dicho soporte sólido tal como en un bioensayo. Mientras que otros expertos en la técnica se centraron principalmente en mejorar los métodos existentes, siendo esencialmente en vano, los inventores abandonaron los caminos transitados y lanzaron una nueva visión sobre el problema. En primer lugar, la invención proporciona un método simple y sencillo para unir al menos un péptido mediante al menos dos enlaces a un soporte molecular, comprendiendo dicho método proporcionar un soporte que comprende al menos un primer y un segundo grupo reactivo, proporcionando al menos un péptido con un grupo funcional SH- capaz de reaccionar con al menos dichos primer y segundo grupos reactivos, poniendo en contacto dicho soporte con al menos dicho péptido en condiciones que permitan que dicho péptido reaccione con al menos dichos primer y segundo grupos reactivos para formar al menos dos enlaces entre dicho soporte y dicho al menos un péptido en una reacción de acoplamiento, en el que la formación de un primer enlace acelera la formación de un enlace consecutivo, en el que dicha reacción de acoplamiento se realiza en una disolución acuosa y en el que dicho soporte comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos. En un modo de realización, se proporciona un método para la síntesis de constructos de bucle molecular conformacionalmente restringidos que consisten en uno o más segmentos moleculares en bucle. También se proporciona un método para la unión superficial de uno o varios bucles sobre superficies activadas de forma estructuralmente controlada. En un modo de realización preferido, se proporciona un método para la síntesis de constructos de péptidos restringidos conformacionalmente que consisten en uno o más segmentos de péptido en bucle. Sorprendentemente, el método proporcionado se puede usar con péptidos esencialmente no protegidos y no es necesario ningún grado de inserción selectiva de grupos funcionales en el soporte usado. Esta nueva estrategia, que no tiene paralelo con ningún método existente, satisface una necesidad sentida desde hace tiempo en varias áreas que van de la química de las proteínas y de los péptidos a la química medicinal y el desarrollo de fármacos.

Como se ha indicado, la invención proporciona un método para unir al menos un péptido mediante al menos dos enlaces a un soporte molecular o soporte. Según el método proporcionado, la formación de un primer enlace entre un soporte y un péptido influye en la reactividad de al menos dicho segundo grupo reactivo de forma que se acelera la formación de un enlace consecutivo. Por lo tanto, en un método proporcionado el primer enlace acelera o mejora la formación de enlaces consecutivos (segundo, tercero, etc.). En otras palabras, la unión de un péptido a un soporte con un método como el proporcionado en la presente memoria tiene lugar en un procedimiento rápido y concertado que comprende una cascada de reacciones. Por ejemplo, la formación de una primera unión, también denominada enlace (químico) o conexión, mediante un primer grupo reactivo aumenta la reactividad de un segundo grupo reactivo y así sucesivamente, de forma que el efecto activante está siendo "transferido" de un grupo reactivo al siguiente. Dichas reacciones químicas implican cambios en los grupos funcionales mientras que el esqueleto molecular del soporte permanece esencialmente inalterable. Por ejemplo, una molécula de soporte como la usada en la presente memoria, provista de al menos dos grupos reactivos, reacciona con al menos un péptido de forma que los grupos reactivos del soporte se ven implicados en los nuevos enlaces con el péptido unido mientras que la

estructura central o esqueleto del soporte no participa directamente en el acoplamiento. Dependiendo del tipo de reacción química, la reactividad del grupo reactivo puede aumentarse de varias formas. De forma general, una reacción química es una secuencia de etapas de formación de enlaces y ruptura de enlaces que implica típicamente electrones enlazantes y no enlazantes. A un nivel molecular, la esencia de dicha reacción química es la atracción de cargas y el movimiento de los electrones. El mayor grupo de reacciones puede considerarse como reacciones iónicas porque sus reactivos son electrónicamente ricos o electrónicamente pobres. En dichas reacciones, un reactivo electrónicamente rico, también denominado nucleófilo, comparte un par de electrones con un reactivo electrónicamente pobre, conocido como electrófilo, en el procedimiento de formación de enlace. La reactividad del reactivo, tal como un grupo reactivo sobre un soporte, se aumenta aumentando su carácter electrónico. Por ejemplo, si un grupo reactivo participa en una reacción de acoplamiento como un nucleófilo, su nucleofilidad es aumentada por un grupo o átomo electrónicamente rico o dador de electrones presente en el soporte molecular. De forma similar, el carácter electrófilo de un grupo reactivo es aumentado por un por un grupo o un átomo electrónicamente pobre o aceptor de electrones en el soporte. Dicho grupo o molécula puede estar situado en vecindad directa del grupo reactivo así como a cierta distancia del grupo reactivo, por ejemplo en el esqueleto molecular del soporte. Una entidad molecular es cualquier átomo, molécula, ión, par de iones, radical, ión radical, complejo, conformero, etc., constitucional o isotópicamente distinto, identificable como un entidad distinguible de forma separada. Por ejemplo, comprende un soporte sin un péptido unido a él o un soporte con un péptido unido a él mediante un primer enlace.

En un modo de realización de la invención, un péptido esencialmente lineal está unido a un soporte mediante al menos dos enlaces que típicamente producen la formación de una estructura en bucle o cíclica unida a dicho soporte.

En un modo de realización preferido, se proporciona un método para proporcionar un soporte con al menos una estructura de péptido en bucle, comprendiendo dicho método proporcionar un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos, proporcionando al menos un péptido capaz de reaccionar con dicha molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos, poniendo en contacto dicho soporte con al menos dicho péptido en una reacción de acoplamiento, en la que la formación de un primer enlace acelera o promueve la formación de un enlace consecutivo para formar un soporte provisto de al menos una estructura de péptido en bucle.

En un método proporcionado para obtener un compuesto que se compone de un soporte con al menos una estructura de péptido en bucle de una forma simple y rápida, un péptido puede ser un péptido lineal o un peptidomimético, incluyendo péptidos que contienen uno o más tramos cíclicos, o una molécula peptídica con uno o más enlaces no peptídicos. Típicamente, una molécula peptídica para ser usada en el método proporcionado es un péptido sintético, por ejemplo obtenido usando procedimientos de síntesis peptídica convencionales. Los péptidos sintéticos se pueden obtener usando varios procedimientos conocidos en la técnica. Estos incluyen tecnologías como la síntesis de péptidos en fase sólida (abreviado generalmente como SPPS por sus iniciales en inglés: solid phase peptide synthesis) y síntesis orgánica en fase disolución (abreviado generalmente como SPOS por sus iniciales en inglés: solution phase organic synthesis). La SPPS es un enfoque rápido y fácil para sintetizar péptidos y proteínas pequeñas. El aminoácido C-terminal está unido, por ejemplo, a una resina de poliestireno reticulado mediante un enlace lábil en medio ácido con una molécula de enlace. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para la síntesis, haciendo que sea relativamente sencillo y rápido lavar el exceso de reactivos y subproductos. Los péptidos adecuados comprenden péptidos de varias longitudes. Como se ejemplifica en la presente memoria, desde oligopéptidos que van de un tamaño tan pequeño como 3 aminoácidos de longitud hasta polipéptidos de 27 restos se han utilizado de forma exitosa en el método proporcionado. La longitud o tamaño máximo de un péptido o peptidomimético depende esencialmente de la longitud o el tamaño que se puede obtener usando la síntesis de péptidos. En general, péptidos de hasta 30 aminoácidos pueden ser sintetizados sin mayor problema.

Un ejemplo preferido de la invención se refiere a una variedad de péptidos (lineales) con dos tioles de cisteína libres que reaccionan rápidamente con una variedad de bis(bromometil)bencenos como soporte o moléculas de soporte. En un modo de realización, se usa un soporte sintético que comprende al menos dos grupos reactivos idénticos para acoplar uno o más péptidos o fragmentos de péptido a dicho soporte. Los péptidos adecuados para ser utilizados en el método proporcionado comprenden todos los posibles péptidos capaces de reaccionar con al menos dos grupos reactivos sobre un soporte para formar al menos dos uniones o enlaces entre dicho péptido y dicho soporte, lo que generalmente da lugar a un segmento de péptido o estructura en bucle o cíclicos sobre un soporte. En lo que se refiere a la química orgánica, la esencia de dicha formación de enlace es la atracción de cargas y el movimiento de los electrones. En un modo de realización preferido, la reacción de acoplamiento entre un péptido variable y una molécula de soporte invariable implica una reacción de sustitución nucleófila en la que un péptido con un grupo funcional nucleófilo libre reacciona con un soporte. Un nucleófilo generalmente comparte un par de electrones con un electrófilo en el proceso de formación del enlace. En otras palabras, el nucleófilo está buscando un centro con deficiencia electrónica (un átomo) con el que reaccionar. Los nucleófilos ("amante de núcleos") pueden estar cargados o sin carga e incluyen, por ejemplo, heteroátomos distintos del carbono que portan un par solitario o electrones pi en cualquier alqueno o alquino. Los electrófilos ("amantes de electrones") son eléctricamente neutros o están cargados positivamente y tiene algún lugar al que puedan ir los electrones, sea un orbital vacío (como en el BH₃) o un orbital potencialmente vacío. En un modo de realización preferido, como se ejemplifica en la descripción

detallada, dicho grupo funcional nucleófilo comprende un grupo tiol o sulfhidrilo. Los tioles son nucleófilos eficaces para la sustitución en átomos de carbono saturados. En general no es difícil proporcionar un péptido con un grupo funcional nucleófilo. Por ejemplo, en un péptido o peptidomimético puede insertarse fácilmente un grupo funcional con un resto tiol incorporando un resto de cisteína en la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, el péptido lineal Ac-CVYETVRVPGSAGGADSLYTPVATQC-NH₂ reacciona con el soporte con dibromo, 1,3-bis(bromometil)benzoceno, en una disolución tampón acuosa. En un modo de realización, se proporciona un método para unir al menos un péptido a un soporte mediante la formación de al menos dos enlaces en una reacción de acoplamiento, en el que dicha reacción de acoplamiento se realiza en disolución.

En otro ejemplo, el péptido Ac-AHHPDITVTCPEATQCHCGK-NH₂ reacciona con tres grupos reactivos del soporte molecular 1,3,5-tris(bromometil)mesitileno para formar tres enlaces con dicha estructura. En todavía otro ejemplo, los péptidos sintéticos Ac-CVYETVRVPGSAGGADSLYTPVATQC-NH₂ y Ac-CRGDLQC-NH₂ reaccionan cada uno con dos grupos halometilo reactivos del soporte tetrahalo-molecular 1,2,4,5-tetra(bromometil)benzoceno. Por supuesto, varios otros grupos funcionales nucleófilos, como los aminoácidos con un resto alcohol (-OH) o amina (-NH), se pueden incorporar de forma similar en un péptido. Sin embargo, se debe subrayar que la química necesaria para la reacción de acoplamiento de un alcohol o una amina en general no permite el uso de péptidos no protegidos, en contraste con el método proporcionado que utiliza un péptido con un grupo funcional -SH. Una reacción de acoplamiento según la invención transcurre sin problemas para prácticamente todos los péptidos posibles que tengan al menos dos grupos sulfhidrilo de cisteína libres. La reacción es totalmente compatible con grupos funcionales no protegidos amino (**K**), amido (**QN**), arginina (**R**), ácido carboxílico (**DE**), alcohol (**ST**), tioéter (**M**), imidazol (**H**), fenilo (**F**), fenol (**Y**), indol (**W**) y grupos alifáticos (**AVILP**). Por lo tanto, el método proporcionado permite el uso de un péptido no protegido en el que ninguna de las cadenas laterales de aminoácidos está protegida o tratada en ningún modo para evitar la participación no deseada en la reacción de acoplamiento. Por lo tanto, se proporciona un método para unir al menos un péptido a un soporte mediante al menos dos enlaces, en el que dicho péptido está esencialmente sin proteger. De forma importante, el método proporcionado en la presente memoria que usa un péptido no protegido economiza tiempo, esfuerzo y dinero costosos ya no son necesarias múltiples etapas de protección/desprotección.

El único grupo funcional que no puede estar presente en forma no protegida es el -SH de la cisteína, ya que es una parte integral de la reacción de acoplamiento. En un modo de realización de la invención, se usa un péptido que, además de sendas cisteínas libres N-terminal y C-terminal, comprende uno o más restos cisteína (Cys) adicionales. Para evitar la participación no deseada de estos grupos tiol de las Cys adicionales en la reacción de acoplamiento, un enfoque sencillo es usar Boc-Cys(StBu)-OH (Boc-S-terc-butilmercapto-L-cisteína) para la introducción del resto Cys protegido durante el transcurso de la síntesis peptídica. El grupo StBu no se elimina durante el transcurso de la reacción normal de desprotección-escisión con TFA, sino que requiere de un tratamiento reductor con BME (exceso) o 1,4-DTT (exceso) para dar la forma del péptido con el sulfhidrilo reducido que puede bien ser usada directamente o bien ser oxidada subsiguientemente para dar el correspondiente péptido con cistinilo. En un modo de realización se usa un péptido que contiene al menos un derivado de la Cys, tal como Cys(StBu), para permitir la formación de un grupo Cys-tiol para que reaccione en un momento determinado, tal como después de finalizar la síntesis de un soporte con al menos una estructura de péptido en bucle. Esto es muy atractivo por al menos dos razones. Por ejemplo, se sintetizan dos péptidos lineales, péptido A y péptido B, comprendiendo cada uno un resto Cys no protegido en la primera y la última posición y un derivado de la Cys en otra posición. A continuación, los dos péptidos con dos grupos funcionales -SH se acoplan a un soporte que comprende cuatro grupos reactivos, lo que da lugar a una estructura de fijación de dos segmentos de péptido en bucle sobre un soporte. Subsiguientemente, los derivados de la Cys pueden ser desenmascarados por adición simple para formar un puente de disulfuro intramolecular entre los péptidos 1 y 2. Además de los enlaces covalentes que unen los átomos de un único aminoácido y el enlace peptídico covalente que une los aminoácidos en la cadena proteica, los enlaces covalentes entre las cadenas laterales de cisteína pueden determinar de forma importante la estructura de la proteína. Especialmente, cuando se sintetiza un compuesto peptidomimético, por ejemplo de un sitio de enlace discontinuo, es ventajoso poder usar péptidos que permitan la formación de enlaces de disulfuro intra- e inter-peptídicos. Además, el uso de derivados de la Cys, tal como el Cys(StBu), permite acoplar un péptido en bucle o cíclico a varios soportes diferentes, como dos o tres, de forma estructuralmente coordinada (véase también la figura 11).

En un modo de realización preferido, un método según la invención implica al menos dos reacciones de sustitución nucleófila en la que al menos un péptido que tiene al menos dos grupos funcionales nucleófilos libres forma dos enlaces o uniones con una molécula de soporte. Por ejemplo, dicho péptido reacciona con dos o más átomos de carbono saturados del soporte, siendo dichos átomos de carbono parte de un grupo reactivo. La sustitución nucleófila también puede ser un procedimiento intermolecular cuando el nucleófilo y el grupo saliente son parte de un único péptido. En un modo de realización preferido de la invención, se proporciona un soporte con al menos un péptido mediante al menos una reacción de sustitución nucleófila intramolecular. Los procedimientos intramoleculares tienen una entropía mucho más favorable que las reacciones intermoleculares análogas porque no es necesario que dos moléculas separadas se aproximen.

Una característica común de una reacción nucleófila que tiene lugar sobre un átomo de carbono saturado es que el átomo de carbono está casi siempre enlazado a un heteroátomo - un átomo distinto del carbono o el hidrógeno. Además, el heteroátomo es generalmente más electronegativo que el átomo de carbono y también es el

denominado grupo saliente (L) en la reacción de sustitución. El grupo saliente parte con el par de electrones mediante el que estuvo enlazado originalmente al átomo de carbono. En un modo de realización preferido se usa un soporte que contiene al menos dos grupos salientes con el fin de facilitar la formación de al menos dos enlaces con al menos un péptido. La facilidad con la que un grupo saliente se escinde puede estar relacionada con la basicidad de dicho grupo; las bases débiles son en general buenos grupos salientes porque son capaces de acomodar el par de electrones de forma eficaz. La reactividad de un grupo reactivo está determinada de forma importante por la tendencia a escindirse de un grupo saliente. Otro factor que tiene alguna importancia sobre la reactividad de un grupo reactivo es la fuerza del enlace entre el grupo saliente y el átomo de carbono, ya que este enlace debe romperse para que se produzca la sustitución.

Por lo tanto, en un modo de realización preferido, en un método según la invención se usa un soporte que comprende al menos dos grupos reactivos, comprendiendo cada uno de ellos un buen grupo saliente. En general, buenos grupos salientes son las bases conjugadas de ácidos fuertes. Los grupos salientes más importantes son las bases conjugadas de ácidos con valores de pK_a por debajo de 5. Los grupos salientes particularmente interesantes incluyen los iones halogenuro, tales como I^- , Br^- y Cl^- . Un enlace carbono-halógeno (C-X) en un halogenuro de alquilo está polarizado, con una carga parcial positiva sobre el átomo de carbono y una carga parcial negativa sobre el halógeno. Por lo tanto, el átomo de carbono es susceptible de ataque por un nucleófilo (un reactivo que trae un par de electrones) y el átomo de halógeno se escinde como ión halogenuro (X^-) tomando los dos electrones del enlace C-X. En un modo de realización un grupo reactivo comprende un átomo de carbono susceptible de ataque por un nucleófilo en el que dicho grupo reactivo comprende un enlace carbono-halógeno. En un modo de realización preferido, se usa un soporte que comprende al menos dos de dichos grupos reactivos para hacerle reaccionar con un péptido con dos grupos funcionales $-SH$ como nucleófilo. Se proporciona un método para obtener un soporte con al menos una estructura de péptido en bucle, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho soporte con al menos un péptido en el que dicho soporte comprende un halógeno-alcano. Los halógeno-alcenos (también conocidos como haloalcenos o halogenuros de alquilo) son compuestos que contienen un átomo de halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo) unido a uno o más átomos de carbono en una cadena. En la presente memoria se proporcionan dihalo-soportes que comprenden dos átomos de halógeno, y tri- y tetrahalo-soportes para la síntesis de compuestos restringidos conformacionalmente como, por ejemplo, constructos de péptido que consisten en uno o más segmentos de péptido en bucle. En general, un buen grupo saliente es electronegativo para polarizar el átomo de carbono, es estable con un par de electrones extra una vez que se ha escindido, y es polarizable, para estabilizar el estado de transición. Con la excepción del yodo, todos los átomos de halógeno son más electronegativos que el átomo de carbono. El cloro y el bromo tienen electronegatividades bastante parecidas y polarizan el enlace con el átomo de carbono de forma bastante similar. Cuando se ionizan, ambos son bases muy débiles, siendo el Br^- la más débil de las dos. El ión bromuro también es más polarizable debido a su mayor tamaño. Por lo tanto, el método proporcionado se pone en práctica ventajosamente usando un soporte que comprende al menos dos átomos de Cl, más preferiblemente usando un soporte que comprende al menos un átomo de Cl y al menos un átomo de Br e incluso más preferiblemente usando un soporte que comprende al menos dos átomos de Br.

En un modo de realización preferido, un soporte comprende un sistema arílico. En un sistema arílico hay tres átomos de carbono, dos de los cuales están conectados mediante un doble enlace carbono-carbono. En un modo de realización preferido, la formación de un enlace o unión entre un soporte y un péptido se produce mediante una reacción de sustitución arílica. Una reacción de sustitución arílica se refiere a una reacción de sustitución que se produce en la posición 1 de un sistema arílico, estando el doble enlace entre las posiciones 2 y 3. El grupo entrante puede unirse al mismo átomo 1 que el grupo saliente o el grupo entrante se une en la posición relativa 3 con movimiento del doble enlace de 2/3 a 1/2. La velocidad de la reacción de sustitución arílica es muy elevada porque el catión alilo intermedio de la reacción, un átomo de carbono que porta una carga positiva unido a un átomo de carbono con un doble enlace, es inusualmente estable. Esto es debido a que el catión arílico es un híbrido de resonancia de dos estructuras exactamente equivalentes. En cualquiera de las dos estructuras contribuyentes hay un orbital p vacío con la nube pi del átomo de carbono electrónicamente deficiente. La superposición de este orbital p vacío con la nube pi del doble enlace da lugar a la deslocalización de los electrones pi, proporcionando de este modo electrones al átomo de carbono electrónicamente deficiente y estabilizando el catión. Incluso se prefiere más un soporte que comprende al menos dos átomos de halógeno arílicos. Debido a la deslocalización electrónica, los halogenuros de arilo tienden a ionizarse muy fácilmente para producir un carbocatión y un ión halogenuro, de forma que la ruptura del enlace carbono-halógeno es rápida. En un modo de realización adicional de la invención, en el soporte hay presente un doble enlace carbono-oxígeno (es decir, un grupo carbonilo). De forma similar a los sistemas arílicos, se pueden formar estructuras de resonancia que contribuyen a la estabilización del carbocatión. Por ejemplo, un soporte comprende dos o más grupos reactivos que comprenden la estructura $-C(O)-CH_2$ -halógeno.

