

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 310**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2008 E 08730678 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2114428**

54 Título: **Péptidos macrocíclicos unidos a triazol**

30 Prioridad:

23.02.2007 US 903073 P

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

15.03.2013

73 Titular/es:

**AILERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
281 Albany Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

NASH, HUW, M.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 398 310 T3

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

DESCRIPCIÓN

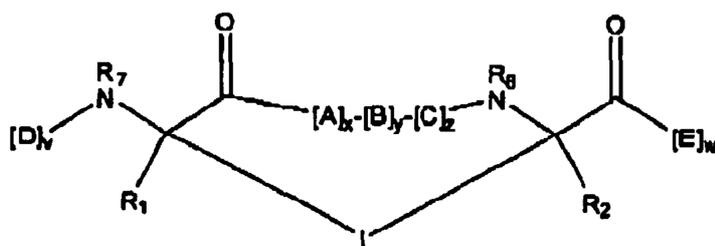
Péptidos macrocíclicos unidos a triazol.

5 **Antecedentes de la invención**

Los péptidos son cada vez más importantes en aplicaciones farmacéuticas. Los péptidos no modificados a menudo adolecen de poca estabilidad metabólica, poca penetración celular, y la unión promiscua debido a la flexibilidad de la configuración. Para mejorar estas propiedades, los investigadores han generado péptidos cíclicos y peptidomiméticos por una variedad de procedimientos, incluyendo la formación de puentes disulfuro, la formación del enlace amida, y la formación de enlace carbono-carbono (Jackson *et al.* (1991), *J. Am. Chem. Soc.* 113:9391-9392; Phelan *et al.* (1997), *J. Am. Chem. Soc.* 119:455-460; documento WO-A-2005044839; Taylor (2002), 66: 49-75 *Biopolymers*; Brunel *et al.* (2005), *Chem. Commun.* (20) :2552-2554; Hiroshige *et al.* (1995), *J. Am. Chem. Soc.* 117: 11590-11591; Blackwell *et al.* (1998), *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:3281-3284; Schafmeister *et al.* (2000), *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892). Las limitaciones de estos procedimientos incluyen poca estabilidad metabólica (enlaces disulfuro y amida), poca penetrabilidad en las células (enlaces disulfuro y amida), y la utilización de metales potencialmente tóxicos (para la formación de enlaces carbono-carbono). Por lo tanto, existe una necesidad significativa de procedimientos mejorados para producir péptidos o peptidomiméticos que poseen una mayor rigidez de configuración, estabilidad metabólica y penetrabilidad celular. La presente invención aborda estas y otras necesidades en la técnica.

Sumario de la invención

En la presente memoria se proporcionan macrociclos peptidomiméticos de Fórmula 1, en la que:

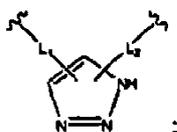


(Fórmula I)

cada A, B, C, D y E es independientemente un aminoácido natural o sintético;

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

L es un enlazador formador de macrociclo que se extiende por 1 o 2 espiras de la hélice α y presenta la fórmula



en la que L₁, es un grupo alqueno de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono y L₂ es un grupo alqueno de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

R₇ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto de D;

R₈ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto de E;

v es un número entero de 1 a 1.000;

w es un número entero de 1 a 1.000;

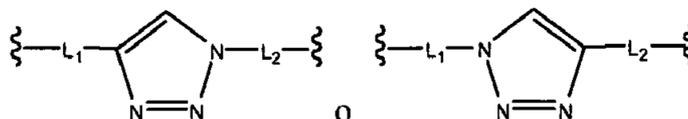
x es un número entero de 0 a 10;

y es un número entero de 0 a 10; y

z es un número entero de 0 a 10.

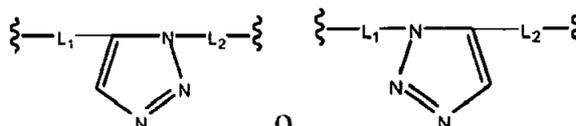
En algunas formas de realización, L es

5



En otras formas de realización, L es

10

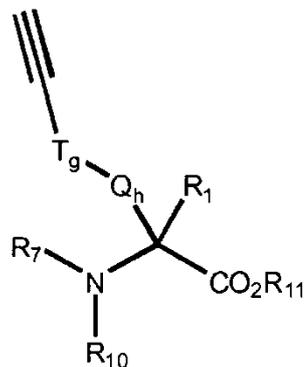


En más formas de realización, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-. En formas de realización relacionadas, R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-. Por ejemplo, por lo menos uno de R₁ y R₂ puede ser alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En algunas formas de realización, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En otras formas de realización, por lo menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otras formas de realización más, tanto R₁ como R₂ son metilo.

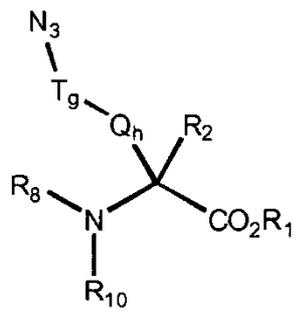
En algunas formas de realización, al menos uno entre D y E es un aminoácido natural o sintético sustituido con un lípido o un hidrocarburo de alto peso molecular. En otras formas de realización, al menos uno de entre D y E está unido a otro enlazador formador de macrociclo. En aún otras formas de realización, una estructura secundaria del macrociclo peptidomimético es más estable que una estructura secundaria correspondiente de un polipéptido no macrocíclico correspondiente. En algunas formas de realización, el macrociclo peptidomimético comprende una hélice α. La hélice α puede comprender, por ejemplo, de 1 a 5 espiras. En otras formas de realización, la hélice α es más estable que una hélice α de un polipéptido no macrocíclico correspondiente. El enlazador formador de macrociclo abarca de 1 a 2 espiras de la hélice α. La longitud del enlazador formador de macrociclo puede ser, por ejemplo, de 5 Å a 9 Å por espira de la hélice α. En algunas formas de realización, el enlazador formador de macrociclo abarca 1 espira de la hélice α. En dichas formas de realización, la longitud del enlazador formador de macrociclo puede ser igual a la longitud de 6 enlaces carbono-carbono a 14 enlaces carbono-carbono, o puede ser igual a la longitud de 8 enlaces carbono-carbono a 12 bonos de carbono-carbono. En formas de realización relacionadas, el macrociclo puede comprender un anillo de 18 átomos a 26 átomos.

En otras formas de realización, el enlazador formador de el macrociclo abarca 2 espiras de la hélice α. En algunas formas de realización, la longitud del enlazador formador de el macrociclo puede ser igual a la longitud de 8 enlaces carbono-carbono a 16 enlaces carbono-carbono, o puede ser igual a la longitud de 10 enlaces carbono-carbono a 13 enlaces carbono-carbono. En formas de realización relacionadas, el macrociclo puede comprender un anillo de 29 átomos a 37 átomos.

Un aminoácido útil en la síntesis del macrociclo peptidomimético de la invención es un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



IIa



IIb

45 en las que

R_1 y R_2 son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

5 cada Q y T es independientemente alquileno.

R_7 y R_8 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

10 R_{10} y R_{11} son independientemente -H o cualquier grupo protector adecuado para la síntesis de péptidos; y

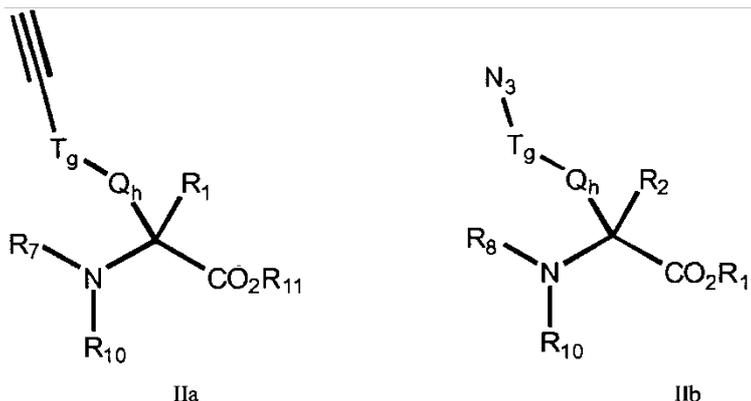
g y h son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5, en el que g+h es mayor que 1.

15 El compuesto puede ser un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo, insustituido o sustituido con halo-. El compuesto puede ser un compuesto de fórmula IIb y R_2 es alquilo insustituido, o sustituido con halo-. El compuesto puede ser un compuesto de fórmula IIa y R_1 está alquilo insustituido. Por ejemplo, R_1 puede ser metilo. El compuesto puede ser un compuesto de fórmula IIb y R_2 es alquilo insustituido. Por ejemplo, R_2 puede ser metilo. Por lo menos uno de R_9 y R_{10} puede ser un grupo protegido adecuado para la síntesis de péptidos. Se describen kits que comprenden compuestos de fórmula IIa y fórmula IIb u otros análogos de aminoácidos útiles en la preparación de los

20 macrociclos peptidomiméticos de la invención junto con los reactivos de macrociclación descritos en la presente memoria.

Se describe un kit que comprende:

25 a) por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consta de compuestos de fórmulas IIa y IIb:



en las que

30 R_1 y R_2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

35 cada Q y T es independientemente alquileno;

R_7 y R_8 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo, o heterocicloalquilo;

40 R_{10} y R_{11} son independientemente -H o cualquier grupo protector adecuado para la síntesis de péptidos;

g y h son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5; y

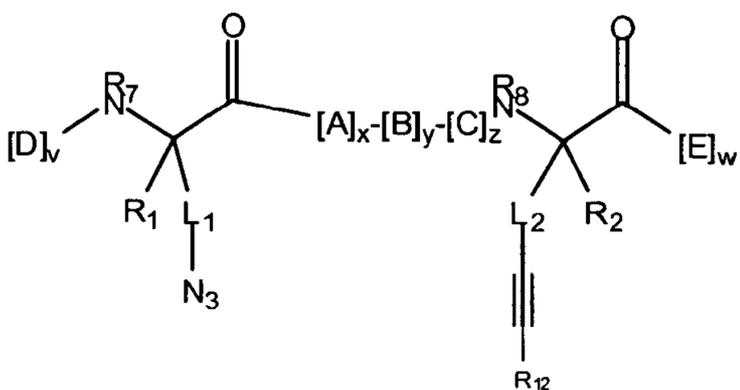
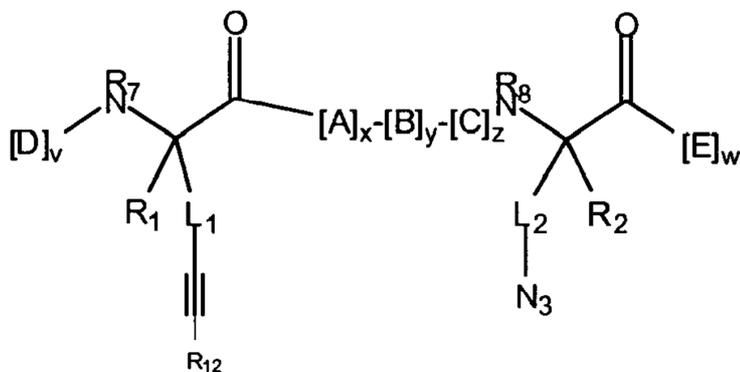
b) un reactivo de macrociclación.

45 Dicho kit puede comprender un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En los casos relacionados, R_1 es alquilo insustituido. Por ejemplo, R_1 puede ser metilo. En otros casos, el kit comprende un compuesto de fórmula IIb y R_2 es alquilo insustituido, o sustituido con halo-. En los casos mencionados, R_2 es alquilo insustituido. Por ejemplo, R_2 puede ser metilo.

50 En algunos casos, un kit comprende al menos un compuesto de fórmula IIa y al menos un compuesto de fórmula IIb. Un kit como el descrito también puede comprender un compuesto de fórmula IIa o fórmula IIb en el que al menos uno de entre R_9 y R_{10} es un grupo protegido adecuado para la síntesis de péptidos. En dichos kits el reactivo de

macro ciclación puede ser un reactivo con Cu. En dichos kits el reactivo de macro ciclación puede ser un reactivo con Ru.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para sintetizar un macrociclo peptidomimético, el procedimiento comprende las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV



10 con un reactivo de macro ciclación;

en las que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ son como se han definido anteriormente; R₁₂ es -H cuando el reactivo de macro ciclación es un reactivo con Cu y R₁₂ es -H o alquilo cuando el reactivo de macro ciclación es un reactivo con Ru, y que además dicha etapa de puesta en contacto da como resultado un enlace covalente formado entre las porciones alquino y azida de fórmula III o fórmula IV. Por ejemplo, R₁₂ puede ser metilo cuando el reactivo de macro ciclación es un reactivo con Ru.

En algunas formas de realización del procedimiento de la invención, al menos uno de entre R₁ y R₂ es alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-. En formas de realización relacionadas, R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-.

Por ejemplo, al menos uno de entre R₁ y R₂ puede ser alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En algunas formas de realización, al menos uno de entre R₁ y R₂ es metilo. En otras formas de realización, R₁ y R₂ son metilo. El reactivo de macro ciclación puede ser un reactivo con Cu. Alternativamente, el reactivo de macro ciclación puede ser un reactivo con Ru.

En algunas formas de realización, el precursor peptidomimético se purifica antes de la etapa de contacto. En otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético se purifica después de la etapa de contacto. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético se repliega tras la etapa de contacto. El procedimiento puede realizarse en solución, o, alternativamente, el procedimiento puede realizarse en un soporte sólido.

También está previsto en la presente memoria realizar el procedimiento de la invención en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. En algunas formas de realización, el procedimiento se realiza en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El procedimiento también se puede aplicar para sintetizar una biblioteca de

macrociclos peptidomiméticos.

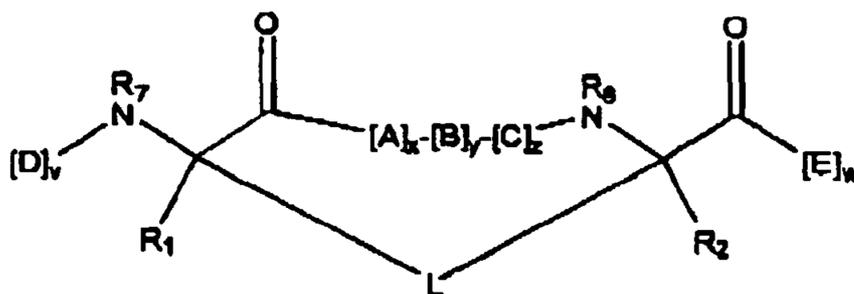
El macrociclo peptidomimético resultante de un procedimiento de la invención comprende la hélice α en solución acuosa. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de estructura α -helicoidal en solución acuosa en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En algunas formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta un aumento de estabilidad térmica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta aumento de actividad biológica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta aumento de la resistencia a la degradación proteolítica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta mayor capacidad para penetrar en las células vivas en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente.

En algunas formas de realización, la porción alquino del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico y la porción azida del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consta de ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alfa-metil-L-ornitina y δ -azido-alfa-metil-D-ornitina.

En algunas formas de realización, $x+y+z$ es 3, y A y B y C son aminoácidos independientemente naturales o sintéticos. En otras formas de realización, $x+y+z$ es 6, y A y B y C son aminoácidos independientemente naturales o no naturales.

En algunas formas de realización, el reactivo de macrociclación es un reactivo con Cu y la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en disolvente prótico, disolvente acuoso, disolvente orgánico y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el disolvente puede seleccionarse entre el grupo que consiste en H_2O , THF/ H_2O , tBuOH/ H_2O , DMF, DIPEA, CH_3CN , CH_2Cl_2 , $ClCH_2CH_2Cl$ o una mezcla de los mismos. En otras formas de realización, el reactivo de macrociclación es un reactivo con Ru y la etapa de contacto se lleva a cabo en un disolvente orgánico. Por ejemplo, el disolvente puede ser DMF, THF, CH_3CN , CH_2Cl_2 o $ClCH_2CH_2Cl$. El disolvente puede ser un disolvente que favorece la formación de la hélice.

El macrociclo peptidomimético que resulta de realizar el procedimiento de la invención presenta la fórmula (I):



(Fórmula I)

en la que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₆, y L son como se ha definido anteriormente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "macrociclo" se refiere a una molécula que tiene una estructura química que incluye un anillo o ciclo formado por al menos 9 átomos unidos por enlace covalente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "macrociclo peptidomimético" se refiere a un compuesto que comprende un gran número de restos de aminoácidos unidos por un gran número de enlaces peptídicos y al menos un enlazador formador de macrociclo formador de un macrociclo entre el carbono α de un resto de aminoácido natural o de un resto de aminoácido sintético o de un resto de análogo de aminoácido y el carbono α de otro resto de aminoácido natural o el resto de aminoácido sintético o el resto de análogo de aminoácido. Los macrociclos peptidomiméticos incluyen opcionalmente uno o más enlaces no peptídicos entre uno o más restos de aminoácidos y/o restos de aminoácidos análogo de aminoácido y, opcionalmente, incluyen uno o más restos de aminoácidos

sintéticos o restos de análogo de aminoácido, además de cualquiera que forme el macrociclo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una estructura secundaria definida en solución por un macrociclo peptidomimético de la invención medido por dicroísmo circular, RMN u otra medida biofísica, o resistencia a la degradación proteolítica *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos no limitativos de estructuras secundarias comprendidas en la presente invención son las hélices α , espiras β y hojas plisadas β .

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "estabilidad helicoidal" se refiere al mantenimiento de la estructura de la hélice α por un macrociclo peptidomimético de la invención medido por dicroísmo circular. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos de la invención presentan un aumento de al menos 1,25, 1,5, 1,75 o 2 veces en la helicidad α determinado por dicroísmo circular en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico.

La terminología "aminoácido α " o simplemente "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unido a un carbono que se designa carbono α . Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, tanto los isómeros D como L de los aminoácidos naturales, así como de los aminoácidos sintéticos preparados por síntesis orgánica u otras rutas metabólicas. A menos que el contexto indique específicamente lo contrario, el término aminoácido, como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir análogos de aminoácidos.

El término "aminoácido natural" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos que se encuentran comúnmente en péptidos sintetizados en la naturaleza, y conocidos por las abreviaturas de una letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.

