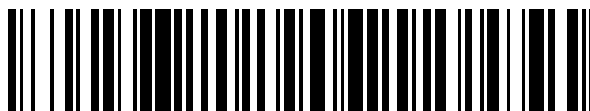


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 856**

51 Int. Cl.:

C07K 7/64 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 12185905 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2540735**

54 Título: **Peptidomiméticos en horquilla β fijados sobre una plantilla, con actividad antagonista con respecto a CXCR4**

30 Prioridad:

02.05.2003 WO PCT/EP03/04640

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

12.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZUMBRUNN, JÜRIG;
DEMARCO, STEVE J.;
MUKHERJEE, RESHMI;
MÖHLE, KERSTIN;
ROBINSON, JOHN, ANTHONY;
HENZE, HEIKO;
ROMAGNOLI, BARBARA;
LOCIURO, SERGIO;
VRIJBLOED, JAN, WIM;
GOMBERT, FRANK;
OBRECHT, DANIEL y
LUDIN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 856 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

Peptidomiméticos en horquilla β fijados sobre una plantilla, con actividad antagonista con respecto a CXCR4

5 La presente invención da a conocer peptidomiméticos de horquilla β fijados sobre plantilla que incorporan cadenas fijadas sobre plantilla de 14 residuos de α aminoácidos que dependiendo de sus posiciones sobre las cadenas son Gly, NmeGly, Pro o Pip, o de ciertos tipos, tal como se definen más adelante. Estos miméticos de horquilla β fijados sobre plantilla tienen actividad antagonista con respecto a CXCR4. Además, la presente invención da a conocer un procedimiento sintético eficaz por el que estos compuestos pueden, en caso deseado, ser realizados en formato paralelo de librería. Estos peptidomiméticos de horquilla β muestran una eficacia mejorada, biodisponibilidad, media vida y de manera más importante una proporción significativamente incrementada entre la actividad antagonista con CXCR4 por una parte y la hemólisis sobre glóbulos rojos y citotoxicidad por otra.

15 Hasta el momento, las terapias disponibles para el tratamiento de infecciones VIH han llevado a una notable mejora de los síntomas y a la recuperación de la enfermedad en personas infectadas. Si bien la terapia altamente activa antirretrovírica (terapia HAART) que comporta una combinación de transcriptas inversa/inhibidor de proteasa ha mejorado notablemente el tratamiento clínico de individuos con infección de sida o VIH, subsisten todavía varios problemas graves incluyendo la resistencia a múltiples medicamentos, efectos adversos significativos y costes elevados. Son particularmente deseados agentes antiVIH que bloqueen la infección VIH en una etapa previa de la infección, tal como la entrada vírica.

25 Se ha reconocido recientemente que para una eficiente entrada en las células objetivo, los virus de la inmunodeficiencia humana requieren los receptores de quimioquina CCR5 y CXCR4, así como el receptor primario CD4 (N. Levy, Engl. J. Med., 335, 29, 1528-1530). De acuerdo con ello, un agente que pueda bloquear los receptores de quimioquina CXCR4 deben impedir infecciones en individuos sanos y reducir o detener el avance vírico en pacientes infectados (Science, 1997, 275, 1261-1264).

30 Entre los diferentes tipos de inhibidores de CXCR4 (M. Schwarz, T. N. C. Wells, A.E.I. Proudfoot, Receptors and Channels, 2001, 7, 417-428), una clase emergente se basa en análogos de péptidos catiónicos de aparición natural derivados de polifemusina II que tienen una estructura de hoja β antiparalela y una horquilla β que se mantiene por dos puentes de bisulfuro (H. Nakashima, M. Masuda, T. Murakami, Y. Koyanagi, A. Matsumoto, N. Fujii, N. Yamamoto, Antimicrobial Agents and Chemoth. 1992, 36, 1249-1255; H. Tamamura, M. Kuroda, M. Masuda, A. Otaka, S. Funakoshi, H. Nakashima, N. Yamamoto, M. Waki, A. Matsumoto, J.M. Lancelin, D. Kohda, S. Tate, F. Inagaki, N. Fujii, Biochim. Biophys. Acta 1993, 209, 1163; WO 95/10534 A1).

35 Las síntesis de análogos estructurales y estudios estructurales por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) han mostrado que los péptidos catiónicos adoptan conformaciones de horquilla β bien definidas debido al efecto limitativo del uno o dos puentes de bisulfuro (H. Tamamura, M. Sugioka, Y. Odagaki, A. Omagari, Y. Kahn, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, S.C. Peiper, N. Hamanaka, A. Otaka, N. Fujii, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 40, 359-362). Estos resultados muestran que la estructura de horquilla β juega un importante papel en la actividad antagonista con respecto a CXCR4.

45 Otros estudios estructurales adicionales han indicado también que la actividad antagonista puede verse influida también por la modulación de la estructura anfífilica y el farmacóforo (H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, K. Gotoh, T. Kanamoto, Y. Xu, E. Kodama, M. Matsuoka, T. Hattori, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka, N. Fujii, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 11, 1897-1902; H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, S. Oishi, H. Habashita, T. Kanamoto, K. Gotoh, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka N. Fujii, Bioorg. Med.Chem. 2002, 10, 1417-1426; H. Tamamura, K. Hiramatsu, K. Miyamoto, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, Y. Kuroda, T. Nakagawa, A. Otaki, N. Fujii, Bioorg. Med. Chem. Letters 2002, 12, 923-928).

50 Un tema clave en el diseño de péptidos con efecto antagonista sobre CXCR4 es la selectividad. Los análogos derivados de polifemusina II ejercen todavía citotoxicidad a pesar de las mejoras conseguidas (K. Matsuzaki, M. Fukui, N. Fujii, K. Miyajima, Biochim. Biophys. Acta 1991, 259, 1070; A. Otaka, H. Tamamura, Y. Terakawa, M. Masuda, T. Koide, T. Murakami, H. Nakashima, K. Matsuzaki, K. Miyajima, T. Ibuka, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, N. Fujii Biol. Pharm. Bull. 1994, 17, 1669 y referencias citadas anteriormente).

60 Esta actividad citotóxica obvia esencialmente su utilización in vivo, y representa una serie de desventajas en aplicaciones clínicas. Antes de que se pueda considerar la utilización intravenosa, la toxicidad general, actividad de unión a proteínas en el suero sanguíneo, y también la estabilidad como proteasa son temas graves que deben ser enfocados adecuadamente.

65 Recientemente se ha demostrado que el receptor de CXCR4 no está involucrado solamente en la entrada de VIH sino también en la actividad quimiotáctica de células de cáncer, tales como metastasis de cáncer de seno o metastasis de cáncer de ovarios (A. Muller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. Mc Clanahan, E. Murphey, W. Yuan, S.N. Wagner, J. Luis Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, A. Zlotnik, Nature 2001, 50, 410, J. M.

Hall, K. S. Korach, *Molecular Endocrinology*, 2003, 1-47), Non-Hodgin's Lymphoma (F. Bertolini, C. Dell'Àgnola, P. Manusco, C. Rabascio, A. Burlini, S. Monestiroli, A. Gobbi, G. Pruneri, G. Martinelli, *Cancer Research* 2002, 62, 3106-3112), or lung cancer (T.Kijima, G. Maulik, P. C. Ma, E. V. Tibaldi, R:E. Turner, B. Rollins, M. Sattler, B.E. Johnson, R. Salgia, *Cancer Research* 2002, 62, 6304-6311), melanoma, cáncer de próstata, cáncer de riñón, neuroblastoma, cáncer de páncreas, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (H. Tamamura y otros *Febs Letters* 2003, 550 79-83, cited ref.). El bloqueo de la actividad quimiotáctica con un inhibidor de CXCR4 debe detener la migración de células de cáncer.

El receptor de CXCR4 ha sido implicado también en el crecimiento y proliferación de tumores. Se ha demostrado que la activación del receptor de CXCR4 era crítica para el crecimiento de tumores malignos tanto neuronales como gliales y tumores de pulmón de células pequeñas. Además, la administración sistémica del antagonista AMD3100 de CXCR4 inhibe el crecimiento de glioblastoma intracraneal e injertos de meduloblastoma al incrementar la apoptosis y disminuir la proliferación de células tumorales (Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 100(23):13513-13518, Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio, T. Schettini G. *Stromal Cancer Res*. 2003, 63(8): 1969-1974, Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B. Sattler M. Johnson BE, Salgia R. *Cancer Res*. 2002-; 62(21): 6304-6311, *Cancer Res*. 2002;62(11):3106-3112.

El factor derivado de células del estroma 1 (CXCL12/SDF-1) y su receptor CXCR4 están involucrados en el tráfico de células B y progenitores hematopoiéticos. Se ha demostrado que el receptor de CXCR4 juega un importante papel en la liberación de células madre desde el tuétano del hueso a la sangre periférica. El receptor es expresado, por ejemplo, sobre células CD34+, y ha sido implicado en el proceso de la emigración y la instalación de células CD34+. Esta actividad del receptor de CXCR4 puede ser muy importante para recogidas eficientes de aferesis de células madre de sangre periférica. Las células de sangre periférica autólogas proporcionan una recuperación hematopoiética rápida y mantenida, a continuación del autotransplante, después de la administración de quimioterapia o radioterapia en grandes dosis en pacientes con enfermedades malignas hematológicas y tumores sólidos. (WC. Liles y otros, *Blood* 2003, 102, 2728-2730).

Existen pruebas crecientes que sugieren que las quimioquinas, en general y la interacción entre el factor alfa quimioatractivo, derivado de CXCL12/células del estroma y su receptor CXCR4 en particular, juegan un papel determinante en la angiogénesis. Las quimioquinas inducen angiogénesis directamente al unir sus receptores sobre células endoteliales o indirectamente promoviendo infiltrados celulares inflamatorios, que facilitan otros estímulos angiogénicos. Se ha demostrado que una serie de quimioquinas proinflamatorias, incluyendo interleuquina 8 (IL 8), oncógenos regulados en cuanto a crecimiento, factor 1 (SDF-1) derivado de células del estroma, proteína quimiotáctica 1 (MCP-1), de monocitos, eotaxina 1, y I-309 se han demostrado que actúan como inductores directos de angiogénesis. (Chen X, Beutler JA, Mc Cloud TG, Loehfelm A, Yang L, Dong HF, Chertov OY, Salcedo R, Oppenheim JJ, Howard OM. *Clin Cancer Res*. 2003 9(8):3115-3123, Salcedo R, Oppenheim JJ. *Microcirculation* 2003 (3-4): 359-370).