Además, en una reacción de sustitución nucleófila, la estructura del sustrato juega un papel tan importante como la naturaleza del grupo saliente. Por ejemplo, si un nucleófilo ataca por detrás al átomo de carbono la reacción se produce de forma no impedida si el grupo saliente está unido a un metilo en el que los hidrógenos dejan una superficie suficiente para el ataque al carbono. A medida que el carbono se vuelve más sustituido, los grupos mayores obstaculizan el camino que el nucleófilo debe tomar para desplazar el grupo saliente. Por estas razones, también es ventajoso que el soporte comprenda al menos dos grupos halometilo.

- En un modo de realización, el soporte comprende un polieno conjugado, también denominado compuesto aromático, o areno, provisto de al menos dos grupos reactivos. Un compuesto aromático es plano, con nubes cíclicas de electrones pi deslocalizados por encima y por debajo del plano de la molécula. Preferiblemente, un soporte molecular según la invención comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos, como por ejemplo grupos halometilo. Los ejemplos adecuados incluyen, pero sin estar limitados a ellos, di(halometil)benceno, tri(halometil)benceno o tetra(halometil)benceno y sus derivados. La ventaja de los sustituyentes halobencílicos se busca principalmente en la especial estabilidad asociada con la resonancia de los polienos conjugados conocidos como compuestos aromáticos; un átomo de halógeno bencílico tiene una tendencia incluso mayor a escindir de un átomo de carbono sobre el que tiene lugar una reacción de sustitución nucleófila.
- La reacción de un péptido adecuado, tal como los péptidos SH-SH, con derivados de halometilbenceno tiene un alcance muy amplio. La reacción tiene lugar de forma satisfactoria con una variedad de compuestos aromáticos que llevan al menos dos grupos halometilo. Estos grupos pueden situarse bien en posición orto-, meta- o para- (véase los soportes moleculares mostrados en la figura 4). El efecto catalítico intramolecular descrito anteriormente es diferente para cada modo de acoplamiento porque los para- y meta-ciclofanos están generalmente más impedidos que los orto-ciclofanos. También se proporciona cualquier otro compuesto (hetero)aromático con al menos dos grupos halometilo en posición orto-, meta- o para-, para la síntesis de un soporte con al menos una estructura de péptido en bucle. La reacción de los tioles con haloalcanos y halometilarenos se aplica en diferentes áreas de la Química y la Biología. Sin embargo, la reacción de péptidos que contienen dos o más grupos sulfhidrilo de cisteína libres con dihaloalcanos y/o derivados de bis(halometil)benceno es menos común. La primera referencia en la bibliografía se refiere a la modificación de lana (que contiene múltiples grupos -SH libres) por medio de la reacción con CH_2X_2 . En 1986, Mosberg fue el primero en usar este procedimiento para la síntesis de un derivado cíclico de encefalina. En contraste con un método según la invención, que implica un procedimiento de acoplamiento en una etapa usando péptidos totalmente desprotegidos en una disolución tampón acuosa, las reacciones publicadas en la bibliografía existente se realizan en disolventes orgánicos mediante múltiples ciclos de protección-desprotección. Posteriormente, el mismo procedimiento, generalmente denominado procedimiento de Mosberg, se usó por otros investigadores para la síntesis de otros análogos de encefalina y vasopresina. Recientemente otros soportes, como o-dibromo xileno, 1,4-but-2-endiolo, 1,3-piridilo, y otros espaciadores de naftilo, se han usado para la síntesis de derivados peptídicos cíclicos. Además, las reacciones se realizaron usando péptidos totalmente protegidos mediante múltiples ciclos de protección-desprotección y/o produjeron rendimientos bajos de los péptidos cíclicos.
- Los soportes moleculares adecuados según la invención también incluyen compuestos aromáticos policíclicos con estructuras de anillo menores o mayores. Sin embargo, un soporte según la invención no se limita a los hidrocarburos. Por el contrario, el método proporcionado también se realiza adecuadamente usando un soporte aromático heterocíclico – una molécula cíclica con al menos un átomo distinto del de carbono en la estructura del anillo, lo más generalmente nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, -3-pirrolina, piridina, pirimidina y sus derivados. Los soportes aromáticos heterocíclicos preferidos incluyen, pero si limitarse a ellos, aquellos que comprenden al menos dos grupos halometilo. Un soporte preferido es la meta-dibromo-piridina.
- En otro modo de realización, el método proporcionado comprende el uso de un soporte que se basa o que consiste en múltiples estructuras aromáticas de anillo, tales como compuestos aromáticos de anillo condensado. Se dice que dos anillos aromáticos que comparten un enlace carbono-carbono están condensados. Los soportes aromáticos de anillos condensados incluyen, por ejemplo, naftaleno, antraceno o fenantreno y sus derivados, con tal de que contengan al menos dos grupos reactivos. En un modo de realización preferido, un soporte aromático de anillo condensado comprende al menos dos grupos reactivos en la que cada grupo contiene un átomo de halógeno bencílico altamente reactivo, por ejemplo un grupo halometilo.,
- Las moléculas que comprenden múltiples sistemas aromáticos o conjugados en los que los sistemas no comparten un par de átomos de carbono también pueden ser útiles como molécula de soporte. Por ejemplo, un soporte comprende una estructura con un anillo múltiple o un anillo condensado, por ejemplo se puede ensayar un soporte en el que los anillos aromáticos, por ejemplo benceno, están conectados directamente mediante un enlace carbono-carbono. Alternativamente, dichos anillos están conectados mediante una molécula de enlace que comprende al menos un átomo. Ejemplos de soportes adecuados en un método de la invención se presentan en las figuras 4, 6 y 8. Los expertos en la técnica serán capaces de elegir qué versiones de estas moléculas se deben ensayar. Desde un punto de vista comercial, un soporte según la invención está preferiblemente disponible comercialmente con un coste relativamente bajo y que se puede obtener en grandes cantidades. Por ejemplo, el soporte con dibromo 1,3-bis(bromometil)benceno se vende actualmente solo por aproximadamente 5 euros por gramo.
- Según la invención, cuando se mezclan los reactivos en una relación 1:1 en concentraciones relativamente bajas, que generalmente van de 0,1-1,0mM, la reacción se produce de forma sorprendentemente rápida. En un modo de realización, una reacción de acoplamiento que une un péptido a una molécula de soporte invariable se completa esencialmente en menos de 60 minutos. Preferiblemente, una reacción se completa incluso más rápidamente, tal como en menos de 45 o incluso menos de 30 minutos. Más preferiblemente, una reacción según la invención se completa en 20 minutos. Lo más preferido, un soporte con al menos un péptido en bucle se obtiene en 10 a 15 minutos.

En general, la velocidad de reacción depende de múltiples parámetros, tal como la temperatura de reacción y la concentración de los reactivos. Ventajosamente, una reacción de acoplamiento según la presente invención se realiza a temperaturas relativamente bajas, tal como aproximadamente 30 a 40 grados centígrados. En comparación con los métodos existentes, una temperatura de reacción relativamente baja también es favorable para la estabilidad de los péptidos. Cuando los reactivos se mezclan en una relación de aproximadamente 1:1 o en una relación esencialmente equimolar, la reacción se realiza rápidamente a temperatura ambiente.

En un modo de realización preferido, una reacción se realiza incluso a temperatura ambiente que en general está entre 20 y 25 grados centígrados. En el método proporcionado, el compuesto deseado se puede obtener con un rendimiento muy elevado. En un modo de realización, el producto deseado se obtiene con un rendimiento de al menos 30%. Preferiblemente se obtiene un rendimiento mayor, tal como al menos 40 a 50% o incluso 50 a 60%. Más preferida es una reacción que produce un rendimiento de al menos 70% del compuesto farmacológico candidato, tal como ~75% o ~80%. Lo más preferido es un método proporcionado que permite obtener un rendimiento de más de 85% del compuesto deseado, como 90% o incluso posiblemente mayor. Incluso cuando la reacción se realiza en presencia de un exceso grande (hasta 20, 50 o incluso 100 veces) de soporte molecular, solo se forma el producto monocíclico, junto con pequeñas cantidades de subproductos como resultado de la hidrólisis o de la aminólisis del soporte. En un modo de realización preferido, el exceso de soporte y/o los posibles subproductos pueden eliminarse fácilmente mediante una etapa de doble lavado con un disolvente orgánico, tal como éter.

La eficacia muy elevada de la reacción de ciclación proporcionada es excepcional cuando se tiene en cuenta que en el caso del péptido 1 implica la formación de un anillo de 88 miembros. En general, se sabe que las reacciones de macrociclación dan rendimientos muy bajos (3-5% en condiciones de dilución grande), en particular cuando se forman anillos muy grandes. Entre las pocas excepciones que se conocen, las reacciones de metátesis de cierre de anillo (abreviadas generalmente como RCM por sus iniciales en inglés: ring-closing metathesis) con catalizador de Ru desarrolladas por Grubbs son conocidas por ser reversibles en algunas condiciones.

En el caso actual la alta eficacia de la reacción se relaciona con al menos tres factores. En primer lugar, las condiciones de alta dilución (preferiblemente $\leq 0,2\text{mM}$) elegidas favorecen la reacción intramolecular sobre la reacción intermolecular, facilitando de este modo la formación de ciclos en lugar de polímeros. En segundo lugar, la secuencia peptídica que se eligió (péptido 1) es parte de una estructura de bucle β de la hormona estimuladora del folículo (abreviada generalmente como FSH por sus iniciales en inglés: folicle stimulating hormone), lo que significa que es probable que la secuencia esté fuertemente predispuesta para una ciclación eficaz como resultado de interacciones secundarias no covalentes. Sin embargo, también para los péptidos SH-SH sin una predisposición notable para la reacción de los grupos -SH, las ciclaciones correspondientes también se producen con un rendimiento muy elevado.

Además de esto, la ciclación intramolecular de un péptido con un grupo funcional -SH sobre un soporte se acelera de forma significativa mediante el efecto denominado efecto del grupo vecino, o efecto catalítico nucleófilo intramolecular. El primer enlace tioéter que se forma activa fuertemente el segundo grupo reactivo para el ataque nucleófilo, facilitando de este modo la ciclación intramolecular sobre una reacción intermolecular del segundo grupo -SH con una segunda molécula de bis(halometil)benzeno. Después de la formación del primer enlace tioéter, se considera que el átomo de azufre funciona como un nucleófilo interno para realizar un ataque nucleófilo sobre un segundo grupo halometilo reactivo y desplaza el átomo de halógeno. Es muy probable que se forme un intermedio iónico de sulfonio cíclico. Las sales del sulfonio intermedio resultantes son bastante receptivas a reaccionar con un nucleófilo, en este caso particular con un segundo grupo -SH de un péptido que debe enlazarse al soporte. El catión sulfuro es un buen grupo saliente y la liberación de tensión de la estructura del anillo también puede aumentar la reactividad. En el ejemplo dado en la figura 2, un segundo grupo -SH reacciona con el intermedio de sal de sulfonio en una sustitución nucleófila de apertura de anillo para dar el producto final. La velocidad de la reacción global es esencialmente la velocidad de formación de la estructura de anillo, un procedimiento intramolecular energéticamente favorable. Dicha implicación de un átomo de la misma molécula se conoce como participación del grupo vecino o asistencia anquimérica.

En un método según la invención, la formación de una primera unión entre un péptido y un soporte invariable acelera o facilita la formación de una segunda unión entre un péptido y un soporte y así sucesivamente. En otras palabras, la formación de cada enlace o unión crea una condición favorable para la formación de cada enlace consecutivo. De hecho, se cree que en el método proporcionado, la formación de una primera unión entre un péptido y el soporte es la etapa inicial determinante de la velocidad de la reacción de acoplamiento, siendo las rápidas reacciones subsiguientes de los restantes grupos reactivos menos exigentes energéticamente. Por lo tanto, la activación observada adicionalmente facilita la ciclación sobre la polimerización, favoreciendo de este modo elevados rendimientos del macrociclo correspondiente (véase la figura 3).

A partir de todo lo dicho anteriormente, es evidente que los soportes adecuados para realizar el método según la invención son numerosos e incluyen tanto compuestos aromáticos como no aromáticos con tal de que la ciclación intramolecular se favorezca de forma significativa mediante el efecto del grupo vecino o el efecto catalítico nucleófilo intramolecular.

El tipo de catálisis nucleófila ha sido estudiada, por ejemplo, para varios cicloalcanos 2-halo-2-tioalquil-sustituidos que reaccionan aproximadamente 70.000 veces más rápidamente cuando los sustituyentes están orientados *trans* iso. *cis* [Bruce, 2001]. Un tipo de activación similar en la reacción del hexakis(bromometil)benceno con 1,0 equivalente de ácido 1-adamantilcarboxílico ha sido descrita recientemente por Hennrich *et al.* que encontraron que solo se formó el producto hexasustituido junto con el material inicial recuperado. De forma similar, en el método proporcionado en dicho documento se produce un efecto de activación acumulativo en el que una reacción precipita una serie de reacciones similares.

Un método publicado para la síntesis de péptidos cíclicos por medio de sustituciones nucleófilas secuenciales sobre compuestos aromáticos polihalogenados incluye las siguientes etapas: (i) se hace reaccionar un péptido lineal o peptidomimético con un grupo funcional nucleófilo libre con el compuesto aromático en el sentido de una sustitución aromática nucleófila sencilla, donde el grupo funcional nucleófilo es un alcohol, tiol o amina; (ii) el grupo protector de un grupo nucleófilo funcional adicional se escinde en el mismo péptido o peptidomimético, donde el grupo funcional nucleófilo liberado es un alcohol, tiol o amina y, (iii) se realiza la ciclación añadiendo una amina terciaria u otra base, con lo que la ciclación se realiza por medio de una sustitución aromática nucleófila de un átomo de halógeno adicional del compuesto haloaromático mediante la liberación de un grupo funcional nucleófilo, estando dicho compuesto haloaromático enlazado al péptido.

Un método según la presente invención tiene varias ventajas importantes sobre un método publicado. En primer lugar, cuando el método publicado se refiere al uso de halogenuros de arilo o de heteroarilo, el presente método proporciona, entre otros, soportes de halogenuros de alquilo. Los halogenuros de alquilo se refieren a compuestos en los que un átomo de halógeno está unido directamente a un anillo aromático. En contraste con los halogenuros de alquilo, la mayoría de los halogenuros de arilo son extremadamente no reactivos. Esto se explica fácilmente a continuación. En la etapa determinante de la velocidad de la sustitución aromática nucleófila, un nucleófilo se une por sí mismo al átomo de carbono que porta un átomo de halógeno; este átomo de carbono se hace tetraédrico y el anillo adquiere una carga negativa. Dicha reacción se hace más difícil por el hecho de que destruye la aromaticidad del anillo e interrumpe la resonancia entre el anillo y el halógeno. De hecho, la reacción de acoplamiento publicada solo se produce con di-, tri- y tetra-azinas porque sin los átomos de nitrógeno en el anillo, los átomos de halógeno serían incluso peores grupos salientes. Por lo tanto, el método proporcionado en la presente memoria para unir un péptido a un soporte, por ejemplo para proporcionar un soporte con al menos un péptido en bucle o cíclico, es conceptualmente diferente del método publicado que usa reacciones de sustitución aromática en halogenuros de arilo. En segundo lugar, la ciclación intramolecular no está significativamente mejorada en el método publicado porque los soportes usados no permiten el efecto del grupo vecino o el efecto catalítico nucleófilo intramolecular. Además, la reactividad de un soporte de halogenuro de arilo decrecerá con cada etapa de sustitución. En contraste, como se ha discutido en detalle anteriormente, en el método proporcionado la formación de una primera unión entre el soporte y un péptido acelera o facilita la formación de una segunda unión o de cada unión consecutiva en la reacción de acoplamiento o de ciclación. En tercer lugar, mientras que el método presente permite el acoplamiento directo de péptidos no protegidos, el método publicado requiere la protección/desprotección del péptido usado.

En un modo de realización adicional de la invención se proporciona un método para la síntesis de un compuesto farmacológico candidato en el que dicho compuesto se compone de un soporte invariable con múltiples péptidos variables, por ejemplo un soporte con dos o más péptidos o fragmentos de péptidos. En la presente memoria, un soporte que comprende al menos tres grupos reactivos se hace reaccionar con un péptido capaz de reaccionar con al menos dichos tres grupos reactivos de tal manera que se forman al menos tres enlaces entre dicho soporte y dicho péptido para formar un soporte provisto de al menos dos estructuras en bucle. En otro modo de realización se obtienen estructuras con múltiples bucles usando el método proporcionado en el que un soporte molecular o un soporte se pone en contacto con múltiples péptidos, siendo cada péptido capaz de formar al menos dos uniones o conexiones con el soporte. En un modo de realización preferido se proporciona un método para unir múltiples péptidos variables, compuestos similares a los péptidos o peptidomiméticos a un soporte. Esto es particularmente útil cuando por ejemplo se está sintetizando un peptidomimético de un epítopo discontinuo que comprende múltiples segmentos de péptido. Rutinariamente se usan barridos de péptidos solapantes (conocido generalmente como *PepScan*) para cartografiar sitios de enlace lineales tomando la secuencia primaria y sintetizando los 13-meros adecuados que se superponen en secuencia por 11 aminoácidos. Estos péptidos pueden ser sintetizados sobre membranas de celulosa que se pueden incubar con una disolución de la proteína o ligando diana. Las dianas enlazadas se detectan a continuación directamente sobre la membrana de celulosa, por ejemplo usando reacciones de ELISA convencionales. Dos o más fragmentos lineales de péptidos en los que se ha identificado que se enlazan específicamente a un compañero de enlace de interés en un procedimiento de selección (por ejemplo, usando tecnología *PepScan*) pueden ser fácilmente inmovilizados sobre una molécula de soporte usando el método proporcionado.

Es importante subrayar que un método según la invención no solo proporciona un procedimiento rápido y directo para la síntesis de compuestos farmacológicos candidatos que comprende una molécula de soporte invariable provista de múltiples péptidos, tal como péptidos en bucle, sino también para la síntesis de plataformas de síntesis incluso más complejas que comprenden, por ejemplo, múltiples soportes y múltiples péptidos unidos. En un modo de realización de la invención, se realizan una serie de reacciones de acoplamiento, cada una de ellas implicando la unión de al menos un péptido a un soporte. Se debe tener en cuenta que en este modo de realización del método

proporcionado, un soporte provisto con al menos un péptido en una primera reacción de acoplamiento puede servir como molécula en una segunda reacción de acoplamiento, y así sucesivamente. Por lo tanto, el término molécula también comprende una entidad molecular que comprende al menos un soporte, con tal de que dicha molécula sea capaz de reaccionar con al menos dos grupos reactivos de otro soporte. Los soportes usados pueden ser diferentes unos de otros, pero también pueden ser idénticos. Como se ejemplifica en la presente memoria (véase la figura 11), el método proporcionado en la presente memoria se usa ventajosamente para la síntesis sencilla y directa de constructos de péptido basados en CDR para mimetizar anticuerpos.

Se proporciona además un método para unir al menos dos péptidos a un soporte en el que cada péptido se une a dicho soporte mediante al menos dos enlaces, comprendiendo dicho método proporcionar un soporte que comprende al menos cuatro grupos reactivos, proporcionar al menos dos moléculas, cada una de ellas siendo capaz de reaccionar con al menos dos de dichos grupos reactivos, poner en contacto dicho soporte con al menos dichos dos péptidos en condiciones que permitan la formación de la menos dos uniones entre dicho soporte y cada uno de dichos péptidos para dar un compuesto farmacológico candidato. En un modo de realización preferido, se proporciona un método para enlazar al menos dos moléculas de péptido a un soporte, por ejemplo al menos dos péptidos que son diferentes entre sí. Dicho soporte proporcionado con al menos dos segmentos de péptido en bucle o cíclicos son particularmente útiles para mimetizar moléculas de enlace biológicas, por ejemplo en la aplicación en diagnóstico, programas de desarrollo de fármacos o en el tratamiento de enfermedades por imitación o competición con compuestos naturales implicados en la enfermedad.

Las microrredes de proteína funcional y polipéptido son críticas para la siguiente fase de la investigación proteómica. Como la microrredes de ADN, las microrredes de proteína o los biochips biológicos serán capaces de analizar miles de muestras simultáneamente, marcando el camino hacia un mapa completo del complemento total de las proteínas humanas. Pero, a diferencia del ADN, las proteínas y los péptidos no son tan fáciles de unir a las microrredes. Mientras que el ADN es robusto y capaz de aguantar condiciones experimentales rigurosas, los péptidos son frágiles y se desnaturalizan si no se manipulan con cuidado. Las proteínas y los fragmentos de péptidos, tal como los segmentos de péptido en bucle sobre un soporte, no pueden ser secados; deben permanecer en un medio líquido para mantener su actividad. Las proteínas son tan sensibles a su medioambiente que se desnaturalizarán en las interfases sólido-líquido y líquido-aire (que serán considerables a medida que los ensayos se hacen incluso más pequeños ya que, al mismo tiempo, la relación superficie/volumen aumenta). Además, las proteínas y los péptidos tienen configuraciones mono-, bi- y tri-dimensionales a medida que se transforman de una cadena lineal de aminoácidos a una unidad funcional. Como de lo que se trata es de la función de medir, este aspecto es crítico para crear una proteína auténtica o una microrred de péptidos. Para finalizar, estas microrredes deben ser capaces también de soportar análisis y procesamientos de alta velocidad.