La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar a un aminoácido y que puede estar sustituida por un aminoácido en la formación de un macrociclo peptidomimético. Los análogos de aminoácidos incluyen, sin limitación, compuestos que son estructuralmente idénticos a un aminoácido, tal como se definen en la presente memoria, excepto por la inclusión de uno o más grupos metileno adicionales entre el grupo amino y carboxilo (por ejemplo, α -amino β -carboxiácidos), o por la sustitución del grupo amino o carboxilo por un grupo reactivo similar (por ejemplo, sustitución de la amina primaria por una amina secundaria o terciaria, o la sustitución del grupo carboxi por un éster).

Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede ser alterado a partir de la secuencia natural de un polipéptido (por ejemplo, un dominio BH3 o el dominio de unión MDM2 p53) sin suprimir o alterar sustancialmente su actividad biológica o bioquímica esencial (por ejemplo, unión al receptor o activación del mismo). Un resto de aminoácido "esencial" es un resto que, cuando se altera a partir de la secuencia natural del polipéptido, da como resultado la supresión o suprime sustancialmente la actividad biológica o bioquímica esencial del polipéptido.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, K, R, H), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, D, E), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, G, N, Q, S, T, Y, C), cadenas laterales apolares (por ejemplo, A, V, L, I, P, F, M, W), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, T, V, I) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, Y, M, W, H). Por lo tanto, un resto previsto de aminoácido no esencial en un polipéptido BH3, por ejemplo, se reemplaza preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de la cadena lateral.

El término "miembro", como se utiliza en la presente memoria en relación con macrociclos o enlazadores formadores de macrociclos se refiere a los átomos que forman o pueden formar el macrociclo, y excluye átomos de la cadena lateral o del sustituyente. Por analogía, ciclodecano, 1,2-difluoro-decano y 1,3-dimetil ciclodecano se consideran todos macrociclos de diez miembros como los sustituyentes de hidrógeno o flúoro o cadenas laterales de metilo no participan en la formación del macrociclo.

El símbolo "" cuando se utiliza como parte de una estructura molecular se refiere a un enlace sencillo o a un doble enlace *trans* o *cis*.

El término "cadena lateral de aminoácido" se refiere a un resto unido al carbono α en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácido para alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácido para fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácido para cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácido para aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácido para tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etc. Otras cadenas laterales de aminoácidos sintéticos también se incluyen, por ejemplo, los que se producen en la naturaleza (por ejemplo, un metabolito aminoácido) o los que se preparan por síntesis (por ejemplo, un aminoácido α , α disustituido).

El término "polipéptido" comprendido dos o más aminoácidos de origen natural o sintético unidos por un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida). Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen proteínas

completas (por ejemplo, proteínas completamente procesadas), así como secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, fragmentos de proteínas naturales o fragmentos de polipéptido sintético).

5 El término "reactivo de macrociclación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier reactivo que puede utilizarse para preparar un macrociclo peptidomimético de la invención por mediación de la reacción entre una azida y alquino. Dichos reactivos incluyen, sin limitación, reactivos de Cu tales como reactivos que proporcionan una especie reactiva de Cu (I), tales como CuBr, CuI o CuOTf, así como sales de Cu (II) tales como de Cu(CO₂CH₃)₂, CuSO₄, y CuCl₂ que pueden convertirse *in situ* en un reactivo activo de Cu (I) mediante la adición de un agente reductor tal como ácido ascórbico o ascorbato de sodio. Los reactivos de macrociclación incluyen además, por
10 que puede proporcionar una especie reactiva de Ru (II).

El término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo o un radical de los mismos.

15 El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀ indica que el grupo tiene de 1 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella en ausencia de una designación numérica. "Alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

20 El término "alquilenilo" se refiere a un grupo alquilo divalente (es decir, -R-).

El término "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono. La porción alquenilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. El término
25 "alquenilo inferior" se refiere a una cadena de alquenilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquenilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

El término "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o unacadena ramificada que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. La porción alquinilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. El término
30 "alquinilo inferior" se refiere a un cadena de alquinilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquinilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico de 6 carbonos o aromático bicíclico de 10 carbonos en el que 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y similares. El término "arilalquilo" o el término "aralquilo" se refiere a alquilo sustituido con un arilo. El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con arilo.

"Arlalquilo" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente. Ejemplos representativos de un grupo arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, 2-metilfenilo, 3-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etilfenilo, 3-etilfenilo, 4-etilfenilo, 2-propilfenilo, 3-propilfenilo, 4-propilfenilo, 2-butilfenilo, 3-butilfenilo, 4-butilfenilo, 2-pentilfenilo, 3-pentilfenilo, 4-pentilfenilo, 2-isopropilfenilo, 3-isopropilfenilo, 4-isopropilfenilo, 2-isobutilfenilo, 3-isobutilfenilo, 4-isobutilfenilo, 2-sec-butilfenilo, 3-sec-butilfenilo, 4-sec-butilfenilo, 2-t-butilfenilo, 3-t-butilfenilo y 4-t-butilfenilo.
45

"Arlamido" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por uno o más grupos -C(O)NH₂. Ejemplos representativos de un grupo arilamido incluyen 2-C(O)NH₂-fenilo, 3-C(O)NH₂-fenilo, 4-C(O)NH₂-fenilo, 2-C(O)NH₂-piridilo, 3-C(O)NH₂-piridilo y 4-C(O)NH₂-piridilo.
50

"Alquilheterociclo" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado por un heterociclo. Ejemplos representativos de un grupo alquilheterociclo incluyen, pero no se limitan a, -CH₂CH₂-morfolina, -CH₂CH₃-piperidina, -CH₂CH₂CH₂-morfolina y -CH₂CH₂CH₂-imidazol.
55

"Alquilamido" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado por un grupo -C(O)NH₂. Ejemplos representativos de un grupo alquilamido incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₃, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃, -CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂C(O)NH₃.
60

"Alcanol" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha sustituido por un grupo hidroxilo. Ejemplos representativos de un grupo alcohol incluyen, pero no se limitan a, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH(OH)CH₃, -CH₂CH(OH)CH₂CH₃, -CH(OH)CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂OH.
65

"Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha sustituido con un grupo -COOH. Ejemplos representativos de un grupo alquilcarboxi incluyen pero no se limitan a, -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₃CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₂CH₃, -CH(COOH)CH₂CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂COOH.

El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye grupos de hidrocarburos cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tiene 3 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 3 a 8 átomos de carbono, y más preferentemente de 3 a 6 átomos de carbono, en el que el grupo cicloalquilo además está opcionalmente sustituido. Algunos grupos cicloalquilo incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros, o tricíclico de 11 a 14 miembros, que tiene 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico, o 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos se seleccionan de entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de O, N o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en el que 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo están sustituidos con un sustituyente. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo y similares.

El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con heteroarilo.

El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico no aromático de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros, que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos de entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 ó 1-9 heteroátomos de O, N o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en el que 0, 1, 2 ó 3 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo, tetrahidrofurano y similares.

El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heteroarilo en cualquier átomo de ese grupo. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, grupos halo, hidroxilo, mercapto, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, alquilarilo, alcoxi, tioalcoxi, ariloxi, amino, alcoxycarbonilo, amido, carboxilo, alcanosulfonilo, alquilcarbonil y ciano.

En algunas formas de realización, los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos y por lo tanto se presentan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas estas formas isómeras de estos compuestos están incluidas en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera. En algunas formas de realización, los compuestos de la presente invención también están representados en múltiples formas tautoméricas, en tales casos, la invención incluye todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, si la de la alquilación de un sistema de anillo da como resultado la alquilación en múltiples puntos, la invención incluye todos los productos de reacción de este tipo). Todas estas formas isoméricas de dichos compuestos están incluidas en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente memoria se incluyen en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos "aumento" y "disminución" significan, respectivamente, producir un aumento o disminución estadísticamente significativo (es decir, $p < 0,1$) de por lo menos 5%.

Como se utiliza en la presente memoria, la lectura de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la invención puede ponerse en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese rango. Así, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable es igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. De igual manera, para una variable que es intrínsecamente continua, la variable es igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. A título de ejemplo no limitativo, una variable que se describe con valores entre 0 y 2 adopta los valores 0, 1 ó 2 si la variable es intrínsecamente discreta, y adopta los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualesquier otros valores reales ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es intrínsecamente continua.

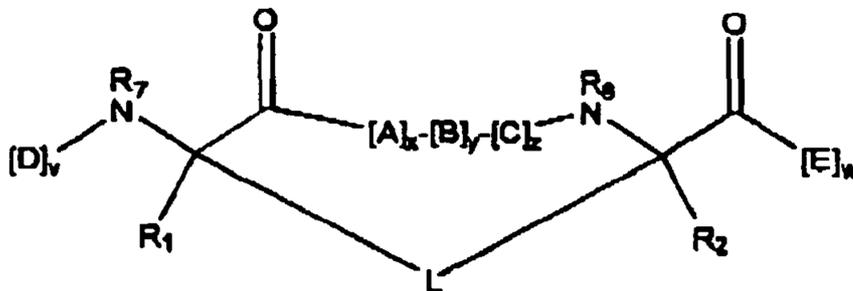
Como se utiliza en la presente memoria, a menos que específicamente se indique lo contrario, la palabra "o" se utiliza en sentido inclusivo de "y/o" y no en sentido exclusivo de "o/o".

Los detalles de una o más formas de realización específicas de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Macrociclos peptidomiméticos de la invención

La presente invención proporciona un macrociclo peptidomimético de fórmula (I):

5



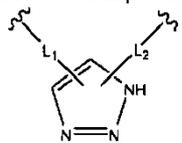
(Fórmula I)

en la que:

10 cada A, B, C, D y E es independientemente un aminoácido natural o no natural;

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

15 L es un enlazador formador de macrociclo que abarca 1 o 2 piras de la hélice α y p la fórmula



en la que L₁, es un grupo alquilenos de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono y L₂ es un grupo alquilenos de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

20 R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto de D;

25 R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto de E;

v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000;

30 x es un número entero de 0-10;

y es un número entero de 0-10; y

35 z es un número entero de 0-10.

En algunas formas de realización de la invención, x+y+z es al menos 3. En otras formas de realización de la invención, x+y+z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo de la invención se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula [A]_x, cuando x es 3, abarca formas de realización en las que los aminoácidos no son idénticos, por ejemplo, Gln-Asp-Ala, así como formas de realización en las que los aminoácidos son idénticos, por ejemplo, Gln-Gln-Gln. Esto se aplica para cualquier valor de x, y, z, en los intervalos indicados.

45 En algunas formas de realización, el macrociclo peptidomimético de la invención comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, lo que permite el enlace de hidrógeno entre la hélice.

En otras formas de realización, la longitud del enlazador L formador de macrociclo como se ha medido desde una primera C α a una segunda C α se selecciona para estabilizar una estructura secundaria de péptido deseada, tal como una hélice α formada por restos del macrociclo peptidomimético incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, aquellos entre la primera C α a una segunda C α .

50

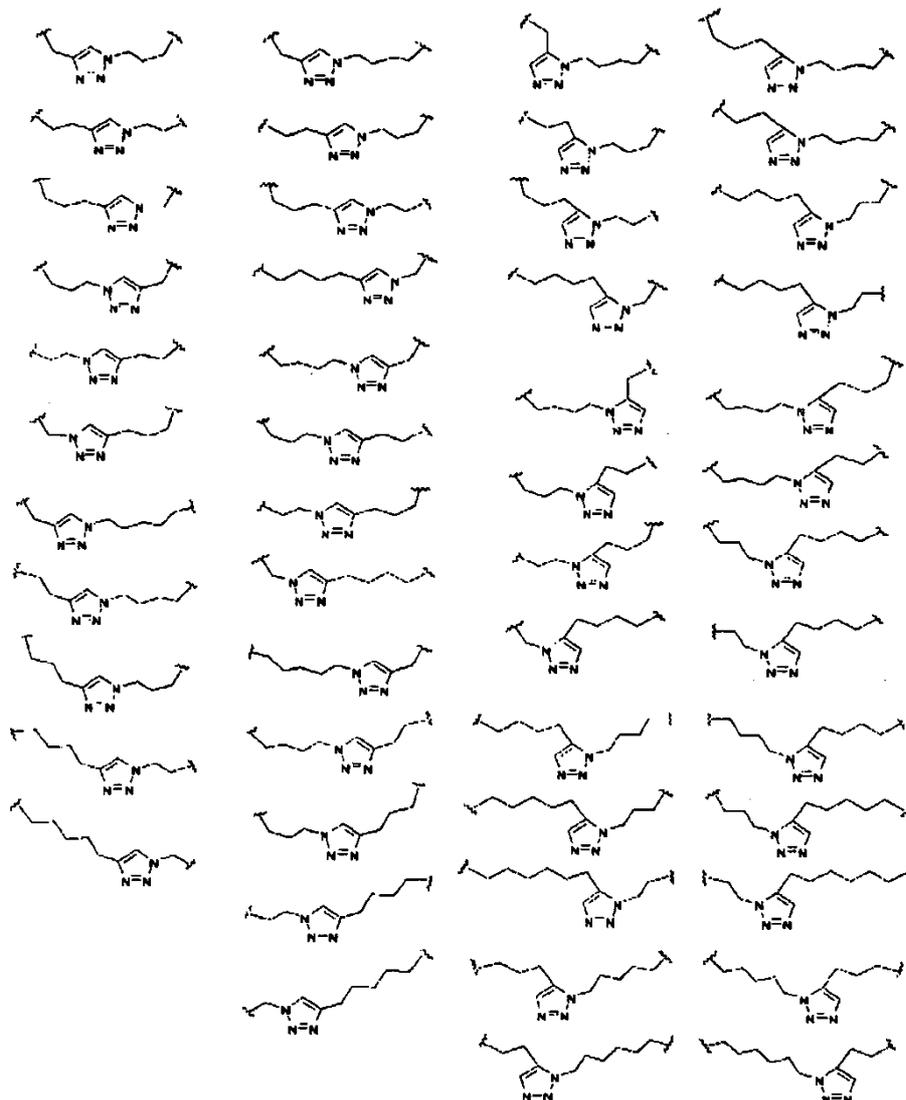
El macrociclo peptidomimético comprende al menos una hélice α . Por ejemplo, A, B y/o C en el compuesto de fórmula I incluyen una o más hélices α . Como una cuestión general, las hélices α incluyen entre 3 y 4 restos de aminoácidos por espira. En algunas formas de realización, la hélice α del macrociclo peptidomimético incluye de 1 a 5 espiras y, por tanto, de 3 a 20 restos de aminoácidos. En formas de realización específicas, la hélice α incluye 1

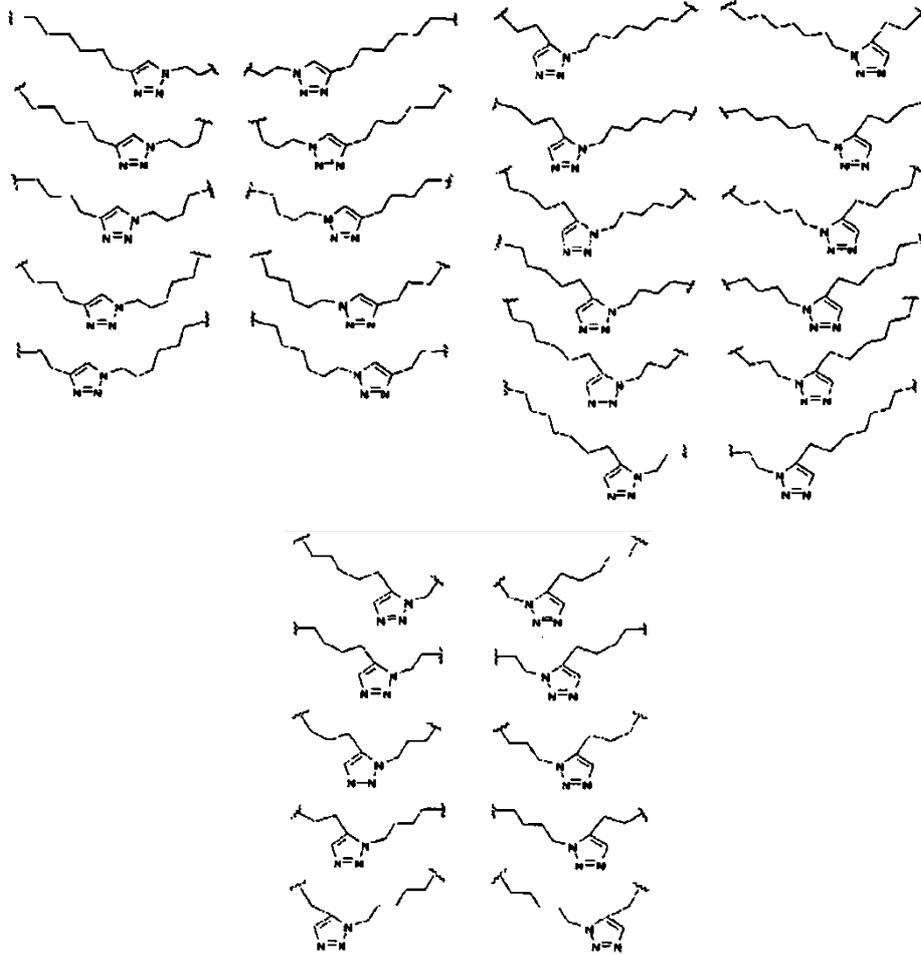
5 espira, 2 espiras, 3 espiras, 4 espiras o 5 espiras. En algunas formas de realización, el enlazador formador de macrociclo estabiliza un motivo de hélice α incluido dentro del macrociclo peptidomimético. Así, en algunas formas de realización, la longitud del enlazador L formador de macrociclo de una primera $C\alpha$ a una segunda $C\alpha$ se selecciona para aumentar la estabilidad de una hélice α . El enlazador formador de macrociclo abarca de 1 espira a 2

10 espiras de la hélice α . En algunas formas de realización, la longitud del enlazador formador de macrociclo es de 5 Å a 9 Å por cada espira de la hélice α , o 6 Å a 8 Å por cada espira de la hélice α . Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 1 espira de una hélice α , la longitud es igual a 5 enlaces carbono-carbono a 13 enlaces carbono-carbono, 7 enlaces carbono-carbono a 11 enlaces carbono-carbono, o 9 enlaces carbono-carbono.