Se ha establecido con claridad que las quimioquinas están involucradas en una serie de patologías inflamatorias y algunas de ellas muestran un papel esencial en la modulación del desarrollo de osteoclastos. El inmunotinte para SDF-1 (CXCL 12) en biopsias sinoviales y de tejidos óseos de muestras de artritis reumatoide (RA) y osteoartritis (OA) han mostrado fuertes incrementos en los niveles de expresión en condiciones inflamatorias. (Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):244-251. Parece probable que el receptor de CXCR4 juega un importante papel en las enfermedades inflamatorias, por ejemplo, artritis reumatoide, asm, o esclerosis múltiple (K. R. Shadidi y otros, *Scandinavian Journal of Immunology*, 2003, 57, 192-198, J. A. Gonzalo J. *Immunol*. 2000, 165, 499-508, S. Hatse y otros, *FEBS Letters* 2002 527, 255-262 y referencias ya citadas).

La mediación del reclutamiento de células inmunes en lugares de inflamación debe ser interrumpida por un inhibidor de CXCR4.

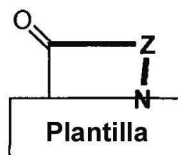
En los compuestos que se describen más adelante se introduce una nueva estrategia para estabilizar conformaciones de horquilla β en peptidomiméticos cíclicos "backbone-turn" que muestran elevada actividad antagonista de CXCR4, siendo útiles para recogida eficiente de células madre de sangre periférica por aferesis y teniendo actividad anticáncer y actividad antiinflamatoria.

Esto comporta el transplante de la secuencia de horquilla catiónica e hidrofóbica en una plantilla cuya función es forzar el núcleo de un bucle de péptido a una geometría de horquilla. La rigidez de la horquilla puede verse influida adicionalmente por la introducción de un puente de bisulfuro. Los péptidos miméticos de horquilla unidos a plantilla, han sido descritos en la literatura (D, Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, *Adv. Med. Chem*. 1999, 4, 1-68; J. A. Robinson, *Syn. Lett*. 2000, 4, 429-441), pero estas moléculas no han sido evaluadas previamente para el desarrollo de péptidos antagonistas de CXCR4. No obstante, la capacidad de generar peptidomiméticos de horquilla β utilizando procedimientos de síntesis combinatoriales y paralelos ha quedado establecida actualmente (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Helv. Chim. Acta*. 2000, 83, 3097-3112).

Estos procedimientos permiten la síntesis y cribado de grandes librerías miméticas de horquilla, que a su vez facilitan considerablemente estudios, estructura-actividad y, por lo tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas con muy potente actividad antagonista de CXCR4 o de actividad anticáncer o actividad antiinflamatoria y baja actividad hemolítica con respecto a glóbulos rojos humanos.

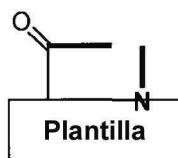
5 Los peptidomiméticos de horquilla β obtenidas por el enfoque que se ha descrito, son útiles como agentes anti-VIH, agentes anticáncer, como inhibidores de crecimiento de tumores o como agentes inductores de apoptosis, agentes antimetástasis y agentes antiinflamatorios o como agentes que pueden ser utilizados en recogidas por aféresis de células madre de sangre periférica.

10 Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención son compuestos de fórmula general



(I)

15 en la que



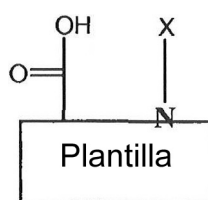
20 es un residuo de dipéptido constituido por dos elementos constructivos de aminoácidos diferentes, siendo el dipéptido $^D\text{Pro-}^L\text{Pro}$; y Z es una cadena constituida por 12 residuos de α -aminoácidos, en la que

- el residuo P1 es el residuo de Tyr;
- el residuo P2 es el residuo de Arg o Gly;
- el residuo P3 es el residuo de Cit;
- 25 - el residuo P4 es el residuo de Val, Phe, Cys, Gly Ile, Thr o Gln;
- el residuo P5 es el residuo de Arg;
- el residuo P6 es el residuo de ^DArg o Arg;
- el residuo P7 es el residuo de Arg;
- el residuo P8 es el residuo de 2-Nal o Trp;
- 30 - el residuo P9 es el residuo de Phe, Val, Cys, Gly, Ile, Thr o Gln;
- el residuo P10 es el residuo de Tyr;
- el residuo P11 es el residuo de Cit o Gly;
- el residuo P12 es el residuo de Lys;

35 Cys en P4 y P9 forman un puente de bisulfuro en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

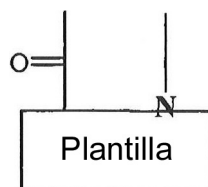
De acuerdo con la presente invención estos peptidomiméticos de horquilla β pueden ser preparados por un procedimiento que comprende:

- 40 (a) acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 6, 7 u 8, estando igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- 45 (b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en los productos finales deseados se encuentra una posición más próximo al residuo de aminoácido N-terminal, siendo igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional, que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;
- 50 (d) eliminar el grupo N-protector obtenido;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que el residuo de aminoácido del terminal N ha sido introducido;
- (f) acoplamiento del producto obtenido con un compuesto de fórmula general;



II

en la que



5

es la definida anteriormente y X es un grupo N-protector

(g) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) o en la etapa (fc);

10 (h) acoplado el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 12, siendo igualmente protegido de modo apropiado cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(i) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

15 (j) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más alejado de la posición 12, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(k) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

(l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos de aminoácidos han sido introducidos;

20 (m) en caso deseado desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir de manera apropiada el grupo o grupos reactivos liberados de este modo:

(n) en caso deseado formar uno, dos o tres enlaces entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas de la región de hebra β ;

(o) desacoplar el producto obtenido del soporte sólido;

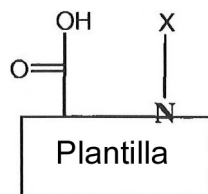
25 (p) ciclar el producto fraccionado del soporte sólido;

(q) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que pueden encontrarse presentes además en la molécula; y

30 (r) en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.

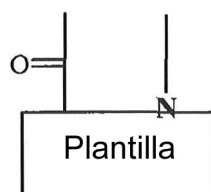
Alternativamente, los peptidomiméticos de la presente invención pueden ser preparados por

35 (a') acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general



II

en la que



es la definida anteriormente y X es un grupo N-protector

(b') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (a') o en la etapa (a'c);

5 (c') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 12, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(d') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

10 (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final se encuentra una posición más allá de la posición 12, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(f') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

15 (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que sean introducidos todos los residuos de aminoácidos;

(h') en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presente en la molécula y sustituir de manera apropiada el grupo o grupos reactivos liberados de esta forma;

(i') en caso deseado formar uno, dos o tres enlaces interhebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;

20 (j') desacoplar el producto obtenido del soporte sólido;

(k') ciclar el producto fraccionado del soporte sólido;

(l') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos, y en caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que se pueden encontrar adicionalmente presentes en la molécula; y

25 (m') en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.

30 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "alquilo" considerado solo o en combinación, indica radicales de hidrocarburo saturados, de cadena recta o ramificada que tienen hasta 24 átomos de carbono, preferentemente hasta 12 átomos de carbono. De manera similar, el término "alqueno" indica radicales de hidrocarburo de cadena recta o ramificada que tienen hasta 24 átomos de carbono, preferentemente hasta 12 átomos de carbono y que contienen como mínimo un enlace olefínico doble o dependiendo de la longitud de la cadena, hasta cuatro enlaces olefínicos dobles. El término "inferior" indica radicales y compuestos que tienen hasta seis átomos de carbono. Por lo
35 tanto, por ejemplo, el término "alquilo inferior" indica radicales de hidrocarburo saturados, de cadena recta o ramificada que tienen hasta seis átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo y similares. El término "arilo" indica radicales de hidrocarburo carbocíclicos aromáticos que contienen uno o dos anillos de seis miembros, tales como fenilo o naftilo, que pueden estar sustituidos por hasta tres sustituyentes tales como Br, Cl, F, CF_3 , NO_2 , alquilo inferior o alqueno inferior. El término "heteroarilo" designa
40 radicales heterocíclicos aromáticos que contienen uno o dos anillos de seis miembros, manteniendo como mínimo uno de ellos hasta tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, S y N y estando dichos anillos opcionalmente sustituidos; se han indicado anteriormente en relación con la definición de R^{77} ejemplos representativos de dichos radicales de heteroarilo opcionalmente sustituidos.

45 La plantilla $^DPro-LPro$ constituye un bloque principal que tiene un terminal N y un terminal C orientados en el espacio de forma tal que la distancia entre estos dos grupos puede encontrarse entre 4,0-5,5Å. Una cadena de péptido **Z** está enlazada en el terminal C y el terminal N de la plantilla $^DPro-LPro$ con intermedio de correspondientes términos N y C de manera que la plantilla y la cadena forman una estructura cíclica tal como se ha mostrado en la fórmula I. En el presente caso en el que la distancia entre los términos N y C de la plantilla se encuentra entre 4,0-5,5Å la
50 plantilla inducirá la red de enlace H necesaria para la formación de la conformación de horquilla β en la cadena de péptido **Z**. De esta manera la plantilla y la cadena de péptido forman un mimético de horquilla β .

La conformación de horquilla β es altamente relevante para la actividad antagonista de CXCR4 de los miméticos de horquilla β de la presente invención. Las propiedades conformacionales estabilizantes de horquilla β de las plantillas
55 (a) a (p) juegan un papel esencial no solamente para la actividad antagonista selectiva de CXCR4 sino también para el proceso de síntesis anteriormente definido, dado que la incorporación de las plantillas al inicio o en las proximidades de la parte media de los precursores de péptidos lineales protegidos favorecen los rendimientos de ciclación de manera significativa.