En un modo de realización adicional, la invención proporciona un método para unir un péptido mediante al menos dos uniones a un soporte, que comprende además unir al menos dicho péptido mediante al menos un enlace a una superficie, que comprende poner en contacto dicho péptido con una superficie para permitir la formación de al menos dicho enlace. Una superficie comprende cualquier soporte sólido superficial, por ejemplo la superficie de una microrred, pero también una resina o material portador usado en aplicaciones cromatográficas, ensayos de tipo ELISA o tecnología de Biacore. En un modo de realización, dicho al menos un enlace comprende un enlace entre un soporte y una superficie, más preferiblemente entre un grupo reactivo de dicho soporte y dicha superficie. Por ejemplo, se proporciona un método en el que un soporte, provisto de al menos un péptido, reacciona mediante su grupo reactivo con una superficie. Una superficie comprende una superficie químicamente activada, por ejemplo una superficie provista de uno o más grupos funcionales nucleófilos. Por ejemplo, un grupo funcional nucleófilo de una superficie comprende un grupo tiol o amino. Se comprenderá que para que un soporte sea capaz de formar al menos dos uniones con al menos un péptido y al menos una unión con una superficie, se prefiere que dicho soporte comprenda al menos tres grupos reactivos. En un modo de realización, se proporciona un método que comprende el menos las siguientes etapas: proporcionar un soporte que comprende al menos tres grupos reactivos, proporcionar al menos un péptido capaz de reaccionar con al menos dos grupos reactivos, proporcionar una superficie capaz de reaccionar con al menos un grupo reactivo, poner en contacto dicho soporte con dicho al menos un péptido y dicha superficie sólida en condiciones que permitan la formación de al menos dos uniones entre dicho soporte y dicho al menos un péptido y al menos una unión entre dicho soporte y dicha superficie en una reacción de acoplamiento, donde la formación de una unión acelera/facilita la formación de una unión consecutiva.

Un método de la presente invención para proporcionar un compuesto de al menos una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte molecular también puede comprender producir una biblioteca que comprende varios de los compuestos mencionados anteriormente. Una biblioteca producida por un método según la reivindicación 5 puede ser una biblioteca que comprende péptidos variables cada uno de ellos restringidos mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte molecular invariable que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos, a la que dicho péptido es accesible espacial o posicionalmente, por ejemplo en forma de una red, si se desea con ayuda mediante localización y/o reconocimiento dirigidos por ordenador de un péptido específico o de un grupo de péptidos en las dimensiones (por ejemplo, el plano o la superficie) del soporte de la biblioteca usada. En una red, dichos péptidos son, por ejemplo, accesibles por sus posiciones en una cuadrícula o una matriz. Un ejemplo es un soporte de un material polimérico (un soporte polimérico) provisto de una biblioteca de compuestos con una densidad de al menos 25

péptidos por centímetro cuadrado o preferiblemente al menos 50, pero más ventajosamente preferiblemente al menos 100, o más, tal como 200-500 o incluso 1.000 péptidos en bucle o cíclicos por centímetro cuadrado.

Una biblioteca producida con el método según la reivindicación 5 puede ser usada para la identificación o detección de un sitio de enlace capaz de interactuar con un péptido y, por lo tanto, para la identificación de un compuesto farmacológico candidato. Por ejemplo, se produce una biblioteca que comprende varios péptidos, por ejemplo péptidos con dos grupos funcionales –SH no protegidos, unidos de forma estructuralmente coordinada a un soporte de di(bromometil)benceno. Por ejemplo, se produce una biblioteca que comprende una red de segmentos de péptido ciclados. Los segmentos o tramos de aminoácidos se pueden obtener a partir de la secuencia de una proteína natural. Sin embargo, también se pueden sintetizar aleatoriamente, por ejemplo usando un enfoque de química combinatoria.

Cuando se produce dicha biblioteca de compuestos enlazados a un soporte sólido no hay un orden o secuencia específica por el que el soporte invariable, el péptido variable y el soporte sólido deben entrar en contacto entre ellos. Por ejemplo, después de una reacción de acoplamiento en disolución para unir un péptido a un soporte para proporcionar un compuesto candidato según la invención, dicho compuesto, que típicamente comprende un péptido cíclico o restringido, se puede unir a una superficie sólida, por ejemplo mediante técnicas de manchado (*spotting*). Por ejemplo, se sintetiza un péptido con grupos funcionales cisteína usando química peptídica con Fmoc convencional y se mancha sobre una fase sólida provista de una molécula de soporte invariable. En otro ejemplo, péptidos variables capaces de formar al menos dos enlaces de tioéter con un soporte se sintetizan en primer lugar o se manchan sobre una superficie sólida, seguido por poner en contacto dicho péptido con un soporte para inducir la ciclación.

Un soporte como se usa en el método según la reivindicación 1 se puede aplicar preferiblemente de forma automática en cada mancha individual que contenga al menos un péptido capaz de reaccionar con dicho soporte. Sin embargo, en un modo de realización preferido un soporte se pone en contacto con al menos un péptido, donde dicho péptido se sintetiza en fase sólida. En teoría, dicho péptido puede ser sintetizado secuencialmente de forma repetitiva, de un monómero (por ejemplo, un aminoácido) a otro, hasta que se obtiene un péptido (esencialmente polimérico) de la longitud deseada. No solo se usan monómeros naturales, las moléculas sintéticas, tales como aminoácidos no naturales, o incluso D-aminoácidos, se usan rutinariamente como monómeros. En un modo de realización, se produce una biblioteca de compuestos en la que cada compuesto se compone de una molécula de soporte que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos y uno o más péptidos. En este caso, la puesta en contacto del péptido y el soporte se puede realizar por simple inmersión o "mojado" de un soporte sólido, por ejemplo una minitarjeta para biblioteca u otro tipo de biochip, en una disolución que contiene un soporte invariable. Por supuesto, después de la ciclación de un primer péptido sobre un soporte es posible unir un segundo péptido a dicho soporte, e incluso un tercer o cuarto péptido. Además, un compuesto farmacológico candidato, sea en disolución o sobre un soporte sólido, comprende más de un soporte molecular o molécula de soporte. Por ejemplo, como se ejemplifica en la descripción detallada, la invención proporciona un método para producir los denominados "cuerpos de enlace" que mimetizan las propiedades de enlace de los anticuerpos naturales, como se evidencia usando análisis del tipo ELISA. Una biblioteca producida por el método según la reivindicación 5, aunque también sea adecuada para detectar o seleccionar sitios de enlace continuos, es ahora particularmente muy adecuada para detectar o seleccionar sitios de enlace discontinuos, en particular con las interacciones proteína-proteína.

Un soporte, como se usa en el método según la reivindicación 1, también puede ser proporcionada en primer lugar sobre un soporte sólido, comprendiendo dicho soporte al menos un primer y un segundo grupo reactivo sobre los que se enlaza al menos un péptido en una o más etapas de ciclación. El soporte se puede aplicar como una capa uniforme sobre una superficie sólida o usando tecnología de manchado o ribeteado (*edging*). Una superficie comprende una superficie químicamente activada capaz de reaccionar, sea de forma reversible o irreversible con un soporte. La ciclación de al menos un péptido se obtiene entonces aplicando dicho péptido sobre dicha superficie provista de un soporte, sea recubriéndola uniformemente o sea aplicándolo en manchas. De forma similar a lo que se ha mencionado anteriormente, también aquí es posible construir compuestos farmacológicos candidatos más complejos que comprenden múltiples péptidos restringidos usando uno o más soportes moleculares que comprenden una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos.

Como se ha indicado anteriormente, en general es muy conveniente y permite ahorrar tiempo el uso de un procedimiento de mojado o inmersión para producir una biblioteca de compuestos con el método según la reivindicación 5. Por ejemplo, el mojado se usa ventajosamente para aplicar un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos sobre un soporte sólido (por ejemplo, después de realizar las manchas de los péptidos) o poniendo en contacto los péptidos en manchas con una molécula de soporte. Sin embargo, como consecuencia de un manchado defectuoso, los péptidos en las manchas vecinas pueden unirse al soporte molecular para dar un compuesto que se compone de un soporte unido a una mezcla de péptidos no prevista. Especialmente, cuando la densidad de péptidos en manchas es elevada, como es el caso cuando se preparan bibliotecas moleculares, se puede prever que algunas áreas de desbordamiento entre las manchas contendrán mezclas de péptidos. Cuando se determina el enlace de una molécula diana con dichos compuestos farmacológicos candidatos, por ejemplo usando una red provista con una biblioteca de compuestos

candidatos, uno o más compuestos no previstos en estas áreas limitantes pueden dar lugar a una señal de enlace "positiva". Sin embargo, es improbable que la fuerza de dicha señal sea suficiente para oscurecer o interferir los aciertos verdaderamente positivos ya que la densidad de las moléculas en manchas será mucho mayor en el centro de la mancha. Además, como resultado de la naturaleza química de un soporte y la de un péptido como se han descrito en la presente memoria, la ciclación intramolecular es fuertemente preferida sobre la ciclación intermolecular. Cualquiera que sea la tasa, la formación de compuestos candidatos "híbridos", si es que se forman, sobre la superficie sólida es improbable como para perturbar de forma significativa la selección de un compuesto farmacológico candidato según un método como se ha proporcionado en la presente memoria. Consecuentemente, se produce una biblioteca de compuestos en un formato muy miniaturizado.

El uso adecuado de una biblioteca de compuestos, como se describe en la presente memoria, es un método para seleccionar un péptido capaz de interactuar con una molécula diana que comprende rastrear una biblioteca de compuestos con al menos una molécula diana potencial y detectar el enlace entre un compuesto de dicha biblioteca y dicha molécula diana. En la presente memoria se usa un procedimiento muy eficaz (por ejemplo, el *Loopscan*) para analizar las propiedades de enlace de los compuestos, por ejemplo aquellos que comprenden péptidos restringidos, frente a uno o más compañeros de enlace potenciales. Un enfoque por *Loopscan* es particularmente útil para elegir un compuesto que comprende un sitio de enlace principalmente de naturaleza peptídica, tal como un peptidomimético. La detección del enlace se obtiene generalmente con sondas marcadas directamente que comprenden nucleótidos o anticuerpos detectables ópticamente (generalmente por fluorescencia). En un modo de realización preferido se usan análisis unidos a enzimas (tipo ELISA) porque estos son típicamente muy sensibles. El rastreo de dicha biblioteca de compuestos con cualquier molécula dada es sencillo, rápido y directo. Los aciertos pueden ser traducidos directamente en la secuencia de aminoácidos o en la composición molecular de la estructura en bucle debido a la red definida por la posición. En la presente memoria se muestra que una biblioteca que comprende una serie de péptidos ciclados solapantes que corresponden al bucle $\beta 3$ de la hormona estimulante del folículo (FSH) se usó con éxito para elegir un enlace específico a un anticuerpo 2 de la FSH-beta. El anticuerpo se enlazó fuertemente al péptido cíclico (12-mero en este caso). Por el contrario, no se enlazó en ningún grado a una superficie polimérica con grupos funcionales con los correspondientes péptidos lineales, ni siquiera a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (véase la figura 12). Por otra parte, la selectividad del anticuerpo está bien expresada por el hecho de que solo algunos de los segmentos de péptido en bucle se enlazan fuertemente con los anticuerpos. Estos descubrimientos ilustran claramente la importancia de los péptidos restringidos conformacionalmente en la mimetización del reconocimiento molecular.

Después de finalizar el procedimiento de selección, los compuestos farmacológicos elegidos se pueden sintetizar subsiguientemente en disolución, si se desea a gran escala, según el mismo procedimiento. Por lo tanto, es posible sintetizar un compuesto en disolución que tiene esencialmente las mismas propiedades de enlace que un compuesto unido, sea directamente o mediante una molécula de enlace, a un soporte sólido, por ejemplo una superficie de una red. Una gran variedad de compuestos farmacológicos candidatos pueden ser sintetizados en forma de red, permitiendo una elección de compuesto rápida y conveniente, y volver a sintetizar simplemente los compuestos elegidos en disolución. Por lo tanto, de forma muy diferente a los enfoques convencionales, la engorrosa transición de la selección de un prototipo molecular (fase sólida) al diseño de un fármaco candidato soluble ya no es necesaria. Se usa ventajosamente un método para acelerar el procedimiento de descubrimiento de un fármaco y desarrollo del fármaco que integra elegantemente la síntesis de un prototipo molecular en fase sólida y la síntesis del compuesto farmacológico candidato en fase disolución (véase la figura 13).

El método según la reivindicación 7 para elegir un compuesto farmacológico candidato es particularmente adecuado para acelerar el descubrimiento de fármacos basados en péptidos. Los procedimientos existentes para el desarrollo de un simulador de proteína o un peptidomimético para su uso como un compuesto farmacéutico típicamente implican múltiples rondas de selección de uno o más segmentos de péptido con determinadas propiedades de enlace. Los péptidos lineales cortos no son, sin embargo, ideales para usarlos como fármacos debido a su flexibilidad inherente y susceptibilidad a sufrir degradación proteolítica. Por lo tanto, una vez que se ha identificado un segmento de péptido activo, por ejemplo usando una biblioteca de péptidos, las estrategias actuales de descubrimiento de fármacos basados en péptidos todavía hacen necesaria la modificación de dicho prototipo peptídico bien en un peptidomimético o bien en otro tipo de candidato farmacológico de molécula pequeña soluble que mimetice las características de enlace del prototipo peptídico. La modificación del prototipo peptídico ya no es necesaria porque el prototipo peptídico ya es peptidomimético por sí mismo. De hecho, como la invención proporciona la síntesis de un gran número de peptidomiméticos, la única cosa que es necesaria implica la selección de aquellos peptidomiméticos que tienen unas características de enlace determinadas.

La molécula de soporte como se usa en el método según la reivindicación 1 puede unirse mediante al menos dos enlaces de tioéter en una reacción de acoplamiento, en la que la formación de un enlace acelera la formación de un enlace consecutivo. Esto permite unir un péptido sobre un soporte de forma restringida conformacionalmente, como es muy deseable, por ejemplo, cuando se proporciona un compuesto que comprende un peptidomimético. En un modo de realización preferido, dicha restricción se obtiene poniendo en contacto un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos con al menos un péptido capaz de reaccionar con dicha molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos. Un compuesto comprende al menos un péptido unido mediante al menos dos enlaces de tioéter a

una molécula de soporte, donde dichos enlaces se forman mediante una reacción de sustitución nucleófila. Un compuesto como se ha proporcionado que comprende al menos un péptido unido al menos a una molécula de soporte en una reacción nucleófila se obtiene, por ejemplo, usando un péptido con al menos un grupo funcional nucleófilo libre. Un péptido que comprende un grupo sulfhidrilo, por ejemplo un péptido con un grupo funcional -SH, se usa ventajosamente para proporcionar un compuesto que se compone al menos de un péptido unido al menos a un soporte mediante al menos dos enlaces de tioéter. En un modo de realización preferido de la invención, un compuesto se compone al menos de una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática, donde dicho péptido se elige entre la familia de proteínas con nudo de cisteína.

En un modo de realización adicional de la invención, un compuesto se compone de al menos una estructura de péptido en bucle unido mediante al menos tres enlaces de tioéter a un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática. Por ejemplo, se proporciona un compuesto que comprende un péptido restringido sobre un soporte de halometilareno mediante tres enlaces, acoplando un péptido con tres grupos funcionales a un soporte que comprende al menos tres grupos reactivos, como por ejemplo un tris(bromometil)benceno o uno de sus derivados. Por supuesto, de forma similar se proporciona un compuesto que comprende al menos un péptido que se une mediante cuatro enlaces de tioéter, o incluso más, a una molécula de soporte. Por ejemplo, la invención proporciona un compuesto que comprende una arquitectura molecular compleja compuesta de múltiples moléculas de soporte y múltiples péptidos. Como un ejemplo específico, la invención proporciona un método para restringir péptidos con 2 ó 3 grupos -SH sobre soportes con tetra- y tri-bromometilo para proporcionar un compuesto que comprende múltiples bucles de péptido sobre un soporte sintético. La reacción de acoplamiento se produce sin formación detectable de ningún subproducto porque la ciclación intramolecular está favorecida sobre la ciclación intramolecular. El acoplamiento se realiza ventajosamente en disolución en condiciones suaves, entre otras razones para reducir la desnaturalización del péptido.

Se proporciona un compuesto en el que dicho al menos un péptido está unido a dicho soporte de forma esencialmente no protegida. Dicho enlace o acoplamiento se puede realizar usando péptidos esencialmente no protegidos, tal como un péptido en el que las cadenas laterales de aminoácidos no están protegidas. Esto permite evitar los procedimientos largos y tediosos que se encuentran cuando se usan enfoques clásicos que típicamente implican múltiples ciclos de protección-desprotección. En un modo de realización, un compuesto según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 comprende al menos un péptido acoplado al menos a una molécula de soporte, en el que dicho acoplamiento se realiza en disolución, más preferiblemente en una disolución acuosa y/o en condiciones suaves, tal como a aproximadamente temperatura ambiente. Esto es particularmente ventajoso cuando dicho compuesto comprende un péptido que es sensible a la desnaturalización.

Preferiblemente, un compuesto según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 comprende al menos una molécula de soporte unida al menos a un péptido en el que el enlace se completa esencialmente en menos de 60 minutos. Por supuesto, se prefiere que dicha reacción de acoplamiento tenga un rendimiento relativamente elevado, por ejemplo al menos 30%, mejor más de 40%, incluso mejor más de 50%, lo mejor más de 75% o incluso más que eso. En un modo de realización, un compuesto según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 está compuesto por al menos un péptido acoplado o unido al menos a un soporte molecular, en la que dicha reacción de acoplamiento se realiza usando reactivos en una relación esencialmente equimolar. Un compuesto según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 puede estar compuesto por al menos un péptido unido a un soporte en el que dicho soporte es un soporte puramente sintético. Un problema importante cuando se trabaja con soportes puramente sintéticos es su necesidad de inserción selectiva de grupos funcionales que generalmente lleva a procedimientos de acoplamiento en múltiples etapas, a menudo con rendimientos muy bajos (5-20%). Un péptido con varios grupos funcionales, por ejemplo grupos cisteína libres, puede reaccionar con un soporte con grupos funcionales simétricamente con al menos dicho de número de grupos reactivos en un procedimiento en una etapa, dando exclusivamente el producto 1:1 con elevados rendimientos (hasta > 90%). Por lo tanto, no es necesaria la inserción selectiva de grupos funcionales en una molécula de soporte, por ejemplo cuando se produce una biblioteca de péptidos restringidos para elegir un compuesto farmacológico candidato según la reivindicación 5. Una molécula de soporte comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos, por ejemplo un soporte (hetero)aromático en la que al menos dos grupos reactivos están en la posición orto-, meta- o para-. Los soportes heteroaromáticos según la invención para usarlos cuando se prepara un compuesto comprenden moléculas similares a la piridina, pirimidina, pirrol, furano y tiofeno. Además, un compuesto según la invención comprende una molécula de soporte que se puede obtener a partir de un halometilareno. Por ejemplo, dicho halometilareno comprende un bis(bromometil)benceno, un tris(bromometil)benceno, un tetra(bromometil)benceno o uno de sus derivados. Además, en la presente memoria se proporcionan compuestos que comprenden un péptido unido a un soporte aromático que se basa en o que se puede derivar de una estructura de anillos múltiples o de anillos condensados. Por ejemplo, soportes adecuados según la invención incluyen, pero sin estar limitados a ellos, los que tienen una estructura central similar al bifenileno, terfenileno, naftaleno o antraceno. Dichos soportes tienen grupos funcionales simétricos con grupos reactivos, por ejemplo en la posición orto-, meta- o para-.

Una mayor ventaja de un procedimiento como el proporcionado radica en el hecho de que un compuesto puede ser sintetizado tanto en fase sólida, tal como en la superficie de una red así como en disolución (preferiblemente acuosa). Un compuesto farmacológico candidato elegido según la invención puede ser presentado a un potencial

compañero de enlace en disolución. Dicho compañero de enlace comprende un compañero de enlace soluble así como un compañero de enlace enlazado a una célula, tal como por ejemplo una molécula de receptor.

