

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 166**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C07K 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2003** **E 03779935 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014** **EP 1689863**

54 Título: **Miméticos de lazo de horquilla beta fijados a patrón y su utilización en exposición en fagos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.09.2014**

73 Titular/es:

**POLYPHOR LTD. (50.0%)**  
**Hegenheimermattweg 125**  
**4123 Allschwil, CH y**  
**UNIVERSITÄT ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VRIJBLOED, JAN WIM;**  
**OBRECHT, DANIEL;**  
**LOCURIO, SERGIO;**  
**GOMBERT, FRANK OTTO;**  
**LUDIN, CHRISTIAN y**  
**JUNG, FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

ES 2 491 166 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

Miméticos de lazo de horquilla beta fijados a patrón y su utilización en exposición en fagos

5 La presente invención da a conocer compuestos peptídicos formados por residuos de origen natural de L-alfa-aminoácidos, de los cuales ciertos residuos, dependiendo de sus posiciones, son residuos de cisteína, unidos mediante un enlace disulfuro, por consiguiente forman estructuras peptídicas cíclicas, y otros residuos concretos, que son adyacentes a dichos residuos de cisteína, forman fracciones de dipéptidos o tripéptidos de ciertos tipos, tal y como se define a continuación, que actúan conjuntamente como un patrón, para facilitar la formación y  
10 estabilización de estructuras de lazo de horquilla beta. Debido a su estabilidad y vínculos, estos miméticos de lazo de horquilla beta estabilizado mediante un patrón presentan una actividad mayor o, más prolongada, en comparación con los complejos de unión proteicos.

15 Los patrones se pueden transferir a la construcción de miméticos de lazo de horquilla derivados de la técnica de exposición en fago para el cribado de bibliotecas y fármacos. Los compuestos de la presente invención son útiles para el cribado e identificación de proteínas que interactúan entre ellas *in vitro*. La presente invención se puede utilizar como una herramienta de búsqueda guía para encontrar dianas, en las que sea difícil transferir epítopos de proteínas a pequeños péptidos o miméticos de péptidos.

20 Se conocen compuestos peptídicos con estructuras, que muestran similitudes a las estructura de los compuestos de la presente invención, por ejemplo de N. C. Wrighton y otros, Science 1996, 273, 458-463; S. C. Shankaramma y otros, ChemBioChem 2002, 3, 1126-1133; y WO-A-00/77194.

25 Los lazos que se encuentran en la superficie de proteínas y péptidos bioactivos, a menudo están implicados en el reconocimiento por parte de complejos de unión proteicos. En consecuencia, es interesante investigar dichos lazos ya que pueden ser guías potenciales para el descubrimiento de fármacos. Las horquillas beta tienen un interés especial: el motivo de horquilla beta es muy abundante en la naturaleza y aparece en la superficie de muchos ligandos de proteínas y en las regiones hipervariables de los anticuerpos. El motivo de horquilla beta consiste en dos cadenas beta antiparalelas unidas por un lazo o giro breve y se clasifica en función de la red de enlaces hidrogeno  
30 (B. L. Sibnda y otros, J. Mol. Biol. 1989, 206, 759-777).

Actualmente ya se pueden generar peptidomiméticos de horquilla beta mediante el método de síntesis combinatoria y paralela (L. Jiang y otros, Helv. Chim. Acta 2000, 83, 3097-3112). Sin embargo, puede que estas moléculas no se sinteticen en bibliotecas de  $10^{10}$  ó  $10^{12}$  miembros.  
35

Una estrategia complementaria en el descubrimiento de las guías basadas en péptidos es la exposición de bibliotecas en bacteriófagos filamentosos, que permite la creación de bibliotecas de hasta  $10^{10}$  a  $10^{12}$  miembros, muchas magnitudes superior a las bibliotecas que se podrían elaborar sintéticamente.

40 Además, existen métodos de selección rápidos y económicos para identificar los miembros de dichas bibliotecas, que se unen a la diana que se está estudiando. La técnica de exposición en fago permite la construcción de péptidos unidos cíclicos, como los lazos de la horquilla beta con uniones disulfuro, como es bien sabido (H. B. Lowman, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1997, 26, 401-24).

45 Dichos lazos tienen un número limitado de conformaciones, que pueden dar como resultado el aislamiento de los ligandos de afinidad de la diana del receptor. Sin embargo, los péptidos cíclicos que se estabilizan con un único enlace disulfuro tienen una conformación bastante flexible. Además, como es bien sabido, la formación y escisión del enlace disulfuro puede ser reversibles, y la flexibilidad aumenta porque las uniones del péptido se fusionan al extremo amino terminal de la proteína del gen III. Por consiguiente, es importante estabilizar estas estructuras de lazo con residuos adicionales, adyacentes al enlace disulfuro, que favorecen la conformación de lámina beta (R. H. Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 1993, 3, 572-579). Este proceso puede no resultar en ligandos de gran afinidad para la diana del receptor. El mismo lazo del péptido se fija a la proteína natural mediante la matriz de la proteína en los extremos C-terminal y N-terminal del lazo y se unen de forma adicional mediante enlaces hidrogeno de las láminas beta antiparalelas inducidas por la matriz natural de la proteína. Se han propuesto otras estrategias, tales como las matrices de péptidos para exponer en giro (A. G. Cochran y otros, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 625-632). Otra posible solución a este problema es utilizar uniones estructurales de una proteína plegada para presentar pequeños segmentos variables de péptido (P.-A. Nygren y otros, Curr. Opin. Struct. Biol. 1997, 7, 463-469; G. P. Smith y otros, J. Mol. Biol. 1998, 277, 317-332; A. Christmann y otros, Protein Eng. 1999, 12, 797-806).  
50  
55

60 En realidad, la transferencia de epítopos de proteínas a pequeños péptidos sigue siendo un problema. (A. G. Cochran, Chem. Biol. 2000, 7, R85-R94).

La presente invención proporciona compuestos con patrones de péptidos, cuya función es la de mantener el lazo del péptido de geometría de horquilla en una conformación estabilizada de horquilla beta. Estos patrones se pueden utilizar para la construir miméticos de lazo de horquilla beta derivados de la exposición en fago para generar bibliotecas de exposición en fago con constantes de unión a dianas muy elevadas.  
65

Esta característica se puede utilizar de forma ventajosa en el cribado de un gran número de bibliotecas de miméticos de lazo de horquilla beta fijados a patrón derivados de exposición en fago, hecho que a su vez facilita considerablemente los estudios de estructura frente a actividad, y por consiguiente el descubrimiento de nuevas moléculas con gran actividad y nuevas selectividades enfocadas a distintos tipos de dianas.

Gracias a la arquitectura bien definida a nivel estructural y conformacional de los componentes de la fórmula I, tal y como se describe a continuación, los residuos de aminoácidos clave o motivos contenidos en la cadena Z, codificados en forma de secuencias de ácidos nucleicos en bibliotecas de exposición en fago, se pueden integrar en disposiciones de conformación cerrada. Al desplazar dichos residuos de aminoácidos clave o motivos a lo largo de la estructura de horquilla beta, se pueden analizar nuevas disposiciones de aminoácidos importantes (análisis posicional de secuencias clave). Alternativamente, se pueden mapear secuencias de proteínas, para detectar los motivos de lazos de horquillas beta. En resumen, esta técnica permite determinar rápidamente aminoácidos clave y motivos ("hotspots") para la unión en grandes superficies e interfaces de proteínas planas no solo en su disposición secuencial, sino que también en su conformación espacial. Por último, esta información se puede utilizar para diseñar pequeños candidatos a fármacos peptidomiméticos. (B. C. Cunningham, Curr. Opin. Struct Biol. 1997, 7, 457; D. Obrecht y otros, Adv. Med. Chem. 1999, 4, 1-68, JAI Press Inc.).

Miméticos de lazo de horquilla beta fijados a patrón de la presente invención son componentes de la fórmula R<sup>1</sup>-Cys-Z-Cys-R<sup>2</sup> (I), en la que Cys, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y Z se definirán a continuación, por ejemplo en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3. La presente invención también proporciona una biblioteca de miméticos de horquilla beta fijados a patrón, en la que dicha biblioteca incluye un gran número de componentes de la fórmula I. Esta biblioteca de miméticos de horquilla beta fijados a patrón se puede fusionar, como mínimo, con una parte de una proteína de cubierta fágica, y miméticos de horquilla beta fijados a patrón se observan en la superficie de un fago o de una partícula fagémida.

La biblioteca de la presente invención se define a continuación, por ejemplo en las reivindicaciones 4 ó 5.