60 Los residuos de L-aminoácidos más preferibles como bloques constituyentes dentro de la plantilla son los siguientes:

	Ala	L-Alanina
	Arg	L-Arginina
	Asn	L-Asparagina
5	Cys	L-Cisteina
	Gln	L-Glutamina
	Gly	Glicina
	His	L-Histidina
	He	L-Isoleucina
10	Leu	L-Leucina
	Lys	L-Lisina
	Met	L-Metionina
	Phe	L-Fenilalanina
	Pro	L-Prolina
15	Ser	L-Serina
	Thr	L-Treonina
	Trp	L-Triptófano
	Tyr	L-Tirosina
	Val	L-Valina
20	Cit	L-Citrulina
	Orn	L-Ornitina
	tBuA	L-t-Butilalanina
	Sar	Sarcosina
	t-BuG	L-tert.-Butilglicina
25	4AmPhe	L-para-Aminofenilalanina
	3AmPhe	L-meta-Aminofenilalanina
	2AmPhe	L-orto-Aminofenilalanina
	Phe(mC(NH ₂)=NH)	L-meta-Amidinofenilalanina
	Phe(pC(NH ₂)=NH)	L-para-Amidinofenilalanina
30	Phe(mNHC (NH ₂)=NH)	L-meta-Guanidinofenilalanina
	Phe(pNHC (NH ₂)=NH)	L-para-Guanidinofenilalanina
	Phg	L-Fenilglicina
	Cha	L-Ciclohexilalanina
	C ₄ al	L-3-Ciclobutitalanina
35	C ₅ al	L-3-Ciclopentitalanina
	Nle	L-Norleucina
	2-Nal	L-2-Naftilalanina
	1-Nal	L-1-Naftilalanina
	4Cl-Phe	L-4-Clorofenilalanina
40	3Cl-Phe	L-3-Clorofenilalanina
	2Cl-Phe	L-2-Clorofenilalanina
	3,4Cl ₂ -Phe	L-3,4-Diclorofenilalanina
	4F-Phe	L-4-Fluorofenilalanina
	3F-Phe	L-3-Fluorofenilalanina
45	2F-Phe	L-2-Fluorofenilalanina
	Tic	Ácido L-1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico
	Thi	L-β-2-Tienilalanina
	Tza	L-2-Tiazolilalanina
	Mso	L-Metionina sulfóxido
50	AcLys	L-N-Acetilisina
	Dpr	Ácido L-2,3-Diaminopropiónico
	A ₂ Bu	Ácido L-2,4-Diaminobutírico
	Dbu	Ácido (S)-2,3-Diaminobutírico
	Abu	Ácido γ-Aminobutírico (GABA)
55	Aha	Ácido ε-Aminohexanóico
	Aib	Ácido α-Aminoisobutírico
	Y(Bzl)	L-O-Benciltirosina
	Bip	L-Bifenilalanina
	S(Bzl)	L-O-Bencilserina
60	T(Bzl)	L-O-Benciltreonina
	hCha	L-Homo-ciclohexilalanina
	hCys	L-Homo-cisteina
	hSer	L-Homo-serina
	hArg	L-Homo-arginina
65	hPhe	L-Homo-fenilalanina
	Bpa	L-4-Benzoilfenilalanina

	Pip	Ácido L-Pipecólico
	OctG	L-Octiglicina
	MePhe	L-N-Metilfenilalanina
	MeNle	L-N-Metilnorleucina
5	MeAla	L-N-Metilalanina
	Melle	L-N-Metilisoleucina
	MeVal	L-N-Metivalina
	MeLeu	L-N-Metileucina

10 Los residuos de aminoácidos más preferentes en la cadena **Z** son los derivados de α -aminoácidos naturales. A continuación se indica una lista de aminoácidos que son apropiados, o lo son sus residuos, para los fines de la presente invención correspondiendo las abreviaturas a práctica usual adoptada de modo general:

	código de tres letras		código de una letra
15	Ala	L-Alanina	A
	Arg	L-Arginina	R
	Asn	L-Asparagina	N
	Asp	Ácido L-Aspártico	D
	Cys	L-Cisteina	C
20	Glu	Ácido L-Glutámico	E
	Gln	L-Glutamina	Q
	Gly	Glicina	G
	His	L-Histidina	H
	Ile	L-Isoleucina	I
25	Leu	L-Leucina	L
	Lys	L-Lisina	K
	Met	L-Metionina	M
	Phe	L-Fenilalanina	F
	Pro	L-Prolina	P
30	^D Pro	D-Prolina	^D P
	Ser	L-Serina	S
	Thr	L-Treonina	T
	Trp	L-Triptófano	W
	Tyr	L-Tirosina	Y
35	Val	L-Valina	V

Otros aminoácidos adecuados para los objetivos de la presente invención, o sus residuos, incluyen:

40	Cit	L-Citrulina
	Orn	L-Ornitina
	tBuA	L-t-Butilalanina
	Sar	Sarcosina
	Pen	L-Penicilamina
	t-BuG	L-tert.-Butilglicina
45	4AmPhe	L-para-Aminofenilalanina
	3AmPhe	L-meta-Aminofenilalanina
	2AmPhe	L-orto-Aminofenilalanina
	Phe(mC(NH ₂)=NH)	L-meta-Amidinofenilalanina
	Phe(pC(NH ₂)=NH)	L-para-Amidinofenilalanina
50	Phe(mNHC (NH ₂)=NH)	L-meta-Guanidinofenilalanina
	Phe(pNHC (NH ₂)=NH)	L-para-Guanidinofenilalanina
	Phg	L-Fenilglicina
	Cha	L-Ciclohexilalanina
	C ₄ al	L-3-Ciclobutilalanina
55	C ₅ al	L-3-Ciclopentilalanina
	Nle	L-Norleucina
	2-Nal	L-2-Naftilalanina
	1-Nal	L-1-Naftilalanina
	4Cl-Phe	L-4-Clorofenilalanina
60	3Cl-Phe	L-3-Clorofenilalanina
	2Cl-Phe	L-2-Clorofenilalanina
	3,4Cl ₂ -Phe	L-3,4-Diclorofenilalanina
	4F-Phe	L-4-Fluorofenilalanina
	3F-Phe	L-3-Fluorofenilalanina
65	2F-Phe	L-2-Fluorofenilalanina
	Tic	Ácido 1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico

	Thi	L-β-2-Tienilalanina
	Tza	L-2-Tiazolilalanina
	Mso	L-Metionina sulfóxido
	AcLys	N-Acetillisina
5	A ₂ Bu	Ácido 2,4-Diaminobutírico
	Dbu	Ácido (S)-2,3-Diaminobutírico
	Abu	Ácido γ-Aminobutírico (GABA)
	Aha	Ácido ε-Aminohexanóico
	Aib	Ácido α-Aminoisobutírico
10	Y(Bzl)	L-O-Benciltirosina
	Bip	L-(4-fenil)fenilalanina
	S(Bzl)	L-O-Bencilserina
	T(Bzl)	L-O-Benciltreonina
	hCha	L-Homo-ciclohexilalanina
15	hCys	L-Homo-cisteina
	hSer	L-Homo-serina
	hArg	L-Homo-arginina
	hPhe	L-Homo-fenilalanina
	Bpa	L-4-Benzoilfenilalanina
20	4-AmPyr1	Ácido (2S,4S)-4-Amino-pirrolidina-L-carboxílico
	4-AmPyr2	Ácido (2S,4R)-4-Amino-pirrolidina-L-carboxílico
	4-PhePyr1	Ácido (2S,5R)-4-Fenil-pirrolidina-L-carboxílico
	4-PhePyr2	Ácido (2S,5S)-4-Fenil-pirrolidina-L-carboxílico
	5-PhePyr1	Ácido (2S,5R)-5-Fenil-pirrolidina-L-carboxílico
25	5-PhePyr2	Ácido (2S,5S)-5-Fenil-pirrolidina-L-carboxílico
	Pro(4-OH)1	(4S)-L-Hidroxiprolina
	Pro(4-OH)2	(4R)-L-Hidroxiprolina
	Pip	Ácido L-Pipecólico
	^D Pip	Ácido D-Pipecólico
30	OctG	L-Octiglicina
	NGly	N-Metilglicina
	MePhe	L-N-Metilfenilalanina
	MeNle	L-N-Metilnorleucina
	MeAla	L-N-Metilalanina
35	Melle	L-N-Metilsoleucina
	MeVal	L-N-Metilvalina
	MeLeu	L-N-Metilleucina
	DimK	L-(N',N'-Dimetil)-lisina
	Lpzp	Ácido L-Piperacínico
40	Dpzp	Ácido D-Piperacínico
	Isorn	L-(N',N'-diisobutil)-ornitina
	PipAla	L-2-(4'-piperidinil)-alanina
	PirrAla	L-2-(3'-pirrolidinil)-alanina
	Ampc	Ácido 4-Amino-piperidina-4-carboxílico
45	NMeR	L-N-Metilarginina
	NMeK	L-N-Metillisina
	NMePhe	L-N-Metilfenilalanina
	IPegK	Ácido L-2-Amino-6- γ -[2-(2-metoxi-etoxi)etoxi]acetilamino- γ -hexanóico
	SPegK	Ácido L-2-Amino-6-[2-(2metoxi-etoxi)-acetilamino]-hexanóico
50	Dab	Ácido L-1,4-Diamino-butírico
	IPegDab	Ácido L-2-Amino-4- γ -[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-acetilamino- γ -butírico
	SPegDab	Ácido L-2-Amino-4-[2-(2metoxi-etoxi)-acetilamino]-butírico
	4-PyrAla	L-2-(4'Tiridil)-alanina
	OrnPyr	Ácido L-2-Amino-5-[(2'carbonilpiracina)]amino-pentanóico
55	Bng	N-Bencilglicina
	(4-OH)BnG	N-4-Hidroxi-bencilglicina
	IaG	N-Isoamilglicina
	IbG	N-Isobutliglicina
	(EA)G	N-(2-Aminoetil)glicina
60	(PrA)G	N-(3-Amino-n-propil)glicina
	(BA)G	N-(4-Amino-n-butil)glicina
	(PeA)G	N-(5-Amino-n-pentil)glicina
	(PEG ₃ -NH ₂)G	N-[(CH ₂) ₃ O-(CH ₂ -CH ₂ O) ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂]glicina
	(Pyr)G	N- γ -[2-[2'-(1'-metil-pirrolidinil)]-etil]-glicina
65	(Dimp)G	N-[2-(N',N'-Dimetilamino)-propil]-glicina

(Im)G	N-[3-(1'-imidazolil)-propil]-glicina
(Pip)G	N-{3-[1'-(4'-metilpiperacilil)]-propil}-glicina
(Dime)G	N-[2-(N',N'-Dimetilamino)-etil]-glicina

5 De modo general, la cadena peptídica **Z** dentro de los miméticos de horquilla β de la invención comprende **12** residuos de aminoácidos. Las posiciones P1 a **P12** de cada residuo de aminoácido de la cadena **Z** se definen de manera inequívoca del modo siguiente: P1 representa el primer aminoácido de la cadena **Z** que está acoplado con su terminal N al terminal C de la plantilla; y **P12** representa el último aminoácido de la cadena **Z** que está acoplado con su terminal C al terminal N de la plantilla.