Un soporte molecular como el usado en método según el método de la reivindicación 1 se elige, por ejemplo, entre el grupo que consiste en: bis-, tris- o tetra-(halometil)benceno; bis-, tris- o tetra-(halometil)piridina; bis-, tris- o tetra-(halometil)piridazina; bis-, tris- o tetra-(halometil)pirimidina; bis-, tris- o tetra-(halometil)pirazina; bis-, tris- o tetra-(halometil)-1,2,3-triazina; bis-, tris- o tetra-(halometil)-1,2,4-triazina; bis-, tris- o tetra-(halometil)pirrol, -furano, -tiofeno; bis-, tris- o tetra-(halometil)imidazol, -oxazol, tiazol; bis-, tris- o tetra-(halometil)-3H-pirazol, -isooxazol, -isotiazol; bis-, tris- o tetra-(halometil)-bifenileno; bis-, tris- o tetra-(halometil)-terc-fenileno; 1,8-bis-(halometil)-naftaleno; bis-, tris- o tetra-(halometil)-antraceno; bis-, tris- o tetra-(halometil)fenilmetano; o, si es aplicable, otro de sus regioisómeros. Por ejemplo, un soporte molecular es el 1,2-bis(halometil)benceno; 3,4-bis(halometil)piridina; 3,4-bis(halometil)piridazina; 4,5-bis(halometil)pirimidina; 4,5-bis(halometil)pirazina; 4,5-bis(halometil)-1,2,3-triazina; 5,6-bis(halometil)-1,2,4-triazina; 3,4-bis(halometil)pirrol, -furano, -tiofeno y otros regioisómeros; 4,5-bis(halometil)imidazol, -oxazol, -tiazol; 4,5-bis(halometil)-3H-pirazol, isooxazol, -isotiazol; 2,2'-bis(halometil)bifenileno; 2,2'-bis(halometil)terc-fenileno; 1,8-bis(halometil)naftaleno 1,10-bis(halometil)antraceno; bis(2-halometilfenil)metano; 1,2,3-tris(halometil)benceno; 2,3,4-(halometil)piridina; 2,3,4-tris(halometil)piridazina; 3,4,5-tris(halometil)pirimidina; 4,5,6-tris(halometil)-1,2,3-triazina; 2,3,4-tris(halometil)pirrol, -furano, tiofeno; 2,4,5-bis(halometil)imidazol, -oxazol, tiazol; 3,4,5-bis(halometil)-1H-pirazol, -isooxazol, isotiazol; 2,4,2'-tris(halometil)bifenileno; 2,2'',6,6''-tetra(halometil)terc-fenileno 2,3,5,6-tetra(halometil)naftaleno y 2,3,7,8-tetra(halometil)antraceno; Bis(2,4-bis(halometil)fenil)metano.

El método según la reivindicación 1 puede proporcionar un péptido unido a un soporte que puede ser utilizado adecuadamente para mimetizar varias familias diferentes de proteínas, incluyendo las de la familia de proteínas con nudo de cisteína.

El método según la reivindicación 1 permite el acoplamiento rápido y eficaz de varios péptidos o segmentos de péptidos en bucle sobre una superficie. Sin embargo, se pueden usar péptidos no protegidos en una disolución tampón acuosa en condiciones suaves, que obviamente es una elección preferida cuando se une un péptido a una superficie sólida de forma que retenga sus grupos funcionales, por ejemplo cuando se usan péptidos para una tecnología de microrred de péptidos o biochip de péptidos. Las microrredes de péptidos pueden estar integradas en cámaras de flujo, de manera que los péptidos están siempre en disolución acuosa y no se desnaturalizan. Los compuestos diana, biomoléculas diana tales como las proteínas introducidas en las cámaras pueden interactuar con los segmentos de péptido en bucle inmovilizados y su enlace puede ser detectado por varios métodos incluyendo la fluorescencia, pero sin limitarse a ella.

En conjunto, la invención proporciona un enfoque nuevo y original para unir al menos un péptido a un soporte. A diferencia de los enfoques clásicos, el método proporcionado comprende un procedimiento en una etapa en el que se forman múltiples uniones en un procedimiento rápido que implica catálisis intramolecular. El método proporcionado esencialmente no requiere en ningún grado la inserción selectiva de grupos funcionales del soporte usado. Una reacción de acoplamiento según la invención para proporcionar un compuesto farmacológico candidato permite obtener generalmente rendimientos elevados es rápida a temperatura ambiente y se puede realizar en condiciones suaves. La invención permite ahora la síntesis fácil de un biomimético, como un péptido cíclico o peptidomimético, para usarlo, entre otras aplicaciones, en programas de desarrollo de fármacos y la diagnosis o el tratamiento de una enfermedad. Estos sistemas miméticos se pueden usar para inducir efectos farmacológicos o terapéuticos en humanos y en otros animales. El método según la reivindicación 1 puede proporcionar compuestos que se pueden usar para inducir una respuesta de un anticuerpo específico en un sujeto, por ejemplo en un programa de vacunación.

Con este objetivo, el soporte puede estar provisto de al menos un epítipo o determinante antigénico, incluyendo un epítipo discontinuo, según el método de la invención. El compuesto así obtenido puede ser utilizado para la formulación de una composición de vacuna. El método según la reivindicación 1 se puede usar para proporcionar sistemas miméticos de antígenos virales, antígenos tumorales, antígenos parasitarios y antígenos bacterianos.

Leyendas

Figura 1. Esquema del enfoque clásico y el nuevo para la síntesis de múltiples bucles de péptidos sobre soportes sintéticos. El enfoque clásico requiere varias etapas de protección-desprotección con el fin de acoplar tres ciclopéptidos diferentes sobre una única molécula de soporte, lo que hace el procedimiento largo y tedioso. La nueva estrategia evita este problema haciendo reaccionar un péptido lineal con el número correcto de grupos funcionales B con un soporte con grupos funcionales simétricamente con un número igual de grupos funcionales A, lo que permite obtener esencialmente el producto 1:1 exclusivamente con rendimientos muy elevados.

Figura 2. Reacción de acoplamiento de péptidos SH-SH con un soporte con dibromobenceno.

Figura 3. Mecanismo de activación, mediada por la formación de un enlace de tioéter, de la segunda función bromometilo lo que lleva a una formación muy eficaz de la estructura de péptido en bucle.

Figura 4. Soportes aromáticos con posicionamiento orto-, meta- o para- de dos grupos halometilo. Hal se refiere a átomos de cloro, bromo o yodo.

- 1,2-bis(halometil)benceno y otros regioisómeros
- 3,4-bis(halometil)piridina (X = N) y otros regioisómeros
- 5 3,4-bis(halometil)piridazina (X = N) y otros regioisómeros
- 4,5-bis(halometil)pirimidina (X = N) y otros regioisómeros
- 4,5-bis(halometil)pirazina (X = N) y otros regioisómeros
- 4,5-bis(halometil)-1,2,3-triazina (X = N) y otros regioisómeros
- 5,6-bis(halometil)-1,2,4-triazina (X = N) y otros regioisómeros
- 10 3,4-bis(halometil)pirrol (X = N), -furano (X = O), -tiofeno (X = S) y otros regioisómeros
- 4,5-bis(halometil)imidazol (X = N, N), -oxazol (X = N, O), -tiazol (X = S) y otros regioisómeros
- 4,5-bis(halometil)-3H-pirazol (X = N, N), -isooxazol (X = N, O), -isotiazol (X = S) y otros regioisómeros
- 1,2-bis(bromometilcarbonilamino)benceno (X₁ = NH, X₂ = O)
- 2,2'-bis(halometil)bifenilo
- 15 2,2''-bis(halometil)terc-fenilo
- 1,8-bis(halometil)naftaleno
- 1,10-bis(halometil)antraceno
- Bis(2-halometilfenil)metano

Figura 5. Formación de una estructura peptídica sobre un soporte de tribromo

- 20 Figura 6. Soportes aromáticos con posicionamiento orto-, meta- o para- de los tres grupos halometilo:
- 1,2,3-tris(halometil)benceno y otros regioisómeros
- 2,3,4-tris(halometil)piridina (X = N) y otros regioisómeros
- 2,3,4-tris(halometil)piridazina (X = N) y otros regioisómeros
- 3,4,5-tris(halometil)pirimidina (X = N) y otros regioisómeros
- 25 4,5,6-tris(halometil)-1,2,3-triazina (X = N) y otros regioisómeros
- 2,3,4-tris(halometil)pirrol (X = N), -furano (X = O), -tiofeno (X = S) y otros regioisómeros
- 2,4,5-bis(halometil)imidazol (X = N, N), -oxazol (X = N, O), -tiazol (X = S) y otros regioisómeros
- 3,4,5-bis(halometil)-1H-pirazol (X = N, N), -isooxazol (X = N, O), -isotiazol (X = S) y otros regioisómeros
- 2,4,2'-tris(halometil)bifenilo
- 30 2,3',2-tris(halometil)terc-fenilo
- 1,3,8-tris(halometil)naftaleno
- 1,3,10-tris(halometil)antraceno
- Bis(2-halometilfenil)metano

Figura 7. Formación de un constructo peptídico con bucle sencillo y doble mediante reacción de un soporte con tetrabromo con péptidos lineales con dos grupos funcionales SH-.

Figura 8. Soportes aromáticos con posicionamiento en orto-, meta- y para- de los cuatro grupos bromometilo.

1,2,4,5-tetra(halometil)benceno y otros regioisómeros

1,2,4,5-tetra(halometil)piridina (X = N) y otros regioisómeros

2,4,5,6-tetra(halometil)pirimidina (X₁ = X₂ = N) y otros regioisómeros

2,3,4,5-tetra(halometil)pirrol (X = NH), -furano (X = O), -tiofeno (X = S) y otros regioisómeros

5 2,2',6,6'-tetra(halometil)bifenilo

2,2'',6,6''-tetra(halometil)terc-fenilo

2,3,5,6-tetra(halometil)antraceno

Bis(2,4-(bis(halometil)fenil)metano (X =CH₂)

10 Figura 9. Formación de un constructo peptídico de doble bucle mediante reacción de soportes de tribromo con péptidos lineales con tres grupos funcionales –SH.

Figura 10. Formación de un constructo peptídico de doble bucle mediante reacción de soportes de tetrabromo con péptidos lineales con cuatro grupos funcionales –SH.

Figura 11. Representación esquemática de la síntesis de múltiples bucles de CDR sobre un soporte sintético para mimetizar anticuerpos (cuerpos de enlace de 3ª generación).

15 Figura 12. Resultados de ELISA para el enlace de anticuerpos monoclonales anti-FSH 2 (10 µg/mL) en minipocillos de 3 µL que contienen superpuestos: a) péptidos ciclados (con m-dibromoxileno) y b) péptidos 12-meros lineales del bucle β3 del FSH-beta; secuencia del péptido de enlace: (AA₆₈-AA₇₉) Ac-**CRVPGAHHADSLC**-resina.

20 Figura 13. Representación esquemática de la selección de compuesto farmacológico candidato entre una biblioteca de compuestos compuesta de un péptido variable unido a un soporte invariable en el que el enlace de un anticuerpo se determina con dicho compuesto sintetizado y enlazado a un soporte sólido, seguido por la síntesis del compuesto farmacológico candidato elegido en disolución.

25 Figura 14. Resultados de ELISA para el barrido de optimización de bucle para el enlace de anticuerpos monoclonales anti-FSH 2 (10 µg/mL) en minipocillos de 3 µL que contienen un subgrupo de péptidos en bucle (miméticos del FSH-β3) con tamaños de bucle variable (Figura 14A). Los resultados (Figura 14B) muestran que algunos de los péptidos 13-meros a 16-meros en bucle muestran un enlace aumentado en comparación con el péptido 12-mero en bucle como se ha identificado en el *LoopScan* del 12-mero (véase ejemplo 7, figura 12).

30 Figura 15. Resultados de ELISA para el barrido de doble bucle para el enlace de anticuerpos monoclonales anti-FSH 2 (10 µg/mL) en minipocillos de 3 µL que contienen un subgrupo de constructos de péptidos en doble bucle (Figura 15A) (miméticos del FSH-β3-β1, bucle constante: AN₆₂-AA₇₃, bucle variable: AA₂-AA₃₂). Los resultados (Figura 15B) muestran que los constructos de péptido en doble bucle para los que el péptido de bucle variable representa la parte superior del bucle β1 de la FSH-β muestran enlace mejorado con el mAB 2 en comparación con ambos bucles por separado como se identifica en el *LoopScan* (véase el ejemplo 7, figura 12).

35 Figura 16. Resultados de ELISA para el barrido *Loop-Linear* para el enlace de anticuerpos monoclonales anti-FSH 2 (0,1 µg/mL) en minipocillos de 3 µL que contienen un subgrupo de constructos de péptidos lineales y en bucle (Figura 16A) (bucle constante: FSH-b, AN₆₂-AA₇₃, péptido lineal variable: FSH-b, AA₂-AA₁₀₇). Los resultados (Figura 16B) muestran que los constructos de péptido lineal y en bucle para los que la carga neta del péptido lineal es positiva (+1, +2, etc.) muestran un enlace mejorado con el mAB 2 en comparación con el bucle peptídico constante, como se identifica en el *LoopScan* (véase el ejemplo 7, figura 12).

Sección experimental

40 La parte central de la presente invención es nuestro descubrimiento de que una variedad de péptidos lineales con dos tioles de cisteína libres reaccionan rápidamente con varios dibromobencenos. Las reacciones se realizan generalmente en disolución acuosa, preferiblemente en mezclas (típicamente 50/50 a 5/95) de acetonitrilo y bicarbonato de amonio 20mM (pH 7,8). Basándose en este descubrimiento, se presenta una nueva estrategia para unir una molécula con un sitio de enlace potencial a un soporte mediante al menos dos uniones, en la que la

45 formación de una primera unión acelera la formación de una segunda unión. El procedimiento es simple y directo y tiene un amplio alcance. El método proporcionado es particularmente atractivo para la síntesis de compuestos farmacológicos candidatos, tales como constructos de péptidos restringidos conformacionalmente que consisten en múltiples segmentos de péptido en bucle. El método proporcionado es muy superior a cualquier método existente ya que puede utilizarse con péptidos totalmente desprotegidos y no requiere ningún grado de inserción selectiva de

50 grupos funcionales del soporte usado. La parte experimental describe la invención con más detalle, pero no debe ser

considerada de ningún modo como limitante de la invención. La presente invención puede, de forma adecuada, comprender, consistir en, o consistir esencialmente en los elementos descritos y puede ponerse en práctica en ausencia o presencia de un elemento no descrito.

Ejemplo 1

5 Ciclación de alto rendimiento de péptidos SH-SH con derivados del dibromobenceno (T2)

Sistema Modelo

Como sistema modelo, hemos estudiado la reacción entre un péptido lineal **Ac-CVYETVRVPGSAGGADSLYTPVATQC-NH₂** (péptido 1) y un soporte con dibromo, 1,3-bis(bromometil)benceno (m-T2) en bicarbonato amónico (20mM, pH 7,9)/acetonitrilo 3:1 (disolución tampón 1). Cuando los reactivos se mezclan en una relación 1:1 a concentraciones típicas de 0,1-1,0mM, la reacción se produce rápidamente (~20-30 minutos) a temperatura ambiente y produce exclusivamente el producto monocíclico con muy alto rendimiento (> 90%). Incluso cuando la reacción se realiza en presencia de un exceso grande (hasta 10 veces) de soporte **m-T2**, se forma únicamente el producto monocíclico junto con pequeñas cantidades de subproducto como resultado de la hidrólisis y/o la aminólisis del soporte. El exceso de soporte y los subproductos se pueden eliminar fácilmente por medio de un lavado doble con éter.

Alcance

La reacción de los péptidos SH-SH con derivados del bis(bromometil)benceno es de amplio alcance. La reacción se produce con éxito con varios soportes aromáticos que portan dos grupos halometilo tanto en posición orto-, como meta- o para- (véase la figura 4). El efecto catalítico intramolecular, como se ha descrito en la sección 2.2, es diferente para cada modo de acoplamiento porque para los para- y meta-ciclofanos generalmente está más restringido que para los orto-ciclofanos. También se proporcionan todos los otros soportes (hetero)aromáticos con dos grupos halometilo en posición orto-, meta- o para- para la síntesis de péptidos con un bucle. La reacción también se produce sin problemas con prácticamente todos los péptidos posibles que tienen dos grupos sulfhidrido de cisteína libres. La reacción es totalmente compatible con grupos funcionales no protegidos amino (**K**), amido (**QN**), arginina (**R**), ácido carboxílico (**DE**), alcohol (**ST**), tioéter (**M**), imidazol (**H**), fenilo (**F**), fenol (**Y**), indol (**W**) y grupos alifáticos (**AVILP**). El único grupo funcional que no puede estar presente en forma no protegida es el -SH de la cisteína ya que es una parte integral de la reacción de acoplamiento, pero este grupo puede estar presente en una forma protegida (StBu, Acn, Bz, etc.) sin dificultar la reacción de ciclación. Por ejemplo, la reacción del **Ac-CIEKEEC(StBu)RFAIC-NH₂** (péptido 3) con **m-T2** avanza suavemente con tal de que [péptido] ≥ 1,0mM. Para péptidos en los que los dos grupos cisteína vecinos están a una distancia de 2 aminoácidos o más (-CXC-, -CXXC-, -CXXXC-,...) la reacción avanza limpiamente y con alto rendimiento (típicamente 80% o más). Para péptidos en los que los dos grupos cisteína están a una distancia de solo 1 aminoácido (-CC-), la reacción es más sensible a reacciones laterales. Aunque el compuesto cíclico 1:1 deseado todavía se forma como producto principal, además se forman pequeñas cantidades de otros productos.

35 Familia de proteínas con nudo de Cys

Se ha usado esta estrategia para mimetizar molecularmente varias familias diferentes de proteínas. El resto estructural nudo de cisteína está presente en péptidos y proteínas de varias especies. Comprende un anillo incrustado formado por dos enlaces de disulfuro y sus segmentos troncales de conexión que está engarzado por un tercer enlace de disulfuro. Está invariablemente asociado con una estructura cercana a la de la lámina beta y parece ser que es un resto muy eficaz para la estabilización estructural.

Se usa la estrategia de síntesis para la fijación estructural de los péptidos lineales como se ha subrayado anteriormente. Se ha analizado la capacidad de estos sistemas miméticos de la FSH-beta basados en péptidos pequeños para enlazarse a varios anticuerpos monoclonales diferentes específicos para la FSH-beta. Los resultados de los estudios de enlace detallados se describen en la Tabla 1, indicando que el péptido en bucle sobre un soporte se enlaza fuertemente a los anticuerpos anti-FSH-β, mientras que los péptidos lineales y con bucle S-S correspondientes no lo hacen.

Tabla 1. Propiedades de enlace de péptidos en bucle miméticos de la FSH-β

			mAb 2K _d [μM]
1	c-T2-[Ac-CRVPGAAHHADSLCNH ₂] "bucle S-T2-S"	FSH-β 62-73	2,5
2	c-[Ac-CRVPGAAHHADSLC-NH ₂] "bucle SS"	FSH-β 62-73	135
3	Ac-CRVPGAAHHADSLC-NH ₂ "péptido lineal"	FSH-β 62-73	> 1000

Ejemplo 2**Reacción de los péptidos SH-SH con 1,3,5-tris(bromometil)mesitileno (T3)**

Cuando el péptido 1, **Ac-CVYETVRVPGSAGGADSLYTPVATQC-NH₂**, se hace reaccionar con el soporte con tribromo 1,3,5-tris(bromometil)mesitileno (**T3**), la formación del péptido en bucle, en el que los grupos -SH libres han reaccionado con dos de los tres grupos bromometilo para formar un enlace tioéter, se realiza con un rendimiento muy alto (> 90%). La reacción de acoplamiento es extremadamente rápida y esencialmente avanza hasta la finalización en menos de 10 minutos a una concentración 0,1-1,0mM en disolución tampón 1. El grupo reactivo bromometilo restante está muy activado en comparación con los grupos funcionales bromometilo en el soporte no modificado, ya que la aminólisis total (o hidrólisis en las disoluciones de fosfato tamponado) del grupo bromometilo restante se completa en pocas horas. Esto ilustra de nuevo el efecto activante de los grupos alquiltiométilo sobre las funciones halometilo en posición meta-.

Alcance

La reacción de los péptidos SH-SH con los derivados de tris(bromometil)benceno tiene un alcance amplio. La reacción se produce con éxito con varios soportes aromáticos con grupos funcionales simétricos y que portan tres grupos halometilo tanto en posición orto-, como meta- o para- (véase la figura 4). También se proporcionan todos los otros soportes (hetero)aromáticos con tres grupos halometilo en posición orto-, meta- o para- para la síntesis de péptidos con un bucle. La reacción también se realizó con el péptido **Ac-CRGDLQC-NH₂** (**péptido 2**) y 1,4-ditiotreitól, dando también altos rendimientos del compuesto sin formación significativa de subproductos (poliméricos). La reacción también se produce sin problemas con prácticamente todos los péptidos posibles que tienen dos grupos sulfhidrilo de cisteína libres. La reacción es totalmente compatible con grupos funcionales no protegidos amido (**QN**), arginina (**R**), ácido carboxílico (**DE**), alcohol (**ST**), tioéter (**M**), imidazol (**H**), fenilo (**F**), fenol (**Y**), indol (**W**) y grupos alifáticos (**AVILP**), pero los grupos amino (**K**) reaccionan rápidamente con el tercer grupo bromo (véase también el ejemplo 4). El otro grupo funcional que no puede estar presente en forma no protegida es el -SH de la cisteína ya que es una parte integral de la reacción de acoplamiento, pero este grupo puede estar presente en una forma protegida (StBu, Acm, Bz, etc.) sin dificultar la reacción de ciclación. Por ejemplo, la reacción del **Ac-CIEKEEC(StBu)RFAIC-NH₂** (**péptido 3**) con el **T3** avanza suavemente con tal de que [péptido] ≥ 1,0mM.

Para péptidos en los que los dos grupos cisteína vecinos están a una distancia de 2 aminoácidos o más (-CXC-, -CXXC-, -CXXXC-,...) la reacción avanza limpiamente y con alto rendimiento (típicamente 80% o más). Para péptidos en los que los dos grupos cisteína están a una distancia de solo 1 aminoácido (-CC-), la reacción es más sensible a reacciones laterales. Aunque el compuesto cíclico 1:1 deseado todavía se forma como producto principal, además se forman pequeñas cantidades de otros productos.