Los elementos estructurales que forman los patrones consisten en dos residuos Cys unidos por puentes disulfuro conjuntamente con los residuos R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, que incluyen cada dos o bien cada tres residuos de aminoácidos, los cuales, tal como se describe a continuación, son capaces de estabilizar la conformación lámina beta y que se colocan en lugares opuestos de las cadenas beta antiparalelas adyacentes al enlace disulfuro; además estos patrones tienen un extremo N-terminal y un extremo C-terminal orientados para enlazarse con la cadena Z. La cadena peptídica Z se une al extremo C-terminal y al extremo N-terminal de los patrones a través de los correspondientes extremos N- y C-terminales respectivamente, de forma que el patrón y la cadena se combinen formando una estructura cíclica.

Entre los residuos aminoacídicos se deben considerar aquellos derivados de L-alfa-aminoácidos de origen natural. A continuación una lista de estos aminoácidos los cuales, o los residuos de los cuales, son adecuados a los propósitos de la presente invención, las abreviaciones corresponden a las que habitualmente reciben.

Ala	A	L-Alanina
Arg	R	L-Arginina
Asn	N	L-Asparagina
Asp	D	L-Ácido aspártico
Cys	C	L-Cisteína
Glu	E	L-Ácido glutámico
Gln	Q	L-Glutamina
Gly	G	Glicina
His	H	L-Histidina
Ile	I	L-Isoleucina
Leu	L	L-Leucina
Lys	K	L-Lisina
Met	M	L-Metionina
Phe	F	L-Fenilalanina
Pro	P	L-Prolina
Ser	S	L-Serina
Thr	T	L-Treonina
Trp	W	L-Triptófano
Tyr	Y	L-Tirosina
Val	V	L-Valina

Las posiciones de la P<sup>1</sup> a la P<sup>n</sup> de cada residuo aminoacídico en la cadena Z se definen de forma inequívoca de la forma siguiente: P<sup>1</sup> representa el primer aminoácido de la cadena Z, enlazado por su extremo N-terminal con el extremo C-terminal del patrón, y P<sup>n</sup> representa el último aminoácido de la cadena Z, enlazado por su extremo C-terminal con el extremo N-terminal del patrón. La exposición en fagos ("phage display") es una técnica en la que variantes de polipéptidos se exponen como proteínas de fusión o de cubierta en la superficie de un fago o una partícula fágica filamentosa, tal y como se describe en «Phage Display of Peptides and Proteins», B. K. Kay y otros,

1996, Academic Press. En esta descripción el término “proteína de cubierta” se refiere a una proteína que tiene, como mínimo, una parte en la superficie de la partícula vírica. La proteína de cubierta puede ser una proteína de cubierta mayoritaria o minoritaria. El término “electroporación” se refiere a un proceso en el cual un material foráneo (proteína, ácido nucleico, etc.) se introduce en una célula mediante la aplicación de voltaje a dicha célula en condiciones en las que esta pueda incorporar dicho material foráneo. Habitualmente el material foráneo es ADN.

Una “proteína de fusión” es un polipéptido que consta de dos partes unidas por un enlace covalente, en el que cada parte es un polipéptido con propiedades distintas.

Un «fagémido» es un vector plasmídico con un origen de replicación bacteriano, ColE1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede basar en cualquier bacteriófago conocido, entre ellos los bacteriófagos filamentosos. Los fragmentos de ADN clonados en dichos vectores se pueden propagar como plásmidos. Cuando se proporcionan todos los genes necesarios para la producción de partículas fágicas a las células que albergan dichos vectores, el modo de replicación del plásmido pasa a replicación en círculo rodante para generar copias de una cadena del ADN del plásmido y partículas de la cápside. El fagémido puede producir partículas fágicas infecciosas o no infecciosas.

El término «vector fágico» es una forma replicativa de doble cadena de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y puede realizar la replicación. El vector fágico tiene un origen de replicación de bacteriófago que permite su replicación y la formación de partículas fágicas. El fago es preferentemente un bacteriófago filamentoso, tal como el fago M 13 o un derivado de este, un fago lambda o lambda tal como, incluyendo pero no limitándose a phi80, los fagos 21, 82, 424, 432, lambda.imm343, lambda.imm21, lambda.EMBL o lambda.gt, o todos sus derivados, derivados realizados con ingeniería genética, o híbridos de estos.

La «ligación» es el proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico. Para que se pueda producir ligación entre los dos fragmentos, los extremos de dichos fragmentos de ADN deben ser compatibles entre ellos. En la mayoría de casos, los extremos ya serán compatibles después de la digestión mediante endonucleasas. Sin embargo, puede que para que se pueda producir la ligación antes se deban convertir los extremos escalonados, que aparecen habitualmente como resultado de la digestión mediante endonucleasas, en extremos romos. Para obtener dichos extremos romos, se utilizan enzimas que modifican el ADN como la polimerasa T4 o Klenow, según las condiciones que especifica el proveedor.

La purificación del ADN se realiza con fenol-cloroformo, kits comerciales de purificación a partir de geles disponibles en el mercado.

Tras la digestión con endonucleasas, el ADN se puede purificar con electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa, previamente a la ligación. El ADN se puede purificar con técnicas estándar de biología molecular (Sambrook y otros. M: A Laboratory Manual, Sambrook y otros. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989) o mediante kits comerciales incluyendo pero no limitándose al kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Inc., Chatsworth, Calif.).

Previamente a la reacción de ligación, se deben tratar los fragmentos de vector linealizados con fosfatasa alcalina bacteriana o fosfatasa alcalina de intestino de ternera para evitar la autoligación durante el proceso de ligación. Es preferente catalizar la reacción de ligación con ligasa ADN 14. Los expertos en la técnica ya saben que las condiciones de ligación pueden variar según el tiempo, temperatura, concentración de tampones, cantidad de moléculas de ADN que se deben ligar, y cantidad de ligasa y ATP.

Los «oligonucleótidos» son nucleótidos de poca longitud de una o dos cadenas polideoxi que se sintetizan químicamente mediante métodos conocidos. Alternativamente, si se conoce la secuencia del aminoácido diana, se pueden inferir secuencias de aminoácido potenciales utilizando residuos de codificación preferidos y conocidos para cada residuo de aminoácido.

Un «complejo de unión» es una asociación de dos o más moléculas unidas entre ellas de una manera específica e identificable, por consiguiente la asociación entre ligando y receptor, o entre anticuerpo y antígeno.

El proceso de síntesis para obtener los compuestos de la presente invención se puede llevar a cabo de forma más ventajosa utilizando la síntesis matricial paralela para producir bibliotecas de miméticos de horquilla beta fijados a patrón de la fórmula I. Dicha síntesis matricial paralela permite obtener matrices de numerosos (normalmente de 24 a 192, típicamente 96) compuestos de la fórmula I en grandes proporciones y purezas definidas, con lo que se minimiza la formación de subproductos diméricos y poliméricos. La selección adecuada del soporte sólido funcionalizado (es decir, soporte sólido y molécula enlazadora), los patrones y el sitio de ciclación son elementos claves en el proceso.

El soporte sólido funcionalizado deriva de poliestireno reticulado con, preferentemente 1-5%, divinilbenceno; poliestireno reticulado con espaciadores de polietilenglicol (Tentagel<sup>R</sup>); y resinas de poliacrilamida (véase también D.

Obrecht y otros, Síntesis combinatoria y paralela en fase sólida de bibliotecas de compuestos de bajo peso molecular, («Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries») Series de Tetrahedron Organic Chemistry, 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

5 El soporte sólido se funcionaliza al añadir un enlazador, es decir, una molécula espaciadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para unirse al soporte sólido y en el otro extremo un grupo funcional escindible selectivamente que se usará en las posteriores transformaciones químicas y procedimientos de escisión. A los  
10 propósitos de la presente invención el enlazador se debe diseñar para poder liberar el grupo carboxilo en condiciones ligeramente ácidas que no afecten a los grupos protectores presentes en cualquier grupo funcional de las cadenas laterales de los diversos aminoácidos. Los enlazadores adecuados a los propósitos de la presente invención forman ésteres lábiles en medio ácido con el grupo carboxilo de los aminoácidos, habitualmente bencilo lábil en medio ácido, ésteres de bencilidrido y tritilo; algunos ejemplos de otras estructuras enlazadoras de este tipo son 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (enlazador Sasrin<sup>R</sup>), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink), ácido 4-(4-hidroximetilo-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB), tritilo y 2-clorotritilo.

15 Preferentemente el soporte deriva de poliestireno reticulado con, preferentemente 1-5%, divinilbenceno y se funcionaliza mediante un enlazador de 2-clorotritilo.

20 Cuando el proceso de la presente invención se lleva a cabo como síntesis matricial paralela se puede realizar de forma más ventajosa como se indica en la presente invención, pero los expertos en la técnica observaran inmediatamente que el procedimiento se debe modificar si se quiere sintetizar un único compuesto de la fórmula I anterior.