15 Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 2 espiras de una hélice α , la longitud es igual a 8 enlaces carbono-carbono a 16 enlaces carbono-carbono, 10 enlaces carbono-carbono a 14 enlaces carbono-carbono, o 12 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 1 espira de una hélice α , el enlace contiene 4 átomos a 12 átomos, 6 átomos a 10 átomos, u 8 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 2 espiras de la hélice α , el enlace contiene 7 átomos a 15 átomos, 9 átomos a 13 átomos, u 11 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 1 espira de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene de 17 miembros a 25 miembros, 19 miembros a 23 miembros o 21 miembros. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca 2 espiras de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene 29 miembros a 37 miembros, 31 miembros a 35 miembros o 33 miembros.

25 Las formas de realización ejemplificativas del enlazador L formador de macrociclo se muestran a continuación:





5 En otras formas de realización, D y/o E se modifican más a fin de facilitar la absorción celular. En algunas formas de realización, la lipidación o PEGilación de un macrociclo peptidomimético facilita la absorción celular, aumenta la biodisponibilidad, aumenta la circulación sanguínea, altera la farmacocinética, disminuye la inmunogenicidad y/o disminuye la frecuencia necesaria de administración.

10 En una forma de realización, un macrociclo peptidomimético presenta propiedades biológicas mejoradas tales como mayor estabilidad estructural, mayor afinidad por una diana, mayor resistencia a la degradación proteolítica y/o mayor penetrabilidad celular cuando se compara con un polipéptido no macrocíclico correspondiente. En otra forma de realización, un macrociclo peptidomimético comprende una o más hélices α en soluciones acuosas y/o presenta un mayor grado de helicidad α en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En algunas formas de realización, un enlazador formador de macrociclo aumenta la permeabilidad celular del macrociclo peptidomimético. Sin desear estar ligado por la teoría, se supone que el enlazador formador de macrociclo puede aumentar la hidrofobia global del macrociclo peptidomimético con respecto a un polipéptido no macrocíclico correspondiente.

20 Cualquier proteína o polipéptido con una conocida secuencia primaria de aminoácidos que contiene una estructura secundaria que se cree que comunica actividad biológica es el objeto de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido puede analizarse y análogos de aminoácidos de la invención que contienen azida y que contienen alquino pueden estar sustituidos en las posiciones apropiadas. Las posiciones apropiadas se determinan averiguando qué superficie(s) molecular(es) de la estructura secundaria se necesita(n) para la actividad biológica y, por lo tanto, a través de qué otra(s) superficie(s) los enlazadores de la invención que forman macrociclos pueden formar un macrociclo sin bloquear estéricamente la(s) superficie(s) requerida(s) para la actividad biológica. Dichas determinaciones se realizan utilizando procedimientos tales como la cristalografía de rayos X de complejos entre la estructura secundaria y una pareja de unión natural para visualizar la actividad en los restos (y superficies) críticos; por mutagenia sucesiva de restos en la estructura secundaria para identificar funcionalmente la actividad en restos (y superficies) críticos, o por otros procedimientos. Mediante dichas determinaciones, los aminoácidos apropiados se sustituyen por los análogos de aminoácidos y los enlazadores de la invención que forman macrociclos. Por ejemplo, para una estructura secundaria α -helicoidal, una superficie de la hélice (por ejemplo, una superficie molecular se extiende longitudinalmente a lo largo del eje de la hélice y de radialmente 45 a 135 alrededor del eje de la hélice)

puede que se necesite que haga contacto con otra biomolécula *in vivo* o *in vitro* para la actividad biológica. En tal caso, se diseña un enlazador formador de macrociclo para unir dos carbonos α de la hélice, mientras que se extiende longitudinalmente a lo largo de la superficie de la hélice en la parte de esta superficie no necesaria directamente para la actividad.

5 En algunas formas de realización de la invención, la secuencia peptídica procede de la familia BCL-2 de proteínas. La familia BCL-2 se define por la presencia de hasta cuatro dominios de homología (BH) BCL-2 conservados denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, todos los cuales incluyen segmentos helicoidales α (Chittenden *et al.*(1995). *EMBO*14:5589; Wang *et al.*(1996), *Genes Dev.* 10:2859). Las proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-2 y BCL-X_L, presentan la conservación de la secuencia en todos los dominios BH. Las proteínas proapoptóticas se dividen en miembros de la familia "multidominio" (por ejemplo, BAK, BAX), que poseen una homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, y miembros de la familia "dominio BH3 sólo" (por ejemplo, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA), que contiene una homología de secuencia exclusivamente en los miembros de la familia BCL-2 del segmento BH3 α -helicoidal anfipático tienen capacidad para formar homodímeros y heterodímeros, lo que sugiere que la unión competitiva y la relación entre los niveles de proteína pro-y antiapoptótica prescribe sensibilidad a los estímulos de muerte. Las proteínas antiapoptóticas funcionan para proteger las células del exceso proapoptótico, es decir, muerte celular programada excesiva. Las medidas de "seguridad" adicionales incluyen la regulación de la transcripción de proteínas proapoptóticas y su mantenimiento como conformadores inactivos, lo que requiere la activación proteolítica, desfosforilación, o cambio de configuración inducido por ligandos para activar las funciones promuerte. En determinados tipos de células, las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática desencadenan la apoptosis a través de una ruta mitocondrial. Las mitocondrias pueden servir como un guardián de la muerte celular al secuestrar el citocromo c, un componente crítico de un complejo citosólico que activa la caspasa 9, lo que conduce a episodios proteolíticos mortales corriente abajo. Las proteínas multidominio como BCL-2/BCL-X_L y BAK/BAX desempeñan funciones de duelo de guardián y verdugo en la membrana mitocondrial, con sus actividades más reguladas por los miembros BH3 sólo corriente arriba de la familia BCL-2. Por ejemplo, BID es un miembro de la familia de dominio BH3 sólo de proteínas proapoptóticas, y transmite señales de muerte recibidas en la membrana plasmática para las proteínas proapoptóticas efectoras en la membrana mitocondrial. BID tiene capacidad para interactuar con las proteínas pro-y antiapoptóticas, y tras la activación de la caspasa 8, desencadena la liberación de citocromo c y la apoptosis mitocondrial. Estudios de eliminación y mutagenia determinaron que el segmento BH3 α -helicoidal anfipático de los miembros de la familia proapoptótica puede funcionar como un dominio de muerte y por lo tanto pueden representar un motivo estructural crítico para la interacción con las proteínas apoptóticas multidominio. Estudios estructurales han demostrado que la hélice BH3 puede interactuar con proteínas antiapoptóticas mediante la inserción en una ranura hidrófoba formada por la interfaz de los dominios BH1, 2 y 3. El BID activado puede estar unido y secuestrado por proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, BCL-2 y BCL-X_L) y puede desencadenar la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, que conducen a la liberación del citocromo c y un programa de apoptosis mitocondrial. BAD es también un dominio BH3 sólo miembro de la familia proapoptótica cuya expresión desencadena la activación de BAX/BAK. Al contrario que BID, sin embargo, BAD muestra unión preferencial a los miembros de la familia antiapoptótica, BCL-2 y BCL-X_L. Mientras que el dominio BH3 de BAD presenta una alta afinidad de unión a BCL-2, el péptido BAD BH3 es incapaz de activar la liberación del citocromo c de la mitocondria *in vitro*, lo que sugiere que BAD no es un activador directo de BAX/BAK. Las mitocondrias que sobre-expresan BCL-2 son resistentes a la liberación del citocromo c inducida por BID, pero el tratamiento conjunto con BAD puede restaurar la sensibilidad al BID. La inducción de la apoptosis mitocondrial por BAD parece resultar de: (1) desplazamiento de activadores BAX/BAK, tales como BID y proteínas similares a BID, de la bolsa de la unión BCL-2/BCL-XL, o (2) ocupación selectiva de la bolsa de unión BCL-2/BCL-XL por BAD para evitar el secuestro de proteínas similares a BID por proteínas antiapoptóticas. Por lo tanto, dos clases de proteínas solamente con dominio BH3 han surgido, proteínas similares a BID que activan directamente la apoptosis mitocondrial, y las proteínas similares a BAD, que tienen capacidad de sensibilizar mitocondrias para proapoptóticos ocupando las bolsas proteínas antiapoptóticas de multidominios. Se han descrito varios dominios α -helicoidales de proteínas miembros de la familia BCL-2 dispuestas para la metodología descrita en este documento (Walensky *et al.* (2004), *Science* 305:1466; y Walensky *et al.*, Publicación de patente US n° 2005/0250680).

En otras formas de realización, la secuencia peptídica procede de la proteína p53 supresora tumoral que se une a la proteína MDM2 del oncogén. El punto de unión de MDM2 se localiza dentro de una región del supresor tumoral p53 que forma una hélice α . En patente de EE.UU. n° 7.083.983, Lane *et al.* dan a conocer que la región de P53 responsable de la unión a MDM2 está representada aproximadamente por los aminoácidos 13 a 31 (PLSQETFSDLWKLLPENNV) de la proteína p53 humana madura. Otras secuencias modificadas dadas a conocer por Lane también se contemplan en la presente invención. Además, la interacción de p53 y MDM2 ha sido expuesta por Shair *et al.* (1997), *Chem. & Biol.* 4:791, y las mutaciones en el gen p53 se han identificado en casi la mitad de todos los casos de cáncer publicados. A medida que se imponen tensiones en una célula, se cree que p53 dispone una respuesta que conduce a la interrupción del ciclo celular y la reparación del ADN, o a la muerte celular programada. Así como las mutaciones en el gen p53 que alteran la función de la proteína p53 directamente, p53 puede alterarse por cambios en MDM2. Se ha demostrado que la proteína MDM2 se une a p53 e interrumpe la activación de la transcripción mediante la asociación con el dominio de transactivación de p53. Por ejemplo, un péptido de 11 aminoácidos procedente del dominio de transactivación de p53 forma una hélice α anfipática de 2,5 espiras que se inserta en la hendidura de MDM2. Así, en algunas formas de realización, las nuevas estructuras de la

5 hélice α generadas por el procedimiento de la presente invención se modifican genéticamente para generar estructuras que se unen fuertemente al receptor de hélice e interrumpen las interacciones naturales proteína-proteína. Estas estructuras se detectan a continuación utilizando técnicas de alto rendimiento para identificar péptidos óptimos de moléculas pequeñas. Las nuevas estructuras que interrumpen la interacción con MDM2 son
 10 útiles para muchas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse al, control de sarcomas de tejidos blandos (que sobreexpresa MDM2 en la presencia de p53 natural). Estos cánceres entonces, en algunas formas de realización, se mantienen en observación con moléculas pequeñas que interceptan MDM2, evitando de este modo la supresión de p53. Además, en algunas formas de realización, las moléculas pequeñas perturbadoras de las interacciones p53-MDM2 se utilizan como terapia adyuvante para ayudar a controlar y modular la amplitud de la respuesta a la apoptosis dependiente de p53 en quimioterapia convencional.

Un ejemplo de listado no limitativo de secuencias peptídicas adecuadas para su utilización en la presente invención es proporcionado a continuación:

15

TABLA 1

Denominación	Secuencia (negrita = restos críticos)	Secuencia reticulada (\underline{X} = resto reticulado)
Péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNLARHLAQVGDSMDRSIPP	QEDIIRNIARHLA \underline{X} VGD \underline{X} MDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYAR	DNRPEIWIAQELR \underline{X} MSD \underline{X} FNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMSDEFDSFKK	NLWAAQRYGREL \underline{X} MSD \underline{X} FVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREIGAQLR \underline{X} MAD \underline{X} LNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKALGDELHQRTM	RSSAAQLTAARLK \underline{X} LGD \underline{X} LHQRTM
NOXAA BH3-	AELPPEFAAQLRKIGDKVYCTW	AELPPEFAAQLR \underline{X} IGD \underline{X} VYCTW
NOXAB BH3-	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLRQKL	VPADLKDECAQLR \underline{X} IGD \underline{X} VNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHRLHT	QHRAEVQIARKLQ \underline{X} IAD \underline{X} FHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKALGDELHQRT	SSAAQLTAARLK \underline{X} LGD \underline{X} LHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIGDEMDVSLRA	CMEGSDALALRLA \underline{X} IGD \underline{X} MDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILKKNSDWTWDWSS	DIERRKEVESILK \underline{X} NSD \underline{X} IWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRLGDELEMIRP	GRLAEVCAVLL \underline{X} LGD \underline{X} LEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIGDELDSNMEL	PQDASTKKSECLK \underline{X} IGD \underline{X} LDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLIIGDDINRR	PSSTMGQVGRQLA \underline{X} IGD \underline{X} INRR
BCL2L1 BH3-	KQALREAGDEFELR	KQALR \underline{X} AGD \underline{X} FELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAGDDFSRR	LSPPVVHLALALR \underline{X} AGD \underline{X} FSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAVKQALR \underline{X} AGD \underline{X} FELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPLHQAMR \underline{X} AGD \underline{X} FETRF
MCL1 BH3-	ATSRKLETLLRRVGDGVQRNHETA	ATSRKLETLLR \underline{X} VGD \underline{X} VQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRLGDELEQIR	LAEVCTVLL \underline{X} LGD \underline{X} LEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGSLDP	MTVGELSRALG \underline{X} ENG \underline{X} LDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKEVEALK \underline{X} SAD \underline{X} VSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQGDDRMKL	SMARDPQRYLV \underline{X} QGD \underline{X} RmKL

La Tabla 1 presenta secuencias humanas que se dirigen al punto de unión de BH3 y están implicadas en cánceres, trastornos autoinmunitarios, enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.

TABLA 2

Denominación	Secuencia (negrita = restos críticos)	Secuencia reticulada (X= resto reticulado)
Péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQVGDSDRSIPP	QEDIIRNI <u>X</u> BSR <u>X</u> QVGDSDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIQAQLRRIGDEFNAYYAR	DNRPEIWI <u>X</u> QEL <u>X</u> RIGDEFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	NLWAAQRY <u>X</u> REL <u>X</u> RMSDEFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER.	EEQWAREI <u>X</u> AQL <u>X</u> RMADDLNAQYER
HRK-BH3	RSSAAQLTAARLKALGDELHQRTM	RSSAAQLT <u>X</u> ARL <u>X</u> ALGDELHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIGDKVYCTW	AELPPEF <u>X</u> AQL <u>X</u> KIGDKVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLRQKL	VPADLKDE <u>X</u> AQL <u>X</u> RIGDKVNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHLHT	QHRAEVQI <u>X</u> RKL <u>X</u> CIADQFHLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKALGDELHQRT	SSAAQLT <u>X</u> ARL <u>X</u> ALGDELHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIGDEMDVSLRA	CMEGSDAL <u>X</u> LRL <u>X</u> CIGDEMDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILKKNSDWIWDWSS	DIERRKEV <u>X</u> SIL <u>X</u> KKNSDWIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRLGDELEMIRP	GRLAEV <u>X</u> AVL <u>X</u> RLGDELEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIGDELDSNMEL	PQDASTKK <u>X</u> ECL <u>X</u> RIGDELDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAIIGDDINRR	PSSTMGQV <u>X</u> RQL <u>X</u> IIGDDINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAGDEFELR	<u>X</u> QAL <u>X</u> EAGDEFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAGDDFSRR	LSPPVVHL <u>X</u> LAL <u>X</u> QAGDDFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAV <u>X</u> QAL <u>X</u> EAGDEFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPL <u>X</u> QAM <u>X</u> AAGDEFETRF
MCL1 BH3-	ATSRKLETLRRVGDGVQRNHETA	ATSRK <u>X</u> ETL <u>X</u> RVGDGVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRLGDELEQIR	LAEV <u>X</u> TVL <u>X</u> RLGDELEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGLDP	MTVGEL <u>X</u> RAL <u>X</u> HENGLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKE <u>X</u> EAL <u>X</u> KSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQGDDRMKL	SMARDP <u>X</u> RYL <u>X</u> IQGDDRMKL

La Tabla 2 presenta secuencias humanas que se dirigen al punto de unión de BH3 y están implicadas en cánceres, trastornos autoinmunitarios, enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.

TABLA 3

Denominación	Secuencia (negrita = restos críticos)	Secuencia reticulada (<u>X</u> = resto reticulado)
Péptidos P53		
Péptido hp53 muy corto	LSQETFSDLWKLLPEN	<u>X</u> SQEXFSDLWKLLPEN
Péptido hp53 corto	PPLSQETFSDLWKLLPEN	PP <u>X</u> SQEXFSDLWKLLPEN
péptido hp53-P27S corto	PPLSQETFSDLWKLLSENN	PP <u>X</u> SQEXFSDLWKLLSENN
Péptido hp53 largo	DPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLP	DPSVEPP <u>X</u> SQEXFSDLWKLLPENNVLSPLP
Péptido hp53-P27S largo	DPSVEPPLSQETFSDLWKLLSENNNVLSPLP	DPSVEPP <u>X</u> SQEXFSDLWKLLSENNNVLSPLP
Péptido hp53 muy corto	LSQETFSDLWKLLPEN	LSQETFSDLW <u>X</u> LLP <u>X</u> N
Péptido hp53 corto	PPLSQETFSDLWKLLPEN	PPLSQETFSDLW <u>X</u> LLP <u>X</u> NN
Péptido hp53-P27S corto	PPLSQETFSDLWKLLSENN	PPLSQETFSDLW <u>X</u> LLS <u>X</u> NN
Péptido hp53 largo	DPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDLW <u>X</u> LLP <u>X</u> NNNVLSPLP
Péptido hp53-P27S largo	DPSVEPPLSQETFSDLWKLLSENNNVLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDLW <u>X</u> LLS <u>X</u> NNNVLSPLP

La Tabla 3 presenta secuencias humanas que tienen como objetivo el sitio de unión de p53 de MDM2/X y están implicados en cánceres.