Barrido de la matriz con péptidos cíclicos inmovilizados sobre superficies con grupos funcionales SH- o NH₂-

La reacción de los péptidos con dos grupos funcionales -SH con soportes con tribromo ofrece una excelente posibilidad para inmovilizar los péptidos ciclados sobre una superficie activada en una forma estructuralmente bien definida. Por lo tanto, el soporte con tribromo **T3** se mezcló en una relación 1:1 con una serie de péptidos con dos -SH en una disolución tampón 1 y después de 10 minutos la disolución se transfirió a varias superficies activadas por SH- o NH₂-. Después de la ciclación del péptido sobre el soporte, la función bromometilo restante reacciona con las funciones SH- o NH₂- sobre la superficie, conectando de esta forma los bucles del péptido a la superficie de forma covalente. El método se usó para conectar los bucles cortos que representan las regiones que determinan la complementariedad (abreviadas generalmente como CDR por sus iniciales en inglés: complementarity determining regions) a los anticuerpos antilisozima D 1.4, D 44.1, HyHEL-5 y HyHEL-10. Los bucles de péptido se extendieron en manchas sobre la superficie activada, bien individualmente o bien en varias combinaciones. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y muestran claramente que el enlace a la lisozima mediante (múltiples) bucles peptídicos (CDRs). En la presente memoria se proporciona un método para la síntesis de un compuesto que comprende (múltiples) bucles peptídicos y la unión superficial de dicho compuesto a una superficie activada por SH- o NH₂-.

Tabla 2. Barrido de bucle de CDRs únicos de α-lisozima Mab con varios péptidos SH-SH en la matriz

Péptido A	Péptido B	mAB	Enlace a la lisozima a 100 µg/mL
CDR-H2 (AA ₅₀ -AA ₅₇)	-	D1.3, H2	-
CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)	-	D1.3, H3	-
CDR-H2 (AA ₅₀ -AA ₅₇)	CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)	D1.3, H2 + H3	++
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	-	D44.1, H2	++
CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)	-	D44.1, H3	++
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)	D44.1, H2 + H3	+++
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	-	HyHEL-5, H2	+

CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)		HyHEL-5,H3	-
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₅)	HyHEL-5,H2 + H3	-
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	-	HyHEL-10,H2	-
CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₂)	-	HyHEL-10,H3	+
CDR-H2 (AA ₄₉ -AA ₅₉)	CDR-H3 (AA ₉₇ -AA ₁₀₂)	HyHEL-10,H2 + H3	-

Ejemplo 3

Reacción de los péptidos SH-SH con 1,2,4,5-tetra(bromometil)benceno (tetrabromodureno, T4)

Reacciones modelo

5 La reacción de los **péptidos 1 y 2** con un exceso de soporte con tetrabromo 1,2,4,5-tetra(bromometil)benceno (**T4**) en una relación 1:10 lleva a la formación de los constructos de péptido en bucle **péptido 1-T4** y **péptido 2-T4** (véase la figura 7). Los productos se forman en 3 formas isoméricas diferentes (orto-, meta- y para-), formándose los productos orto- y meta- en > 90% y el para- en < 10%. El exceso de **T4** se eliminó fácilmente por extracción doble con dietil éter. La reacción subsiguiente de los productos 1:1 con un segundo equivalente del péptido con dos -SH **1** y/o **2** da en ambos casos los productos 2:1 simétricos correspondientes con rendimientos bastante buenos (rendimiento de 50-80%).

10 En ambos de los casos descritos anteriormente, el producto 2:1 está formado probablemente por una mezcla de dos o más diastereoisómeros. Con el fin de resolver este problema, se proporciona una reacción de acoplamiento con bis(3,5-bis(halometil)fenil)metano mostrada en la figura 8, por la que todos los productos que corresponden a diferentes modos de acoplamiento con el péptido pueden ser interconvertidos sencillamente mediante rotaciones conformacionales en la molécula de soporte. Se proporciona un método para la síntesis de un compuesto que comprende un constructo peptídico de doble bucle usando un molécula de soporte como se muestra en la figura 8.

Familia de proteínas con nudo de cisteína

20 Esta estrategia se ha usada para mimetizar molecularmente varias familias de proteína. El resto estructural nudo de cisteína está presente en péptidos y proteínas de varias especies. Comprende un anillo incrustado formado por dos enlaces de disulfuro y sus segmentos troncales de conexión que está engarzado por un tercer enlace de disulfuro. Está invariablemente asociado con una estructura cercana a la de la lámina beta y parece ser que es un resto muy eficaz para la estabilización estructural.

1.- Gonadotropina coriónica humana (hCG) y hormona luteinizante (LH)

25 La gonadotropina coriónica humana (hCG) es sintetizada por la placenta a lo largo del embarazo y pertenece a la familia de hormonas de la glicoproteína que también incluye la hormona luteinizante (LH) derivada de la pituitaria, hormona estimulante del foliculo (FSH) y hormona estimulante del tiroides (TSH). Estos compuestos consisten en dos subunidades no idénticas y no enlazadas covalentemente, denominadas alfa y beta. Las subunidades alfa de las cuatro hormonas tienen una secuencia de aminoácidos casi idénticas y, por lo tanto, hasta ahora han sido indistinguibles inmunológicamente. Las subunidades beta, que llevan los determinantes biológicamente activos, se consideran específicas de cada hormona. Sin embargo la LH y la CG reconocerán el mismo receptor en las células diana, proporcionando una excepción a esta regla. Sus subunidades beta son idénticas en un gran número de moléculas, difiriendo la CG-beta en un péptido C-terminal (CTP) de 30 aminoácidos.

35 Para la inhibición de la interacción específica con la hCG y su receptor se necesitan compuestos que mimeticen estructuralmente la hormona. Los estudios cristalográficos por rayos X muestran que el enlace del anticuerpo monoclonal (Mab) 3468 a la CG-beta se produce a través de un sitio de enlace discontinuo en la CG-beta. Por lo tanto, es probable que el enlace de la CG-beta al receptor también implique un enlace discontinuo en la hormona. Se proporciona el diseño y la síntesis de miméticos de la CG-beta basados en péptidos pequeños que se enlazan fuertemente al anticuerpo monoclonal 3468. Se usa la estrategia de síntesis para la fijación estructural de péptidos lineales como se ha indicado anteriormente. Los resultados de los estudios de enlace detallados se describen en la

40 Tabla 3. Los miméticos de la CG-beta se usan ventajosamente para la producción de antisueros que reaccionan específicamente con la hCG.

Tabla 3. Constructo de péptido de doble bucle (usando **T4**) que mimetiza las propiedades de enlace de la CG-beta

	Péptido A	Péptido B	Secuencia	mAb 3468 K _d [μM]
1	Ac-FESCRLPGAPRGVNPVCSYA-NH ₂	Ac-CEREGAPVAC-NH ₂	CG-β 58-77, 19-26	15
2	Ac-FESCRLPGAPRGVNPVCSYA-NH ₂		CG-β	73

			58-77	
3	-	Ac-CEKEGAPVAC- NH ₂	CG-β 19-E6	> 1000

2.- Hormona estimulante del folículo

Para la inhibición de la interacción específica con la FSH-beta y su receptor es necesaria mimetizar estructuralmente la hormona. Aunque no hay una estructura cristalográfica que describa la interacción de la FSH-beta con su receptor, es muy probable que este sitio de enlace tenga naturaleza discontinua. Se han diseñado y sintetizado varios constructos de péptido de doble bucle sobre un soporte con tetrabromo (**T4**) que se podrían usar para mimetizar la FSH beta. Se usó la estrategia sintética para la fijación estructural de péptidos lineales como se ha indicado anteriormente. Se ha analizado la capacidad de estos miméticos de la FSH-beta basados en péptidos pequeños para enlazarse a varios anticuerpos monoclonales diferentes específicos para la FSH-beta. Los resultados de los estudios de enlace detallados se recogen en la Tabla 4, indicando que todos los miméticos fueron compañeros de enlace fuertes de los anticuerpos conocidos. Además, los miméticos de la FSH-beta se pueden usar con éxito para la producción de antisueros que reaccionan específicamente con la FSH-beta.

Tabla 4. Constructo de péptido de doble bucle (usando **T4**) que mimetiza las propiedades de enlace de la FSH-β

	Péptido A	Péptido B	Secuencia	mAb1 K _d [μM]
1	Ac-YETCRVPGAHHADSLCTYP-NH ₂	Ac-CEKEEARFAC- NH ₂	FSH-β 58-77, 19-26	0,27
2	Ac-YETCRVPGAAMHADSLC7YP-NH ₂		FSH-β 58-77	21
3	-	Ac-CEKEEARFAC- NH ₂	FSH-β 19-26	> 1000

3.- Miméticos de la citosina (TNF-α)

Actualmente se acepta ampliamente que las citocinas tales como el TNF tienen funciones muy importantes en patofisiología, siendo factores que interfieren fuertemente con el crecimiento, diferenciación y muerte bien de los tipos de células inmunes o bien de los no inmunes. Dirigiendo sus dos receptores transmembranales para liberar señales de proliferación celular, diferenciación o apoptosis, el TNF parece no solo orquestar respuestas agudas a la infección y el daño inmunológico, sino también actuar como un factor de equilibrio para el restablecimiento de la homeostasis fisiológica y la regulación inmune.

La observación en el laboratorio de que el TNF-α está en la cúspide de la cascada pro-inflamatoria de los cultivos sinoviales de artritis reumatoide combinada con los estudios en modelos animales que soportan un papel del TNF-α en el desarrollo y la progresión de la artritis establecieron el TNF-α como una diana para la intervención terapéutica. Los ensayos clínicos del bloqueo del TNF-α se iniciaron en 1992 e implicaron el uso de infliximab (Remicade®), un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1 Fv-humano de elevada capacidad de neutralización del TNF-α, producido por Centocor Inc. Los resultados fueron muy esperanzadores con un alivio rápido del dolor, anquilosamiento y cansancio matinal y reducción de la sensibilidad e inflamación de las articulaciones en una o dos semanas. Se proporcionan varios constructos de péptido de doble bucle sobre un soporte con tetrabromo que se podrían usar como antagonistas del TNF-alfa. Para la síntesis se puede usar la misma estrategia sintética que para la fijación estructural de los péptidos lineales como se ha indicado anteriormente.

4.- Factor de Von Willebrandt (VWF)

El factor de Von Willebrandt (VWF) es una glicoproteína plasmática multimérica que es necesaria para la formación normal del tapón plaquetario hemostático. La proteína plasmática madura está compuesta de subunidades aparentemente iguales (Mr = 260.000) que se unen por enlaces de disulfuro. La molécula de VWF circulante varía en tamaño de dímeros a multímeros extremadamente grandes. Durante la hemostasis normal, los multímeros grandes de VWF son los responsables de facilitar la formación del tapón plaquetario mediante la formación de un puente entre la glicoproteína IB de las plaquetas y el colágeno expuesto en el subendotelio. Tanto la falta de proteína VWF como la presencia de anomalías que producen una disminución de la polimerización pueden producir una pérdida de actividad biológica que es característica de la enfermedad de Willebrand.

Los miméticos del VWF basados en péptidos pequeños se concibieron y se diseñaron según el método proporcionado usando la fijación estructural de péptidos lineales como se ha señalado anteriormente sobre un soporte con tetrabromo. Se prevé que estos miméticos de VWF se enlacen fuertemente a varios anticuerpos monoclonales específicos para el VWF diferentes. De manera importante, los nuevos miméticos del VWF se pueden usar para la selección de antisueros para la identificación de nuevos anticuerpos que reaccionan específicamente con el VWF.

Ejemplo 4**Reacción de péptidos con tres –SH con el 1,3,5-(bromometil)benceno (tribromomesitileno, T3)**Reacciones modelo

5 Las reacciones del péptido lineal con tres grupos funcionales –SH, Ac-CMSCDIFTNSRGKRC-NH₂ (**péptido 4**) con 1,0 equivalentes del soporte con tribromo 1,3,5-tris(bromometil)benceno, **T3**, el constructo correspondiente péptido de doble bucle-soporte, en el que cada función –SH ha reaccionado con una función bromometilo. Como resultado de la activación de la función bromometilo restante por formación del primer enlace de tioéter, la formación del producto 1:1 es casi exclusiva, formándose < 10% de otros productos. También en este caso la reacción puede transcurrir con un exceso de soporte sin formación de constructos de péptido di- y tri-alquilados.

10 Alcance

La reacción 1:1 de los péptidos con tres grupos –SH y los derivados del tris(bromometil)benceno tiene un alcance muy amplio. Para péptidos en los que los dos grupos cisteína vecinos a una distancia de 2 aminoácidos o más (por ejemplo Ac-AHHPDTIVTCPEATQCHCGK-NH₂, **péptido 5**) la reacción se produce limpiamente y con un rendimiento elevado (generalmente de 80% o más). Para péptidos en los que dos de los tres grupos cisteína están a una distancia de solo 1 aminoácido (Ac-GAPIYQCMGCCFSRAYPTPA-NH₂, **péptido 6**) todavía se forma el producto 1:1 como producto mayoritario, aunque en este caso también se encontraron pequeñas cantidades de otros productos.

20 La estrategia de acoplamiento descrita es totalmente compatible con los grupos funcionales no protegidos amino (**K**), amido (**QN**), arginina (**R**), ácido carboxílico (**DE**), alcohol (**ST**), tioéter (**M**), imidazol (**H**), fenilo (**F**), fenol (**Y**), indol (**W**) y grupos alifáticos (**AVILP**). El único grupo funcional que no puede estar presente en forma no protegida es el –SH de la cisteína ya que es una parte integral de la reacción de acoplamiento.

25 En otro modo de realización de la invención, el método comprende la reacción de péptidos con dos –SH con una lisina (**K**) libre en la cadena peptídica. Aunque la cadena lateral de la lisina sola no es suficientemente reactiva para reaccionar con los soportes activados por el halometilo (es decir, de forma intermolecular), la reacción intramolecular entre el grupo amino de la cadena lateral de lisina en un péptido con dos grupos funcionales –SH y el tercer grupo bromometilo de un soporte con tres bromos se produce suavemente y da un producto en el que dos grupos bromometilo han reaccionado con los dos grupos –SH, mientras que el tercer grupo bromometilo está unido a la cadena de lisina. Este tipo de reacción intramolecular se puede usar para preparar un nuevo grupo completo de constructos de péptido con dos bucles.

Ejemplo 530 **Reacción de péptidos con cuatro grupos –SH con 1,2,4,5-tetra(bromometil)benceno (tetrabromodureno, T4)**Reacciones modelo

35 El péptido **pEPLPDCCRQKTCSCCKDRKYELL-OH** (**péptido 7**) con 1 equivalente del soporte con tetrabromo 1,2,4,5-tetrakis(bromometil)benceno (**T4**) da el correspondiente constructo de constructo-péptido con tres bucles en el que cada función SH- ha reaccionado una vez con una función bromometilo con buen rendimiento. El producto se forma como una mezcla de al menos dos diastereoisómeros diferentes.

Alcance

40 La reacción 1:1 de los péptidos con cuatro grupos –SH y los derivados de tetrakis(bromometil)benceno tiene un alcance muy amplio. La reacción con un soporte conformacionalmente flexible (véase la figura 8), en el que diferentes diastereoisómeros pueden interconvertirse mediante rotación alrededor de un enlace C-C conectando los dos anillo aromáticos, da limpiamente el producto deseado como un único isómero. Los problemas observados con los péptidos con grupos funcionales –SH en los que dos restos cisteína vecinos están separados solo por 1 aminoácido, no se observaron para los derivados de tetrabromobenceno en los que dos de los cuatro grupos bromometilo están en disposición orto-. Para los otros soportes con tetrabromo se hicieron las mismas observaciones que para los soportes con tribromo. La estrategia de acoplamiento descrita es totalmente compatible con los grupos funcionales amino (**K**), amido (**QN**), arginina (**R**), ácido carboxílico (**DE**), alcohol (**ST**), tioéter (**M**), imidazol (**H**), fenilo (**F**), fenol (**Y**), indol (**W**) y grupos alifáticos (**AVILP**). El único grupo funcional que no puede estar presente en forma no protegida es el –SH de la cisteína ya que es una parte integral de la reacción de acoplamiento. Sin embargo, se pueden incorporar cisteínas libres usando el grupo protector eliminable Cys(StBu) que se puede eliminar fácilmente por tratamiento reductor, por ejemplo con 1,4-DDT o etano ditiol.

50

Ejemplo 6**Combinación de enfoques de los ejemplos anteriores**Diseño y síntesis de los sitios de enlace

5 Se proporciona la síntesis en fase disolución de péptidos con múltiples bucles mediante la combinación de enfoques sintéticos como los descritos en los ejemplos anteriores (véase la figura 11), usando el grupo protector Cys(StBu) para enmascarar temporalmente parte de los grupos –SH reactivos. Los constructos de péptido obtenidos de esta forma contienen tres o cuatro bucles peptídicos ensamblados sobre una plataforma sintética. Los constructos mimetizan las propiedades de enlace de los anticuerpos naturales, como se pone de manifiesto usando análisis del tipo ELISA.

10 Las reacciones de los péptidos con dos y tres grupos –SH con soportes con tetra- (**T4**) y tri-bromo (**T3**) se pueden combinar fácilmente para la construcción de arquitecturas moleculares complejas que consisten en múltiples bucles de CDR sobre un soporte sintético (cuerpos de enlace de 3^a generación). Por ejemplo, la reacción del péptido lineal con tres grupos funcionales –SH **Ac-C(StBu)CAA₅₀-AA₅₈CAA₈₉-AA₉₇CC(StBu)-NH₂** (CDR-H2/L3, a-lisozima Mab D1.3, **péptido 10**) en acetonitrilo(NH₄HCO₃ 20mM (pH = 7,8) 1:1 (concentración 0,2mM) con 2,5 equivalentes de 1,3,5-bis(bromometil)mesitileno a temperatura ambiente puede dar el correspondiente constructo de péptido 10 con doble bucle-T3 en 30-60 minutos, en el que cada grupo funcional –SH no protegido ha reaccionado una vez con una función bromometilo (véase la figura 11A). De forma similar, el péptido lineal **Ac-C(StBu)CAA₉₈-AA₁₀₈CAA₄₉-AA₅₃CC(StBu)-NH₂** (CDR-L2/H3, a-lisozima Mab D1.3, **péptido 11**) reaccionó con 2,5 equivalentes de 1,3,5-bis(bromometil)mesitileno a temperatura ambiente en acetonitrilo(NH₄HCO₃ 20mM (pH = 7,8) 1:1 (concentración 0,2mM) puede dar el correspondiente constructo de péptido 11 con doble bucle-T3 (véase la figura 11A). El exceso de soporte se eliminó por extracción con dietil éter (2x). Ambos constructos se hicieron reaccionar subsiguientemente con 100 equivalentes de 1,4-DTT en acetonitrilo/NH₄HCO₃ 20mM (pH = 7,8) 1:1 (concentración 1,0mM) durante 24 horas con el fin de eliminar los grupos protectores StBu de los restos Cys terminales. Después de liofilizar las mezclas de reacción, el exceso de DTT se eliminó disolviendo los restos en TFA y precipitando los constructos de péptido con dietil éter, con lo que el DTT permanece en disolución. Finalmente, la reacción del constructo de péptido 10-T3 en forma desprotegida en acetonitrilo/NH₄HCO₃ 20mM (pH = 7,8) 1:1 (concentración 0,1mM) con 10 equivalentes de 1,2,4,5-tetra(bromometil)benceno a temperatura ambiente puede dar el correspondiente constructo del péptido 10 con doble bucle-T3 en 30-60 minutos, en el que dos de los cuatro grupos bromometilo han reaccionado con los restos Cys terminales del constructo péptido-soporte original. Después de lavar de nuevo la disolución con dietil éter (2x) para eliminar el exceso de soporte, el segundo constructo de péptido 11-T3 se añadió en cantidad equimolar (1:1) y la reacción con el constructo de péptido 10-T3-T4 (que contiene dos grupos bromometil restantes) puede dar finalmente el constructo péptido 10-T3-T4-T3-péptido 11 (véase la figura 11C). El constructo se purifica preferiblemente por HPLC preparativa y se puede usar a continuación como mimético de anti-lisozima mAb D1.3.