10 Los procedimientos de la invención pueden ser llevados a cabo ventajosamente en forma de síntesis de conjuntos paralelos para conseguir librerías de peptidomiméticos de horquilla β fijados en plantilla de la anterior fórmula general I. Esta síntesis en paralelo permiten obtener conjuntos de numerosos compuestos (normalmente de 24 a 192, de manera típica 96) de fórmula general y con altos rendimientos y purezas definidas, minimizando la formación de subproductos dímeros y polímeros. La elección adecuada del soporte sólido funcionalizado (es decir, soporte sólido mas molécula enlazadora), plantillas y lugar de ciclación juegan papeles clave.

15 El soporte sólido funcionalizado es derivado convenientemente de poliestireno reticulado preferentemente con 1-5% de divinilbenceno; poliestireno recubierto con separadores de polietilenglicol (Tentagel[®]); y resinas de poliacrilamida (ver también Obrecht, D.; Villalgorido, J.-M., "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Com-pound Libraries", Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

20 El soporte sólido es funcionalizado por medio de un enlazador, es decir, una molécula separadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para acoplamiento al soporte sólido y en el otro extremo un grupo funcional fraccionable selectivamente para las transformaciones químicas subsiguientes y procesos de fraccionado o cribado. Para los objetivos de la presente invención se utilizan dos tipos de enlazadores:

25 Los enlazadores de tipo 1 están diseñados para liberar el grupo amida en condiciones ácidas (Rink H. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3783-3790). Los enlazadores de este tipo forman amidas del grupo carboxilo de los aminoácidos; se incluyen entre los ejemplo de resinas funcionarizadas por dichas estructuras enlazadoras resina 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] PS, resina 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] -4-metil-bencidrilamina PS (Resina Rink amida MBHA PS), y resina 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido) aminometil] bencidrilamina PS (resina Rink amida BHA PS).
30 Preferentemente el soporte es derivado de poliestireno reticulado, de modo más preferente con 1-5% devinilbenceno y funcionalizado por medio del enlazador 4-(((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido).

35 Los enlazadores de tipo 2 están diseñados para liberar eventualmente el grupo carbonilo en condiciones ácidas. Los enlazadores de este tipo forman esterres inestables frente a ácidos con el grupo carboxilo de los aminoácidos, usualmente esterres inestables frente a ácidos de bencilo, bencidriilo y tritilo; se incluyen entre los ejemplos de dichas estructuras de enlazadores 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (enlazador Sasrin[®]), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi (enlazador Rink), ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoci)butrico (HMPB linker), tritil y 2-clorotritil. Preferentemente, el soporte se deriva de poliestireno reticulado de manera más preferente con, 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado por medio del enlazador de 2-clorotritilo.

40 Cuando se llevan a cabo como síntesis paralelas los procesos de la invención pueden ser llevados a cabo de manera ventajosa tal como se describe más adelante pero quedará evidente para los técnicos en la materia la forma en que estos procedimientos se modificarán en el caso de que se desee sintetizar un solo compuesto de la anterior fórmula I.

45 Una serie de recipientes de reacción (normalmente 24 a 192, de manera típica 96) igual al número total de compuestos da sintetizar por el método paralelo se cargan con 25 a 1000 mg, preferentemente 100 mg del soporte sólido apropiadamente funcionalizado, preferentemente 1 a 3% de poliestireno reticulado o resina Tentagel.

50 El disolvente para utilizar debe ser capaz de hinchar la resina e incluye, sin que sea limitativo, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), dioxano, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), isopropilalcohol y similares. Las mezclas de disolventes que contienen, como mínimo, un componente de disolvente polar (por ejemplo, 20%/TFE/DCM, 35% THF/NMP) son beneficiosos para asegurar una elevada reactividad y solvatación de las cadenas de péptidos unidos a las resinas (Fields, G. B., Fields, C. G., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4202-4207).

55 Con el desarrollo de diferentes enlazadores que liberan el grupo de terminal C del ácido carboxílico en condiciones ácidas suaves, no afectando a los grupos inestables frente a ácidos que protegen grupos funcionales en la cadena o cadenas laterales, se ha hecho considerables progresos en las síntesis de fragmentos de péptidos protegidos. El enlazador derivado de 2-metoxi-4-hidroxibencilalcohol (SasrinR linker, Mergler y otros, Tetrahedron Lett. 1988, 29 4005-4008) puede ser fraccionado con ácido trifluoroacético diluido (0,5-1% TFA en DCM) y es estable a las

condiciones de desprotección Fmoc durante la síntesis de péptidos, siendo compatibles con este esquema de protección, los grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu. Otros enlazadores adecuados para el proceso de la invención incluyen el enlazador 4-(2,4-dimetoxifenil-hidrometil)-fenoxi súper inestable a los ácidos (enlazador Rink, Rink, H. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787-3790), en el que la eliminación del péptido requiere 10% de ácido acético en DCM o 0,2% de ácido trifluoroacético en DCM; el enlazador derivado del ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (enlazador HMPB, Flörsheimer & Riniker, péptidos 1991, 1990 131) que es fraccionada también con 1% TFA/DCM para dar lugar a un fragmento de péptido que contiene todos los grupos protectores de cadena lateral inestables a los ácidos y, además, el enlazador de 1-clorotritilcloruro (Barlos y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946), que permite el desacoplamiento del péptido utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 minutos.

Son por ejemplo, grupos protectores adecuados para aminoácidos y, respectivamente, para sus residuos,

- para el grupo amino (tal como se encuentra presente, por ejemplo, también en la cadena lateral de lisina)

Cbz	benciloxicarbonilo
Boc	tert.-butiloxicarbonilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Alloc	alliloxicarbonilo
Teoc	trimetilsililetoxicarbonilo
Tcc	tricloroetoxicarbonilo
Nps	o-nitrofenilsulfonilo;
Trt	trifenilmetil o tritilo

- para el grupo carboxilo (tal como se encuentra presente, por ejemplo, también en la cadena lateral del ácido aspártico y ácido glutámico) por conversión en ésteres con los componentes alcohol

tBu	tert.-butilo
Bn	bencilo
Me	metilo
Ph	fenilo
Pac	fenacil allilo
Tse	trimetilsililetilo
Tce	tricloroetilo;

- para el grupo guanidino (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de arginina)

Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
Ts	tosil (es decir, p-toluensulfonilo)
Cbz	benciloxicarbonilo
Pbf	pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

- para el grupo hidroxilo (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de treonina y serina)

tBu	tert.-butilo
Bn	bencilo
Trt	tritilo

- y para el grupo mercapto (tal como se encuentra presente, por ejemplo, en la cadena lateral de cisteína)

Acm	acetamidometilo
tBu	tert.-butilo
Bn	bencilo
Trt	tritilo
Mtr	4-metoxitritilo

Los derivados del aminoácido 9-fluorenilmetoxicarbonilo-(Fmoc) protegido son utilizados preferentemente como componentes para la construcción de los miméticos de bucle de horquilla β fijados por plantilla de la fórmula I. Para la desprotección, es decir, separación del grupo Fmoc se puede utilizar 20% de piperidina en DMF o 2% DBU/2% de piperidina en DMF.

Los derivados de glicina N sustituida (tipo I) utilizados como elementos componentes para la construcción de ciertos compuestos de fórmula I se derivan de derivados de aminoácidos 9-fluorenilmetoxicarbonil-(Fmoc)-protegidos o, alternativamente, construidos en dos etapas a partir de precursores de glicina, que contienen un grupo cedente, tal como ácido bromo, cloro o yodo acético, y elementos componentes adecuados de amina primaria $\text{NH}_2\text{-R}^{86}$. La primera etapa de la síntesis consiste en el acoplamiento del agente acetilante, que contiene el grupo cedente, tal

como ácido bromo acético al intermediario unido a la resina a través de la formación del enlace de amida. La segunda etapa de la reacción, desplazamiento nucleofílico, se consigue utilizando los elementos componentes primarios de amina, de manera que los residuos, en caso necesario, están protegidos adecuadamente con grupos, tal como se ha descrito anteriormente para cadenas laterales de aminoácidos.

5 Para la incorporación de los derivados de glicina N-sustituídos como elementos componentes en los miméticos de bucle de horquilla β fijados por plantilla, se utiliza, tal como se describe el proceso general de síntesis para acoplamiento de miméticos de horquilla.

10 La cantidad de reactivo, es decir, el derivado de aminoácido es habitualmente de 1 a 20 equivalentes basado en los miliequivalentes por gramo de carga (meq/g) del soporte sólido funcionalizado (típicamente de 0,1 a 2,85 meq/g para resinas de poliestireno) dispuestos originalmente después de pesada en el tubo de reacción. Se pueden utilizar equivalentes adicionales de reactivos si es necesario para activar la reacción hasta su terminación en un tiempo razonable. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector son reinsertados en el
15 bloque contenedor y el aparato es fijado conjuntamente. Se inicia el flujo de gas a través del colector para proporcionar un entorno controlado, por ejemplo, nitrógeno, argón, aire y similares. El flujo de gas puede ser también calentado o enfriado antes de pasar 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 y similares para conseguir las reacciones sintéticas deseadas. La agitación se consigue por sacudidas o agitación magnética (dentro del tubo de reacción). Las estaciones de trabajo preferentes (no obstante, sin limitación a ello) son la
20 estación Combi-chem de Labsource y el sintetizador Syro de MultiSyn Tech.