25 Se cargan el mismo número de recipientes de reacción (normalmente de 24 a 192, típicamente 96) que los compuestos se van a sintetizar con el método de síntesis paralela con 25 a 1000 mg, preferentemente 100 mg, del soporte sólido funcionalizado apropiado, preferentemente del 1 al 3% de poliestireno reticulado o resina de tentagel.

30 El disolvente que se utilice debe ser capaz de hinchar la resina y puede incluir, pero sin limitación a los mismos, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), dioxano, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), alcohol isopropílico y similares. Las mezclas de disolventes que contienen, como mínimo, un componente disolvente polar (por ejemplo 20% TFE/DCM, 35% THF/NMP) facilitan asegurar una alta reactividad y la disolución de las cadenas peptídicas unidas a resina (G.B. Fields y otros, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4202-4207). Gracias al desarrollo de varios enlazadores que liberan el grupo ácido carboxílico del extremo C-terminal en condiciones ligeramente ácidas, que no afectan los grupos lábiles en medio ácido, que protegen los grupos funcionales de la(s) cadena(s) lateral(es), se han realizado progresos considerables en la síntesis de fragmentos peptídicos protegidos. El enlazador derivado de 2-metoxi-4-hidroxibencilalcohol (enlazador Sasrin<sup>R</sup>, Mergler y otros, Tetrahedron Lett, 1988, 29 4005-4008) es escindible con ácido trifluoroacético diluido (del 0,5 al 1% de TFA en DCM) y es estable en condiciones de desprotección de Fmoc durante la síntesis peptídica, los grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu son compatibles con este esquema de protección. Otros enlazadores adecuados para este proceso de la presente invención son el enlazador lábil en medio súper ácido 4-((2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)-fenoxi (enlazador Rink, Rink, H. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787-3790), para el que es necesario ácido acético al 10% en DCM o ácido trifluoroacético al 0,2% en DCM para eliminar el péptido; el enlazador derivado del ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi) butírico (enlazador HMPB, Florsheimer & Riniker, Peptides 1991, 1990, 131), que también se escinde con 1% de TFA/DCM, para proporcionar un fragmento peptídico que contiene todos los grupos protectores de cadena lateral lábiles en medio ácido; y el enlazador 2-clorotritilo (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946), que permite la separación de péptidos utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 min. Algunos ejemplos de grupos protectores adecuados para aminoácidos y, respectivamente, para sus residuos son, por ejemplo,

50 - para el grupo amino (ya que también se encuentra en la cadena lateral de la lisina)

Cbz	benciloxicarbonilo
Boc	terc-butiloxicarbonilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
55 Alloc	aliloxicarbonilo
Teoc	trimetilsililetoxicarbonilo
Tcc	tricloroetoxicarbonilo
Nps	o-nitrofenilsulfonilo
60 Trt	trifenimetilo o tritilo

- para el grupo carboxilo (ya que también se encuentra en la cadena lateral del ácido aspártico y el ácido glutámico) por conversión en ésteres con los componentes alcohol

5	tBu	terc-butilo
	Bn	bencilo
	Me	metilo
	Ph	fenilo
	Pac	fenacilo
	Tse	trimetilsililetilo
10	Tce	triclороetilo

- para el grupo guanidino (ya que se encuentra en la cadena lateral de la arginina)

15	Boc	t-butiloxicarbonilo
	Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
	Cbz	benciloxicarbonilo
	Pbf	pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

- para el grupo hidroxilo (ya que se encuentra por ejemplo en la cadena lateral de la treonina y la serina)

20	tBu	terc-butilo
	Bn	bencilo
	Trt	tritilo

25 - y para el grupo mercapto (ya que se encuentra en la cadena lateral de la cisteína)

	Acm	acetamidometilo
	tBu	terc-butilo
	Bn	bencilo
30	Trt	tritilo
	Mtr	4-metoxitritilo

35 Los derivados de aminoácidos protegidos con 9-fluorenilmetoxicarbonilo-(Fmoc) se utilizan preferentemente como bloques de construcción de miméticos de lazo de horquilla beta fijados a patrón de la fórmula I. Para la desprotección, es decir, la escisión del grupo Fmoc, se puede utilizar 20% piperidina en DMF o 2% DBU/2% piperidina en DMF.

40 La cantidad de reactivo, es decir, de derivado de aminoácido, es normalmente de 1 a 20 equivalentes en base a la carga en mmoles por gramo (meq./g) de soporte sólido funcionalizado (típicamente de 0,1 a 2,85 mmol./g para resinas de poliestireno) pesado originalmente en el tubo de reacción. Se pueden utilizar, si es necesario, equivalentes adicionales de reactivo para finalizar la reacción en un tiempo razonable. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector, se reinsertan en el bloque de depósito, y el aparato se fija conjuntamente. Se inicia el flujo de gas a través del colector para proporcionar un entorno controlado, por ejemplo, nitrógeno, argón, aire y similares. También se puede calentar o enfriar el flujo de gas antes de hacerlo fluir a través del colector. El calentamiento o refrigeración de los pocillos de reacción se consigue calentando el bloque de reacción o enfriándolo externamente con isopropanol/hielo seco o similares para llevar a cabo las reacciones de síntesis deseadas. La agitación se consigue mediante oscilación o agitación magnética (en el tubo de reacción). Las estaciones de trabajo preferentes (sin limitarse a las citadas) son la estación ACT 90, el sintetizador de péptidos Symphoni abi 433A y el sintetizador MultiSyn Tech's-Syro.

50 Para la formación de enlaces amida se requiere la activación del grupo alfa-carboxilo para la etapa de acilación. Cuando esta activación se realiza, como es habitual, con la utilización de carbodiimidas como la dicitclohexilcarbodiimida (DCC, Sheehan & Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067-1068) o diisopropilcarbodiimida (DIC, Sarantakis y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 73, 336-342), las dicitclohexilurea y diisopropilurea resultante es insoluble y, respectivamente, es soluble en los disolventes que se utilizan habitualmente. En una variación del método de la carbodiimida, se incluye 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, König & Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 788-798) como aditivo a la mezcla de acoplamiento. El HOBt evita la deshidratación, inhibe la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las reacciones de acoplamiento lentas. Se han utilizado algunos reactivos de fosfonio como reactivos de acoplamiento directo, tal como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP, Castro y otros, Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis, 1976, 751-752), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-BOP, Coste y otros, Tetrahedron Lett. 1990, 31, 205-208) o tetrafluoroborato (TBTU) o hexafluorofosfato (HBTU) de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (Knorr y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930); además estos reactivos de fosfonio son adecuados para la formación *in situ* de ésteres de HOBt con los derivados de aminoácidos protegidos. Más recientemente, se han utilizado además difenoxifosforil azida (DPPA) o tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TATU) o bien hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-

N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU)/7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt) (Carpino y otros, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281) como reactivos de acoplamiento.

Debido a que las reacciones de acoplamiento prácticamente cuantitativas son esenciales, es deseable tener una demostración experimental de la finalización de dichas reacciones. El ensayo de ninhidrina (Kaiser y otros, Anal. Biochemistry 1970, 34, 595), en el que una respuesta colorimétrica positiva a una alícuota de péptido unido a resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, se puede realizar de forma fácil y rápida después de cada etapa de acoplamiento. La química de Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo de Fmoc, cuando se libera con la base (Meienhofer y otros, Int. J. Peptide Protein Res. 1979, 13, 35-42).

El intermedio unido a la resina dentro de cada tubo de reacción se lava para liberarlo del exceso de reactivos retenidos, de disolventes y de los subproductos por exposición repetitiva a disolvente(s) puro(s) mediante uno de los dos métodos siguientes:

1) Los pocillos de reacción se llenan con disolvente (preferentemente 5 ml), los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector se sumergen, se agitan durante 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y se drenan por gravedad seguido de gas a presión aplicado a través del colector de entrada (mientras se cierra la salida) para expulsar el disolvente.

2) El colector se retira del bloque de soporte, las alícuotas de disolvente (preferentemente 5 ml) se dispensan a través de la parte superior de los tubos de reacción y se drenan por gravedad a través de un filtro en un recipiente receptor, tal como un tubo o vial de ensayo.

Ambos procesos de lavado citados anteriormente se repiten hasta 50 veces (preferentemente 10 veces), se realiza un seguimiento la eficiencia de eliminación de reactivo, disolvente y subproducto con métodos como TLC, GC o la inspección de los lavados.

El procedimiento descrito anteriormente de hacer reaccionar el compuesto unido a resina con reactivos dentro de los pocillos de reacción, seguido de la eliminación de los reactivos en exceso, los subproductos y disolventes, se repite con cada transformación sucesiva, hasta que se obtiene el péptido lineal completamente protegido unido a la resina final.