TABLA 4

Denominación	Secuencia (negrita = restos críticos)	Secuencia reticulada (<u>X</u> = resto)
Ligandos del péptido GPCR		
Angiotensina II	DRVYIHPF	DR <u>X</u> Y <u>X</u> HPF
Bombesina	EQRLGNQWAVGHLM	EQRLGN <u>X</u> WAVGH <u>X</u>
Bradiquinina	RPPGFSPFR	RPP <u>X</u> FSPFR <u>X</u>
C5a	ISHKDMQLGR	ISHKDM <u>X</u> LGR <u>X</u>
C3a	ARASHLGLAR	ARASHL <u>X</u> LAR <u>X</u>
hormona estimulante de melanocitos α	SYSMEHFRWGKPV	SYSM <u>X</u> BFRW <u>X</u> KPV

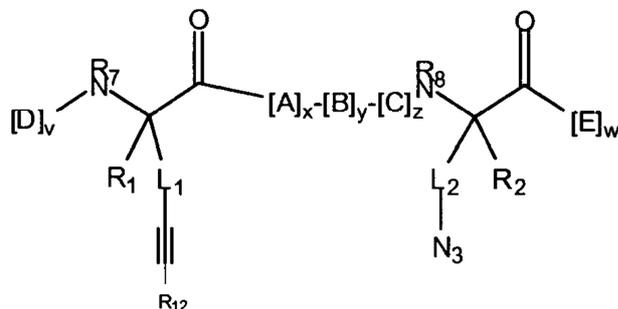
La Tabla 4 presenta secuencias que tienen como objetivo humano receptores acoplados a la proteína G y están implicadas en numerosas enfermedades humanas (Tyndall *et al.* (2005), *Chan. Rev.* 105:793-826).

Procedimientos de preparación de los macrociclos peptidomiméticos de la invención

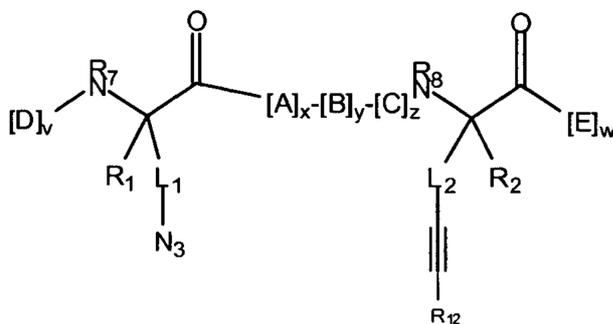
- 5 En la presente memoria se describen procedimientos de síntesis de los macrociclos peptidomiméticos de la invención. En las formas de realización, la síntesis de estos macrociclos peptidomiméticos implica un proceso en múltiples pasos que presenta la síntesis de un precursor peptidomimético que contiene una porción de azida y una porción de alquino; seguido de la puesta en contacto del precursor peptidomimético con un reactivo de
- 10 macrociclación para generar un macrociclo peptidomimético unido a triazol. Los macrociclos o los precursores de macrociclos se sintetizan, por ejemplo, por procedimientos en fase de solución o en fase sólida, y puede contener tanto los aminoácidos naturales como de origen sintético. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids" in Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids editado por G.C. Barrett, Chapman and Hall, 1985.
- 15 En algunas formas de realización, una azida está unida al carbono α de un resto y un alquino está unido al carbono α de otro resto. En algunas formas de realización, las porciones azida son análogos azido de los aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina, alfa-metil-D-lisina, L-ornitina, D-ornitina, alfa-metil-L-ornitina o alfa-metil-D-ornitina. En otra forma de realización, la porción alquino es L-propargilglicina. Aún en otras formas de realización, la porción alquino es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico y ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico.
- 20

En algunas formas de realización, la invención proporciona un procedimiento para sintetizar un macrociclo peptidomimético, el procedimiento comprende las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV:

5



(Fórmula III)



(Fórmula IV)

10 con un reactivo de macrociclación;

en las que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ son como se ha definido anteriormente; R₁₂ es -H cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu y R₁₂ es -H o alquilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru, y además en el que dicha etapa de puesta en contacto da como resultado un enlace covalente formado entre el alquino y la porción azida en la fórmula III o fórmula IV. Por ejemplo, R₁₂ puede ser metilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru.

15

En algunas formas de realización del procedimiento de la invención, por lo menos uno de entre R₁ y R₂ es alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-. En formas de realización relacionadas, R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-.

20

Por ejemplo, por lo menos uno de entre R₁ y R₂ puede ser alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, no sustituido o sustituido con halo-. En algunas formas de realización, al menos uno de entre R₁ y R₂ es metilo. En otras formas de realización, R₁ y R₂ son metilo. El reactivo de macrociclación puede ser un reactivo de Cu o un reactivo de Ru.

25

En algunas formas de realización, el precursor peptidomimético se purifica antes de la etapa de contacto. En otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético se purifica después de la etapa de contacto. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético se repliega después de la etapa de contacto. El procedimiento puede realizarse en solución, o, alternativamente, el procedimiento puede realizarse en un soporte sólido.

30

En la presente memoria también se concibe realizar el procedimiento de la invención en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. En algunas formas de realización, el procedimiento se realiza en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El procedimiento también se puede aplicar para sintetizar una biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

35

El macrociclo peptidomimético resultante de un procedimiento de la invención puede comprender una hélice α en disolución acuosa. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de estructura α -helicoidal en solución acuosa en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En algunas formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta un aumento de la estabilidad térmica en comparación

40

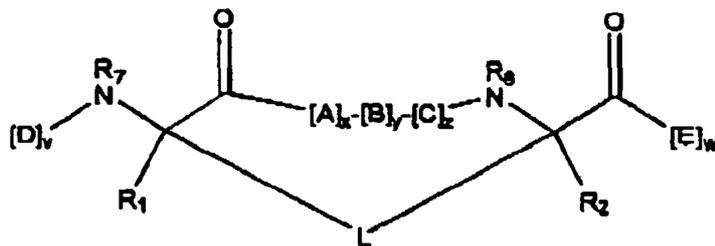
con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta un aumento de la actividad biológica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta un aumento de la resistencia a la degradación proteolítica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Aún en otras formas de realización, el macrociclo peptidomimético presenta un aumento de capacidad para penetrar en las células vivas en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico.

En algunas formas de realización, la porción alquino del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico y ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico. En otras formas de realización, la porción azida del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido- α -metil-L-lisina, ϵ -azido- α -metil-D-lisina, δ -azido- α -metil-L-ornitina y δ -azido- α -metil-D-ornitina.

En algunas formas de realización, $x+y+z$ es 3 y A, B y C son, independientemente, aminoácidos naturales o sintéticos. En otras formas de realización, $x+y+z$ es 6, y A, B, y C son aminoácidos independientemente naturales o sintéticos.

En algunas formas de realización, la etapa de contacto se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consta de disolvente prótico, disolvente acuoso, disolvente orgánico y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el disolvente puede seleccionarse de entre el grupo que consta de H₂O, THF, THF/H₂O, tBuOH/H₂O, DMF, DIPEA, CH₃CN o CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl o una mezcla de los mismos. El disolvente puede ser un disolvente que favorece la formación de la hélice.

El macrociclo peptidomimético procedente de realizar el procedimiento de la invención presenta la fórmula (I):



(Fórmula I)

en la que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈ y L son como se ha definido anteriormente.

Grupos alternativos pero protectores equivalentes, grupos salientes o reactivos están sustituidos y algunas de las etapas de síntesis se realizan en secuencias u órdenes alternativos para producir los compuestos deseados. Las transformaciones químicas de síntesis y metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, las descritas en Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2^a Ed., John Wiley and Sons (1991); Fieser y Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

Los macrociclos peptidomiméticos de la invención se fabrican, por ejemplo, por procedimientos de síntesis química, tal como se describe en Fields *et al.*, Capítulo 3 en Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, pág. 77. Por lo tanto, por ejemplo, los péptidos se sintetizan utilizando técnicas automáticas de Merrifield de síntesis en fase sólida con la amina protegida ya sea por la química de tBoc o de Fmoc utilizando aminoácidos protegidos en la cadena lateral, por ejemplo, en un sintetizador automático de péptidos (por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), modelo 430A, 431, o 433).

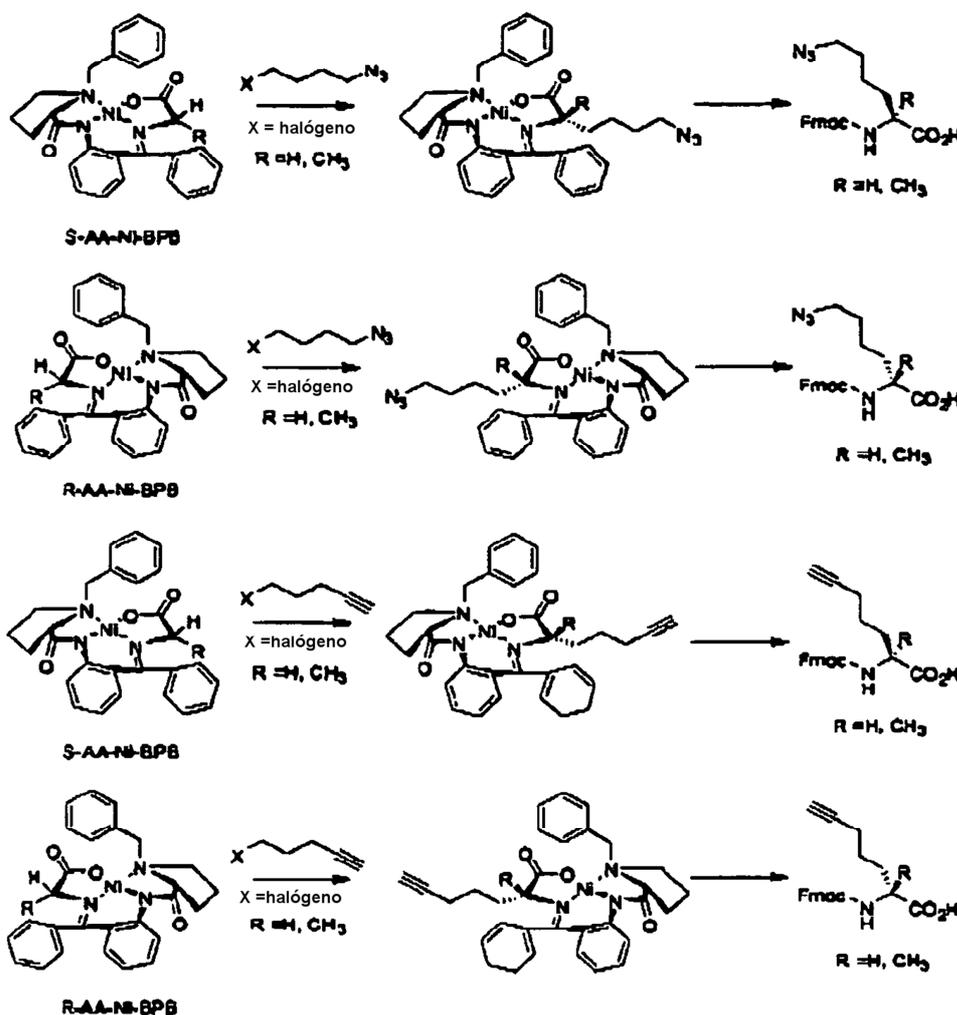
Una manera de producir los precursores peptidomiméticos y macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria utiliza la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS). El aminoácido del terminal C está unido a una resina de poliestireno reticulado por un enlace lábil en medio ácido con una molécula de enlace. Esta resina es insoluble en los disolventes utilizados para la síntesis, por lo que es relativamente sencillo y rápido lavar el exceso de reactivos y subproductos. El terminal N está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácido, pero desmontable por bases. Los grupos funcionales de las cadenas laterales están protegidos según sea necesario con grupos básicos estables o ácidos lábiles.

Los precursores peptidomiméticos más largos se producen, por ejemplo, combinando péptidos sintéticos individuales utilizando enlace químico natural. Alternativamente, se biosintetizan péptidos sintéticos más largos por técnicas bien conocidas de ADN recombinante y de expresión de proteínas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales estándares muy conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un precursor peptidomimético de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se traduce a la inversa para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que el gen se va a expresar. A continuación, se construye un gen sintético, por lo general sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y algunos elementos reguladores, en caso necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula anfitriona. El péptido se expresa entonces en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y el anfitrión. El péptido se purifica y caracteriza por procedimientos normalizados.

Los precursores de peptidomiméticos se preparan, por ejemplo, de modo combinatorio con alto rendimiento utilizando, por ejemplo, un sintetizador combinatorio policanal de alto rendimiento (por ejemplo, sintetizador de péptidos multicanal modelo Apex 396 de AAPPTEC, Inc., Louisville. KY).

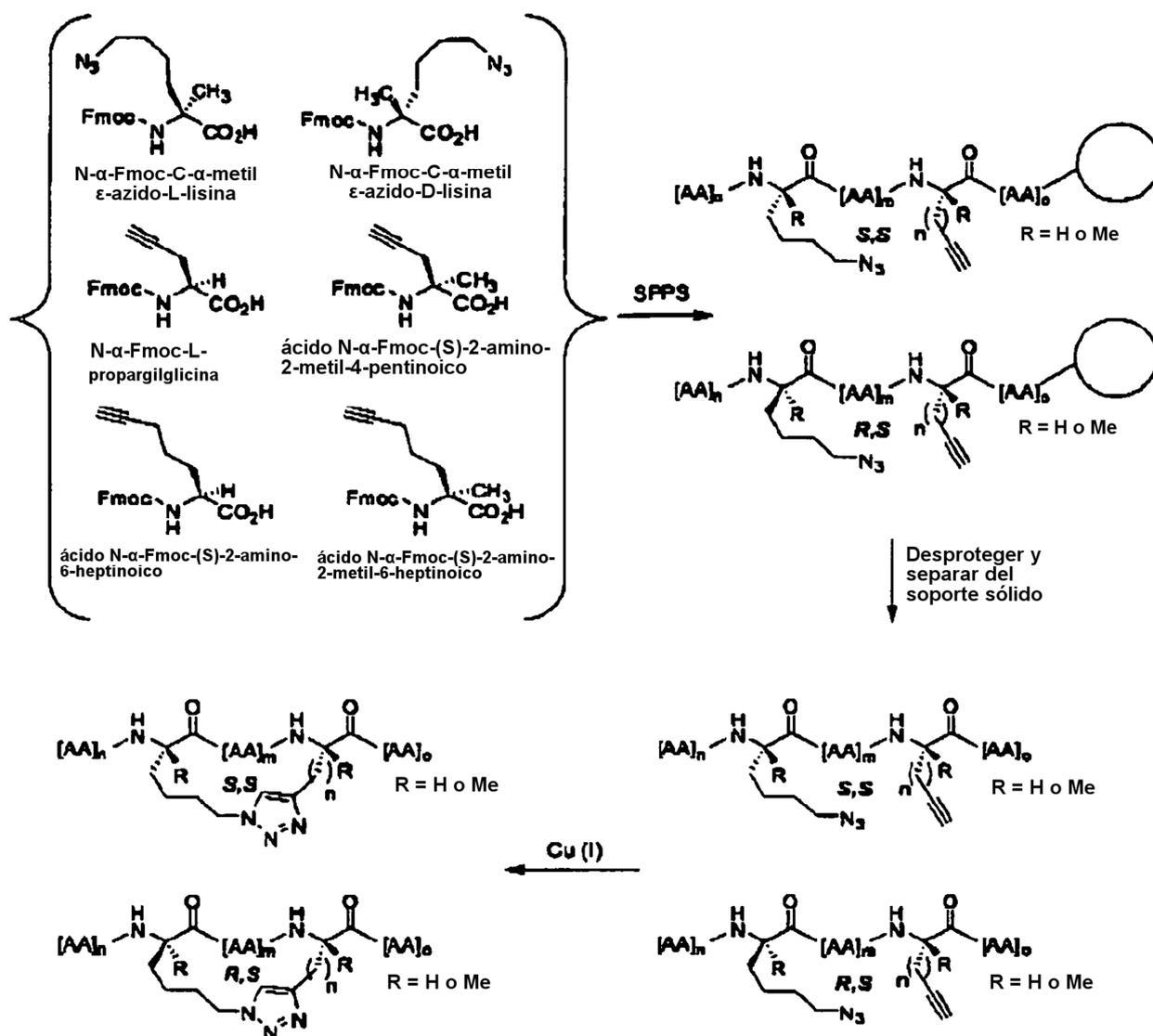
Los esquemas de síntesis siguientes se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención y no se pretende limitar el alcance de la invención, tal como se describe en la presente memoria. Para simplificar los dibujos, los esquemas ilustrativos describen análogos azido de aminoácidos ϵ -azido- α -metil-L-lisina y ϵ -azido- α -metil-D-lisina, y análogos alquino de aminoácidos L-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico y ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico. Esto, en los siguientes esquemas sintéticos, cada R_1 , R_2 , R_7 y R_8 es -H; cada L_1 es $-(CH_2)_4-$, y cada L_2 es $-(CH_2)-$. Sin embargo, como se observó a lo largo de la descripción detallada anterior, muchos otros análogos de aminoácidos se pueden emplear en los que R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , L_1 y L_2 puede seleccionarse independientemente de las diferentes estructuras dadas a conocer en la presente memoria.

Esquema de síntesis 1:



El Esquema de síntesis 1 describe la preparación de varios compuestos de la invención. Los complejos de Ni (II) de bases de Schiff derivadas de (S)-2-[N-(N'-bencilproilil)amino]benzofenona (BPB) quiral auxiliar y aminoácidos tales como glicina o alanina se preparan como se describe en Belokon *et al.* (1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252. Los complejos resultantes se hace reaccionar posteriormente con reactivos alquilantes que comprenden una porción azido o alquinilo para obtener compuestos enantioméricamente enriquecidos de la invención. Si se desea, los compuestos resultantes pueden protegerse para su utilización en la síntesis de péptidos.