La formación del enlace de amida requiere la activación del grupo α -carboxilo para la etapa de acilación. Cuando esta activación es llevada a cabo por medio de las habitualmente utilizadas carbodiimidas, tales como
25 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), la dicitclohexilurea y diisopropilurea resultantes son respectivamente insoluble y soluble en los disolventes utilizados de modo general. En una variante del procedimiento de carbodiimida, se incluye como aditivo a la mezcla de acoplamiento 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, König & Geiger, Chem. Ver 1970, 103, 788-798) . HOBt previene la deshidratación, suprime la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las reacciones lentas de acoplamiento. Se han
30 utilizado algunos reactivos de fosfonio como reactivos de acoplamiento directos, tales como benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio hexafluorofosfato (BOP, Castro y otros, Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis, 1976, 751-752), o benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato (Py-BOP, Coste y otros., Tetrahedron Lett. 1990, 31, 205-208) o 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio terafluoroborato (TBTU), o hexafluorofosfato (HBTU, Knorr y otros, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1927-1930); estos reactivos de fosfonio son adecuados también para la formación in situ de ésteres de HOBt con los derivados de aminoácidos protegidos. Más recientemente se han utilizado también como agentes de acoplamiento difenoxi-fosforil acida (DPPA) o O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N, N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TATU) o O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU)/7-aza-1-hidroxi benzotriazol (HOAt, Carpino y otros., Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281).
40

Debido al hecho de que las condiciones de acoplamiento casi cuantitativas son esenciales, es deseable tener evidencia experimental de la terminación de las reacciones. La prueba de ninhidrina (Kaiser y otros, Anal. Biochemistry 1970, 34, 595), en la que una respuesta colorimétrica positiva a una cantidad alícuota de péptido unido
45 a la resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, se puede llevar a cabo de manera fácil y rápida después de la etapa de acoplamiento. La química de Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo Fmoc cuando es liberado con la base (Meienhofer y otros, Int. J. Peptide Proteins Res. 1979, 13, 35 -42).

El intermediario unido a la resina dentro de cada uno de los tubos de reacción es lavado para liberarlo de exceso de reactivos retenidos, disolventes, o subproductos por exposición repetitiva a disolvente o disolventes puros por uno de los dos procedimientos siguientes:
50

- 1) Los pocillos de reacción son llenados con disolvente (preferentemente 5 ml), los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y colector, son sumergidos y agitados durante un tiempo de 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y son drenados por gravedad seguido de presión de gas aplicada a través de la entrada del colector (cerrando mientras tanto la salida) para expulsar el disolvente;
- 2) El colector es retirado del bloque de soporte, se dispensan partes alícuotas de disolvente (preferentemente 5 ml) a través de la parte superior de los tubos de reacción y drenaje por gravedad a través de un filtro hacia un recipiente receptor tal como tubo de pruebas o vial.

60 Ambos procesos de lavado mencionados son repetidos hasta unas 50 veces (preferentemente unas 10 veces), controlando la eficiencia de la eliminación del reactivo, disolvente, y subproducto por procedimientos tales como TLC, GC, o inspección de los lavados.

65 El procedimiento anteriormente descrito de reacción del compuesto unido a la resina con reactivos dentro de pocillos de reacción seguido de la eliminación del exceso de reactivos, subproductos y disolventes es repetido con cada

transformación sucesiva hasta que se ha obtenido el péptido lineal final completamente protegido unido a resina.

Antes de desacoplar del soporte sólido este péptido lineal completamente protegido, es posible, en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir de manera apropiada los grupos reactivos liberados de esta forma. A estos efectos, los subgrupos funcionales en cuestión deben ser protegidos inicialmente por un grupo protector que puede ser eliminado selectivamente sin afectar el resto de grupos protectores restantes. Un ejemplo es Alloc (aliloxicarbonilo) para dicho grupo protector amino para el que puede ser eliminado selectivamente, por ejemplo, por medio de Pd⁰ y fenilsilano en CH₂Cl₂, sin afectar el resto de grupos protectores, tales como Fmoc, presentes en la molécula. El grupo reactivo liberado de esta forma puede ser tratado a continuación con un agente adecuado para introducir el sustituyente deseado. De este modo, por ejemplo, un grupo amino puede ser acilado por medio de un agente acilante que corresponde al sustituyente de acilo a introducir. Para la formación de los aminoácidos pegilados tales como IPegK, o SpegK, preferentemente una solución de 5 equivalentes de HATU (N-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetileno]-*N*-metilmetanaminio hexafluorofosfato *N*-óxido) en DMF seco y una solución de 10 equivalentes de DIPEA (Disopropil etilamina) en DMF seco y 5 equivalentes de ácido 2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi] acético (IPeg) y, respectivamente, ácido 2-(2-metoxietoxi)acético (sPeg), se aplican al grupo amino liberado de la cadena lateral de aminoácido apropiada durante 3 h. El procedimiento es repetido posteriormente durante otras 3h con una solución nueva de reactivos después de filtrar y lavar la resina.

Antes de desacoplar este péptido lineal completamente protegido del soporte sólido, es también posible, en caso deseado, formar un enlace o enlaces interhebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas de la región de hebra β.

Los enlaces interhebras y su formación se han explicado anteriormente, en relación con las explicaciones realizadas con respecto a grupos de tipo H que pueden ser, por ejemplo, puentes de bisulfuro formados por residuos de cisteína y homocisteína en posiciones opuestas de la hebra β; o puentes de lactamo formados por residuos de ácido glutámico y ácido aspártico enlazando ornitina y, respectivamente, residuos de lisina, o por residuos de ácido glutámico enlazando residuos de ácido 2,4-diaminobutírico situados en posiciones opuestas de la hebra β por formación de enlaces de amida. La formación de dichos enlaces interhebra se puede efectuar por procedimientos bien conocidos en esta técnica.

Para la formación de puentes de bisulfuro se aplica preferentemente una solución de 10 equivalentes de una solución de yodo en DMF o una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH durante 1,5 h que se repite durante otras 3h con una solución de yodo nueva después de filtrar la solución de yodo, o en una mezcla de DMSO y una solución de ácido acético, tamponada con 5% de NaHCO₃ a pH 5-6 durante 4h, o en agua después de ajustar a pH 8 con solución de hidróxido amónico con agitación durante 24h, o en una solución de NMP y tri-*n*-butilfosfina (preferentemente 50 equivalentes).

Para la formación de puentes de lactama preferentemente una solución de 2 equivalentes de HATU (N-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetileno]-*N*-metilmetanaminio hexafluorofosfato *N*-óxido) en DMF seco y una solución de 4 equivalentes de DIPEA (Diisopropil etilamina) en DMF seco se aplica durante 16 h.

El desacoplamiento del péptido lineal completamente protegido con respecto al soporte sólido se consigue por inmersión de los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y colector en pocillos de reacción que contienen una solución de reactivo de fraccionamiento (preferentemente 3 a 5 ml). El flujo de gas, control de temperatura, agitación, y control de la reacción se implementan tal como se ha descrito anteriormente y de la forma deseada para conseguir la reacción de desacoplamiento. Los tubos de reacción, en combinación con el bloque de soporte y el colector, son desacoplados del bloque recipiente y levantados por encima del nivel de la solución pero por debajo del borde superior de los pocillos de reacción, y se aplica presión de gas a través de la entrada del colector (mientras se cierra la salida) para expulsar de manera eficiente la solución del producto final hacia dentro de los pocillos recipientes. La resina que permanece en los tubos de reacción es lavada a continuación 2 a 5 veces tal como se ha indicado anteriormente con 3 a 5 ml de un disolvente apropiado para la extracción (lavado) de la mayor cantidad posible de producto desacoplado. Las soluciones de producto obtenidas de este modo son combinadas, teniendo cuidado de evitar mezclas cruzadas. Las soluciones/extractos individuales son manipuladas a continuación según sea necesario para aislar los compuestos finales. Las manipulaciones típicas incluyen, sin que ello sea limitativo, evaporación, concentración, extracción líquido/líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones adicionales en solución.

Las soluciones que contienen derivados de péptidos lineales completamente protegidos que han sido separados por fraccionamiento del soporte sólido y neutralizados con una base, son evaporados. A continuación se efectúa la ciclación en solución utilizando disolventes tales como DCM, DMF, dioxanos, THF y similares. Varios reactivos de acoplamiento que han sido mencionados anteriormente pueden ser utilizados para la ciclación. La duración de la ciclación es aproximadamente de 6-48 horas, preferentemente unas 16 horas. El avance de la reacción se sigue, por ejemplo, mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento con fase inversa). A continuación el disolvente es eliminado por evaporación, el derivado de péptido cíclico completamente protegido es disuelto en un disolvente que no es miscible con agua, tal como DCM, y la solución es extraída con agua o una mezcla de

disolventes miscibles en agua, a efectos de eliminar cualquier exceso del reactivo de acoplamiento.

De manera alternativa el desacoplamiento y desprotección completa del péptido completamente protegido con respecto al soporte sólido se puede conseguir manualmente en recipientes de vidrio.

5 Finalmente, el derivado de péptido completamente protegido es tratado con 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS u otra combinación de barredores para llevar a cabo el fraccionamiento de grupos protectores. El tiempo de la reacción de fraccionamiento es habitualmente de 30 minutos a 12 horas, preferentemente unas 2,5 horas. Los volátiles son evaporados hasta estado seco y el péptido en bruto es disuelto en 20% AcOH en agua y extraído con isopropil éter u otros disolventes adecuados para ello. La capa acuosa es recogida y evaporada hasta estado seco, y el derivado de péptido cíclico completamente desprotegido de fórmula I es obtenido como producto final. Dependiendo de su pureza, este derivado de péptido puede ser utilizado directamente para ensayos biológicos, o tiene que ser purificado adicionalmente, por ejemplo por HPLC preparativa.

15 Tal como se ha mencionado anteriormente, es posible posteriormente, en caso deseado, convertir un producto completamente desprotegido de fórmula I obtenido de la forma indicada en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o no aceptable, obtenida de este modo en un compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de estas operaciones puede ser llevada a cabo por procedimientos bien conocidos en esta técnica.

20 Los materiales plantilla iniciales de fórmula II utilizados en los procedimientos de la invención, materiales pre-iniciales para los mismos, y la preparación de estos materiales y pre-iniciales se describen en la solicitud internacional PCT/EP02/01711 de los mismos solicitantes publicada como WO 02/070547 A1.

25 Los materiales iniciales de fórmula H₂NR⁸⁶ son conocidos o pueden ser preparados por procedimientos bien conocidos en esta técnica.

30 Los peptidomiméticos de horquilla β de la invención pueden ser utilizados en un amplio rango de aplicaciones para prevenir infecciones de VIH en individuos sanos y reducir o interrumpir el avance vírico en pacientes infectados, o en los casos en los que el cáncer es mediado o resultante de actividad del receptor de CXCR4, o cuando enfermedades inmunológicas están mediadas o son resultado de actividad del receptor CXCR4, o los peptidomiméticos de horquilla β de la invención pueden ser utilizados para tratar inmuno supresión, o pueden ser utilizados durante las recogidas por aféresis de células madre de la sangre periférica.