La separación del péptido lineal completamente protegido del soporte sólido se consigue mediante la inmersión de los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector, en los pocillos de reacción que contienen una solución de reactivo de escisión (preferentemente de 3 a 5 ml). El flujo de gas, el control de la temperatura, la agitación y el seguimiento se llevan a cabo tal y como se ha descrito anteriormente y tal como se desea para efectuar la reacción de separación. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector se desensamblan del bloque de reserva y suben hasta el nivel de la solución pero por debajo del borde superior de los pocillos de reacción, y se aplica gas a presión a través del colector de entrada (mientras se cierra la salida) para expulsar la solución del producto final en los pocillos de reserva. La resina restante en los tubos de reacción se lava posteriormente entre 2 y 5 veces tal y como se describió anteriormente con de 3 a 5 ml del disolvente adecuado para extraer (lavar) todo el producto separado que sea posible. Las soluciones de producto que se obtienen se combinan, se deben evitar las mezclas cruzadas. Posteriormente las soluciones/extractos individuales se manipulan según sea necesario para aislar los compuestos finales. Entre las manipulaciones más habituales, se incluyen pero no se limitan a las mismas, evaporación, concentración, extracción líquido-líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones adicionales en solución.

Las soluciones que contienen derivados de péptidos lineales completamente protegidos que se han separado del soporte sólido y neutralizado con una base, se evaporan. Previamente a que este péptido lineal completamente protegido se haya separado del soporte sólido, es posible, si se desea, desproteger selectivamente el grupo alfa-amino protegido del residuo amino del aminoácido del extremo N-terminal y acilar el grupo amino que se libera mediante un agente acilante correspondiente al sustituyente acilo que se introduce. Alternativamente se pueden eliminar selectivamente y en primer lugar los grupos protectores de las cisteínas y realizar la ciclación tal y como se describe a continuación. La escisión de la resina y la desprotección del péptido cíclico se pueden realizar como se describe a continuación.

El derivado peptídico completamente protegido se trata con 82,5% de TFA, 5% de H<sub>2</sub>O, 5% de fenol, 5% de tioanisol, 2,5% de etanatiol u otra combinación de otros eliminadores para realizar la escisión de los grupos protectores. La duración de la reacción de escisión oscila habitualmente entre los 30 minutos y las 12 horas, preferentemente alrededor de 5 horas. A partir de ahí la mayor parte de TFA se ha evaporado y el producto ha precipitado con éter u otros disolventes adecuados para dicho proceso. Después de eliminar detenidamente el disolvente, el derivado peptídico ya se puede purificar.

La ciclación (formación de puentes disulfuro) se realiza posteriormente en solución, utilizando disolventes como agua, DMF o productos similares. Se pueden utilizar diversos reactivos oxidantes para el proceso de ciclación, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aire o iodo. La duración del proceso de ciclación oscila entre 15 minutos y 24 horas, preferentemente alrededor de 40 minutos. Posteriormente al proceso de reacción se realiza, por ejemplo una RP-HPLC o

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa («Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography») y una espectrometría de masas. Después se elimina el disolvente mediante evaporación, y se purifica el derivado peptídico cíclico utilizando RP-HPLC.

5 El proceso de exposición en fagos de la presente invención se puede realizar de la forma siguiente: el mimético de lazo de horquilla beta fijado a patrón de la presente invención se fusiona, como mínimo, con una parte de la proteína de cubierta fágica y forma una proteína de fusión que contiene el mimético de lazo de horquilla beta fijado a patrón. La proteína de fusión se puede sintetizar expresando un gen de fusión que codifique para la proteína de fusión con técnicas conocidas de exposición en fago como las que se describen a continuación.

10 La exposición en fago de bacteriófagos es una técnica conocida en la que se exponen variantes de polipéptidos en forma de proteínas de fusión a la proteína de la cubierta de la superficie de las partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G.P. Science 1990, 249; 386). La utilidad de esta técnica es el hecho de que se pueden clasificar un gran número de bibliotecas de variantes proteicas aleatorizadas de forma selectiva (o ADNc clonado al azar) de forma rápida y eficiente de aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad.

15 Normalmente las variantes de polipéptidos como el mimético de horquilla beta fijado a patrón de la presente invención, se fusionan con la proteína del gen III que se expone en un extremo del virión.

20 La técnica de la exposición en fago monovalente es un proceso en el que se fusiona una secuencia peptídica o proteica con una parte de la proteína del gen III y se expresa a bajos niveles en presencia de la proteína del gen III de tipo salvaje, de forma que las partículas exponen principalmente la proteína del gen III de tipo salvaje y una copia o ninguna de la proteína de fusión que también se puede utilizar en la presente invención.

25 Los vectores del gen III apropiados para exponer miméticos de horquilla beta fijados a patrón de la presente invención son fUSE5, MKE 13 (New England Biolabs, Inc), fAFF1 (Cwirla y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6378-6382), fd-CAT1, fdtetDOG, 33,88, pComb3, pComb8, m663, pHEN1, vectores CB genentech pCANTAB5E y similares.

30 Los métodos de exposición en fago para proteínas, péptidos y variantes mutantes de los mismos, que incluyen construir una familia de vectores variantes replicables que contenga un elemento regulador de la transcripción unido de forma operativa a un gen de fusión que codifica para un polipéptido de fusión, transformar las células huésped adecuadas, hacer un cultivo de las células transformadas para formar partículas fágicas que expongan el polipéptido de fusión en la superficie de la partícula fágica en contacto con las partículas fágicas recombinantes con una molécula diana de forma que como mínimo una parte de las partículas se unan a la diana, y separar las partículas que se unan de aquellas que no lo hagan, son técnicas conocidas que se pueden utilizar en conformidad con la presente invención (K. O'Neil y otros, Curr. Opin. Struct. Biol. 1995 5, 443- 449).

40 El gen que codifica la proteína de cubierta del fago y el gen que codifica la parte deseada del mimético de horquilla beta fijado a patrón de la proteína de fusión se pueden obtener por técnicas ya conocidas (Sambrook y otros. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, pp. A1-A4 1989). El gen que codifica el ADN se puede sintetizar químicamente (Letzinger and Khorona. J. Am. Chem. Soc. 1965, 87, 3526, ibd. 1966, 88, 3181; L. J. McBride, M.H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 1983, 24, 245-248), y posteriormente se puede mutar para preparar una biblioteca de variantes como se describe a continuación.

45 Para ligar fragmentos de ADN y formar un vector funcional que contenga el gen de fusión, los extremos de los fragmentos de ADN deben ser compatibles entre ellas. Puede que primeramente sea necesario convertir los extremos cohesivos producidos por la digestión de la endonucleasa en extremos romos para que sean compatibles durante el proceso de ligación. Para hacer que los extremos sean romos, se trata el ADN con un tampón adecuado un mínimo de 15 minutos a 15°C del fragmento Klenow de la ADN polimerasa 1 (Klenow) en presencia de los cuatro oxinucleótidos trifosfato. Posteriormente se purifica el ADN mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, o mediante otras técnicas de purificación de ADN.

50 Los fragmentos de ADN segmentados se pueden separar y seleccionar según su tamaño mediante un gel en electroforesis. Se puede separar el ADN mediante electroforesis con una matriz de agarosa o de poliacrilamida. Después de la electroforesis se extrae el ADN de la matriz con electroelución o con métodos de purificación y ligación.

60 Los fragmentos de ADN que deben ligarse entre sí se colocan en una solución en cantidades aproximadamente equimolares. Dicha solución también contiene ATP, tampón ligasa y una ligasa del tipo ADN ligasa T4.

65 Tras la ligación, el vector portador del gen foráneo insertado se purifica con métodos estándar de biología molecular (Sambrook y otros. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989) y se transforma en una célula huésped adecuada. El método preferido de transformación es la electroporación que se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la materia. Si se quieren elaborar bibliotecas, es preferente que



el ADN tenga una concentración final de 0,05-0,2 microgramos por 100 microlitros suspensión de células competentes.

5 Es preferente purificar el ADN para eliminar contaminantes. El ADN se puede purificar mediante cualquier método conocido; sin embargo, un método de purificación preferido es la purificación del ADN por afinidad. Se puede utilizar la técnica bien conocida de purificación del ADN mediante resinas de unión al ADN y reactivos de afinidad, o cualquier otro método conocido en la materia (por ejemplo Biorad, Qiagene).

10 Las células huésped pueden ser cualquier célula adecuada que se puedan transformar por electroporación según el método de la presente invención. Las células huésped adecuadas que se pueden transformar son las células gram negativo como E. coli. Las cepas adecuadas de E. coli incluyen, pero no se limitan a las mismas, XL1 Blue (Stratagene), ElectroTen-Blue (Stratagene), ER2738 (New England Biolabs), DH5alpha (Gibco), MC1061 (American Type Culture Collection (ATTC), ATTC número 53338).