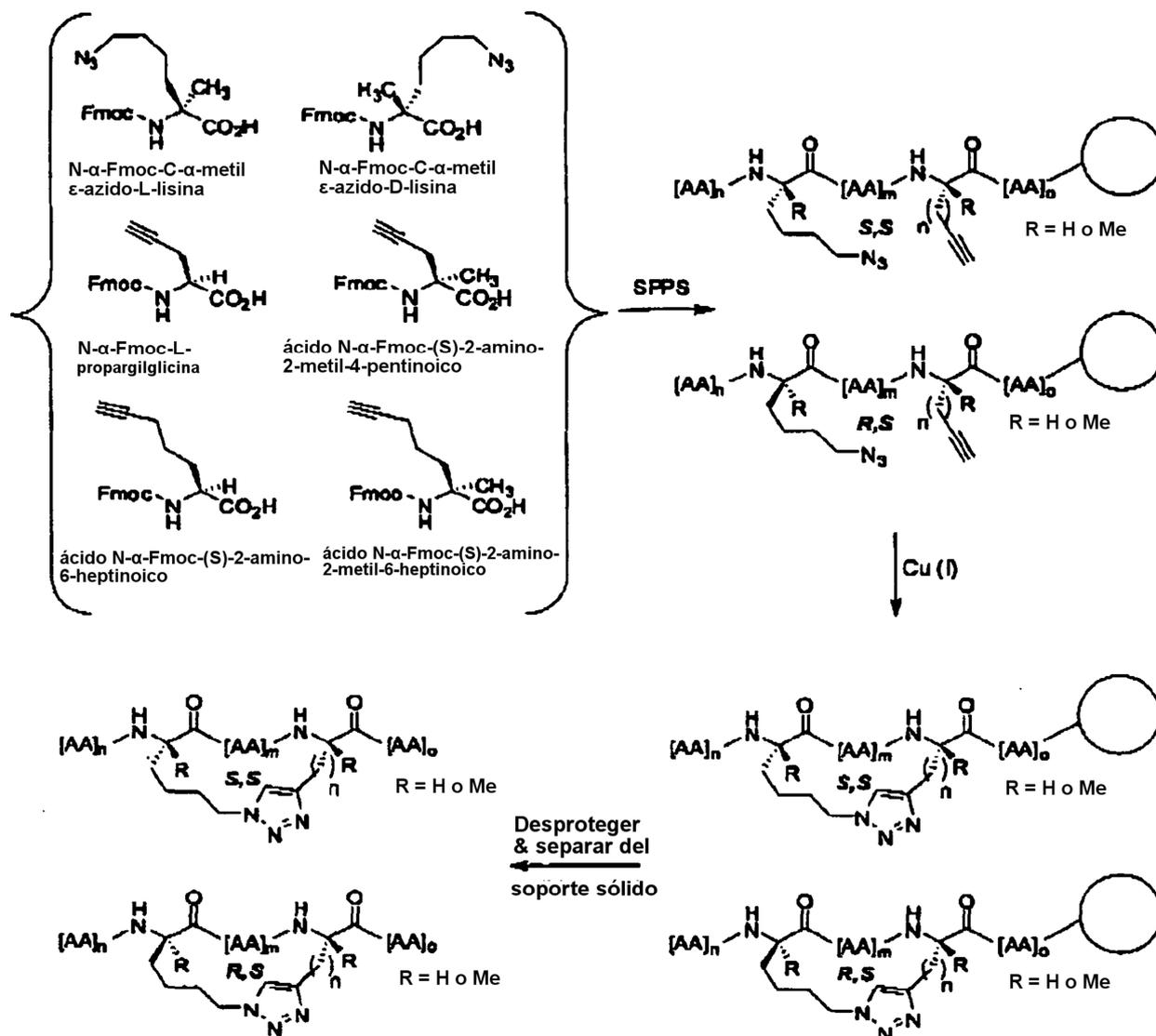
Esquema de síntesis 2



En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos que se muestran en el Esquema de síntesis 2, el precursor peptidomimético contiene una porción azida y una porción resto alquino y se sintetiza por síntesis en fase de solución o en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N-α-Fmoc-L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas por N-α-Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil-ε-azido-L-lisina y N-metil-ε-azido D-lisina. El precursor peptidomimético se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en condiciones estándar (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). El precursor peptidomimético se hace reaccionar como una mezcla en bruto o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Cu (I) en soluciones orgánicas o acuosas (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tornøe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Purma *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). En una forma de realización, la reacción para la formación de triazol se lleva a cabo en condiciones que favorecen la formación de la hélice α. En una forma de realización, la etapa de macrociclación se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo constituido por H₂O, THF, CH₃CN, DMF, DIPEA, tBuOH, o una mezcla de los mismos. En otra realización, la etapa de

macro ciclación se lleva a cabo en DMF. En algunas formas de realización, la etapa de macro ciclación se lleva a cabo en un tampón acuoso o un disolvente parcialmente acuoso.

Esquema de síntesis 3:

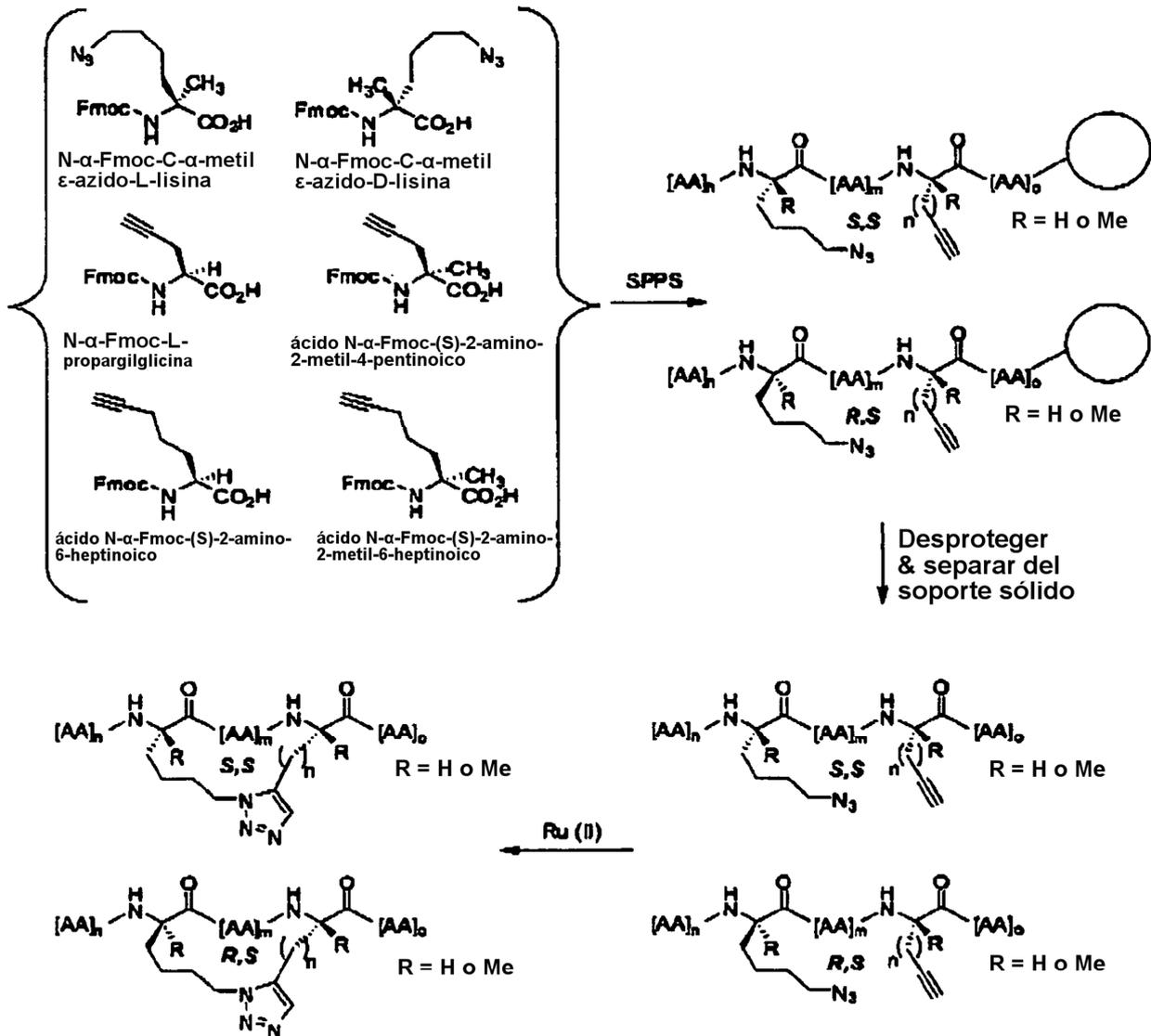


5

En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos que se muestran en el Esquema de síntesis 3, el precursor peptidomimético contiene una porción azida y una porción resto alquino y se sintetiza por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N-α-Fmoc-L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas con N-α-Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil-ε-azido-L-lisina y N-metil-ε-azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se hace reaccionar con un reactivo tal como un reactivo de macro ciclación tal como un reactivo de Cu (I) en la resina como una mezcla en bruto (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tomoe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Purma *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). El macrociclo peptidomimético que contiene triazol resultante se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en condiciones estándar (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). En algunas formas de realización, la etapa de macro ciclación se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl, DMF, THF, NMP, DIPEA, 2,6-lutidina, piridina, DMSO, H₂O o una mezcla de los mismos. En algunas formas de realización, la etapa de macro ciclación se lleva a cabo en un tampón acuoso o un disolvente parcialmente acuoso.

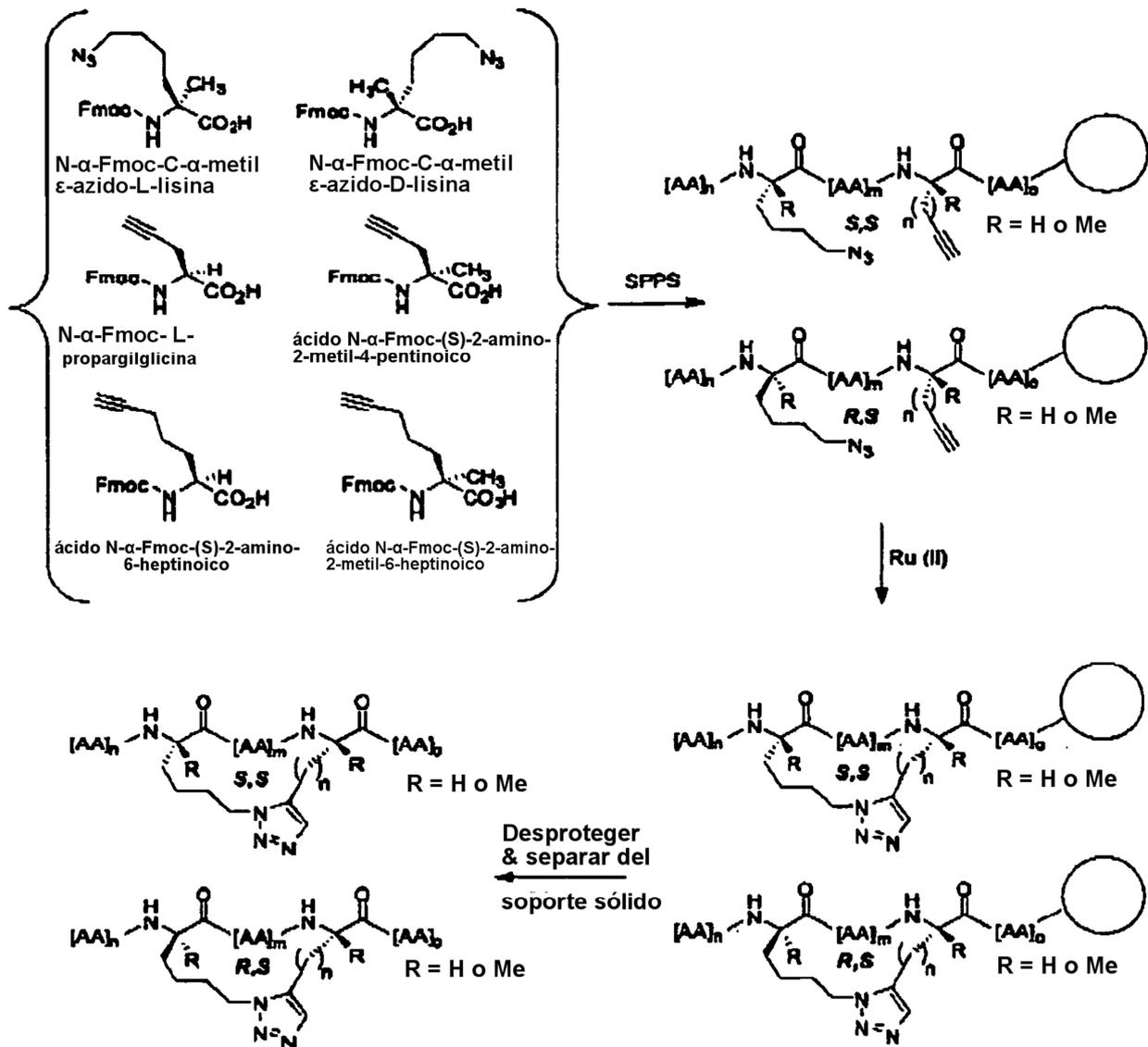
20

Esquema de síntesis 4:



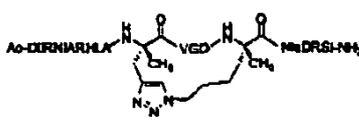
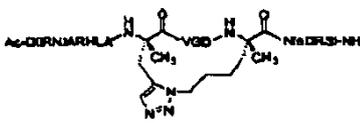
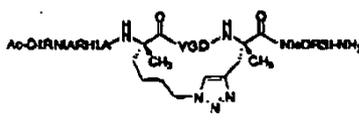
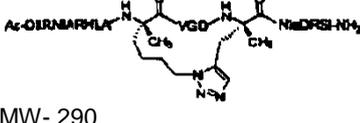
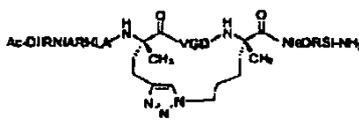
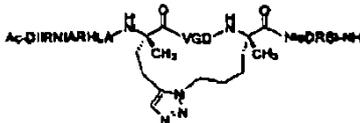
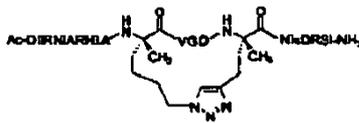
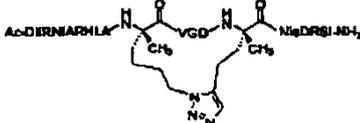
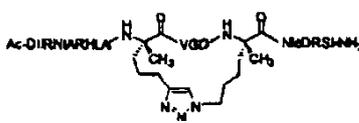
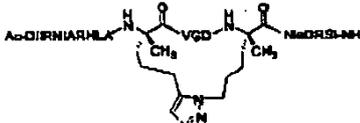
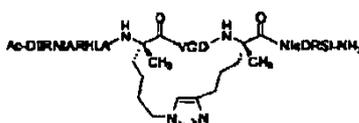
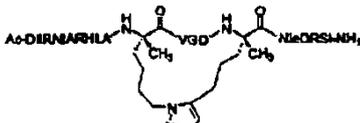
5 En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos mostrado en el Esquema de síntesis
 10 4, el precursor peptidomimético contiene una porción azida y una porción alquino y se sintetiza por síntesis de
 péptidos en fase de solución o en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido disponible en el mercado N-α-Fmoc-L-
 propargilglicina y las formas protegidas con N-α-Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico,
 ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, N-metil-ε-azido-L-lisina, y N-metil-ε-azido-D-
 lisina. El precursor peptidomimético se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en
 15 condiciones estándares (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). El precursor peptidomimético se hace
 reaccionar como una mezcla en bruto o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como
 reactivos de Ru (II), por ejemplo Cp^{*}RuCl (PPb₃)₂o [Cp^{*}RuCl]₄ (Rasmussen *et al.* (2007), *Org. Lett.* 9:5337-
 5339; Zhang *et al.* (2005). *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). En algunas formas de realización, la etapa de
 macrociclación se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en DMF, CH₃CN y THF.

Esquema de síntesis 5:



- 5 En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos mostrado en el Esquema de síntesis 5, el precursor peptidomimético contiene una porción azida y una porción alquino y se sintetiza por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N- α -Fmoc- L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas con N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se hace reaccionar con un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Ru (II) en la resina como una mezcla en bruto. Por ejemplo, el reactivo puede ser Cp* $\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ o [Cp* $\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen *et al.* (2007), *Org. Lett.* 9:5337-5339; Zhang *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). En algunas formas de realización, la etapa de macrociclación se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en CH_2Cl_2 , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, CH_3CN , DMF y THF.
- 10
- 15 En la Tabla 5 se muestran a título de ejemplo varios macrociclos peptidomiméticos. Para estos macrociclos, un polipéptido no macrocíclico correspondiente es el fragmento DILRNIAHLAQVGDSDMSDRSI de secuencia del polipéptido BID BH3. "Nle" representa norleucina y sustituye a un resto de metionina. Se prevé que los enlazadores similares se utilizan para sintetizar macrociclos peptidomiméticos basados en las secuencias de polipéptidos descritos en la Tabla 1 a la Tabla 4.
- 20

TABLA 5

	MW = 2464		MW = 2464
	MW = 2464		MW = 2464
	MW = 2478		MW = 2478
	MW = 2473		MW = 2478
	MW = 2482		MW = 2482
	MW = 2492		MW = 2492

La Tabla 5 muestra ejemplos de macrociclos peptidomiméticos de la invención. "Nle" representa norleucina.

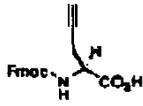
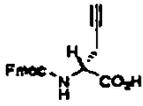
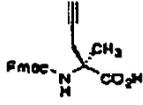
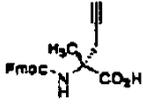
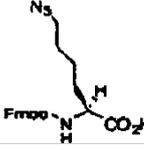
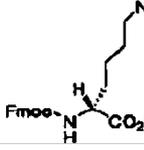
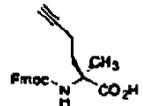
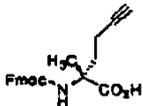
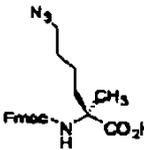
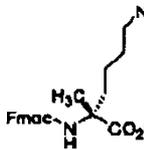
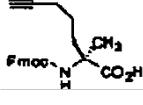
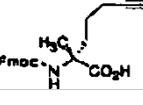
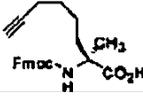
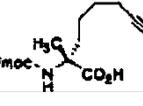
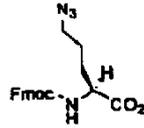
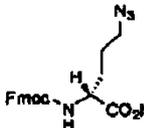
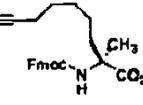
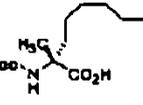
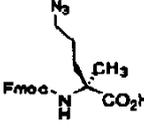
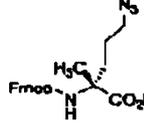
Aminoácido 5)

5

La presente invención comprende la utilización de aminoácidos sintéticos en la síntesis de los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria. Cualquier aminoácido susceptible de los procedimientos sintéticos empleados para la síntesis de triazol estable que contiene macrociclos peptidomiméticos se puede utilizar en la presente invención. Por ejemplo, L-propargilglicina se contempla como un aminoácido útil en la presente invención. Sin embargo, otros aminoácidos que contienen alquino que contienen una cadena lateral diferente de aminoácidos son también útiles en la invención. Por ejemplo, L-propargilglicina contiene una unidad de metileno entre el carbono α del aminoácido y el alquino de la cadena lateral del aminoácido. La invención también contempla la utilización de aminoácidos con múltiples unidades de metileno entre el carbono α y el alquino. Además, los análogos azido de los aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina, y alfa-metil-D-lisina, se contemplan como aminoácidos útiles en la presente invención. Sin embargo, otros aminoácidos con azida terminal que contienen una diferente cadena lateral de aminoácidos son también útiles en la invención. Por ejemplo, el análogo azido de L-lisina contiene cuatro unidades de metileno entre el carbono α del aminoácido y la azida terminal de la cadena lateral de aminoácidos. La invención también contempla la utilización de aminoácidos con menos de o más de cuatro unidades de metileno entre el carbono α y la azida terminal. La tabla 6 muestra algunos aminoácidos útiles en la preparación de macrociclos peptidomiméticos de la invención.