35 Los peptidomiméticos de horquilla β pueden ser administrados tal cual o se pueden aplicar como formulación apropiada junto con portadores, diluyentes o excipientes bien conocidos en esta técnica.

40 Cuando se utilizan para tratar o prevenir infecciones por VIH o cáncer tal como cáncer de seno, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de ovarios, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, cáncer de páncreas, melanoma, angiogénesis y tejidos hematopoyéticos, o trastornos inflamatorios tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades del pulmón por hipersensibilidad y neumonitis de hipersensibilidad, neumonías eosinofílicas, hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedades intersiciales del pulmón (ILD), fibrosis pulmonar idiopática, ILD asociado con artritis reumatoide, lupus erimatosus sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a los medicamentos, artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus erimatosus sistémico, miastenia gravis, diabetes de inicio juvenil, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, rechazo de injerto, incluyendo rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades inflamatorias del intestino, dermatosis inflamatorias; o para tratar inmunosupresión, incluyendo inmunosupresión inducida por quimioterapia, terapia por radiación o rechazo de injerto/transplante, los peptidomiméticos de horquilla β pueden ser administrados solos, o como mezclas de varios peptidomiméticos de horquilla β, en combinación otros agentes VIH, o agentes antimicrobianos o agentes anticancerígenos o agentes antiinflamatorios, o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. Los peptidomiméticos de horquilla β pueden ser administrados tal cual o como composiciones farmacéuticas.

55 Las composiciones farmacéuticas que comprenden peptidomiméticos de horquilla β según la invención pueden ser fabricados por medios convencionales tales como mezcla, disolución, granulación, fabricación de tabletas recubiertas, levigado, emulsión, encapsulado, atrapado o liofilización. Se pueden formular composiciones farmacéuticas de modo convencional utilizando uno o varios portadores fisiológicamente aceptables, diluyentes, excipientes o auxiliares que facilitan el proceso de los peptidomiméticos de horquilla β activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende del procedimiento de administración escogido.

60 Para administración tópica los peptidomiméticos de horquilla δ de la invención pueden ser formulados como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. tal como es conocido en esta técnica.

65

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

5 Para las inyecciones, los peptidomiméticos de horquilla δ de la invención pueden ser formulados en soluciones adecuadas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hink, solución de Ringer o tampón fisiológico salino. Las soluciones pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes y/o agentes dispersantes. De manera alternativa, los peptidomiméticos de horquilla δ de la invención pueden adoptar forma de polvo para su combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos antes de su utilización.

Para administración transmucosal, se utilizan en la formulación, tal como es conocido en esta técnica, penetrantes apropiados a la barrera a atravesar.

15 Para administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente combinando los peptidomiméticos de horquilla δ activos de la invención con portadores de farmacéuticamente aceptables bien conocidos en esta técnica. Estos portadores posibilitan que los peptidomiméticos de horquilla β de la invención sean formulados como tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, emulsiones, suspensiones, etc. para ingestión oral por el paciente a tratar. Para formulaciones orales, tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados incluyen cargas, tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparados de celulosa, tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes de unión. En caso deseado, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar o ácido alginico, o una sal del mismo, tal como alginato sódico. En caso deseado, las formas de dosificación sólida pueden estar dotadas de recubrimiento de azúcar o recubrimiento entérico, utilizando técnicas estándar.

Para preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, se incluyen entre los portadores, excipientes o diluyentes adecuados, agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes de sabor, conservantes, agentes colorantes y similares.

Para administración oral, la composición puede adoptar la forma de tabletas, pastillas, etc. formuladas de manera habitual.

35 Para administración por inhalación, los peptidomiméticos de horquilla β de la invención, se suministran convenientemente en forma de una pulverización de aerosol desde envases a presión o un nebulizador, con ayuda de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede ser determinada proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para utilización en un inhalador o insuflador conteniendo una mezcla de materiales en polvo de los peptidomiméticos de horquilla β de la invención y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos se pueden formular también en composiciones para administración rectal o vaginal, tales como supositorios junto con bases de supositorio apropiadas, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los peptidomiméticos de horquilla β de la invención pueden ser formulados también como preparados de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular o por inyección intramuscular). Para la fabricación de dichos preparados de depósito, los peptidomiméticos de horquilla β de la invención se pueden formular con materiales polímeros o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como sales poco solubles.

Además, se pueden utilizar otros sistemas de suministro farmacéutico tales como liposomas y emulsiones bien conocidos en esta técnica. Algunos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido, también pueden ser utilizados. Adicionalmente, los peptidomiméticos de horquilla β de la invención se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación continuada, tal como plantillas semipermeables de polímeros sólidos conteniendo el agente terapéutico. Se han determinado varios materiales de liberación continuada y estos son bien conocidos por los técnicos en la materia. Las cápsulas de liberación continuada, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante algunas semanas o incluso durante 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente terapéutico, se pueden utilizar estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Dado que los peptidomiméticos de horquilla β de la invención pueden contener residuos con carga, estos pueden ser incluidos en cualesquiera de las formulaciones antes descritas como tales o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros

disolventes prácticos que las correspondientes formas libres.

Los peptidomiméticos de horquilla β de la invención, o composiciones de los mismos, serán utilizados en general, en una cantidad efectiva para conseguir el objetivo deseado. Se debe comprender que la cantidad usada dependerá de la aplicación específica.

Para administración tópica para el tratamiento o prevención de infecciones del VIH, se puede determinar una dosis terapéuticamente efectiva utilizando, por ejemplo, los ensayos in vitro previstos en los ejemplos. El tratamiento puede ser aplicado mientras la infección por VIH es visible o incluso cuando no es visible. Un técnico ordinario en la materia será capaz de determinar cantidades terapéuticamente efectivas para tratar infecciones tópicas por VIH sin excesiva experimentación.

Para administración sistémica se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro la dosis terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para conseguir un rango de concentración de peptidomimético de horquilla β circulante que incluye el IC_{50} determinado en un cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de prueba que es letal para el 50% de un cultivo celular). Esta información puede ser utilizada para determinar de manera más precisa las dosis útiles en humanos.

Las dosis iniciales pueden ser determinadas también a partir de datos in vivo, por ejemplo modelos de animales, utilizando técnicas bien conocidas en el sector. Un técnico ordinario en la materia, podría optimizar fácilmente la administración a humanos basándose en datos de animales.

Las cantidades de dosificación para aplicaciones como agentes anti-VIH se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma de los peptidomiméticos de horquilla β de la invención, que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Se pueden conseguir niveles en suero terapéuticamente efectivos por administración de múltiples dosis todos los días.

En casos de administración local o toma selectiva, la concentración local efectiva de los peptidomiméticos de horquilla β de la invención puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un técnico ordinario en la materia será capaz de optimizar las dosificaciones locales, terapéuticamente efectivas sin experimentación indebida.

La cantidad de peptidomiméticos de horquilla β administrada dependerá, desde luego, del sujeto sometido a tratamiento, del peso del mismo, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración y de la evaluación del médico que hace la prescripción.

La terapia anti-VIH se puede repetir de manera intermitente mientras las infecciones son detectables o incluso cuando no son detectables. La terapia puede ser proporcionada sola o en combinación con otros medicamentos, tales como, por ejemplo, otros agentes anti-VIH o agentes anticancerosos u otros agentes antimicrobianos.

Normalmente, una dosis terapéuticamente efectiva de los peptidomiméticos de horquilla β descritos proporcionarán ventajas terapéuticas sin provocar toxicidad sustancial.

La toxicidad de los peptidomiméticos de horquilla β de la invención se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en últimos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la LD_{50} (dosis letal para el 50% de la población) o la LD_{100} (dosis letal para 100% de la población). La proporción de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los compuestos que muestran elevados índices terapéuticos son preferentes. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación que no es tóxico para su utilización en humanos. La dosificación de los peptidomiméticos de horquilla β de la invención se encuentran preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro del rango dependiendo de la forma de dosificación utilizada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, ruta de administración y dosis pueden ser escogidos por cada médico en vista del estado del paciente (ver, por ejemplo Fingl y otros 1975, In : The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1, p. 1).

Los siguientes ejemplos muestran la invención de manera más detallada, pero no están destinados a limitar el alcance en modo alguno. Las siguientes abreviaturas son utilizadas en los ejemplos:

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

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol;

DIEA: diisopropiletilamina;

HOAT: 7-aza-1-hidroxibenzotriazol;

HATU: hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (Carpino y otros Tetrahedron Lett. 1994, 35, 2279-2281).

Ejemplos

1. Síntesis de péptido

5 *Acoplamiento del primer residuo de aminoácido protegido a la resina*

0,5 g de resina de 2-clorotritilcloruro (Barlos y otros Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3943-3946) (0,83 mMol/g, 0,415 mmol) se colocaron en un matraz seco. La resina fue suspendida en CH₂Cl₂ (2,5 ml) y se dejó hinchar a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 min. La resina fue tratada con 0,415 mMol (1eq) del primer residuo de aminoácido adecuadamente protegido (ver más adelante) y 284 μl (4eq) de diisopropiletilamina (DIEA) en CH₂Cl₂ (2,5 ml), la muestra fue sometida a agitación a 25°C durante 4 horas. La resina cambió a color púrpura y entonces la solución permaneció de color amarillento. La resina fue sometida a agitación (CH₂Cl₂/MeOH/DIEA: 17/2/1), 30 ml durante 30 min; a continuación se lavó en el siguiente orden con CH₂Cl₂(1x), DMF (1x), CH₂Cl₂(1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂(1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (2x), Et₂O (2x) y se secó en vacío durante 6 horas. La carga fue de manera típica 0,6-0,7 mMol/g.

Se prepararon las siguientes resinas precargadas: Fmoc-ProO-clorotritilresina, Fmoc-^DProO-clorotritilresina y Fmoc-S-(4-S-Alloc-amino)-ProO-clorotritilresina.