15 En la electroporación es preferente utilizar una concentración celular de unas  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias o más por ml de suspensión de células vivas viables. Tras la electroporación es preferente hacer crecer las células en medio SOC (para ver la preparación del medio SOC consulte, por ejemplo, Sambrook y otros, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, p. A1-A4 1989).

20 Si los aminoácidos están cercanos dentro de la cadena polipeptídica, puede que muten simultáneamente si se utiliza un oligonucleótido que codifique por todas las sustituciones deseadas del aminoácido. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar de tal forma que contengan nucleótidos ambiguos o inequívocos en posiciones predeterminadas tal y como sucede con la codificación de los patrones de la presente invención. Durante la síntesis en las posiciones ambiguas se incluye una mezcla de todos los nucleótidos o un subgrupo seleccionado de nucleótidos. Se pueden utilizar codones que codifiquen la totalidad de los aminoácidos, por ejemplo, el codón NNK o NNS, en el que N es A, C, G o T, y K es G o T y S es G o C.

25 Tras la selección de las células transformadas, dichas células se multiplican en un cultivo y entonces se debe aislar el ADN de vector. Gracias a la secuenciación de ADN usando métodos conocidos en la materia se puede aislar, purificar y analizar el ADN vector del fago o fagémido.

30 Los compuestos I de la presente invención aportan el beneficio de un nuevo sistema para diseñar y analizar péptidos de forma racional cuyas características están estructuralmente bien definidas. Las bibliotecas combinatorias que contengan dichos miméticos de horquilla beta fijados a patrón y métodos para utilizarlos proporcionan información útil y herramientas para investigar la interacción proteína-proteína. Los miméticos de horquilla beta fijados a patrón que se dan a conocer en este documento o generados según los fundamentos de la presente invención pueden ser candidatos para varios agentes biológicos o terapéuticos, incluyendo pero no limitándose a las mismas, inhibidores de enzimas, antagonistas de ligandos y agonistas de ligandos.

35 Los ejemplos siguientes ilustran con mayor detalle la presente invención pero en ningún caso pretenden limitarla. En estos ejemplos se utilizan las siguientes abreviaturas:

HBTU: hexafluorofosfato de 1-benzotriazol-1-il-tetrametiluronio (Knorr y otros. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930)

45 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

DIEA: diisopropiletilamina

## Ejemplos

### 50 1. Síntesis peptídica de miméticos de horquilla beta unidos a patrón

#### a) Síntesis

##### *Acoplamiento del primer residuo protegido de aminoácido*

55 Se llenó un matraz seco con 0,5 g de resina de cloruro de 2-clorotritilo (Barlos y otros. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) (0,83 mmol/g, 0,415 mmol). La resina se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,5 ml) y se hinchó a temperatura ambiente a agitación constante durante 30 min. La resina se trató con 0,415 mMol (1 eq.) del primer residuo de aminoácido protegido adecuado (ver a continuación) y 284 microlitros (4 eq.) de diisopropiletilamina (DIEA) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,5 ml), y la mezcla se agitó a 25°C durante 4 horas. El color de la resina pasó a violeta y la solución quedó de un color amarillento. La resina se agitó (30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH/DIEA : 17/2/1) durante 30 min, posteriormente se lavó en el orden siguiente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1x), DMF (1x),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1x), MeOH (1x),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1x), MeOH (1x),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x),  $\text{Et}_2\text{O}$  (2x) y secó al vacío durante 6 horas.

Normalmente la carga era 0,45 – 0,5 mmol/g. Se prepararon las siguientes resinas precargadas: resina Fmoc-Cys(Trt)-clorotritilo, resina Fmoc-Glu(OtBu)-clorotritilo, resina Fmoc-Lys(Boc)-clorotritilo, resina Fmoc-Val-clorotritilo y resina Fmoc-Gly-clorotritilo.

## 5 Procedimiento 1

La síntesis se llevó a cabo mediante el sintetizador peptídico Syro (Multisyntech) y se utilizaron entre 24 y 96 recipientes de reacción. En cada recipiente se colocaron 60 mg (peso de la resina previamente a la carga) de la resina citada anteriormente. Se programaron y realizaron los siguientes ciclos de reacción:

10

Etapa	Reactivo	Tiempo
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , lavado e hinchamiento (manual)	3 x 1 min
2	DMF, lavado e hinchamiento	1 x 5 min
3	40% piperidina/DMF	1 x 5 min
4	DMF, lavado	5 x 2 min
5	5 eq. Fmoc aminoácido/DMF + 5 eq. HBTU + 5 eq. HOBt + 5 eq. DIEA	1 x 120 min
6	DMF, lavado	4 x 2 min
7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , lavado (al final de la síntesis)	3 x 2 min

Las etapas de la **3** a la **6** se repiten al añadir cada aminoácido.

### Acetilación del aminoácido amino-terminal

15

Las etapas 1-4 del procedimiento 1 se llevaron a cabo para eliminar el grupo protector Fmoc del extremo N-terminal de la secuencia sintetizada.

20

Posteriormente se transfirieron las resinas cargadas con los péptidos a jeringas de 15 ml equipadas con vidrio poroso y llave. Las resinas se hincharon durante 30 minutos con 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A cada reactor se añadió DIEA (0,4 ml) y anhídrido acético (0,1 ml). Las resinas se agitaron entre 6 horas y una noche. Dichas resinas se filtraron y lavaron sucesivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/dietiléter en el orden en que se citan. Las resinas se secaron al vacío.

25

### Escisión y desprotección del fragmento peptídico completamente protegido

30

Tras haber finalizado la síntesis, la resina se suspendió en 1 ml de TFA AL 1% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) y 1 ml de DIEA al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 3 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces para asegurarse de completar la escisión. El filtrado se evaporó hasta estar seco y el producto se desprotegió con la mezcla de escisión que contenía 82,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de agua, 5% de fenol, 5% de tioanisol, y 2,5% etanoditiol, durante 5 horas a temperatura ambiente y a continuación, se concentró al vacío. Para precipitar los péptidos se añadieron 10 ml de dietiléter, posteriormente se centrifugó, y se eliminó la fase de éter. Dicha operación se repitió dos veces con 5 ml de dietiléter. Los péptidos crudos se disolvieron en 1 ml de CH<sub>3</sub>CN al 10% en agua y en 0,5 a 1 ml de DMF, se filtraron con celita y se purificaron con HPLC en fase reversa.

35

### Ciclación del péptido lineal desprotegido

40

Los péptidos lineales obtenidos se disolvieron en 1,5 ml de agua a una concentración de 10<sup>-4</sup> M, y se añadieron 15 microlitros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 M, 1 eq). La ciclación duró 700 min.

Los péptidos cíclicos obtenidos se analizaron mediante HPLC analítica y ESI-MS. En los ejemplos se indican los datos analíticos sobre los tiempos de retención HPLC y ESI-MS.

45

Los tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) se determinaron utilizando un columna VYDAC 218MS5215 de tamaño 0,21 cm x 15 cm, 5 micrómetros de lateral de embalaje (sílice) con los disolventes siguientes A (H<sub>2</sub>O + TFA al 0,02%) y B (CH<sub>3</sub>CN) y el gradiente siguiente: 0 min: 92% A, 8% B; 8 min: 62% A, 38% B; 9-12 min: 0% A, 100% B, flujo: 0,4 ml/min.

50

El **ejemplo 1** (n = 8) aparece en la *tabla 1*. El péptido se sintetizó empezando con el aminoácido Cys que se insertó en la resina. La resina inicial era resina Fmoc-Cys(Trt)-clorotritilo que se preparó tal como se ha descrito anteriormente. El péptido lineal se sintetizó en un soporte sólido según el **procedimiento 1** siguiendo la secuencia siguiente: Resina-Cys-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1-Cys, y posteriormente se aciló, segmentó, purificó y cicló, tal como se ha indicado. El tiempo de retención HPLC (minutos) y la masa se determinaron gracias al *gradiente* descrito anteriormente: RT = 7,26 min, [M+H]<sup>+</sup> = 1281,3.

55



## 2a. Método de medición de la cinética de la formación de puentes disulfuro de miméticos de horquilla beta fijados a patrón

Se prepararon soluciones stock de cada péptido lineal desprotegido purificado, que contenían 1,5 ml de la solución peptídica a una concentración de  $10^{-4}$  M en agua. Gracias al LC-MS analítico descrito anteriormente, se pudo hacer un seguimiento de la formación del puente disulfuro. La primera toma de datos se lleva a cabo sin el reactivo de oxidación  $H_2O_2$  en el tiempo 0. La segunda toma de datos se realiza 15 minutos después de añadir el reactivo de oxidación  $H_2O_2$  (15 microlitros, 0,01 M, 1 eq.). Se recogieron datos cada 33 minutos hasta el momento en que no se detectaron más cambios en la conversión.