20

TABLA 6

			
N- α -Fmoc-L-propargilglicina	N- α -Fmoc-D-propargilglicina		
			
Ácido N- α -Fmoc-(5)-2-amino-2-metil-4-pentinoico	Ácido N- α -Fmoc-(R)-2-amino-2-metil -4-pentinoico	N- α -Fmoc- ϵ -azido-L-lisina	N- α -Fmoc-azido-D-lisina
			
Ácido N- α -Fmoc-(Q)-2-amino-2-metil -5-hexinoico	Ácido N- α -Fmoc-(R)-2-amino-2-metil -5-hexinoico	N- α -Fmoc-azido- α -metil -L-lisina	N- α -Fmoc--azido- α -metil -D-lisina
			
Ácido N- α -Fmoc-(5)-2-amino-2-metil-6-heptinoico	Ácido N- α -Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-heptinoico		
			
Ácido N- α -Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-7-octinoico	Ácido N- α -Fmoc-(R)-2-amino-2-metil -7octinoico	N- α -Fmoc- δ -2-azido-L-ornitina	N- α -Fmoc- δ -2-azido-D-ornitina
			
Ácido N- α -Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-noninoico	Ácido N- α -Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-5-noninoico	N- α -Fmoc-azido- α -metil-L-ornitina	N- α -Fmoc--azido- α -metil -D-ornitina

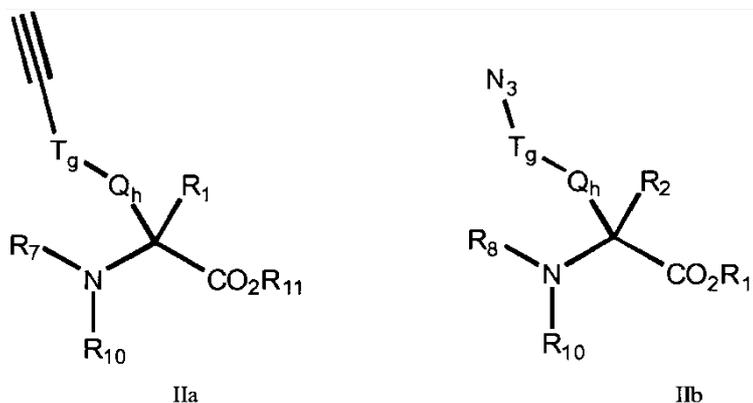
La Tabla 6 muestra ejemplos de aminoácidos útiles en la preparación de macrociclos peptidomiméticos de la invención.

5 En algunas formas de realización, los aminoácidos presentan la configuración D. En otras formas de realización presentan la configuración L. En algunas formas de realización, algunos de los aminoácidos contenidos en el peptidomimético presentan la configuración D, mientras que algunos de los aminoácidos presentan la configuración L. En algunas formas de realización, los aminoácidos 5 están α , α -disustituidos, tales como α -metil-L-propargilglicina, α -metil-D-propargilglicina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina y ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina. En algunas formas de realización, los aminoácidos 5 están N-alquilados, por ejemplo, N-metil-L-propargilglicina, N-metil-D-propargilglicina, N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ azido-D-lisina.

10

En algunas formas de realización, la porción NH del aminoácido está protegida con un grupo protector, incluyendo, sin limitación -Fmoc y Boc-. En otras formas de realización, el aminoácido no está protegido antes de la síntesis del macrociclo peptidomimético.

- 5 En algunas formas de realización, un aminoácido útil en la síntesis del macrociclo peptidomimético de la invención es un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



en las que

- 10 R_1 y R_2 son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

15 cada Q y T es independientemente alquileno;

- 15 R_7 y R_8 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

20 R_{10} y R_{11} son independientemente -H o cualquier grupo protector adecuado para la síntesis de péptidos; y

20 g y h son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5, en el que g + h es mayor de 1.

25 En algunas formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo, insustituido o sustituido con halo-. En otras formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula IIb y R_2 es alquilo, insustituido o sustituido con halo-. Aún en otras formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo insustituido. Por ejemplo, R_1 puede ser metilo. Aún en otras formas de realización, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIb y R_2 es alquilo insustituido. Por ejemplo, R_2 puede ser metilo.

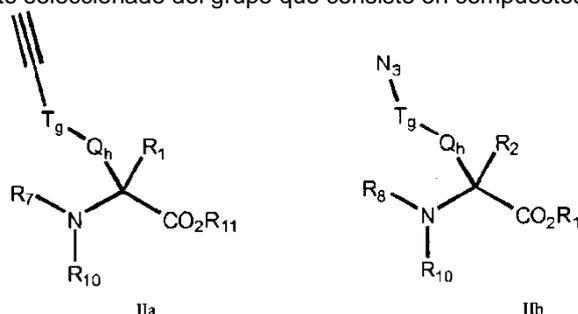
30 En algunas formas de realización de los compuestos de la invención, al menos uno de entre R_9 y R_{10} es un grupo protegido adecuado para la síntesis de péptidos.

Kits

35 Se describen kits que comprenden compuestos de fórmula IIa o IIb u otros análogos de aminoácidos útiles en la preparación de los macrociclos peptidomiméticos de la invención junto con los reactivos de macrociclación descritos en la presente memoria.

En algunas formas de realización, la invención proporciona un kit que comprende:

- 40 a) por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de las fórmulas IIa y IIb:



en las que

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

5 cada Q y T es independientemente alqueno;

R₇ y R₈ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

10 R₁₀ y R₁₁ son independientemente -H o cualquier grupo protector adecuado para la síntesis de péptidos;

g y h son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5; y

b) un reactivo de macrociclación.

15 En algunos casos, el kit comprende un compuesto de fórmula IIa y R₁ es alquilo insustituido, o sustituido con halo-. En los casos relacionados, R₁ es alquilo insustituido. Por ejemplo, R₁ puede ser metilo. En otros casos, el kit comprende un compuesto de fórmula IIb y R₂ es alquilo insustituido, o sustituido por halo-. En los casos relacionados, R₂ es alquilo insustituido. Por ejemplo, R₂ puede ser metilo.

20 En algunos casos, un kit comprende por lo menos un compuesto de fórmula IIa y por lo menos un compuesto de Fórmula IIb. Un kit como se ha descrito también puede comprender un compuesto de fórmula IIa o fórmula IIb en el que al menos uno de R₉ y R₁₀ es un grupo protegido adecuado para la síntesis de péptidos. En casos específicos del kit descrito en la presente memoria, el reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu o un reactivo de Ru. En algunos casos, el kit contiene un gran número de compuestos de fórmula IIa y/o fórmula IIb. En algunos casos, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más análogos de aminoácidos tal como se describe en la presente memoria. En otros casos, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más reactivos de macrociclación como se describe en la presente memoria. En otros casos, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más análogos de aminoácidos tal como se describe en la presente memoria, así como uno o más recipientes que contienen uno o más reactivos de macrociclación como se describe en la presente memoria.

35 Por ejemplo, en algunos casos, el kit comprende un recipiente que contiene al menos dos análogos de aminoácidos, como se describió anteriormente, teniendo al menos uno un alquino de cadena lateral y teniendo al menos uno una porción azida en el terminal de la cadena lateral, el análogo de aminoácido opcionalmente protegido y adecuado para las síntesis descritas en la presente memoria. En algunos casos, el análogo de aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico ácido, ε-azido-L-lisina, ε-azido-D-lisina, ε-azido-α-metil-L-lisina y ε-azido-α-metil-D-lisina, δ-azido-α-metil-L-ornitina, y δ-azido-α-metil-D-ornitina y todas las formas adecuadamente protegidas para la síntesis de péptidos en fase líquida o sólida.

45 En algunos casos, el kit comprende un recipiente que contiene al menos un aminoácido sintético, o análogo de aminoácido, unido a un soporte sólido compatible con las síntesis descritas en la presente memoria para macrociclos peptidomiméticos. En algunos casos, el kit comprende un recipiente que contiene un análogo de aminoácido de la invención que incluye una porción alquino terminal en combinación con un recipiente que contiene análogos de aminoácidos de la invención que incluyen una porción azida terminal en combinación con un reactivo de macrociclación de la invención.

50 Ensayos

Las propiedades de los macrociclos peptidomiméticos de la invención se ensayan, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos a continuación. En algunas formas de realización, un macrociclo de la invención tiene propiedades mejoradas en relación con un correspondiente polipéptido no macrocíclico. Un polipéptido no macrocíclico correspondiente es, por ejemplo, un precursor de un macrociclo peptidomimético, tal como un compuesto de fórmula III o IV, que se convierte en dicho macrociclo. Alternativamente, un polipéptido no macrocíclico correspondiente es una secuencia de polipéptido, tal como una secuencia de polipéptido natural que tiene una superposición sustancial de secuencia con el macrociclo de la invención. Numerosos ejemplos de polipéptidos naturales que corresponden con el polipéptido macrocíclico se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

65 En general, un polipéptido no macrocíclico correspondiente puede ser también un polipéptido natural o precursor peptidomimético marcado. Dicho marcaje, por ejemplo, mediante marcaje fluorescente o radioactivo, se utiliza si es necesario en algunos de los ensayos descritos a continuación. En dichos ensayos, tanto el macrociclo como el correspondiente polipéptido no macrocíclico por lo general se marcan por procedimientos similares o funcionalmente equivalentes.

Ensayo para determinar helicidad α

5 En solución, la estructura secundaria de polipéptidos con dominios α -helicoidales alcanzará un equilibrio dinámico entre las estructuras en espiral aleatoria y las estructuras α -helicoidales, expresado a menudo como "helicidad por ciento". Así, por ejemplo, los dominios BH3 proapoptóticos no modificados son espirales principalmente aleatorias en solución, con contenido α -helicoidal generalmente inferior al 25%. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados, por otro lado, poseen, por ejemplo, una helicidad alfa que es por lo menos dos veces mayor que la de un polipéptido no macrocíclico correspondiente. En algunas formas de realización, los macrociclos de la invención poseerán una alfa-helicidad mayor del 50%. Para ensayar la helicidad de los macrociclos peptidomiméticos de la invención, tales como los macrociclos basados en el dominio BH3, los compuestos se disuelven en una solución acuosa (por ejemplo, solución 50 mM de fosfato de potasio a pH 7, o H₂O destilada, a concentraciones de 25-50 mM). Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) utilizando parámetros estándar de medición (por ejemplo, temperatura 20°C; longitud de onda, 190-260 nm; resolución de etapa, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 seg; anchura de banda, 1 nm; longitud de trayectoria, 0,1 cm). El contenido α -helicoidal de cada péptido se calcula dividiendo la elipticidad media residual (por ejemplo, $[\Phi]$ 222obs) por el valor señalado para un decapeptido de modelo helicoidal (Yang *et al.*(1986), *Methods Ezymol.*130:208)).

20 Ensayo para determinar la temperatura de fusión (T_m)

Un macrociclo peptidomimético de la invención que comprende una estructura secundaria tal como una hélice α , presenta, por ejemplo, una temperatura de fusión superior que un polipéptido no macrocíclico correspondiente. Por lo general los macrociclos peptidomiméticos de la invención presentan una T_m > 60°C lo que representa una estructura muy estable en soluciones acuosas. Para ensayar el efecto de la formación de macrociclos sobre la temperatura de fusión, macrociclos peptidomiméticos o péptidos no modificados se disuelven en H₂O destilada (por ejemplo, a una concentración final de 50 mM) y la T_m se determina midiendo el cambio en la elipticidad en un intervalo de temperatura (por ejemplo, 4 a 95°C) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J.710) utilizando parámetros estándar (por ejemplo, longitud de onda de 222 nm; resolución de la etapa, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; anchura de banda, 1 nm, ritmo de aumento de la temperatura: 1°C/min; longitud del trayectoria, 0,1 cm).

Ensayo de resistencia a la proteasa

35 El enlace amídico de la cadena principal del péptido es sensible a la hidrólisis por las proteasas, haciendo de este modo vulnerables los compuestos peptídicos a una rápida degradación *in vivo*. La formación de la hélice peptídica, sin embargo, por lo general oculta la cadena principal de la amida y por lo tanto puede protegerla de la escisión proteolítica. Los macrociclos peptidomiméticos de la presente invención pueden someterse a proteólisis con tripsina *in vitro* para evaluar cualquier cambio en la velocidad de degradación en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético y un polipéptido no macrocíclico correspondiente se incuban con tripsina agarosa y las reacciones se inactivan en varios momentos por centrifugación y posterior inyección de HPLC para cuantificar el sustrato residual por absorción ultravioleta a 280 nm. En resumen, el macrociclo peptidomimético y precursor peptidomimético (5 mcg) se incuban con tripsina agarosa (Pierce) (S/E ~ 125) durante 0, 10, 20, 90 y 180 minutos. Las reacciones se inactivan por centrifugación de sobremesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se cuantifica por detección del pico a 280 nm por HPLC. La reacción proteolítica muestra una cinética de primer orden y la constante de velocidad, k, se determina a partir de un gráfico de ln[s] frente al tiempo (k = -1Xpendiente).

Ensayo de estabilidad *ex vivo*

50 Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen por ejemplo, una vida media *ex vivo* que es por lo menos dos veces mayor que la de un péptido de polipéptido no macrocíclico correspondiente y poseen una vida media *ex vivo* de 12 horas o más. Para estudios de estabilidad en suero *ex vivo*, pueden utilizarse varios ensayos. Por ejemplo, un macrociclo peptidomimético y un polipéptido no macrocíclico correspondiente (en un ejemplo específico, el polipéptido natural correspondiente) (2 mcg) se incuban con suero reciente de ratón, de rata y/o humano (2 ml) a 37°C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Para determinar el nivel de compuesto intacto, puede utilizarse el procedimiento siguiente: Las muestras se extraen transfiriendo 100 μ l de sueros a tubos de 2 ml de centrifuga seguido de la adición de 10 μ l de ácido fórmico al 50% y 500 μ l de acetonitrilo y centrifugación a 14.000 RPM durante 10 min a 4 \pm 2°C. Los sobrenadantes se transfieren a continuación a tubos de 2 ml recientes y se evaporan en TurboVap bajo N₂<10 psi, 37°C. Las muestras se redisuelven en 100 μ l de acetonitrilo:agua 50:50 y se someten a análisis de LC-MS/MS.

Ensayos de unión *in vitro*

65 Para evaluar la unión y afinidad de los macrociclos peptidomiméticos y precursores peptidomiméticos a proteínas receptoras, se utiliza, por ejemplo, un ensayo de polarización fluorescente (FPA). La técnica de FPA mide la

orientación molecular y movilidad utilizando luz polarizada y marcador fluorescente. Cuando se excita con luz polarizada, trazadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares aparentes altos (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades más lentas de rotación en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en solución).

Por ejemplo, macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados (25 nM) se incubaron con la proteína receptora (25-1000 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de unión se mide, por ejemplo, por polarización fluorescente en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar por análisis de regresión no lineal utilizando, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Un macrociclo peptidomimético de la invención muestra, en algunos casos, una K_d similar o menor que el polipéptido no macrocíclico correspondiente.

Las proteínas receptoras de péptidos BH3 tales como BCL-2, BCL-X1, BAX o MCL1 pueden utilizarse, por ejemplo, en este ensayo. Las proteínas receptoras para los péptidos p53, tales como MDM2 o MDMX también se pueden utilizar en este ensayo.

Ensayos de desplazamiento *in vitro* para caracterizar los antagonistas de las interacciones péptido-proteína

Para evaluar la unión y afinidad de los compuestos que antagonizan la interacción entre un péptido (por ejemplo, un péptido BH3 o un péptido p53) y una proteína receptora, se utiliza, por ejemplo, un ensayo de polarización fluorescente (FPA) que utiliza un macrociclo peptidomimético fluoresceinado procedente de una secuencia precursora peptidomimética. La técnica de FPA mide la orientación molecular y movilidad utilizando luz polarizada y marcador fluorescente. Cuando se excita con luz polarizada, trazadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con altos pesos moleculares aparentes (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades más lentas de rotación en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en solución). Un compuesto que antagoniza la interacción entre el macrociclo peptidomimético fluoresceinado y una proteína receptora se detectará en un experimento de FPA de unión competitiva.

Por ejemplo, los presuntos compuestos antagonistas (1 nM a 1 mM) y un macrociclo peptidomimético fluoresceinado (25 nM) se incubaron con la proteína receptora (50 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad antagonista de unión se mide, por ejemplo, por la polarización fluorescente en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar por análisis de regresión no lineal utilizando, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Cualquier clase de molécula, tales como pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, oligonucleótidos o proteínas pueden examinarse como supuestos antagonistas en este ensayo. Las proteínas receptoras de péptidos BH3 tales como BCL2, BCL-XL, BAX o MCL1 se pueden utilizar en este ensayo. Las proteínas receptoras para los péptidos p53, tales como MDM2 o MDMX se pueden utilizar en este ensayo.