Ejemplo 7**Síntesis en fase sólida de péptidos en bucle y rastreo de sus propiedades de enlace en un *Loopscan***

La formación de bucles peptídicos mediante la reacción de un péptido lineal que contiene dos grupos sulfhidrilo libres con un soporte de 1,3-bis(bromometil)benceno también se realizó sobre una superficie de polipropileno injertada con ácido poliacrílico (disolución al 6% que contenía CuSO₄, irradiación usando radiación γ con una dosis de 12 kGy) y en la que se han insertado grupos funcionales amino mediante acoplamiento con t-butoxicarbonil-hexametilendiamina (Boc-HMDA) usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) con N-hidroxibenzotriazol (HOBT) y subsiguiente desprotección de los grupos Boc usando ácido trifluoroacético (TFA). Se usó química peptídica con Fmoc convencional para sintetizar una serie de péptidos lineales solapantes de péptidos de 14 aminoácidos de largo, que correspondían al bucle β 3 de la FSH, en micropocillos de 3 μ L cada usando el formato de minitarjeta desarrollado previamente. Cada péptido se sintetizó con un resto Cys en posición 1, seguido por las secuencias superpuestas del bucle β 3 de la FSH (2-13, 3-14, 4-15, etc.) seguido por otro resto Cys en la posición final. Subsiguientemente, se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral por tratamiento usando TFA con moléculas limpiadoras (*scavengers*). A continuación, se trataron las minitarjetas durante 30-60 minutos con una disolución 0,5mM de 1,3-dibromoxileno en NH₄HCO₃ 20mM (pH 7,8) que contenía 50% de acetonitrilo, produciéndose el hecho de que los péptidos se ciclaron (al menos parcialmente) mediante la reacción con el soporte con dibromo. Después de esto, las minitarjetas se sometieron a ultrasonidos durante 30 minutos a 70°C en PBS-13 (pH 7,2) que contenía SDS al 1%/BME al 1%, seguido por 45 minutos en agua.

Las propiedades de enlace de los péptidos ciclados se analizaron mediante un análisis de ELISA en sándwich con anti-FSH- β mAb 2. Se había demostrado previamente que este anticuerpo no se enlaza en ningún grado sobre una superficie polimérica con grupos funcionales con péptidos 12-meros lineales, incluyo a un concentración de 10 μ g/mL. Sin embargo, como muestra el resultado en la figura 12, los péptidos 12-meros ciclados se enlazan fuertemente al mAb 2, incluso a concentraciones tan bajas como 1 mg/mL (DO = 2500-1500). Sin embargo, la

selectividad del enlace al anticuerpo se expresa bien por el hecho de que el anticuerpo solo se enlaza fuertemente a un péptido (68-79).

Ejemplo 8

5 Selección de una biblioteca de péptidos en bucle e identificación del péptido en bucle con óptimas propiedades en el denominado “barrido de optimización de bucle”

La síntesis de los péptidos en bucle en el barrido de optimización de bucle se realizó según el procedimiento descrito en el ejemplo 7. Después de haber identificado, en una etapa inicial, el epítipo de la región de enlace de una proteína, esta región particular puede volverse a sintetizar en varios formatos de bucle diferentes, por ejemplo usando diferentes tamaños de bucle (por ejemplo, CXXXXC, CXXXXXXC, CXXXXXXXXC, etc.) y formatos de bucle (CXXXXC, XCXXXXC, XCXXXCX, XXCXXC, XXCXCX, XXCCXX, etc.) (véase la figura 14A). Subsiguientemente, la biblioteca completa de péptidos en bucle sintetizada de esta forma, se rastreó el enlace con un anticuerpo monoclonal, en este caso anti-FSH mAb 2, cuyo resultado se muestra en la figura 14B. Obviamente, los péptidos en bucle usados en la presente memoria, representan solo un subgrupo del conjunto total de posibles estructuras en bucle. Los datos de enlace muestran claramente que la molécula de enlace identificada en el *Loopscan* de 12-meros (véase el ejemplo 7) no está optimizada en absoluto y que, aumentando el tamaño de bucle y variando la posición de las cisteínas de enlace, la fuerza del enlace puede ser considerablemente aumentada.

Ejemplo 9

20 Síntesis en fase sólida de péptidos con doble bucle y rastreo de sus propiedades de enlace mediante “barrido de doble bucle”.

En otra variación del *Loopscan* (descrito en el ejemplo 7), se sintetiza una biblioteca de constructos de péptidos de doble bucle sobre un soporte sólido. Esta biblioteca puede rastrearse, por ejemplo, para estudiar el enlace con un anticuerpo. La síntesis de los constructos de péptido de doble bucle comienza generalmente con la síntesis de péptidos lineales que contienen dos unidades de cisteína como se describe en el ejemplo 7. En esta etapa los péptidos están totalmente desprotegidos (por ejemplo usando TFA/moléculas limpiadoras y se hacen reaccionar con un constructo de péptido-soporte 4 según el método descrito en el ejemplo 3. Los dos grupos sulfhidrilo libres del péptido sobre la fase sólida se hacen reaccionar entonces con los dos grupos bromometilo sin reaccionar en el constructo péptido-soporte 4, entonces se inmoviliza el segundo bucle peptídico sobre el soporte sólido. De esta forma, se puede obtener una biblioteca de constructos de péptidos de doble bucle, poseyendo todos ellos un bucle variable directamente unido a un soporte sólido, combinado con un bucle peptídico constante que está unido al primer bucle mediante el **soporte 4** (véase la figura 15A).

Se usó el barrido de doble bucle para identificar las partes adicionales del epítipo discontinuo de la FSH- β que participaban en el enlace con el mAb 2. Para este anticuerpo particular los constructos de doble bucle, que consisten en el péptido del bucle β 3 constante “**CRVPGAHHADSLC**” y los bucles variables que cubren el bucle β 1 del FSH- β (AA11-AA22), se enlaza de forma significativamente más fuerte con el anticuerpo que cualquiera de los dos bucles peptídicos solos lo que sugiere fuertemente que el bucle β 1 del FSH- β es parte del sitio de enlace del mAb 2 (figura 15B).

Ejemplo 10

40 Síntesis en fase sólida de los constructos de péptido lineal-en bucle y rastreo de las propiedades de enlace en un barrido “Bucle-Lineal”

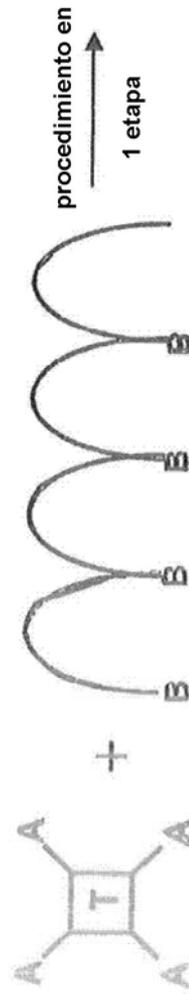
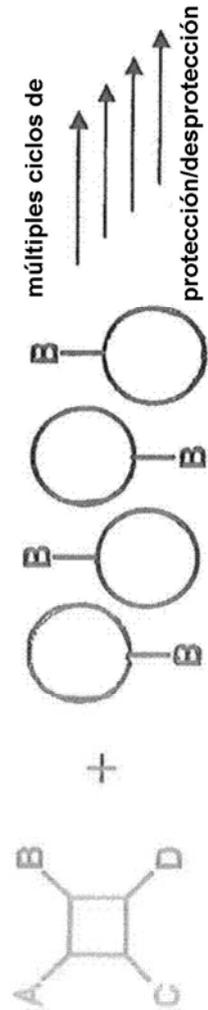
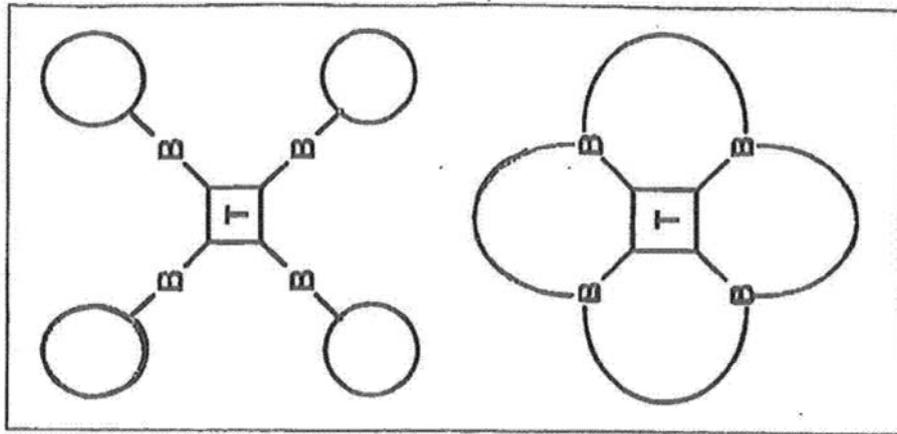
En todavía otra variación del *Loopscan* (ejemplo 7) se sintetiza una biblioteca de péptidos en bucle con péptidos lineales sobre un soporte sólido y se rastreó su enlace con un anticuerpo. La síntesis de los constructos de péptido lineal y con bucle generalmente se inicia con la síntesis de los péptidos lineales que contienen una unidad de cisteína como se ha descrito en el ejemplo 7. En esta etapa, los péptidos están totalmente desprotegidos (usando TFA/moléculas limpiadoras y se hacen reaccionar con un constructo de péptido-soporte 3 sintetizado según el método descrito en el ejemplo 2. Los grupos sulfhidrilo libres del péptido en fase sólida reaccionan entonces con un grupo bromometilo sin reaccionar en el constructo de péptido-soporte 3, inmovilizando de esta forma el bucle peptídico constante sobre el soporte sólido. De esta manera, se puede obtener una biblioteca de constructos de péptido lineal-en bucle, en la que todos poseen un péptido lineal variable que está unido directamente a un soporte sólido combinado con un bucle peptídico constante que está unido al péptido lineal mediante el soporte 3 (véase la figura 16).

También se usó el barrido de doble bucle para identificar las partes adicionales del epítipo discontinuo de la FSH- β que participan en el enlace con el mAb 2. Para este anticuerpo particular se demostró que los constructos en bucle-lineal, que consisten en el péptido en bucle β 3 constante “**YETCRVPGAHHADSLCTYP**” en combinación con el péptido lineal que lleva la carga neta positiva (+1 o superior) se enlaza de forma significativamente más fuerte con el anticuerpo que bien el bucle peptídico solo o bien el péptido lineal solo, lo que sugiere fuertemente que el bucle β 1 del FSH- β es parte del sitio de enlace del mAb 2.

REIVINDICACIONES

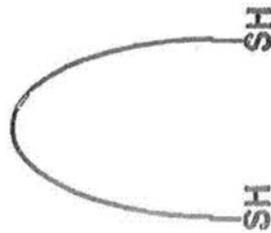
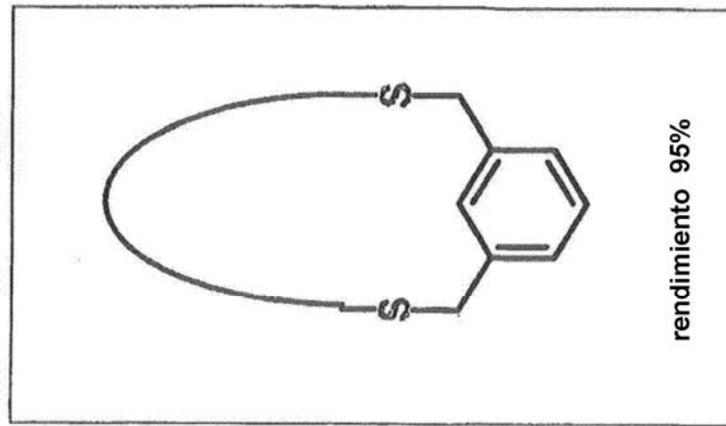
- 1.- Un método para proporcionar un compuesto que se compone de al menos una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos dos enlaces tioéter a un soporte molecular, comprendiendo dicho método proporcionar una molécula de soporte con grupos funcionales que comprende una molécula (hetero)aromática que comprende al menos dos sustituyentes halobencílicos; proporcionando al menos un péptido con dos grupos funcionales –SH capaz de reaccionar con al menos dichos dos sustituyentes halobencílicos; poniendo en contacto dicha molécula de soporte con grupos funcionales con al menos dicho péptido con dos grupos funcionales –SH para formar al menos dos enlaces entre dicho soporte y al menos dicho péptido en una reacción de acoplamiento, donde la formación de un enlace acelera la formación de un enlace consecutivo y donde dicha reacción de acoplamiento se realiza en disolución acuosa.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el péptido comprende al menos un grupo funcional elegido entre el grupo que consiste en los grupos funcionales no protegidos amino (K), amido (QN), arginina (R), ácido carboxílico (DE), alcohol (ST), tioéter (M), imidazol (H), fenilo (F), fenol (Y), indol (W) y grupos alifáticos (AVILP).
- 3.- Un método según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha molécula de soporte es un halometilareno, preferiblemente elegido entre el grupo que consiste en bis(bromometil)benceno, tris(bromometil)benceno y tetra(bromometil)benceno o uno de sus derivados.
- 4.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un enlace entre dicho soporte y al menos dicho péptido comprende un enlace tioéter.
- 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además producir una biblioteca que comprende varios compuestos que se componen al menos de una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte molecular.
- 6.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además producir una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un compuesto que se compone al menos de una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte molecular.
- 7.- Un método para elegir un compuesto farmacológico candidato que comprende:
- proporcionar una biblioteca de compuestos que se componen al menos de una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos tres enlaces de tioéter a un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática o, si dicho péptido se elige entre la familia de proteínas con nudo de cisteína, unido por medio de al menos dos enlaces tioéter; y
 - determinar el enlace de una molécula diana a dichos compuestos.
- 8.- Un método según la reivindicación 7, en el que dicho enlace se determina en una fase sólida provista de dicha librería de compuestos.
- 9.- Un compuesto que se compone de al menos una estructura de péptido en bucle unida mediante al menos tres enlaces de tioéter a un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática.
- 10.- Un compuesto que se compone de al menos una estructura de péptido en bucle unido mediante al menos dos enlaces de tioéter a un soporte que comprende una molécula (hetero)aromática, en el que dicho péptido se elige entre la familia de proteínas con nudo de cisteína.

FIGURA 1



Hanuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D.,
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997, 36, 2680-2683.

FIGURA 2



+

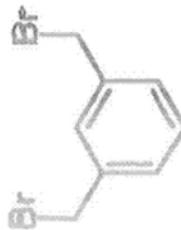
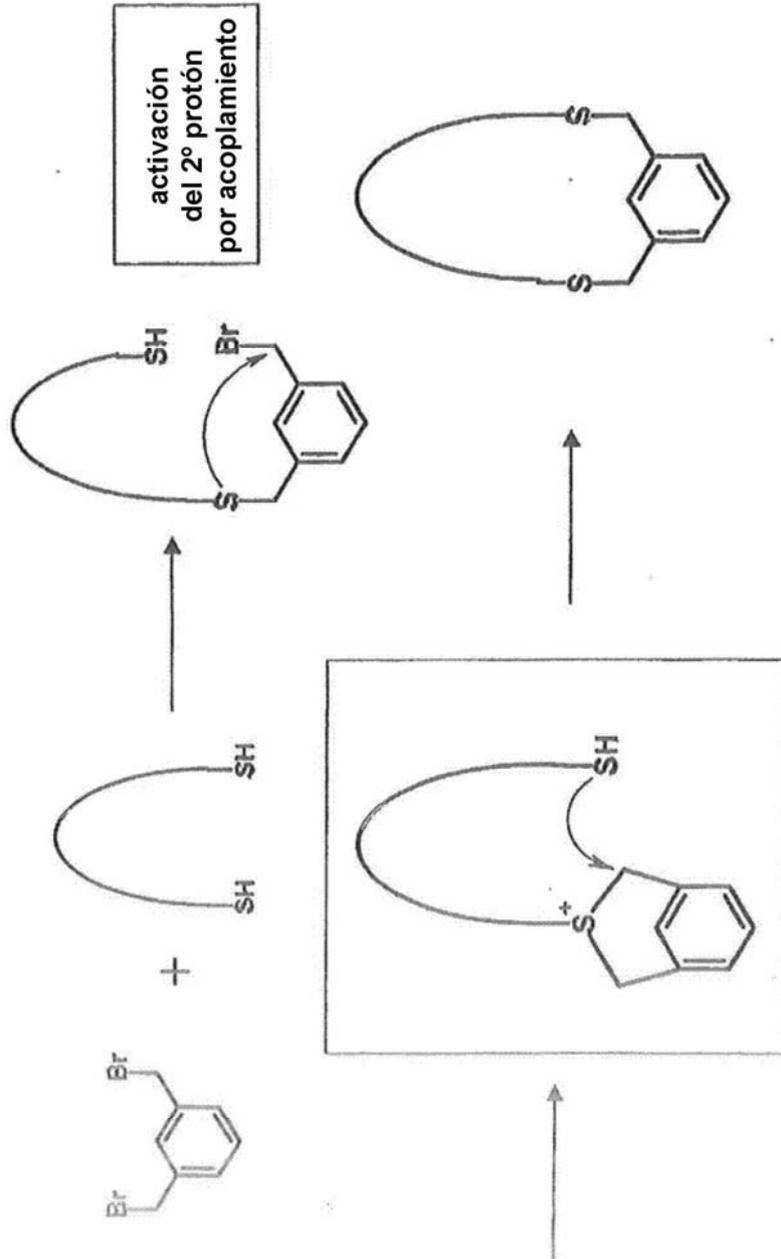
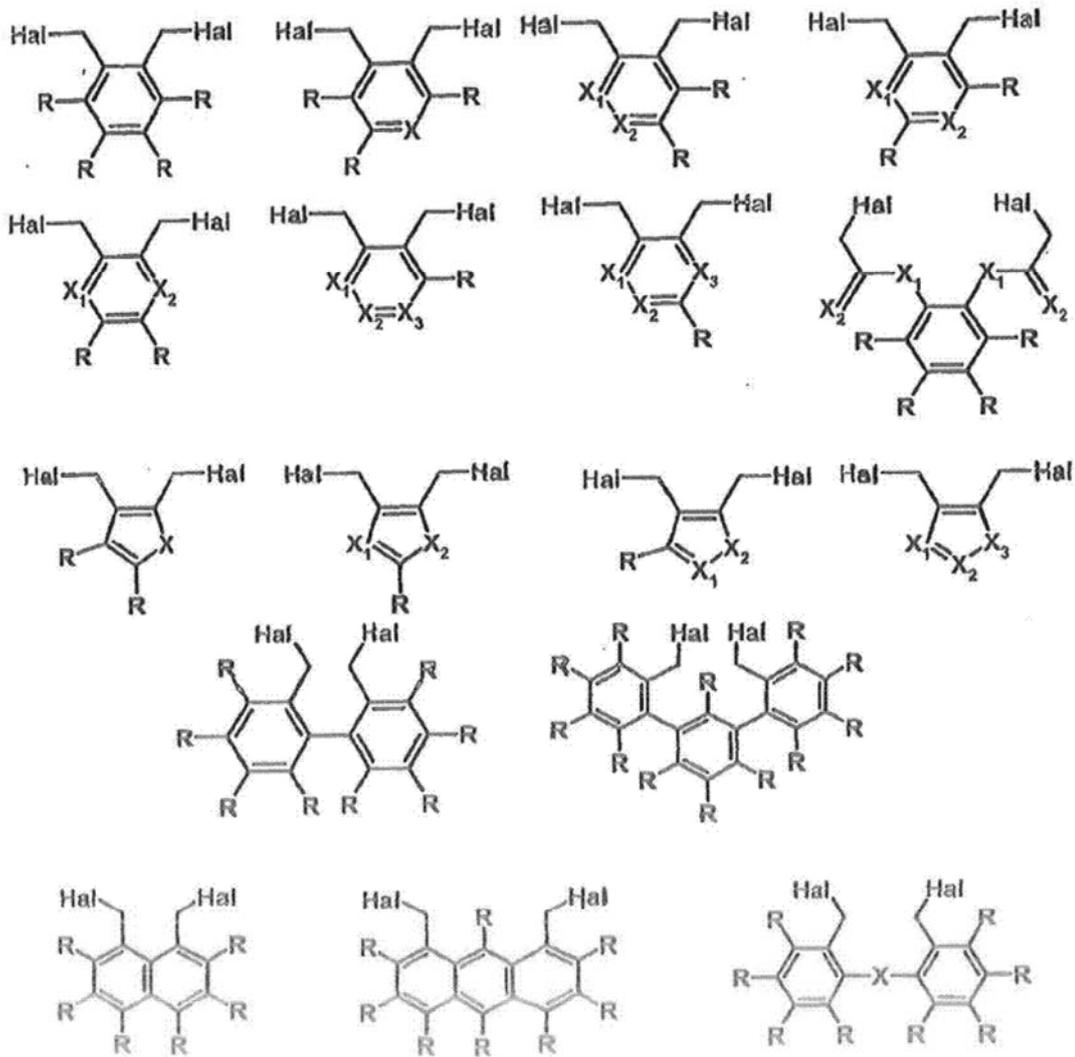


FIGURA 3



Heinrich, G.; Lynch, V.M.; Anslyn, E.V., *Chem. Commun.* 2001, 2436-2437.