20 *Síntesis del fragmento de péptido completamente protegido*

La síntesis fue llevada a cabo utilizando un sintetizador de péptidos Syro (Multisyntech) utilizando de 24 a 96 recipientes de reacción. En cada recipiente se colocarán 60 mg (peso de la resina antes de la carga) de la resina antes indicada. Los siguientes ciclos de reacción fueron programados y realizados:

Etapa	Reactivo	Tiempo
1	CH ₂ Cl ₂ , lavado e hinchado (manual)	3 x 1 min.
2	DMF, lavado e hinchado	1 x 5 min.
3	40 % piperidina/DMF	1 x 5 min.
4	DMF, lavado	5 x 2 min.
5	5 equiv. 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 ₂ Cl ₂ , lavado (al final de la síntesis)	3 x 2 min.

Las etapas 3 a 6 se repitieron para añadir cada aminoácido.

40 *Pegilación de funciones amino de cadena lateral con ácido 2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi] acético y ácido 2-(2-metoxietoxi) acético*

La resina (0,040 mmoles) conteniendo péptido fue hinchada en 5 ml de CH₂Cl₂ recién destilado durante 30 min y a continuación se añadió el catalizador de paladio Pd(PPh₃)₄, 14 mg, 0,3 eq, seguido por PhSiH₃, 0,8 mmol, 20 eq. La resina fue sometida a agitación durante 2 h y la solución de reacción se separó por filtrado. La reacción fue repetida nuevamente utilizando la misma cantidad de reactivos y después de 2 h la resina fue lavada con CH₂Cl₂ y DMF y finalmente con Et₂O.

La resina fue hinchada nuevamente en CH₂Cl₂ (2ml) recién destilado durante 30 min, el disolvente fue separado por filtrado y la resina fue hinchada en DMF durante 1 h. Se añadió una solución de DIPEA (10 eq) en 1 ml de DMF seguido de la adición de ácido 2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi] acético o ácido 2-(2-metoxietoxi)acético (5 eq) y finalmente por una solución de HATU (5 eq) en 1 ml de DMF. La resina fue sometida a agitación durante 3 h y la solución de reacción fue separada por filtrado. La reacción fue repetida nuevamente utilizando la misma cantidad de reactivos y después de 3 h la resina fue lavada con CH₂Cl₂ y DMF y finalmente con Et₂O.

El proceso de pegilación se llevó a cabo finalmente después de terminar la síntesis del fragmento de péptido completamente protegido, y a continuación se adoptó el Procedimiento A, Procedimiento B o Procedimiento C, tal como se describe más adelante, dependiendo de si no se debían formar enlaces interhebras o enlaces de hebra β de bisulfuro o hebra β lactama.

60 **Procedimiento A:** Ciclación y preparación de péptidos ciclados de núcleo

Segmentación del fragmento de péptido completamente protegido

Después de completar la síntesis, la resina fue suspendida en 1 ml (0,39 mMol) de 1% TFA en CH₂Cl₂ (v/v) durante 3 minutos, se filtró y el filtrado fue neutralizado con 1 ml (1,17 mMol, 3eq.) de 20% DIEA en CH₂Cl₂ (v/v). Este

procedimiento fue repetido dos veces para asegurar la terminación de la segmentación. El filtrado fue evaporado hasta estado seco y el producto fue completamente desprotegido [mezcla de segmentación conteniendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de agua y 2,5% de triisopropilsilano (TIS)] para su análisis mediante HPLC de fase inversa (columna C₁₈) y ESI-MS para controlar la eficiencia de la síntesis del péptido lineal.

5

Ciclación del péptido lineal

Se disolvieron 100 mg del péptido lineal completamente protegido en DMF (9ml, conc. 10 mg/ml). A continuación se añadieron 41,8 mg (0,110 mMol, 3 eq.) de HATU, 14,9 mg (0,110 mMol, 3 eq.) de HOAt y 1 ml (0,584 mMol) de 10% DIEA en DMF (v/v), y la mezcla fue sometida a vórtex a 20°C durante 16 horas y a continuación se concentró bajo vacío elevado. El residuo fue dividido entre CH₂Cl₂ y H₂O/CH₃CN (90/10: v/v). La fase de CH₂Cl₂ fue evaporada proporcionando el péptido cíclico completamente protegido.

10

Desprotección y purificación del péptido cíclico

15

El péptido cíclico obtenido puede ir suelto en 1 ml de la mezcla de segmentación conteniendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de agua y 2,5% de triisopropilsilano (TIS). La mezcla se dejó reposar a 20°C durante 2,5 horas y a continuación fue concentrada en vacío. El residuo fue disuelto en una solución de H₂O/ácido acético (72/25: v/v) y la mezcla fue extraída con diisopropiléter.

20

La fase acuosa fue secada en vacío y a continuación el producto fue purificado por HPLC de fase inversa preparativa.

Después de la liofilización los productos fueron obtenidos en forma de polvo blanco y se analizaron por ESI-MS. Los datos analíticos comprendiendo la pureza después de HPLC preparativa y ESI-MS se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

25

Procedimiento analítico 1:

Se determinaron tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna VYDAC 218MS5215 con los siguientes disolventes A (H₂O + 0,02% TFA) y B (CH₃CN) y gradiente: 0 min: 92%A, 8%B; 8 min: 62%A 38%B; 9-12 min: 0% A, 100%B.

30

Procedimiento analítico 2:

Se determinaron tiempos de retención de HPLC analítica (RT, en minutos) utilizando una columna EX (s.n. 217808-2 con los siguientes disolventes A (H₂O + 0,02% TFA) y B (CH₃CN) y gradiente: 0 min: 95%A, 5%B; 8 min: 30%A 70%B; 9 min: 0%A, 100%B; 9-12 min: 95% A, 5%B.

35

40 **Procedimiento B:** Ciclación y preparación de péptidos ciclados de núcleo con enlaces β-hebra de bisulfuro

Formación de enlace β-hebra de bisulfuro

Después de terminación de la síntesis, la resina fue hinchada en 3 ml de DMF seco durante 1 h. A continuación se añadieron 10 eq. de solución de yodo en DMF (6 ml) al reactor, seguido de agitación durante 1,5 h. La resina fue filtrada y se añadió una solución reciente de yodo (10 eq.) en DMF (6 ml), seguido de agitación durante otras 3 h. La resina fue filtrada y lavada con DMF (3x) y CH₂Cl₂(3x).

45

Ciclación de núcleo, segmentación y purificación del péptido

Después de formación del enlace de hebra β de bisulfuro, la resina fue suspendida en 1 ml (0,39 mMol) de 1% TFA en CH₂Cl₂ (v/v) durante 3 minutos y fue filtrada, y el filtrado fue neutralizado con 1 ml (1,17 mMol, 3eq.) de 20% DIEA en CH₂Cl₂ (v/v). Este procedimiento fue repetido dos veces para asegurar la terminación de la segmentación.

50

Los volátiles fueron eliminados y se añadieron 6 ml de DMF seco al tubo. A continuación se añadieron al péptido 2 eq. de HATU en DMF seco (1 ml) y 4 eq. de DIPEA en DMF seco (1 ml), seguido de agitación durante 16 h. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco. El péptido ciclado en bruto fue disuelto en 7 ml de CH₂Cl₂ y extraído con 10% de acetonitrilo en H₂O (4,5 ml) tres veces. La capa de CH₂Cl₂ fue evaporada hasta estado seco. Para desproteger el péptido por completo, se añadieron 3 ml de un cóctel de segmentación TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5), y la mezcla se mantuvo durante 2,5 h. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco y el péptido en bruto fue disuelto en 20% de AcOH en agua (7 ml) y extraído con isopropil éter (4 ml) tres veces. La capa acuosa fue recogida y evaporada hasta estado seco, y el residuo fue purificado por HPLC de fase inversa preparativa.

55

60

Después de liofilización, los productos fueron obtenidos en forma de polvo blanco y analizados por ESI-MS por el método analítico 1 ó 2. Los datos analíticos comprenden la pureza después de HPLC preparativa y ESI-MS se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

65

Procedimiento C: Ciclado y preparación de péptidos ciclados de núcleo que tiene enlaces de hebra β lactama.

Formación de enlace de hebra β lactama

5 0,036 moles de la resina fueron dispuestos en un reactor e hinchados en DMF seco durante 1 hr. Para ello se añadieron 41,60mg (1 eq.) de Pd(PPh₃)₄ y 0,133 ml (30 eq.) de PhSiH₃ y se agitó durante una noche. La resina fue filtrada y lavada por completo con DCM y DMF. La resina fue hinchada nuevamente en DMF seco durante 1 hr. Para
10 ello se añadió 1ml de solución DIPEA en DMF (24,64 μ L de DIPEA en 1 ml DMF, 4 eq.) seguido de 1 ml de solución HATU en DMF (27,37 mg de HATU, 2 eq.) y el volumen final de la mezcla de reacción fue de 7 ml y se agitó durante una noche. La resina fue lavada por completo con DMF, CH₂Cl₂, DMF, CH₂Cl₂.

Ciclado de núcleo, segmentación y purificación del péptido

15 El péptido fue segmentado a partir de la resina mediante 1% de TFA en DCM y se evaporó a estado seco y se añadieron 8 ml de DMF seco al tubo. 2 equivalentes de HATU en DMF seco (1 ml) y 4 equivalentes de DIPEA en DMF seco (1 ml) fueron añadidos al péptido y se agitó durante 16 h. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco. El péptido ciclado en bruto fue disuelto en 7 ml de DCM y extraído con 10% de acetonitrilo en H₂O (4,5 ml) tres
20 veces. La capa de DCM fue evaporada hasta estado seco.

25 El péptido ciclado en bruto fue disuelto en 7 ml de CH₂Cl₂ y extraído con 10% de acetonitrilo en H₂O (4,5 ml) tres veces. La capa de CH₂Cl₂ fue evaporada hasta estado seco. Para desproteger el péptido de modo completo, se añadieron 3 ml del cóctel de segmentación TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5), y la mezcla fue mantenida en este estado durante 2,5 h. Los volátiles fueron evaporados hasta estado seco y el péptido en bruto fue disuelto en 20% de AcOH en agua (7 ml) y extraído con isopropil éter (4 ml) tres veces. La capa acuosa fue recogida y evaporada hasta estado seco, y el residuo fue purificado por HPLC de fase inversa preparativa.