Ensayos de unión en células intactas

Es posible medir la unión de péptidos o peptidomiméticos macrociclos a sus receptores naturales en células intactas por experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, se incuban células intactas con compuestos fluoresceinados (marcados con FITC) de 4 horas en ausencia de suero, seguido de sustitución de suero y posterior incubación que oscila entre 4 y 18 horas. Después las células se sedimentan y se incuban en tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, CHAPS al 1% y mezcla inhibidora de proteasa) durante 10 minutos a 4°C. Los extractos se centrifugan a 14.000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se recogen y se incuban con 10 µl de anticuerpo anti-FITC de cabra durante 2 horas en rotación a 4°C seguido de 2 horas más de incubación a 4°C con proteína A/G Sepharose (50 µl de suspensión de perlas al 50%). Después de centrifugación rápida, los gránulos se lavan en tampón de lisis que contiene concentraciones crecientes de sal (por ejemplo, 150, 300, 500 mM). Las perlas se reequilibran a continuación en NaCl 150 mM antes de la adición de tampón de muestra que contenía SDS y ebullición. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se someten opcionalmente a electroforesis utilizando geles Bis-Tris en gradiente 4% -12% seguido de la transferencia a membranas Immobilon-P. Después del bloqueo, las inmunotransferencias se incuban opcionalmente con un anticuerpo que detecta FITC y también con uno o más anticuerpos que detectan las proteínas que se unen al macrociclo peptidomimético, incluyendo BCL2, MCL1, BCL-XL, A1, BAX, BAK, MDM2 o MDMX.

Ensayos de permeabilidad celular

Un macrociclo peptidomimético es, por ejemplo, más permeable a las células en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. En algunas formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos

son más permeables a las células que los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, permeabilidad celular que es al menos dos veces mayor que el correspondiente polipéptido no macrocíclico, y a menudo 20% o más del péptido aplicado se observará que han penetrado en la célula después de 4 horas. Para medir la permeabilidad celular de los macrociclos peptidomiméticos y de los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes, las células intactas se incuban con macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados o los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes (10 μM) durante 4 horas en medio exento de suero a 37°C, se lavan dos veces con medio y se incuban con tripsina (0,25%) durante 10 min a 37°C. Las células se lavan de nuevo y se vuelven a poner en suspensión en PBS. La fluorescencia celular se analiza, por ejemplo, utilizando ya sea un citómetro de flujo FACSCalibur o el lector KineticScan HCS® de Cellomics.

Ensayos de eficacia celular

La eficacia de determinados macrociclos peptidomiméticos se determina, por ejemplo, en ensayos de destrucción celular utilizando varias estirpes de células tumorígenas y no tumorígenas y células primarias procedentes de poblaciones de células humanas o de ratón. La viabilidad celular se controla, por ejemplo, más de 24 a 96 horas de incubación con macrociclos peptidomiméticos (0,5 a 50 μM) para identificar los que matan a $\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{M}$. Varios ensayos estándar que miden la viabilidad celular medida están disponibles en el mercado y se utilizan opcionalmente para evaluar la eficacia de los macrociclos peptidomiméticos. Además, ensayos que miden la activación de anexina V y la caspasa se utilizan opcionalmente para evaluar si los macrociclos peptidomiméticos destruirán las células al activar el sistema apoptótico.

Ensayo de estabilidad *in vivo*

Para investigar la estabilidad *in vivo* de los macrociclos peptidomiméticos, los compuestos se administran, por ejemplo, a ratones y/o ratas por vía IV, IP, PO o inhalación en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 50 mg/kg y muestras de sangre extraídas a 0', 5', 15', 30', 1 h, 4 h, 8 h y 24 horas después de la inyección. Las concentraciones de compuesto intacto en 25 μl de suero reciente se miden entonces por LC-MS/MS como anteriormente.

Eficacia *in vivo* en modelos animales

Para determinar la actividad antioncogénica de macrociclos peptidomiméticos de la invención *in vivo*, los compuestos se administran, por ejemplo, solos (por las vías IP, IV, PO, por inhalación o nasal) o en combinación con dosis subóptimas de quimioterapia aplicable (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido). En un ejemplo, 5×10^6 RS4; 11 células (creadas en la médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) que expresa de forma estable la luciferasa se inyectan por vena caudal en ratones NOD-SCID 3 horas después de haber sido sometidos a irradiación corporal total. Si no se trata, esta forma de leucemia es mortal en 3 semanas en este modelo. La leucemia se controla fácilmente, por ejemplo, inyectando a los ratones D-luciferina (60 mg/kg) y diagnosticando por la imagen los animales anestesiados (por ejemplo, Sistema de diagnóstico por la imagen Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La bioluminiscencia corporal total se cuantifica por integración del flujo fotónico (fotones/s) por Living Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los macrociclos peptidomiméticos solos o combinados con dosis subóptimas de agentes quimioterapéuticos aplicables se administran, por ejemplo, a ratones leucémicos (10 días después de la inyección/día 1 de experimento, en el intervalo de bioluminiscencia 14-16) por la vena caudal o por vía IP a dosis que oscilan de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg durante 7 a 21 días. Opcionalmente, se diagnostica por la imagen a los ratones durante el experimento cada dos días y la supervivencia controla diariamente durante el experimento. Los ratones fallecidos se someten opcionalmente a necropsia al final del experimento. Otro modelo animal es la implantación en ratones NOD-SCID de DoHH2, una estirpe celular procedente de un linfoma folicular humano, que expresa de forma estable la luciferasa. Estos ensayos *in vivo*, generan opcionalmente datos preliminares farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos.

Ensayos clínicos

Para determinar la idoneidad de los macrociclos peptidomiméticos de la invención para el tratamiento de seres humanos, se realizan ensayos clínicos. Por ejemplo, los pacientes diagnosticados de cáncer y necesitados de tratamiento se seleccionan y se separan en el tratamiento y uno o más grupos de referencia, en el que se administra al grupo de tratamiento un macrociclo peptidomimético de la invención, mientras que los grupos de referencia reciben un placebo o un fármaco contra el cáncer conocido. La seguridad y eficacia del tratamiento de los macrociclos peptidomiméticos de la invención pueden así evaluarse realizando comparaciones de los grupos de pacientes con respecto a factores tales como la supervivencia y la calidad de vida. En este ejemplo, el grupo de pacientes tratados con un macrociclo peptidomimético muestran mejor supervivencia a largo plazo en comparación con un grupo de referencia de pacientes tratados con un placebo.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Los macrociclos peptidomiméticos de la invención también incluyen derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Un "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de un éster,

5 profármaco u otro derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de esta invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente invención. Los derivados farmacéuticamente aceptables especialmente favorecidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la invención cuando se administran a un mamífero (por ejemplo, al aumentar la absorción en la sangre de un compuesto administrado por vía oral) o que aumenta el suministro del compuesto activo a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con relación a la especie progenitora. Algunos derivados farmacéuticamente aceptables incluyen un grupo químico que aumenta la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la mucosa gastrointestinal.

10 En algunas formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos de la invención son modificados mediante enlace covalente o no covalente uniendo grupos funcionales apropiados para mejorar propiedades biológicas selectivas. Dichas modificaciones incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyección, alteran el metabolismo y alteran la velocidad de excreción.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales de ácidos adecuados incluyen acetato, adipato, benzoato, bencensulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, lactato, maleato, malonato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales procedentes de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquilo)₄⁺.

25 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen portadores sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias, que también actúa como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregadores de comprimidos, o un material encapsulador. Los detalles sobre técnicas para la formulación y administración están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co., Easton PA.

30 En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido, que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido en comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

35 Los excipientes sólidos adecuados son cargas de carbohidratos o proteínas e incluyen, pero no se limitan a azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas incluyendo arábica y de tragacanto; así como proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se añaden agentes disgregadores o disolventes, tales como la polividona reticulada, agar-agar, ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato sódico.

40 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, soluciones acuosas o de agua/propilenglicol. Para inyectables parenterales, pueden formularse preparaciones líquidas en solución acuosa de polietilenglicol.

45 La preparación farmacéutica está preferentemente en forma de dosis unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. También, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o la propia pastilla, o puede ser un número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada.

50 Cuando las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de macrociclo peptidomimético y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes a niveles de dosificación de aproximadamente 1 a 100%, y más preferentemente entre aproximadamente 5 a 95% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia. En algunas formas de realización, otros agentes se administran por separado, como parte de un régimen de dosis múltiples, a partir de los compuestos de la presente invención. Alternativamente, esos agentes forman parte de una sola forma de dosificación, mezclados junto con los compuestos de la presente invención en una composición única.

Procedimientos de utilización

65 En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos macrociclos peptidomiméticos que son útiles en ensayos de unión competitiva para identificar agentes que se unen a ligando(s) natural(es) de las proteínas o péptidos en los

que se modelan los macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, en el sistema p53 MDM2, se utilizan macrociclos peptidomiméticos estabilizados marcados basados en el p53 en un ensayo de unión de MDM2 junto con pequeñas moléculas que se unen competitivamente a MDM2. Los estudios de unión competitiva permitir una rápida evaluación *in vitro* y la determinación de los fármacos experimentales específicos para el sistema p53/MDM2. Asimismo en el sistema antiapoptótico BH3/BCL-X_L los macrociclos peptidomiméticos marcados basado en BH3 se pueden utilizar en un ensayo de unión de BCL-X_L junto con pequeñas moléculas que se unen competitivamente a BCL-X_L. Los estudios de unión competitiva permiten una rápida evaluación *in vitro* y la determinación de fármacos candidatos específicos para el sistema BH3/BCL-X_L. La invención describe además la generación de anticuerpos contra los macrociclos peptidomiméticos. En algunas formas de realización, estos anticuerpos se unen específicamente tanto al macrociclo peptidomimético como a los precursores peptidomiméticos p53 o BH3 de los que proceden los macrociclos peptidomiméticos. Dichos anticuerpos, por ejemplo, alteran los sistemas p53/MDM2 o BH3/BCL-XL, respectivamente.

En otros aspectos, la presente invención describe procedimientos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un paciente en situación de riesgo de (o sensible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante (por ejemplo, insuficiente o excesiva) de miembro de la familia BCL-2 (por ejemplo, anomalías de la ruta apoptótica extrínseca o intrínseca). Se cree que algunos trastornos de tipo BCL-2 son producidos, al menos en parte, por un nivel anormal de uno o más miembros de la familia BCL-2 (por ejemplo, sobre o bajo expresión) o por la presencia de uno o más miembros de la familia BCL-2 que presentan una actividad anormal. Como tal, se utiliza la reducción en el nivel y/o actividad del miembro de familia BCL-2 o el aumento del nivel y/o de actividad del miembro de la familia BCL-2, por ejemplo, para mejorar o reducir los síntomas adversos del trastorno.

También se describen procedimientos para tratar o prevenir enfermedades hiperproliferantes al interferir con la interacción o unión entre p53 y MDM2 en las células tumorales. Estos procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un animal de sangre caliente, incluyendo un ser humano, o a las células tumorales que contienen p53 natural. En algunos casos, la administración de los compuestos de la presente invención provocan la interrupción del crecimiento celular o apoptosis. En otros o más casos, los presentes compuestos de la invención se utilizan para tratar una enfermedad y/o células tumorales que comprenden concentraciones elevadas de MDM2. Las concentraciones elevadas de MDM2 como las utilizadas en la presente memoria se refiere a concentraciones de MDM2 mayores que los encontrados en las células que contienen más del número normal de copias (2) de mdm2 o por encima de aproximadamente 10.000 moléculas de MDM2 por célula, medidas por ELISA y ensayos similares (Picksley *et al.* (1994), *Oncogene* 9, 2523 2529).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente, que padece una enfermedad, un síntoma de la enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos de la invención pueden utilizarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Como se utiliza en la presente memoria, los términos "cáncer", "hiperproliferante" y "neoplásica" se refieren a células que tienen capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizado por el rápido crecimiento celular proliferante. Las enfermedades hiperproliferantes y neoplásicas pueden clasificarse como patológicas, es decir, caracterizando o constituyendo una enfermedad, o pueden clasificarse como no patológicas, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada a una enfermedad. El término se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasión. Un tumor metastático puede surgir de un gran número de tipos de tumores primarios, incluyendo pero sin limitarse a los de mama, pulmón, hígado, colon y ovario. Las células "hiperproliferantes patológicas" se producen en enfermedades caracterizadas por el crecimiento del tumor maligno. Ejemplos de células hiperproliferantes no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas a la reparación de heridas. Ejemplos de trastornos celulares proliferantes y/o diferenciadores incluyen el cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma o trastornos metastásicos. En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos son nuevos agentes terapéuticos para el control del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de dichos cánceres y similares.

Los ejemplos de cánceres o afecciones neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, un fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, liomiosarcoma, rbdomiosarcoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer cerebral, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sebáceas, papilar carcinoma, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer testicular, carcinoma microcítico pulmonar, carcinoma no microcítico pulmonar, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico,

oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma o sarcoma de Kaposi.

5 Ejemplos de trastornos proliferantes incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, derivados de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Preferentemente, las enfermedades se derivan de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Otros trastornos mieloides a título de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC) (examinada en Vaickus (1991), *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 11:267-97); los cánceres linfoides incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), tricoleucemia (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Otras formas de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no hodgkiniano y variantes del mismo, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATL), linfoma de linfocitos T cutáneos (LCTC), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Stemberg.

20 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores de mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de mama proliferante, incluyendo, por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante y papilomas ductales pequeños; tumores, por ejemplo, tumores de estroma tal como fibroadenomas, tumor filoides y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma ductal grande; carcinoma de mama incluyendo carcinoma (no invasor) *in situ*, que incluye carcinoma canalicular *in situ* (incluyendo la enfermedad de Paget) y el carcinoma lobular *in situ*, y carcinoma invasor (infiltrante) que incluye, pero no se limita a, carcinoma canalicular invasor, carcinoma lobular invasor, carcinoma medular, carcinoma coloide (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasor, y diversos tumores malignos. Los trastornos en la mama masculina incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

30 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores de pulmón incluyen, pero no se limitan a, carcinoma broncogénico, incluyendo síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoide bronquial, tumores diversos y tumores metastásicos; patologías de la pleura, incluyendo derrames pleurales inflamatorios, derrames pleurales no inflamatorios, neumotórax, y tumores pleurales, incluyendo tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y el mesotelioma maligno.

35 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores del colon incluyen, pero no se limitan a, pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes familiares, carcinogénesis colorectal, carcinoma, colorrectal y tumores carcinoides.

40 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores del hígado incluyen, pero no se limitan a, las hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, incluyendo el carcinoma primario, del hígado y tumores metastásicos.

45 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores del ovario incluyen, pero no se limitan a, los tumores de ovario tales como, tumores de epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistoadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales superficiales, tumores de células germinativas, tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor del seno endodérmico, coriocarcinoma, tumores del estroma del cordón sexual tales como, tumores de células tecales granulosa, los comafibromas, androblastomas, tumores de células enfermas y gonadoblastoma; y tumores metastásicos, tales como tumores de Krukenberg.

50 En otras formas de realización o además, los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria son para su utilización para tratar, presentar o diagnosticar enfermedades caracterizadas por la muerte celular hiperactiva o la muerte celular debido a un ataque fisiológico, etc. Algunos ejemplos de estados caracterizados por la muerte celular prematura o no deseada son o incluyen la proliferación celular alternativamente no deseada o excesiva, pero no se limitan a enfermedades hipocelulares/hipoplásicas, acelulares/aplásicas o hiper celulares/hiperplásicas. Algunos ejemplos incluyen trastornos hematológicos que incluyen, pero no se limitan a anemia de Fanconi, anemia aplásica, talasemia, neutropenia congénita o mielodisplasia.

60 En otras o más formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos de la invención que actúan para disminuir la apoptosis son para su utilización en el tratamiento de trastornos asociados a un nivel indeseable de muerte celular. Así, en algunas formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos de la invención son para su utilización en el tratamiento de trastornos tales como las que conducen a la muerte celular asociada con la infección vital, por ejemplo, infección asociada a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Una amplia variedad de enfermedades neurológicas se caracterizan por la pérdida gradual de conjuntos específicos de neuronas, y los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos de la invención se utilizan, en algunas formas de realización, en el tratamiento de estos trastornos. Dichos trastornos incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), retinitis pigmentosa, atrofia muscular medular, y

varias formas de degeneración cerebelar. La pérdida de células en estas enfermedades no provoca una respuesta inflamatoria, y la apoptosis parece ser el mecanismo de la muerte celular. Además, un número de enfermedades hematológicas están asociadas a una disminución de la producción de células sanguíneas. Estos trastornos incluyen la anemia asociada a enfermedad crónica, anemia aplásica, neutropenia crónica y síndromes mielodisplásicos. Los trastornos de la producción de células sanguíneas, tales como síndrome mielodisplásico y algunas formas de anemia aplásica, se asocian al aumento de la muerte celular por apoptosis en la médula ósea. Estos trastornos podría proceder de la activación de genes que estimulan la apoptosis, deficiencias adquiridas en células de estroma o factores hematopoyéticos de supervivencia, o los efectos directos de toxinas y mediadores de respuestas inmunitarias. Dos trastornos comunes asociados a la muerte celular son los infartos de miocardio y la embolia cerebral. En ambos trastornos, las células dentro de la zona central de la isquemia, que se produce en caso de pérdida aguda de circulación sanguínea, parecen morir rápidamente como resultado de la necrosis. Sin embargo, fuera de la zona isquémica central, las células mueren en un período de tiempo más prolongado y morfológicamente parecen morir por apoptosis. En otras o más formas de realización, los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos de la invención se utilizan para tratar todos estos trastornos asociados con la muerte celular indeseable.

Algunos ejemplos de trastornos inmunológicos que se tratan con los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a rechazo de trasplante de órganos, artritis, lupus, IBD, enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple, diabetes, etc.

Algunos ejemplos de trastornos neurológicos que se tratan con los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria incluyen pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, amiloidosis con hemorragia cerebral hereditaria de tipo holandés. La amiloidosis reactiva, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático; mieloma asociado a macroglobulinemia, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar, amiloidosis cardíaca aislada, amiloidosis senil generalizada, diabetes del adulto, insulinoma, amiloidosis auricular aislada, carcinoma medular de la tiroides, amiloidosis familiar, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, polineuropatía amiloidótica familiar, encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatía espongiiforme bovina, una enfermedad mediada por priones y la enfermedad de Huntington.

Algunos ejemplos de trastornos endocrinológicos que son tratados con los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a diabetes, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, etc.