FIGURA 4



$X_{1,2,3} = N(H), O, S$

también todos los demás derivados orto-, meta- y para- de los compuestos descritos

FIGURA 5

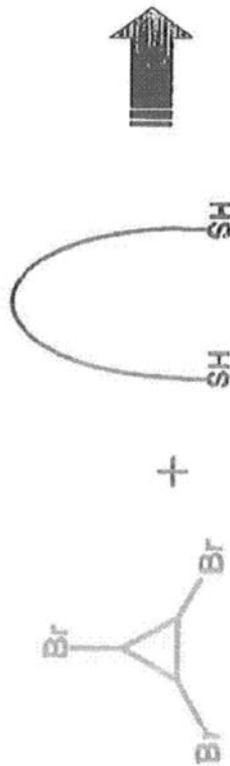
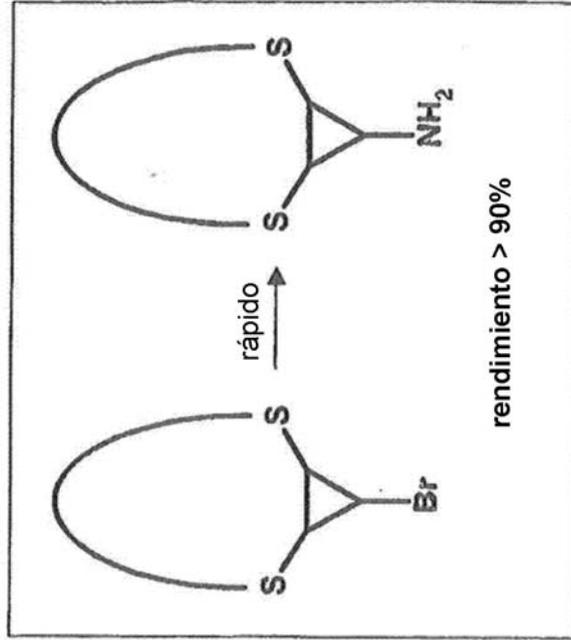
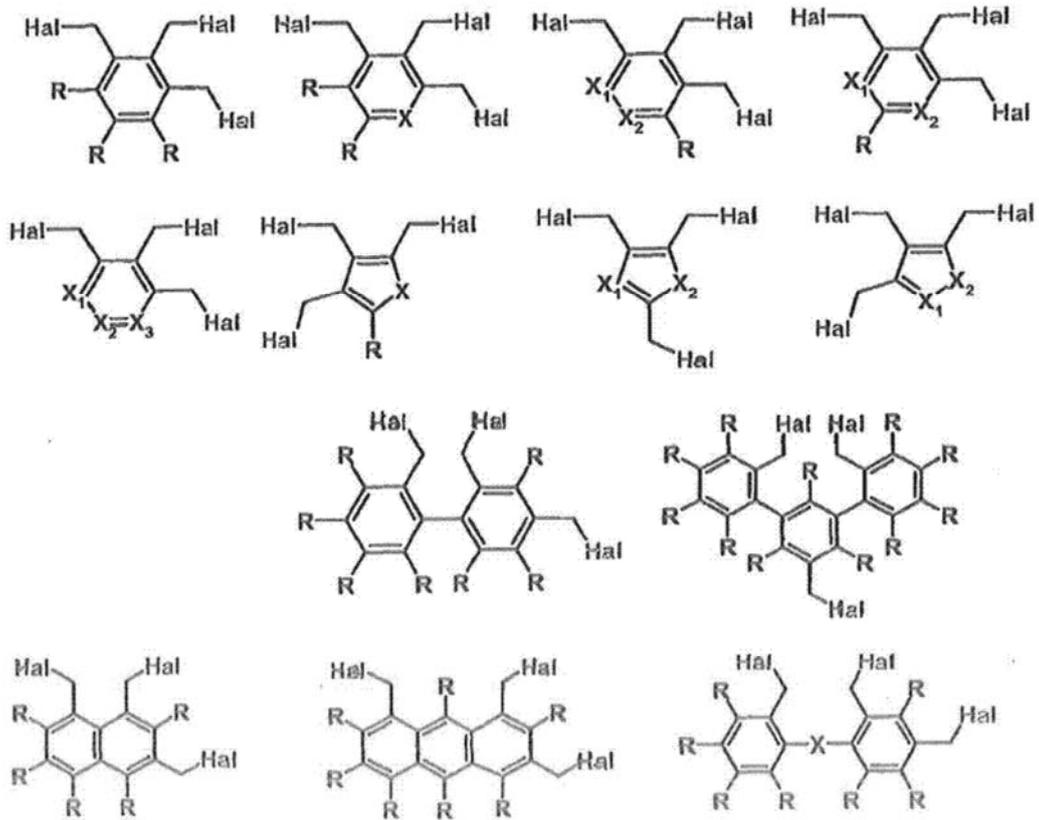


FIGURA 6



$X_{1,2,3} = N(H), O, S$

también todos los otros derivados orto-, meta- y para- de los compuestos descritos

FIGURA 7

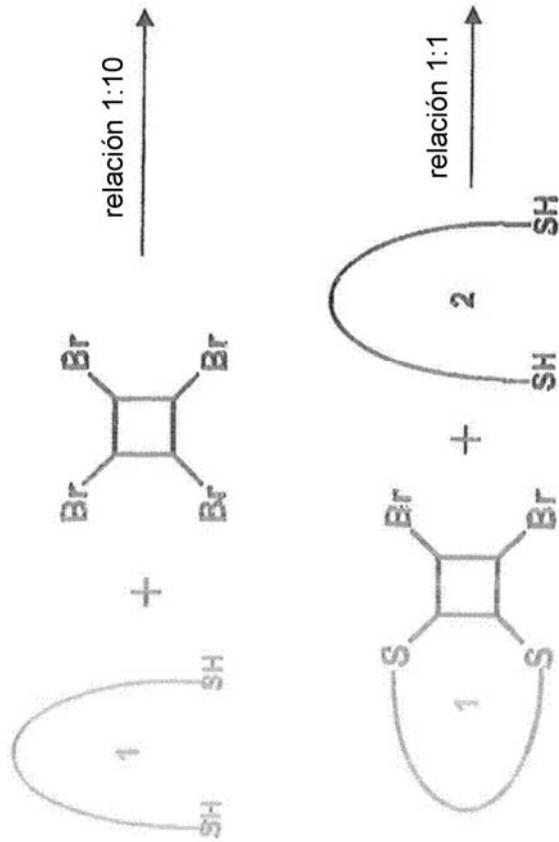
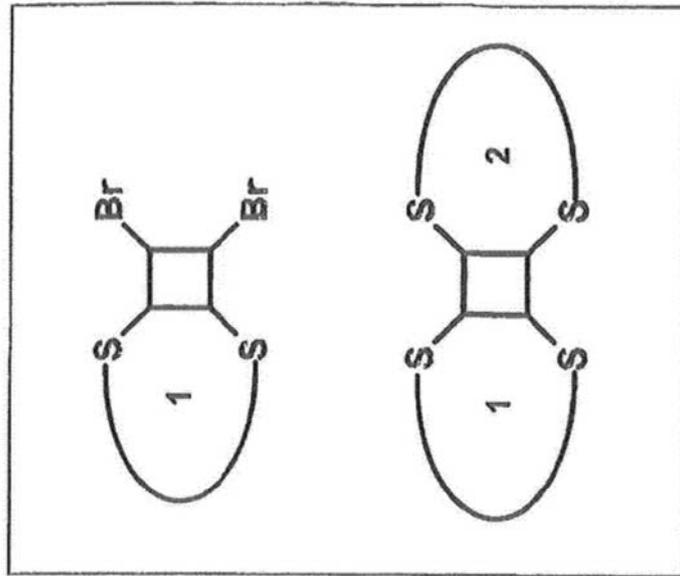
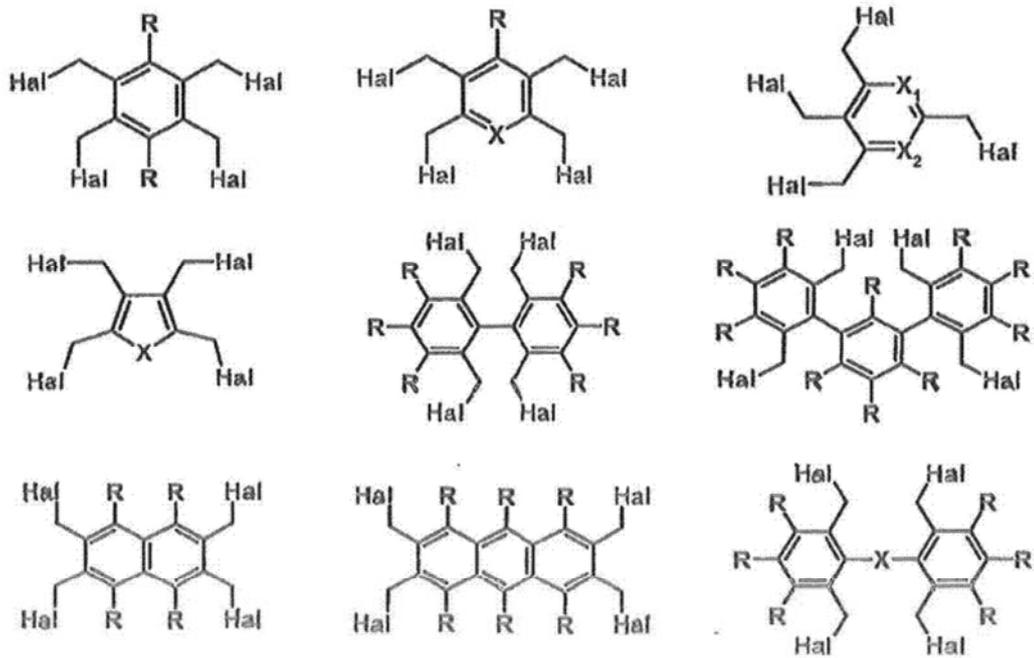


FIGURA 8



$X_{1,2} = N(H), O, S$

también todos los otros posibles derivados orto-, meta- y para- de los compuestos descritos