La cantidad de péptido cíclico unido por puentes disulfuro se calculó en base al porcentaje de área de pico (integrado manualmente) del péptido cíclico en el tiempo t menos el porcentaje de área de pico del péptido cíclico (integrado manualmente) en el tiempo t0 a una longitud de onda de 220 nm.

## 2b. Método de medición del dicroísmo circular

Las mediciones de dicroísmo circular son sensibles a la estructura secundaria de péptidos y proteínas, y se han utilizado extensamente para analizar la conformación de ambos (M. Jourdan y otros, Eur. J. Biochem. 2000, 267, 3539-3548; J. T. Peltó y otros, Analytical Biochemistry, 2000, 277, 167-176).

El espectro de dicroísmo circular se obtuvo gracias a un espectropolarímetro J-715 Jasco, equipado con un gestor de espectros para Windows 95/NT. Versión 1.52.01 [Build2]. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en células de cuarzo de 0,1 cm de recorrido en agua. Los espectros se registraron con un ancho de banda de 1 nm, se utilizaron 5 escáneres para mejorar la relación señal/ruido y se registró la referencia del disolvente y se restó de los espectros de las muestras. Todos los espectros de dicroísmo circular se ajustaron (con el mismo valor), y los residuos peptídicos se registraron en unidades elipticidad molecular (Mol. Ellip.).

Parámetros de medición: Ancho de banda: 1,0 nm, respuesta: 1 s, sensibilidad: estándar, rango de medición: 240-190 nm, datos: 0,5 nm, velocidad de escaneo: 50 nm/min. Concentración de las soluciones de péptido lineal desprotegido, purificado:  $10^{-4}$  M en agua y sales TFA. El pH y la pureza de los péptidos lineales desprotegidos, purificados, como precursores de los ejemplos siguientes fueron: **ejemplo 3**: pH 6,38, pureza 91%; **ejemplo 4**: pH 6,77, pureza 89%; **ejemplo 5**: pH 6,01, pureza 98%; **ejemplo 9**: pH 6,00, pureza 94%.

## 2c. Resultados:

Las figuras 1-6 muestran una comparación de la formación de miméticos de horquilla beta unidos por puentes disulfuro en % hasta el momento después del cual no se detectó más conversión.

**Figura 1: ejemplos 1 y 2** (n = 8); la tasa de formación de puentes disulfuro del compuesto del **ejemplo 2** con patrón se compara con la del **ejemplo 1** como referencia ya que este último no tiene patrón.

**Figura 2: ejemplos 3 y 4** (n = 10); la tasa de formación de puentes disulfuro del compuesto del **ejemplo 4** con patrón se compara con la del **ejemplo 3** como referencia ya que este último no tiene patrón.

**Figura 3: ejemplos 5, 6 y 9** (n = 10); la tasa de formación de puentes disulfuro del compuesto de los **ejemplo 6 y 9** con patrón se compara con la del **ejemplo 5** como referencia ya que este último no tiene patrón.

**Figura 4: ejemplos 3 y 10** (n = 10); la tasa de formación de puentes disulfuro del compuesto del **ejemplo 10** con patrón se compara con la del **ejemplo 3** como referencia ya que este último no tiene patrón.

**Figura 6: ejemplos 13 y 14** (n = 12); la tasa de formación de puentes disulfuro del compuesto del **ejemplo 14** con patrón se compara con la del **ejemplo 13** como referencia ya que este último no tiene patrón.

**Figura 7:** Los espectros de dicroísmo circular (epsilon en  $\text{deg} \times \text{cm}^2/\text{mol}$ ) de los precursores de péptidos lineales de los compuestos de los **ejemplo 3, 4, 5 y 9**, esto es, previamente a la formación de puentes disulfuro.

## 2d. Discusión

### *Diseño de las secuencias Z del ejemplo*

Se han seleccionado dos tipos distintos de secuencias Z centrales peptídicas para investigar si el patrón facilita la formación y estabilización de los miméticos de horquilla beta fijados a patrón: la secuencia -Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Trp-Val- [SEQ ID NO:22] se obtuvo del lazo L3 CDR de un anticuerpo (L. Jiang y otros, *Chimia* (2000) 54, 558-563) y se modificó para convertirla en la secuencia -Lys-Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln- [SEQ ID NO:23] que contenía una secuencia estabilizadora giro beta y lámina beta según P. Y. Chou y otros, *J. Mol. Biol.* (1977) 115, 135-175 como horquilla beta de referencia. Se construyó una segunda secuencia Z -Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala- [SEQ ID

NO:24] a partir de la secuencia -Leu-Trp-Tyr-Ser-Asn-His-Trp-Val-Lys-Trp- [SEQ ID NO:25] que no contiene ninguna secuencia estabilizadora de giro beta o lámina beta según to P. Y. Chou y otros, J. Mol. Biol. (1977) 115, 135-175.

5 Los resultados representados en las figuras de la 1 a la 4 y en la figura 6 muestran que las tasas de formación de puentes disulfuro de los compuestos con un patrón y la secuencia central -Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala- [SEQ ID NO:24] son más elevadas en comparación con las de los compuestos que tienen la misma secuencia central pero no disponen de patrón. Los resultados demuestran claramente que los patrones de la presente invención facilitan la formación de miméticos de horquilla beta. Incluso en el caso de la secuencia central Z -Lys- Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln- [SEQ ID NO:23], que en si misma ya contiene una secuencia estabilizador giro beta y lámina beta, se puede demostrar (véase figura 2 y 4) que el patrón facilita la formación de miméticos de horquilla beta.

15 Además, el espectro de dicroísmo circular (véase la figura 7) del precursor lineal del compuesto del **ejemplo 5** que contiene la secuencia central -Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala-[SEQ ID NO:24] pero no tiene patrón, indica un elevado contenido de estructuras hélice enrollada y hélice alfa, y trazas de estructuras lámina beta, mientras que el precursor lineal del compuesto del **ejemplo 9** (que contiene la misma secuencia central y un patrón) indica un elevado contenido en estructuras lámina beta y una estructura giro beta. El espectro de dicroísmo circular del precursor lineal del compuesto del **ejemplo 3** contiene la secuencia central Lys-Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln- [SEQ ID NO:23] pero no contiene patrón indica una mezcla de una estructura enrollada y una lámina beta mientras que el espectro de dicroísmo circular del precursor lineal del compuesto del **ejemplo 4** (que contiene la misma estructura central y un patrón) indica un elevado contenido de la estructura lámina beta. Estos resultados indican que los patrones de la presente invención inducen a la formación de miméticos de horquilla beta.

### 3. Construcción de secuencias de miméticos de horquilla beta fijados a patrón de exposición en fago que incorporan los patrones

25 Procedimiento:

30 Las bibliotecas de oligonucleótidos de la presente invención se pueden fusionar con el gen III del bacteriófago filamentososo M13KE según el procedimiento del Ph. D. Peptide Display Cloning System, boletín técnico # E8101 (8/21/02, New England Biolabs, Inc) y K. Noren, C. Noren, Methods, 2001, 23, 169-178. La exposición en fago del mimético de horquilla beta fijado a patrón del **ejemplo 3** [SEQ ID NO: 10] se consigue tal y como se describe en el apartado siguiente. Para todas las otras secuencias presentes en las tablas 5-8 se utilizan los procedimientos correspondientes, se diferencian en los oligonucleótidos utilizados para generar ADN insertado.

35 Los oligonucleótidos 1 y 2 (véase a continuación) se utilizan para construir el ADN insertado. Las posiciones únicas AccI y EagI de los sitios de restricción para clonar en ADN vector están subrayadas.

40 Para aparear 2 microgramos (aprox. 170 pmol) de oligonucleótido se calientan 1 y 4,5 microgramos de oligonucleótido 2 (aprox. 170 pmol), aproximadamente a 95°C en 50 microlitros de TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) que contienen 100 mM NaCl. Tras enfriarlo lentamente durante 15-30 minutos el dúplex apareado se amplía gracias al fragmento Klenow de ADN polimerasa I en un volumen total de 200 microlitros. Las condiciones de la reacción se resumen en Sambrook y otros. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press. El inserto de ADN resultante se digirió con EagI y Acc65I en las condiciones recomendadas por el proveedor (New England Biolabs). La mezcla se extrae con fenol/cloroformo y cloroformo antes de precipitar la fase acuosa con etanol. El precipitado se purifica en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8% según los procedimientos estándar de la biología molecular (Sambrook y otros. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press).