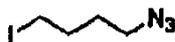
Los ejemplos de trastornos cardiovasculares (por ejemplo, trastornos inflamatorios) que se tratan o previenen con los macrociclos peptidomiméticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, infarto de miocardio, apoplejía, trombosis, aneurisma, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, angina de pecho, muerte súbita cardíaca, cardiopatía hipertensora; enfermedad de vasos no coronarios, tales como arteriosclerosis, enfermedad de vasos pequeños, nefropatía, la hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatosis, asma, hipertensión, enfisema y neumopatía crónica, o una enfermedad cardiovascular asociada a procedimientos quirúrgicos ("traumatismo vascular por intervención quirúrgica"), tal como restenosis tras la angioplastia, colocación de una derivación, endoprótesis vascular, injertos por escisión sintéticos o naturales, catéter permanente, válvula u otros dispositivos implantables. Los trastornos cardiovasculares preferidos incluyen la aterosclerosis, infarto de miocardio, aneurisma, y embolia cerebral.

Ejemplos

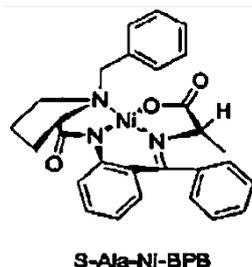
El apartado siguiente proporciona ejemplos ilustrativos de la presente invención.

Ejemplo 1. Preparación de aminoácidos alfa, alfa-disustituidos

Compuesto 1



El compuesto 1 se preparó por una secuencia en dos pasos según Yao *et al.* (2004) *J. Org. Chem.* 69:1720-1722. A 1-yodo-4-cloro-butano (1 ml, 8,2 mmoles) en dimetilformamida (10 ml) se añadió azida sódica (0,53 g, 8,2 mmoles) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó a continuación con acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua (3 veces), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar 1-azido-4-cloro-butano con un rendimiento del 80%. La azida se diluyó con acetona (38 ml) y se añadió yoduro de sodio (1,98 g, 13,00 mmoles) y la reacción se calentó a reflujo durante una noche. Después, la reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo con éter (tres veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron a vacío. El producto 1 se purificó pasándolo a través de un tapón de alúmina neutra. El rendimiento fue del 89%.

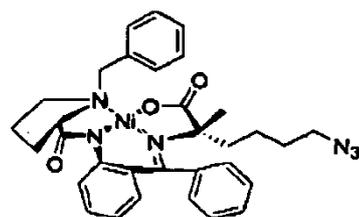
Compuesto 2

5 El compuesto 2 se preparó mediante una secuencia de tres pasos según Belokon *et al.* (1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252. Una solución de S-prolina (100 g, 0,869 mol) y KOH (172 g, 2,61 mol) en isopropanol (600 ml) se preparó con agitación a 40°C. Tan pronto como la solución se volvió transparente, se añadió cloruro de bencilo (156 ml, 1,34 mol) a la misma temperatura. Después de completar la adición (3,5 h), la reacción se agitó durante la noche a 40°C. La reacción se neutralizó con HCl conc. (110 ml) hasta pH 5, después se añadió cloroformo (400 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se dejó en agitación durante la noche. La mezcla se filtró y el precipitado se lavó con CHCL. Las soluciones en CHCl₃ se combinaron y se evaporaron, el residuo se trató con acetona y el precipitado del producto en bruto se filtró y se lavó además con acetona. El producto de bencil prolina se aisló con 75% de rendimiento.

15 A una solución de bencil prolina (41 g, 0,2 mol) en cloruro de metileno (200 ml) se le añadió cloruro de tionilo (1834 ml, 0,25 mol) con agitación entre -20°C y -30°C durante un período de 10 min. Se continuó la agitación a -10°C hasta que la mezcla de reacción resultó casi transparente. A continuación, una solución de 2-aminobenzofenona (25 g, 0,125 mol) en cloruro de metileno (100 ml) se añadió a la mezcla de reacción a -30°C con agitación. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 10 h más y una solución de carbonato de sodio (40 g) en agua (150 ml) se añadió a la mezcla de reacción con agitación a 0°C. La capa orgánica se separó, se extrajo la capa acuosa varias veces con cloruro de metileno y las soluciones orgánicas se combinaron y se evaporaron. El producto (aducto bencil prolina-aminobenzofenona) se cristalizó en etanol y se aisló con 85% de rendimiento.

25 Una solución de KOH (23,1 g, 0,35 mol) en metanol (75 ml) se vertió en una mezcla agitada de aducto bencil prolina-aminobenzofenona (19,5 g, 0,05 mol) y nitrato de níquel hexahidratado (29,1 g, 0,1 mol), L-Ala (8,9 g, 0,1 mol) en metanol (175) bajo nitrógeno a 40°C-50°C. La mezcla de reacción se agitó a 55°C-65°C durante 2 h y después se neutralizó con ácido acético (20 ml). El volumen de reacción se diluyó con agua (500 ml). Después de 6 h, el sólido cristalino separado se filtró y se lavó con agua (2x) para dar el compuesto puro 2 (sólido de color rojo, 22 g). M + H obs. 512,4, M + H calc. 512,1.

30 **Compuesto 3**



35 El compuesto 2 (5,122 g, 10,0 mmol) se añadió dimetilformamida (45 ml), que se desgasificó mediante un ciclo de congelación-descongelación. La solución se enfrió a 4°C con un baño de hielo y KOH en polvo (6,361 g, 100 mmol) se añadió en un lote. El baño frío se retiró y el compuesto 1 (3,375g, 15 mmol) disuelto en dimetilformamida (4,0 ml) se añadió con una jeringa. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La reacción se enfrió añadiéndola lentamente a una solución fría de ácido acético acuoso al 5% (200 ml). El producto en bruto se recogió por filtración y se lavó tres veces con agua fría. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida utilizando una columna de sílice Biotage y hexano acetato de etilo como eluyente. El compuesto 3 se obtuvo como un sólido de color rojo, (51% de rendimiento), M + H calc. 609,2, M + H obs. 609,37. La pureza se determinó como 98% por UV 254 nm.

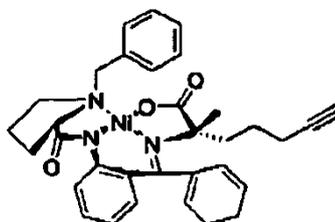
45 **Compuesto 4**



50 A una solución de 5-cloro pentino (5 g, 47,8 mmol) en acetona (80 ml) se le añadió yoduro de sodio (14,321g, 95,54 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante la noche. Después, la reacción se diluyó con agua y el producto se

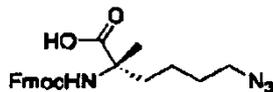
extrajo con éter (tres veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío. El producto 4 se purificó pasándolo a través de un tapón de alúmina neutra. El rendimiento fue de 92%.

5 Compuesto 5



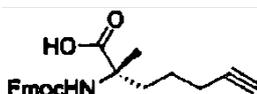
Al compuesto 2 (2,561g, 5,0 mmol) se añadió dimetilformamida (23 ml), que se desgasificó mediante un ciclo de congelación-descongelación. La solución se enfrió a 4°C con un baño de hielo y KOH en polvo (3,181g, 50 mmol) se le añadió en un lote. Se retiró el baño frío y el compuesto 4 (1,94 g, 10 mmol) disuelto en dimetilformamida (2,0 ml) se añadió con una jeringa. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La reacción se inactivó añadiéndola lentamente a una solución fría o ácido acético acuoso al 5% (100 ml). El producto en bruto se recogió por filtración y se lavó tres veces con agua fría. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida utilizando una columna Biotage de sílice y hexano acetato de etilo como eluyente. El compuesto 5 es un rojo sólido, 1,4 g rendimiento del 48%. M + H calc. 578,19, M + H obs. 578,69. La pureza se determinó como 97% por UV 234 nm.

Compuesto 6



A una solución (12 ml) de HCl/MeOH 1/1 3 N a 70°C se le añadió una solución del compuesto 3 (1 g, 1,65 mmol) en MeOH (3 ml) gota a gota. El material de partida desapareció en 5 a 10 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el disolvente residual se eliminó en un bomba de alto vacío. El residuo en bruto se diluyó con Na₂CO₃ acuoso al 10% (16 ml) enfriado a 0°C con un baño de hielo. Se añadió Fmoc-OSu (0,84 g, 2,5 mmol) disuelto en dioxano (16 ml) y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente con agitación durante la noche. Después, la reacción se diluyó con acetato de etilo y HCl 1 N. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (3 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío. El producto puro se aisló después de una purificación por cromatografía ultrarrápida con una columna de sílice Biotage y acetato de etilo/hexano y cloruro de metileno/metanol como eluyentes para dar un aceite viscoso en 36% de rendimiento global para ambas etapas. M+Na obs. 431,89, M+H calc. (409,18). La pureza se determinó como 98% UV 254 nm.

Compuesto 7



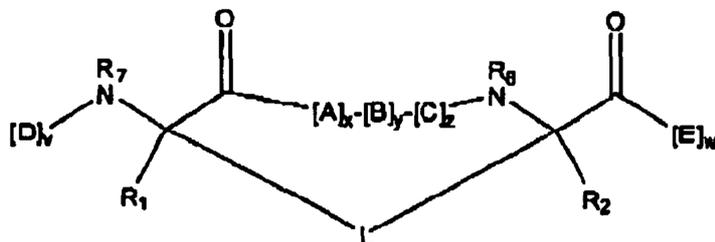
A una solución (18 ml) de HCl/MeOH 1/1 3 N a 70°C se añadió una solución del compuesto 5 (1,4 g, 2,4 mmol) en MeOH (4 ml) gota a gota. El material de partida desapareció en 5 a 10 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el disolvente residual se eliminó en un bomba de alto vacío. El residuo en bruto se diluyó con Na₂CO₃ acuoso al 10% (24 ml) enfriado a 0°C con un baño de hielo. Se añadió Fmoc-OSu (0,98 g, 2,9 mmol) disuelto en dioxano (24 ml) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante la noche. Después, la reacción se diluyó con acetato de etilo y HCl 1 N. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (3 veces). La capa orgánica se secó a continuación sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto puro se aisló (30% de rendimiento para ambas etapas) después de purificación por cromatografía ultrarrápida con una columna de sílice Biotage y acetato de etilo/hexano y cloruro de metileno/metanol como eluyentes. El producto se obtuvo como un aceite viscoso, que solidifica en reposo M+H calc. 379,16, M+Na obs. 400,85.

Se han descrito numerosas formas de realización de la invención. No obstante, debe apreciarse que pueden introducirse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras formas de realización están comprendidas en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Macrosciclo peptidomimético adecuado para su utilización como producto farmacéutico, que comprende una hélice α en solución acuosa y presenta la fórmula (I):

5



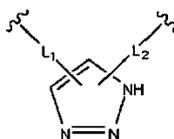
(Fórmula I)

en la que:

10 cada A, B, C, D y E es independientemente un aminoácido natural o no natural;

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

15 L es un enlazador formador de macrosciclo que comprende 1 ó 2 espiras de la hélice α y presenta la fórmula:



20 en la que L₁ es un grupo alqueno de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono y L₂ es un grupo alqueno de cadena lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

R₇ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto D;

25 R₈ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, o parte de una estructura cíclica con un resto E;

v es un número entero de 1-1.000;

30 w es un número entero de 1-1.000;

x es un número entero de 0-10;

y es un número entero de 0-10; y

35

z es un número entero de 0-10.

2. Macrosciclo peptidomimético según la reivindicación 1, en el que

40 (a) por lo menos uno entre R₁ y R₂ es alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

(b) R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, insustituido o sustituido con halo-;

45

(c) por lo menos uno entre R₁ y R₂ es alquilo, insustituido o sustituido con halo-;

(d) R₁ y R₂ son independientemente alquilo, insustituido o sustituido con halo-;

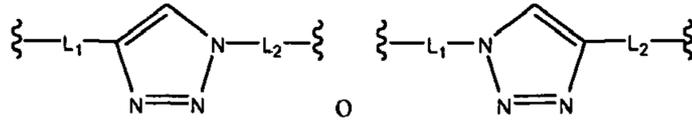
50

o

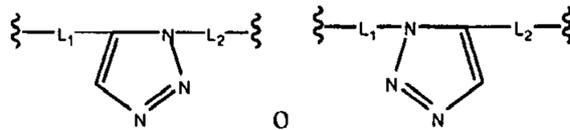
(e) por lo menos uno entre R₁ y R₂ es metilo.

3. Macrociclo peptidomimético según la reivindicación 1 en el que R₁ y R₂ son metilo.

4. Macrociclo peptidomimético según la reivindicación 1, en el que L presenta la fórmula



5. Macrociclo peptidomimético según la reivindicación 1, en el que L presenta la fórmula



6. Macrociclo peptidomimético según la reivindicación 1, en el que el enlazador formador de macrociclo abarca 1 espira de la hélice α, en el que

(i) la longitud del enlazador formador de macrociclo es igual a la longitud de desde 6 enlaces carbono-carbono a 14 enlaces carbono-carbono,

(ii) la longitud del enlazador formador de macrociclo es igual a la longitud de desde 8 enlaces carbono-carbono y 12 enlaces carbono-carbono, o

(iii) el macrociclo comprende un anillo de 18 átomos a 26 átomos.

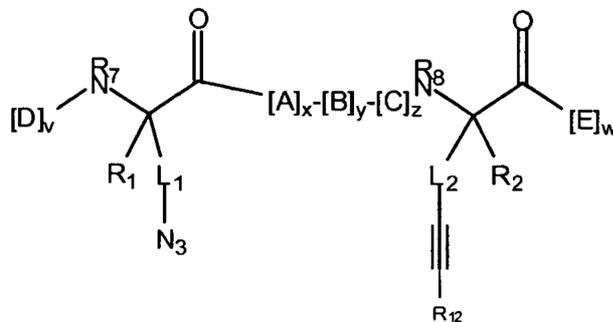
7. Macrociclo peptidomimético según la reivindicación 1 en el que el enlazador formador de macrociclo abarca 2 espiras de la hélice α, en el que

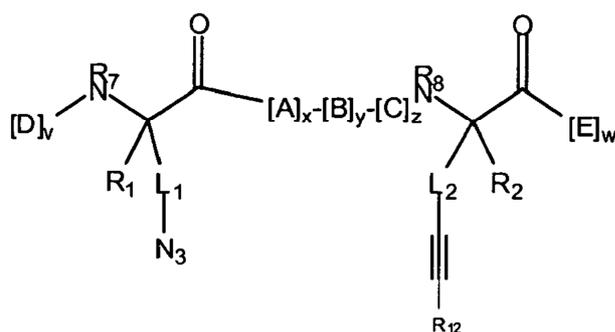
(i) la longitud del enlazador formador de macrociclo es igual a la longitud de desde 8 enlaces carbono-carbono a 16 enlaces carbono-carbono,

(ii) la longitud del enlazador formador de macrociclo es igual a la longitud de desde 10 enlaces carbono-carbono y 13 enlaces carbono-carbono, o

(iii) el macrociclo comprende un anillo de 29 átomos a 37 átomos.

8. Procedimiento para sintetizar un macrociclo peptidomimético, comprendiendo el procedimiento las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV:





(Fórmula IV)

con un reactivo de macrociclación;

5 en las que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ son como se define en la reivindicación 1; R₁₂ es -H cuando el reactivo es un reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu y R₁₂ es -H o alquilo cuando el reactivo es un reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru; y dicha etapa de puesta en contacto da como resultado un enlace covalente formado entre las porciones alquino y azida en la fórmula III o fórmula IV para proporcionar un macrociclo peptidomimético,

10

en las que el macrociclo peptidomimético comprende una hélice α en disolución acuosa.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que

15

(a) el precursor peptidomimético se purifica antes o después de la etapa de contacto;

(b) el macrociclo peptidomimético se repliega después de la etapa de contacto;

20

(c) el procedimiento se realiza en solución o sobre un soporte sólido;

(d) el procedimiento se realiza en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión,

25

(e) el procedimiento se realiza en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión;

(f) el procedimiento se aplica para sintetizar una biblioteca de macrociclos peptidomiméticos;

30

(g) el macrociclo peptidomimético comprende una hélice α en solución acuosa;

(h) el macrociclo peptidomimético presenta una estructura α -helicoidal aumentada en solución acuosa en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente;

35

(i) el macrociclo peptidomimético presenta una estabilidad térmica aumentada en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente;

(j) el macrociclo peptidomimético presenta una actividad biológica aumentada en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente;

40

(k) el macrociclo peptidomimético presenta una resistencia aumentada a la degradación proteolítica en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente; o

(l) el macrociclo peptidomimético presenta una capacidad aumentada para penetrar en las células vivas en comparación con un polipéptido no macrocíclico correspondiente.

45

10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que

50

(a) la porción alquino del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico y la porción azida del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina,

ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alfa-metil-L-ornitina, y δ -azido-alfa-metil-D-ornitina;

(b) $x + y + z$ es 3; o

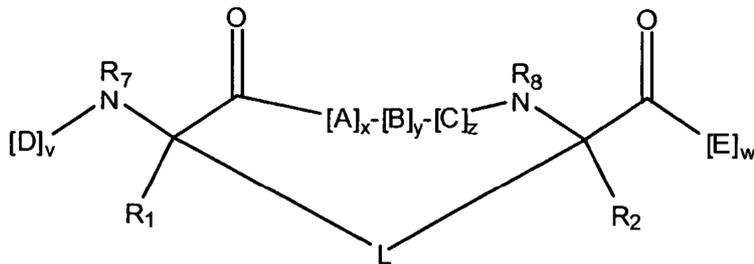
5 (c) $x + y + z$ es 6.

11. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que

10 (a) el reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu y la etapa de contacto se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en disolvente prótico, disolvente acuoso, disolvente orgánico y mezclas de los mismos, opcionalmente en el que el disolvente es H₂O, THF/H₂O, tBuOH/H₂O, DMF, DIPEA, CH₃CN, CH₂Cl₂ o ClCH₂CH₂Cl, o es un disolvente que favorece la formación de la hélice o,

15 (b) el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru y la etapa de contacto se lleva a cabo en un disolvente orgánico, opcionalmente en el que el disolvente es DMF, THF, CH₃CN, CH₂Cl₂ o ClCH₂CH₂Cl.

12. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el macrociclo peptidomimético presenta la fórmula (I):



(Fórmula I)

20 en la que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈ y L son como se define en la reivindicación 1.