FIGURA 9

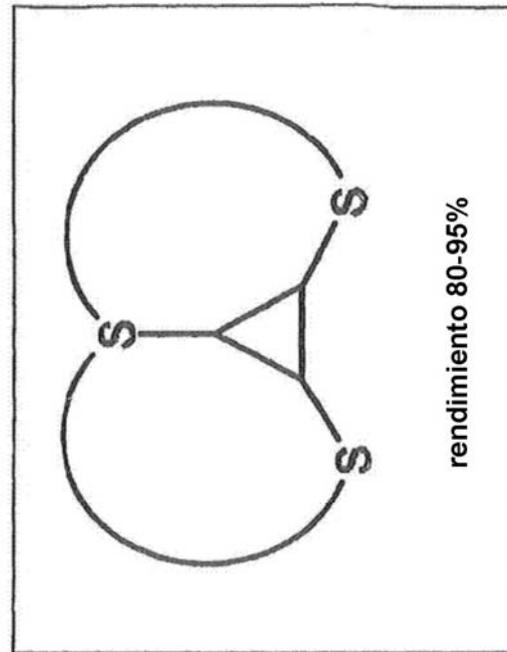


FIGURA 10

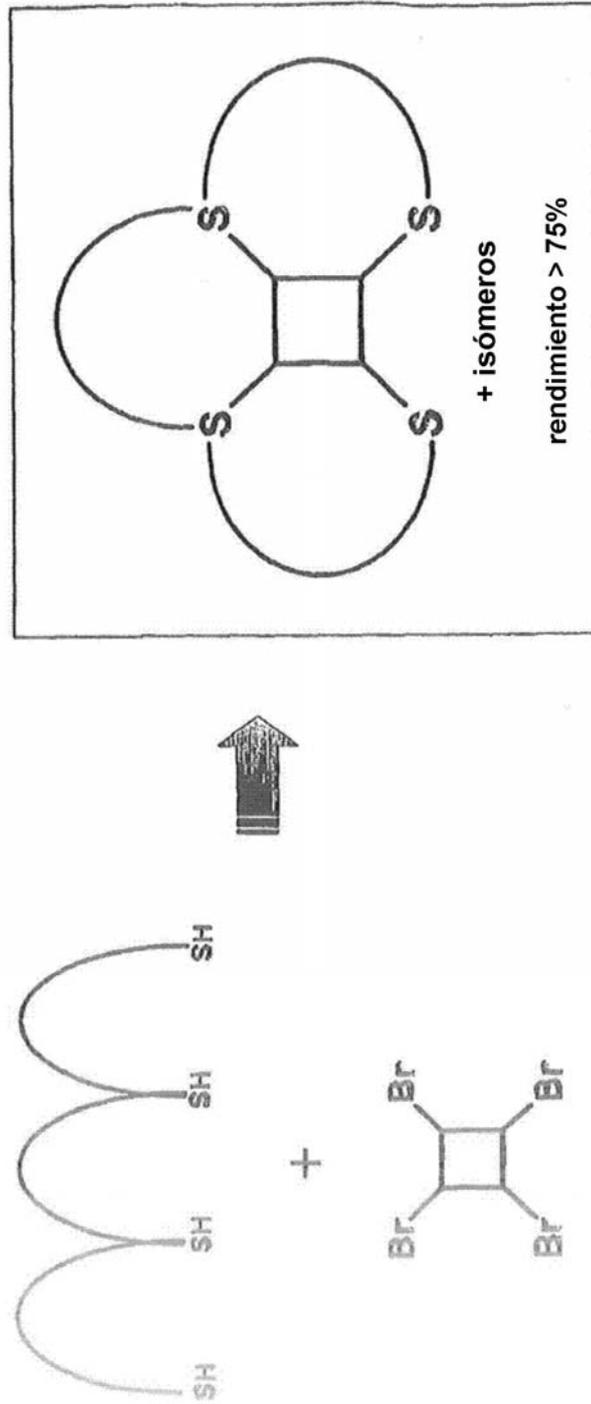


FIGURA 11A

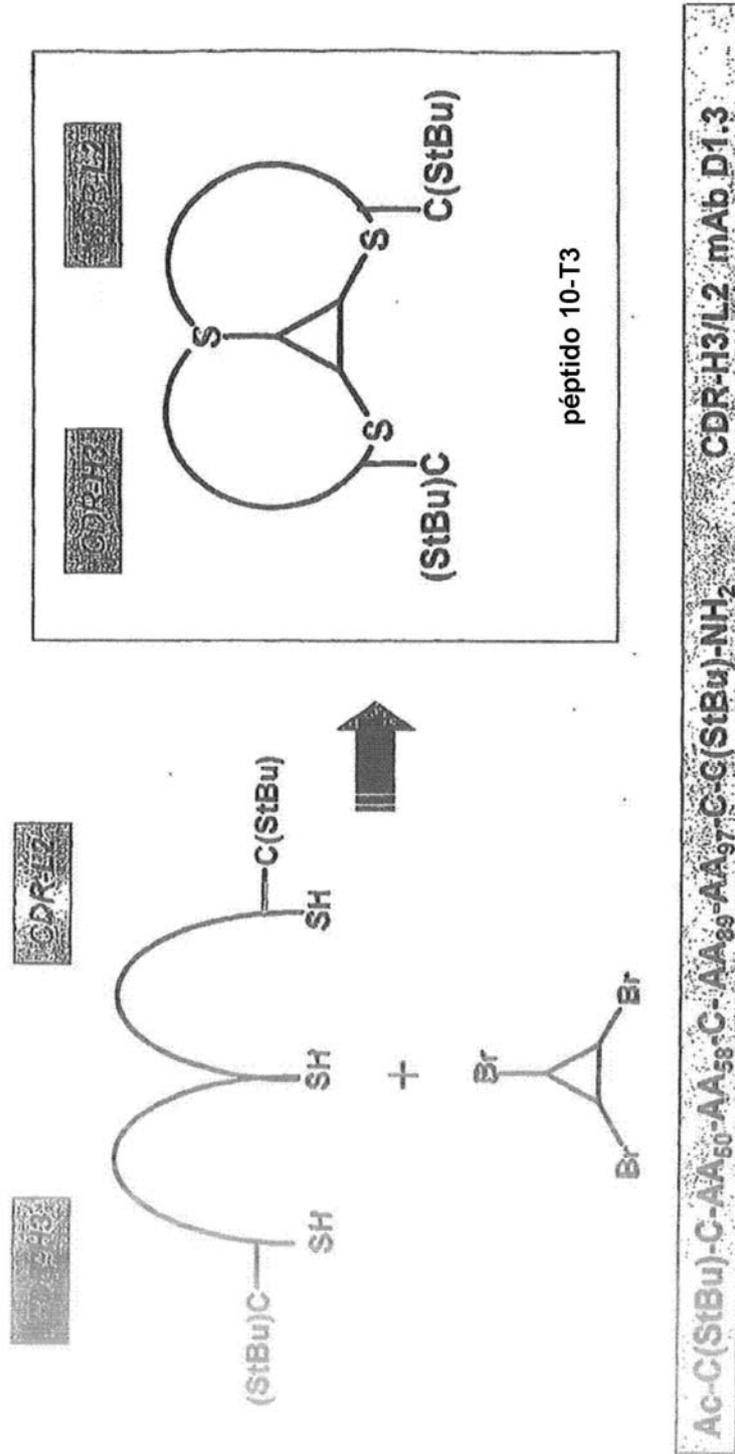


FIGURA 11B

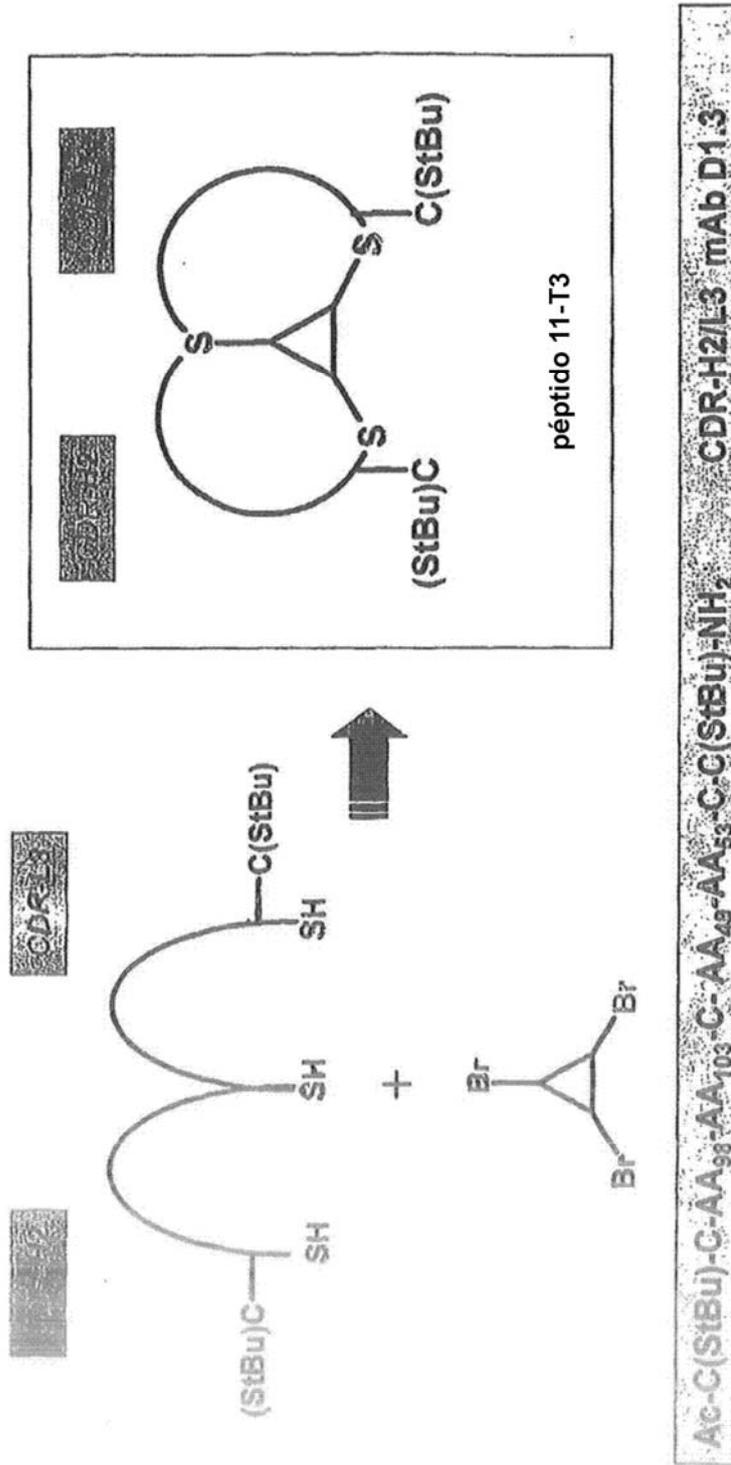


FIGURA 11C

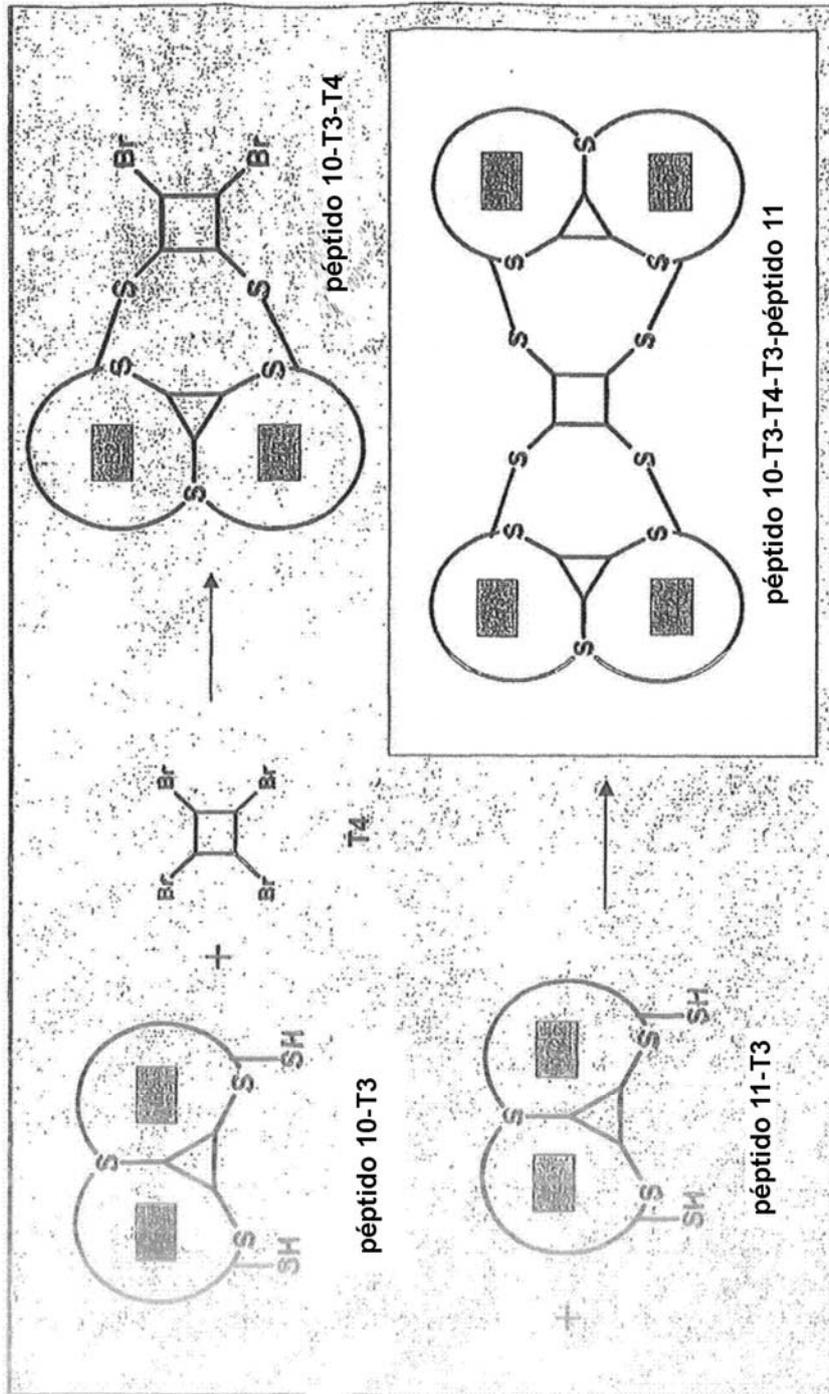


FIGURA 12

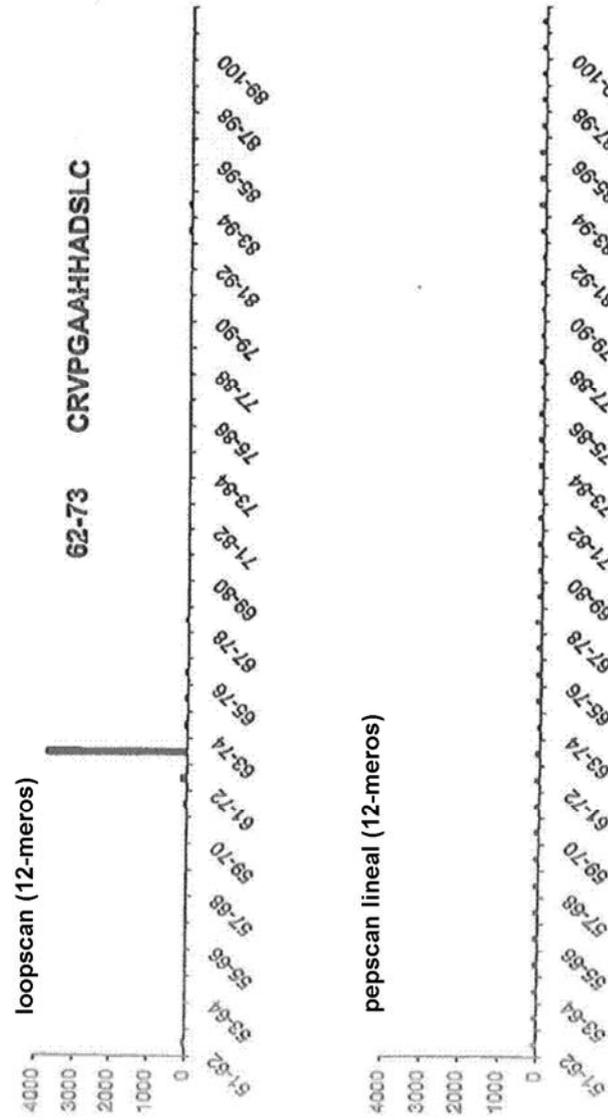


FIGURA 13

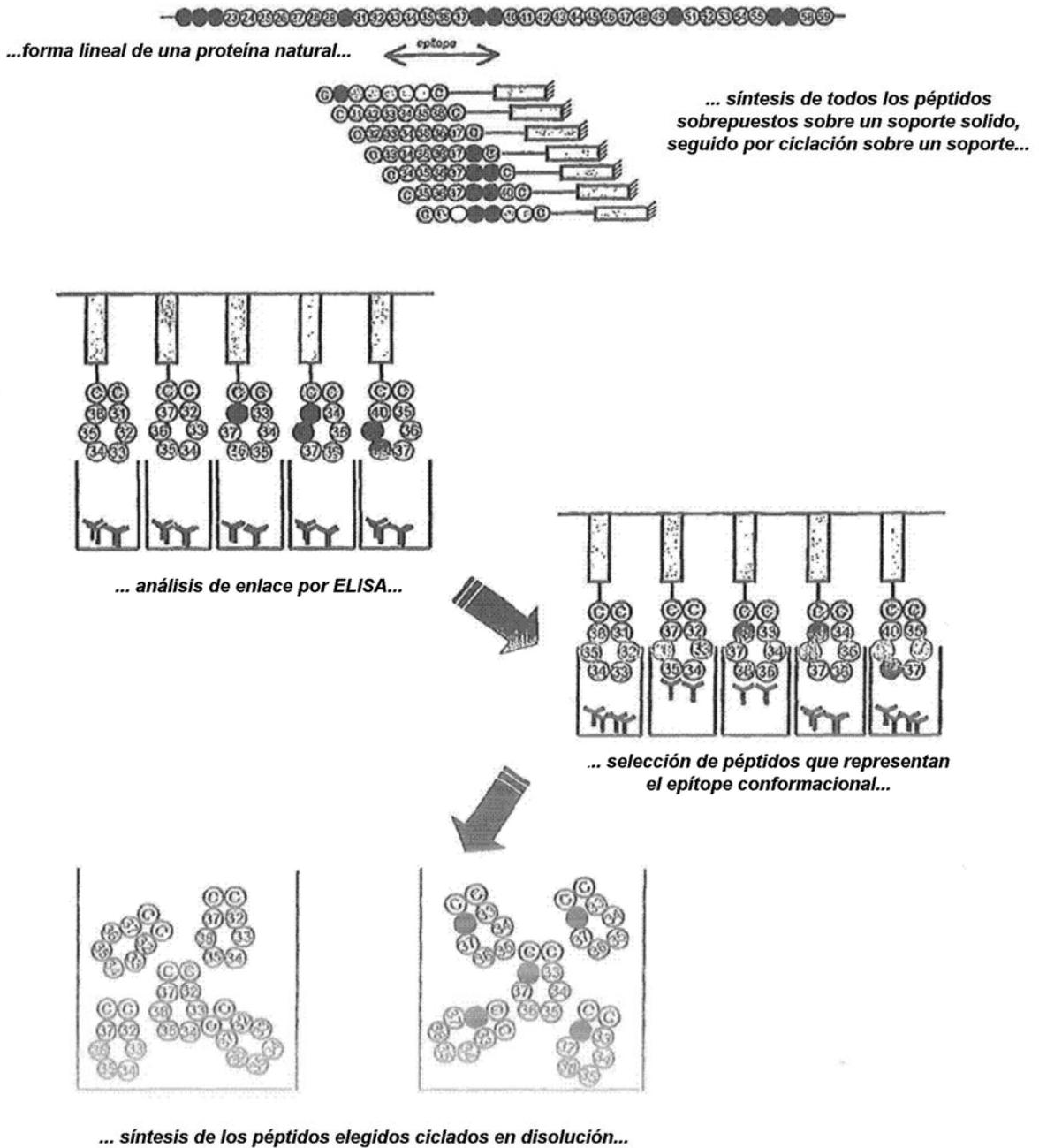


FIGURA 14A

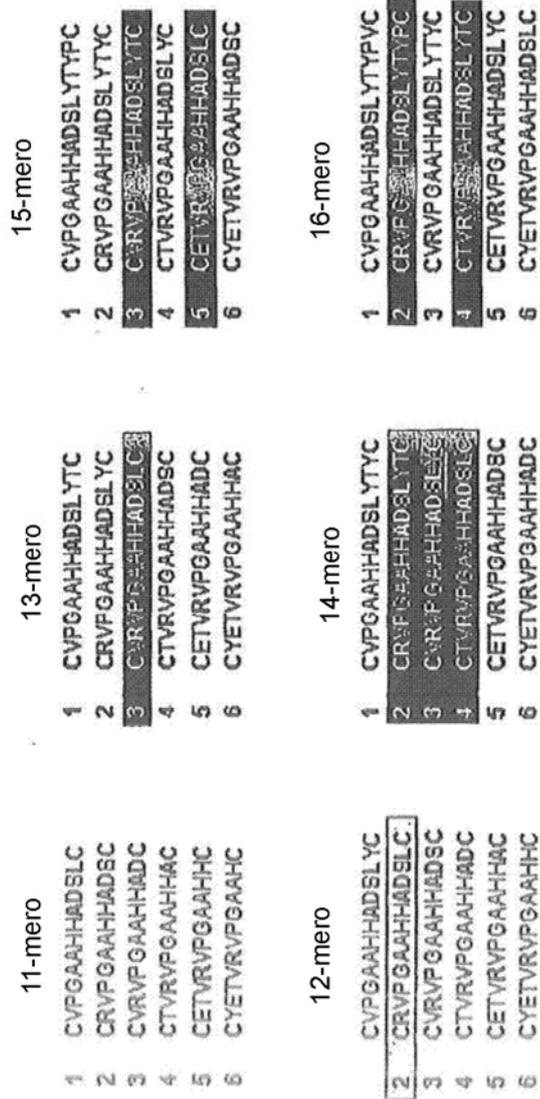


FIGURA 14B

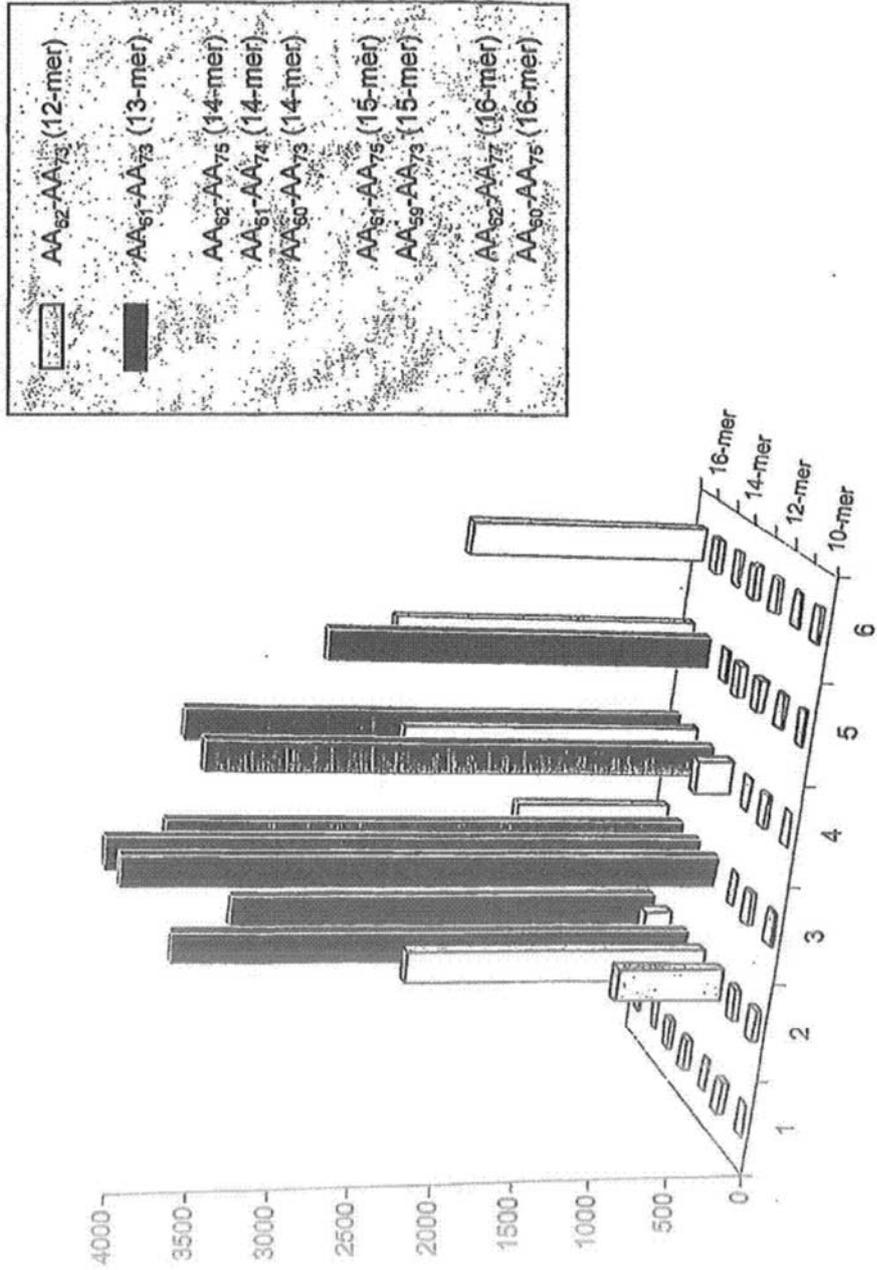


FIGURA 15A

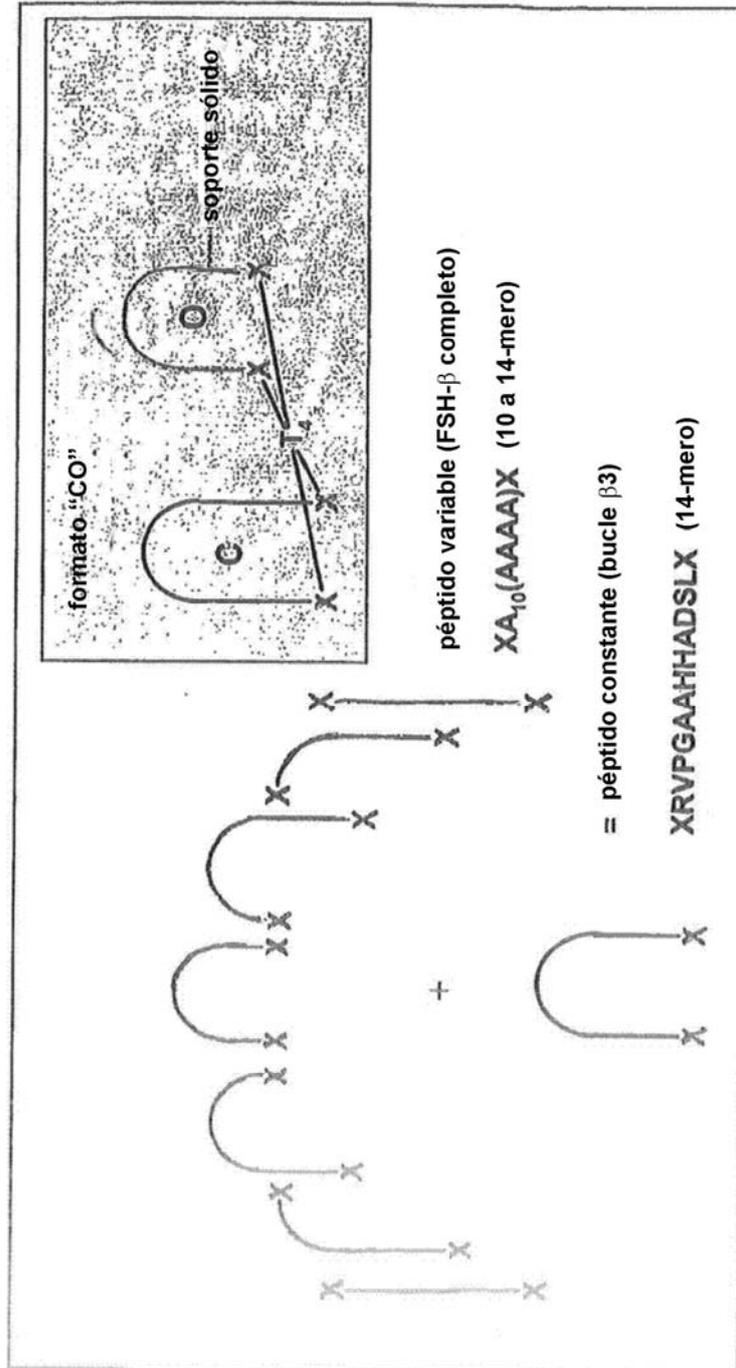


FIGURA 15B

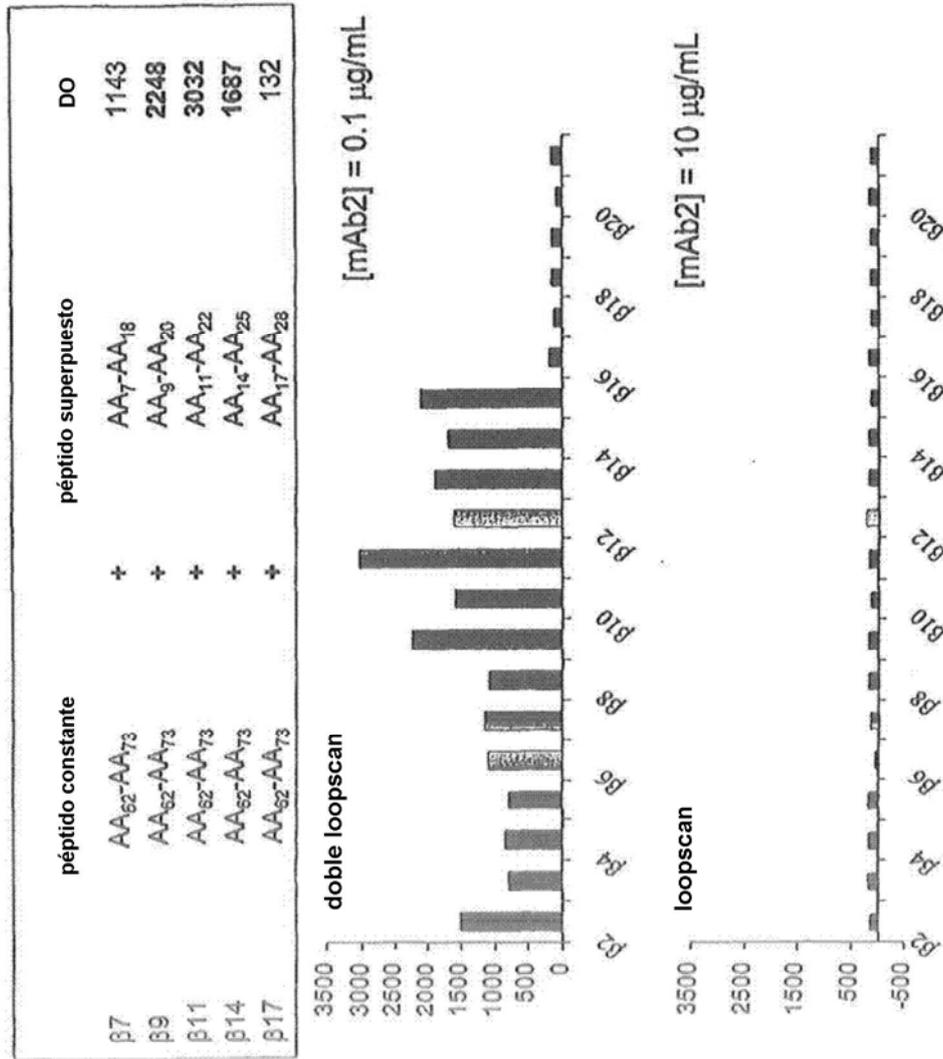


FIGURA 16B

	péptido constante		péptido superpuesto	DO
$\beta 17$	AA ₅₈ -AA ₇₇	+	AA ₁₇ -AA ₂₁ (contiene R ₁₈)	3638
$\beta 31$	AA ₅₈ -AA ₇₇	+	AA ₃₁ -AA ₃₅ (contiene R ₃₅)	3617
$\beta 47$	AA ₅₈ -AA ₇₇	+	AA ₄₇ -AA ₅₁ (contiene K ₄₉)	3649
$\beta 62$	AA ₅₈ -AA ₇₇	+	AA ₆₂ -AA ₆₆ (contiene R ₆₂)	3301
$\beta 95$	AA ₅₈ -AA ₇₇	+	AA ₉₅ -AA ₉₉ (contiene R ₉₇)	3725