50 Con EagI y Acc65I se digieren 15 microgramos del vector M13KE (New England Biolabs), según las condiciones recomendadas por New England Biolabs. La mezcla se purifica en agarosa y el vector de ADN linealizado se recupera gracias al kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen)

Oligonucleótido número 1

55 Acc65I  
5' CATGCCCGGGTACCTTTCTATTCTCACTCTGAAACCTGC 3' [SEQ ID NO:26]

Oligonucleótido número 2

60 EagI  
5'  
CATGTTTCGGCCGAGCCACCACCTTTGGTGCAGGTCTGATAATGGTTGCTGAA  
CCATTTGGTGCAGGTTTCAGAGTGAGAATAG 3' [SEQ ID NO:27]

65 Para clonar el ADN insertado las condiciones no están optimizadas. En resumen, la ligación se lleva a cabo durante la noche a 16°C en un volumen total de 20 microlitros de tampón ligasa ADN T4 que contiene aproximadamente 40

5 ng de vector linealizado, un exceso molar de aproximadamente 3:1 de dúplex y 200 unidades de ligasa T4. También se realizan reacciones de control que implican solo un vector, con más o menos ligasa, para determinar la eficiencia de ligación y la base debidos a la religación del vector. Las mezclas de ligación se activan por calor a 65°C durante 15 minutos y se utilizan alícuotas de 1 microlitro para la posterior electroporación en 100 microlitros con células competentes para la electroporación Electro Ten-blue (Stratagene) tal como describe New England Biolabs. Inmediatamente después de la electroporación se añade 1 ml de medio SOC (2% bacto triptona, 0,5% extracto de bacto-levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucosa) a cada cubeta, y se incuban durante 30 minutos a 37°C. Las alícuotas se utilizan para valorar cada cultivo por selección azul/blanco con un medio que contenga X-gal y IPTG. Se seleccionan los clones individuales para la confirmación de secuencias y se incuban en 1 ml a dilución 1:100 en un cultivo durante la noche de XL1-Blue después de incubar a 37°C durante 4-4,5 horas. Se obtienen fagos que se pueden conservar a largo plazo y para secuenciación, de estos cultivos líquidos, cuando se aplican los protocolos conocidos.

Tabla 1: Ejemplos 1-2, n = 8

Ejemplo	Id sec.	R <sup>1</sup>	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Cys	R <sup>2</sup>
1	SEQ ID NO: 8	Ac-NH-	Cys	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Cys-H	
2	SEQ ID NO: 9	Ac-NH-Glu	Thr	Cys	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Cys Thr Lys-H

---

las cisteínas están unidas mediante puentes disulfuro

---

15

Tabla 2: Ejemplos: 3-9, n=10

Ejemplo	Sequ.ID	R1	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Cys	R2
3	SEQ ID NO:10	Ac-NH-Cys	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Ser	Asn	His	Tyr	Gln	Thr	Cys	
4	SEQ ID NO:11	Ac-NH-Glu	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Ser	Asn	His	Tyr	Gln	Thr	Cys-H	
5	SEQ ID NO:12	Ac-NH-Cys	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys-H	Thr
6	SEQ ID NO:13	Ac-NH-Leu	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Lys
7	SEQ ID NO:14	Ac-NH-Asn	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Lys
8	SEQ ID NO:15	Ac-NH-Gly	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Gly
9	SEQ ID NO:16	Ac-NH-Glu	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Thr

las cisteinas se unen mediante un puente disulfuro  
Ac = acetilo

Tabla 3: Ejemplos: 10-12, n=10

Ejemplo	Sequ.ID	R1	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Cys	R2
10	SEQ ID NO:17	Leu	Thr	Lys	Trp	Phe	Ser	Asn	His	Tyr	Gln	Thr	Cys	Glu
11	SEQ ID NO:18	Val	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Gly
12	SEQ ID NO:19	Gly	Thr	Lys	Trp	Phe	Leu	Ala	His	Tyr	Ala	Thr	Cys	Gly

Las cisteínas se unen mediante un puente disulfuro



Tabla 4: Ejemplos: 13-14, n=12

Ejemplo	Seq. ID	R <sup>1</sup>	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Cys	R <sup>2</sup>
13	SEQ ID NO:20	Ac-NH-Cys	Gly	Thr	Lys	Trp	Phe	Ser	Asn	His	Tyr	Gln	Thr	Gly	Cys-H		
14	SEQ ID NO:21	Ac-NH-Glu	Thr	Cys	Gly	Lys	Trp	Phe	Ser	Asn	His	Tyr	Gln	Thr	Gly	Cys	Thr

las cisteínas se unen mediante un puente disulfuro  
Ac = acetilo

# ES 2 491 166 T3

Tabla de secuencias de ADN que corresponden a los ejemplos 1-14

		R <sup>1</sup>	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Cys	R <sup>2</sup>	
SeqID No:			TGC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	TGC		
28														
SeqID No:	GAA	ACC	TGC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	TGC	ACC	AAA
29														

Tabla 6: Ejemplos: 3-9, n=10

SeqID No:	R <sup>1</sup>	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Cys	R <sup>2</sup>
SeqID No: 30		TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	AGC	AAC	CAT	TAT	CAG	ACC	TGC	
SeqID No: 31	GAA	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	AGC	AAC	CAT	TAT	CAG	ACC	TGC	AAA
SeqID No: 32		TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	
SeqID No: 33	CTG	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	AAA
SeqID No: 34	AAC	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	AAA
SeqID No: 35	GGT	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	GGT
SeqID No: 36	GAA	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	AAA

Tabla 7: Ejemplos: 10-12, n=10

	R1	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Cys	R2
SeqID No: 37	AAA	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	AGC	AAC	CAT	TAT	CAG	ACC	TGC	GAA
SeqID No: 38	GGT	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	GGT
SeqID No: 39	GGC	TGC	ACC	AAA	TGG	TTC	CTG	GCG	CAT	TAT	GCG	ACC	TGC	GGC
	CTG													GTT
	GTT													CTG
	GGT													GGT
	GAA													AAA
	AAA													GAA
	GGT													GGT

Tabla 8: Ejemplos: 13-14, n=12

SeqID	R1	Cys	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Cys	R2
SeqID No40		TGC	GGT	ACC	AAA	TGG	TTC	AGC	AAC	CAT	TAT	CAG	ACC	GGT	TGC	
SeqID No41	GAA	ACC	GGT	ACC	AAA	TGG	TTC	AGC	AAC	CAT	TAT	CAG	ACC	GGT	TGC	ACC
																AAA

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto de la fórmula  $R^1\text{-Cys-Z-Cys-R}^2$  (I), en el cual  
 cada uno de los Cys es un residuo L-cisteína, los dos grupos -SH de los dos residuos L-cisteína se sustituyen por  
 un grupo -S-S-, R1 y R2 son Glu-Thr y Thr-Lys; o Lys-Thr y Thr-Glu; o Thr-Glu y Lys-Thr; o Thr-Lys y Glu-Thr; o Leu-  
 Glu y Lys-Val; o Val-Lys y Glu-Leu; o Glu-Leu y Val-Lys; o Lys-Leu y Val-Glu; o Glu-Leu-Lys y Glu-Val-Lys; o Lys-  
 Val-Glu y Lys-Leu-Glu; o Leu-Glu-Lys y Glu-Lys-Val; o Val-Lys-Glu y Lys-Glu-Leu; o Glu-Lys-Leu y Val-Glu-Lys; o  
 Lys-Glu-Val y Leu-Lys-Glu; o Lys-Glu-Leu y Val-Lys-Glu; o Glu-Lys-Val y Leu-Glu-Lys, y Z es una cadena de 6 hasta  
 10 20 residuos aminoacídicos, siendo cada uno de estos residuos, independientemente, el residuo de un aminoácido L-  
 alfa de origen natural, con la condición, de que Z contenga una de las fracciones -Lys-Trp- Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln-  
 [SEQ ID NO:23]; y -Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala- [SEQ ID NO:24].
- 15 2. Compuesto, según la reivindicación 1, de la fórmula I, en la que  $R^1$  y  $R^2$  sean Glu-Thr y Thr-Lys; o Leu-Glu y Lys-  
 Val; o Glu-Leu-Lys y Glu-Val-Lys.
- 20 3. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, de la fórmula I, en el que  
 $R^1$  y  $R^2$  son Glu-Thr y Thr-Lys, y  
 Z es -Lys-Trp-Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala-; o  
 -Thr-Lys-Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln-Thr-; o  
 -Thr-Lys-Trp-Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala-Thr-; o  
 -Gly-Thr-Lys-Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln-Thr-Gly-,  
 o  
 25  $R^1$  y  $R^2$  son Leu-Glu and Lys-Val, y  
 Z es -Thr-Lys-Trp-Phe-Leu-Ala-His-Tyr-Ala-Thr-,  
 o  
 $R^1$  y  $R^2$  son Glu-Leu-Lys y Glu-Val-Lys, y  
 Z es -Thr-Lys-Trp-Phe-Ser-Asn-His-Tyr-Gln-Thr-.
- 30 4. Biblioteca que incluye un gran número de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 de la  
 fórmula 1.
- 35 5. Biblioteca, según la reivindicación 4, **que se caracteriza porque** cada uno de los compuestos de la fórmula I se  
 fusiona, como mínimo, con una parte de la cubierta proteica del fago y se expone en la superficie del fago o del  
 fagémido.

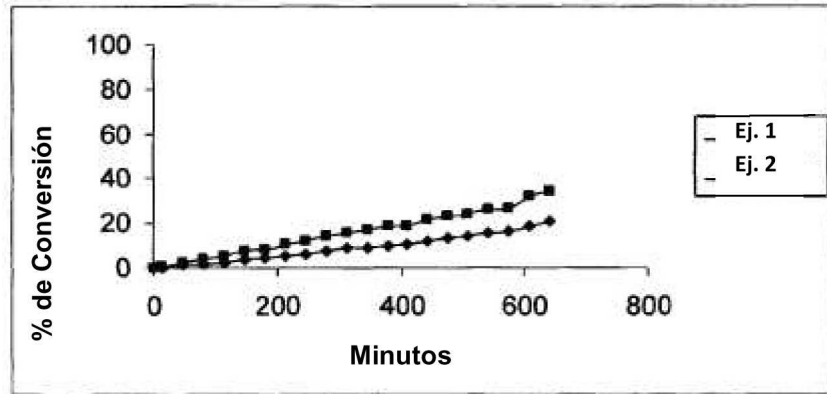


Figura 1

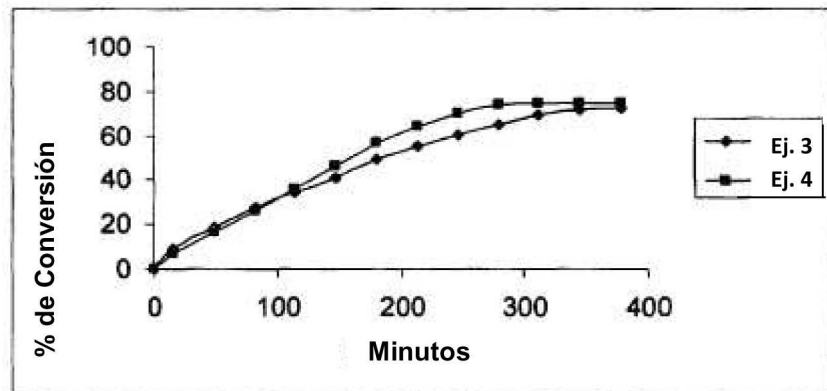


Figura 2

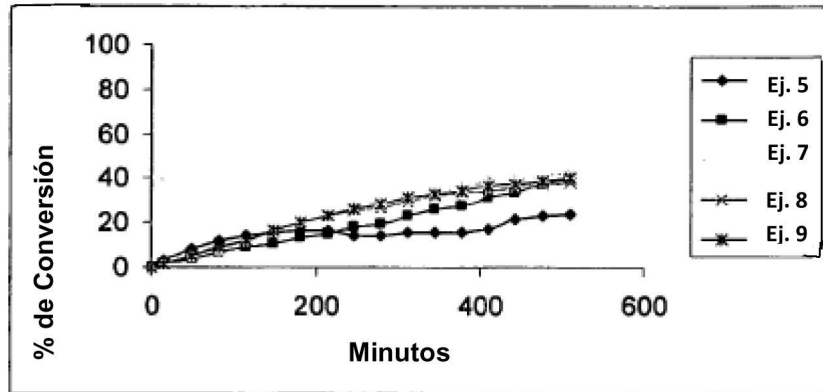


Figura 3

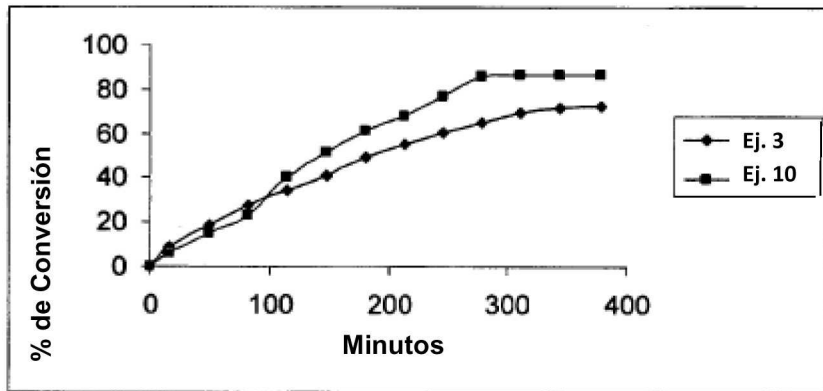


Figura 4



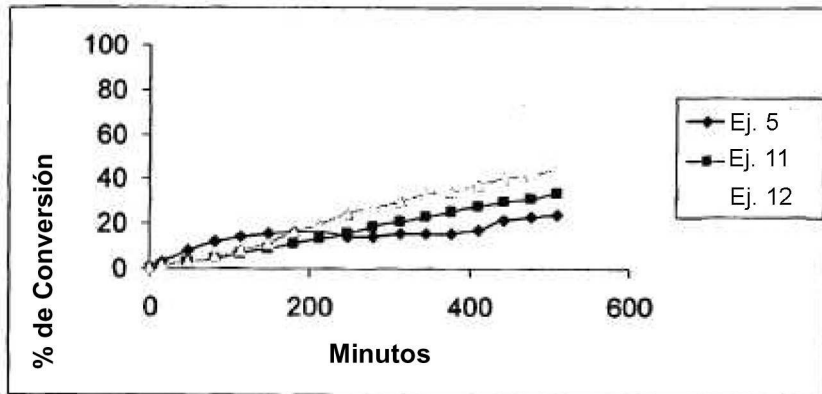


Figura 5

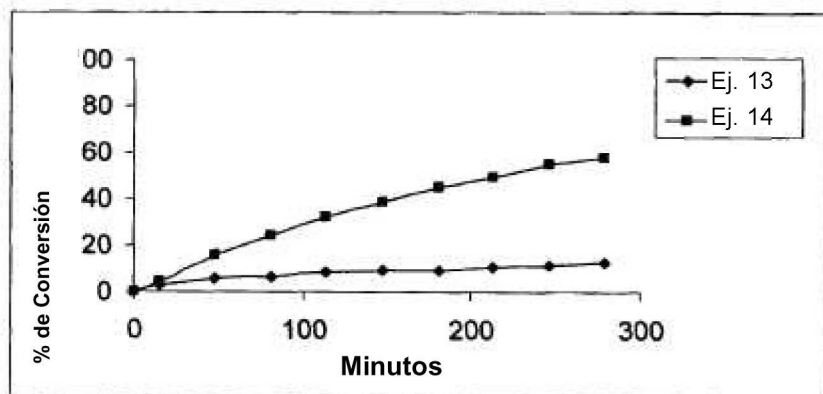


Figura 6

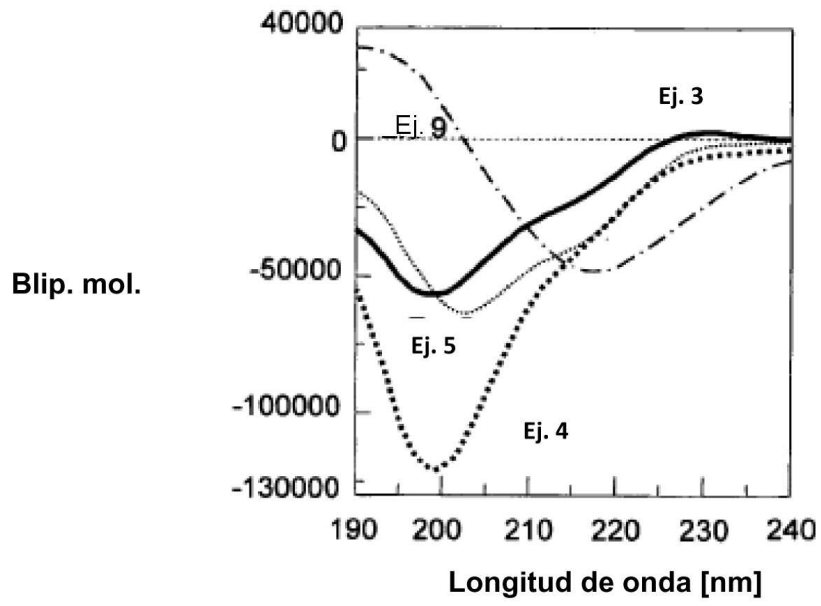


Figura 7