30 Después de la liofilización, los productos fueron obtenidos en forma de polvo blanco y se analizaron por ESI-MS método analítico 1 ó 2. Los datos analíticos comprendiendo pureza después de HPLC preparativa y ESI-MS se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

35 **Ejemplos 1-6 y 8-11** (n=12) mostrados en la *Tabla 1*. Los péptidos fueron sintetizados partiendo del aminoácido Pro que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina de Fmoc-ProO-clorotritilo, que fue preparada, tal como se ha descrito anteriormente. Los péptidos lineales fueron sintetizados sobre soporte sólido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en las siguientes secuencias: Resina-Pro-^DPro-P12-P11-P10-P9-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Después de ello se clivaron a partir de la resina, se ciclaron, se desprotegeron y purificaron, tal como se indica en el procedimiento A.

40 Los tiempos de retención HPLC (minutos) fueron determinados utilizando el procedimiento de gradiente 1, que se ha descrito anteriormente:

Ej.1 (4,98); **Ej.2** (4,62); **Ej.3** (5,63); **Ej.4** (5,33); **Ej.5** (5,12), **Ej.6** (4,75); **Ej.8** (5,08); **Ej.9** (6,17); **Ej.10** (6,28); **Ej.11** (6,57).

45 **Ejemplos 7 y 12-14** (n=12) se muestran en la *Tabla 1*. Los péptidos fueron sintetizados empezando con el aminoácido Pro, que fue injertado a la resina. La resina inicial era resina Fmoc-ProO-clorotritilo, que fue preparada tal como se ha descrito anteriormente. Los péptidos lineales fueron sintetizados sobre soporte sólido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la siguiente secuencia: Resina-Pro-^DPro-P12-P11-P10-P9-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1. Después de ello se formaron los puentes de bisulfuro y los péptidos fueron clivados a partir de la
50 resina, ciclados, desprotegidos y purificados, tal como se ha indicado en el procedimiento B.

Los tiempos de retención HPLC (minutos) fueron determinados utilizando el procedimiento de gradiente 1 descrito anteriormente:

55 **Ej.7** (4,48); **Ej.12** (4,83); **Ej.13** (5,30); **Ej.14** (4,08).

Tabla 1: Ejemplos n = 12

Ejemplo	Sequ.ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Plantilla	Pureza% ^{a)}	[M+ 2H] ²
1	SEQ ID NO:1	Tyr	Arg	Cit	Val	Arg	DArg	Arg	2-Nal	Phe	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	83	1016,1
2	SEQ ID NO:2	Tyr	Arg	Cit	Val	Arg	DArg	Arg	2-Nal	Val	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	992,4
3	SEQ ID NO:3	Tyr	Arg	Cit	Phe	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Phe	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	78	1040,4
4	SEQ ID NO:4	Tyr	Arg	Cit	Val	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Phe	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	83	1016,7
5	SEQ ID NO:5	Tyr	Arg	Cit	Phe	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Val	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	69	1016,2
6	SEQ ID NO:6	Tyr	Arg	Cit	Val	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Val	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	992,3
7	SEQ ID NO:7	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Cys	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	92	994,8
8	SEQ ID NO:8	Tyr	Arg	Cit	Gly	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Gly	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	1119,3
9	SEQ ID NO:9	Tyr	Arg	Cit	Ile	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Ile	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	4,98
10	SEQ ID NO:10	Tyr	Arg	Cit	Thr	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Thr	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	993,8
11	SEQ ID NO:11	Tyr	Arg	Cit	Gln	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Gln	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	1162,0
12	SEQ ID NO:12	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	DArg	Arg	2-Nal	Cys	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	100	995,1
13	SEQ ID NO:13	Tyr	Gly	Cit	Cys	Arg	Arg	Arg	2-Nal	Cys	Tyr	Gly	Lys	DProLPro	64	895,2
14	SEQ ID NO:14	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	Arg	Arg	Trp	Cys	Tyr	Cit	Lys	DProLPro	87	989,6

a) %-pureza de compuestos después de HPLC prep.

Cys en posición 4 y 9 en Ej. 7, 12-14 forman un puente de bisulfuro

2. Métodos biológicos

2.1. Preparación de los péptidos.

5 Los péptidos liofilizados fueron pesados en una microbalanza (Mettler MT5) y disueltos en agua estéril para conseguir una concentración final de 1 mM si no se indica de otro modo. Se mantuvieron soluciones a +4°C, con protección contra la luz.

2.2. Ensayo Ca^{2+} : actividad antagonista de CXCR4 de los péptidos.

10 Procedimiento 1: 3-4 Mio CXCR4 de células pre-B transfectadas [ver referencias 1, 2 y 3, más adelante] por medición fueron resuspendidas en 200 μl de MSB (20 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-etansulfónico (HEPES), 136 mM de NaCl, 4,8 mM de KCl y 1 mM de CaCl_2) conteniendo 5 mM de D-Glucosa y se cargaron con 0,75 μl de 1 mM Fura-2-acetoximetiléster (Fura-2-AM) durante 17 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas libres de Fura-2-AM con una centrifugadora de plaquetas y resuspendidas en 800 μl de MSB conteniendo 5 mM de D-Glucosa. Los péptidos a administrar fueron diluidos hasta 100 veces de concentración final en MSB/0,2 % PPL, y 8 μl fueron inyectados. Se registró con un fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 340 nM y una longitud de onda de emisión de 510 nM [ver más abajo referencia 4] el cambio de fluorescencia dependiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como respuesta a estimulación única o secuencial con el péptido. Las mediciones fueron efectuadas con agitación continua a 37°C. La intensidad de la señal fue calibrada con 3 mM de CaCl_2 /1 mM de Ionomicina (máxima saturación de fura-2-acetoximetiléster) y 10 μM de MnCl_2 (mínima saturación Fura-2-acetoximetiléster) y los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son presentados en % de saturación de fura-2-acetoximetiléster. La proporción de cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue calculada en base a los cambios iniciales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y se representaron con dependencia de la concentración de quimioquina obteniendo una curva sigmoïdal y para determinar los valores de IC_{50} .

25 MSB: 20 mM HEPES, 136 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4; Osmolaridad: 310 mOsm ajustada con NaOH o HCl, ajustada con H_2O PBS.

MSB plus: 5 mM D-glucosa en MSB (50 mg/50mL).

Fura 2-acetoximetiléster: 1 solución mM en dimetilsulfóxido.

30 Procedimiento 2: se controlaron los incrementos de calcio intracelular utilizando una Flexstation 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para evaluar los péptidos para antagonismo de CXCR4 en una línea celular pre-B de ratón 300-19 transfectada de manera estable con CXCR4 humano [ver referencias 1, 2 y 3, más adelante]. Las células fueron cargadas por lotes con el kit de ensayo Calcium 3 (Molecular Devices) en tampón de ensayo (solución de sal equilibrada de Hanks, HBSS, 20 mM HEPES, pH 7,4, 0,1% BSA) durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se dispensaron 200.000 células etiquetadas a placas de ensayo negras de 96 pocillos (Costar N° 3603). Se añadió a las células una solución concentrada 20 veces de péptido en tampón de ensayo y la placa completa fue centrifugada para disponer las células en el fondo de los pocillos. La movilización de calcio inducida por factor 1 derivado de 10 nM estroma (SDF-1) fue medida en la Flexstation 384 (excitación, 485 nM; emisión, 525 nM) durante 90 segundos. Se utilizó un cambio máximo de respuesta de fluorescencia por encima de la línea base para calcular la actividad antagonista. Los datos para las curvas de respuesta de dosis (concentración de antagonista contra % máximo de respuesta) fueron ajustados a una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando SoftmaxPro 4,6 (Molecular Devices), a partir del cual se calcularon los valores de $\text{IC}_{50\%}$.

2.3. Ensayo FIGS™

45 Los ensayos fueron llevados a cabo de acuerdo con la referencia 5, indicada más adelante. Se prepararon diluciones de los péptidos (10 mM) por disolución en 10 mM Tris-HCl a temperatura ambiente. Las soluciones fueron mantenidas a +4°C, con protección contra la luz. Se prepararon diluciones de trabajo extemporáneamente por dilución en serie de solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se añadieron en un volumen final de 10 μl directamente a los cultivos celulares. Después de 48 horas de co-cultivo, los cultivos fueron lavados con PBS y a continuación expuestos a glutaraldehído/formaldehído (0,2% / 2%) en PBS durante cinco minutos. Para cuantificación fotométrica, los cultivos fijados fueron incubados a continuación con orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG) como sustrato de β -galactosidasa, que fue convertida enzimáticamente en el cromóforo orto-nitrofenol (ONP). La lectura es obtenida directamente por medición de densidad óptica de pocillos a 405 nm en un lector iEMS de 96 pocillos por placa.

2.4. Ensayo de citotoxicidad

60 La citotoxicidad de los péptidos con respecto a células HELA (Acc57) y células COS-7 (CRL-1651) fue determinada utilizando el ensayo de reducción MTT [ver ref. 6 y 7, más adelante]. De forma breve, el procedimiento fue el siguiente: se sembraron células HELA y células COS-7 a $7,0 \cdot 10^3$, y respectivamente $4,5 \cdot 10^3$ células por pocillo y se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C a 5% de CO_2 . En este momento, se determinó el tiempo cero (Tz) por reducción MTT (ver más adelante). El sobrenadante de los pocillos restantes se descartó, y se pipetearon medio fresco y los péptidos en diluciones en serie de 12,5, 25 y 50 μM en los pocillos.

Cada concentración de péptidos fue ensayada en triplicado. La incubación de las células fue continuada durante 48 horas a 37°C a 5% de CO₂. Los pocillos fueron lavados a continuación una vez con PBS y a continuación se añadieron a los pocillos 100 µl de reactivo MTT (0,5 mg/mL en medio RPMI1640 y, respectivamente, DMEM). Se incubó a 37°C durante 2 horas y a continuación el medio fue aspirado y se añadieron a cada pocillo 100 µl de isopropanol. Se midió la absorbencia a 595 nm del producto solubilizado (péptido OD₅₉₅). Para cada concentración se calcularon promedios a partir de triplicados. El porcentaje de crecimiento fue calculado de la manera siguiente:

$$\text{(péptido OD}_{595}\text{-OD}_{595} \text{ Tz-OD}_{595} \text{ pocillo vacío) / (OD}_{595}\text{Tz-OD}_{595} \text{ pocillo vacío) x 100\% y}$$

se trazó gráfico para cada concentración de péptido.

Los valores de LC 50 (Concentración Letal, definida como concentración que extermina el 50% de las células) se determinaron para cada péptido utilizando la función de línea de tendencia de EXCEL (Microsoft Office 2000) para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0 µM), los correspondientes de crecimiento y el valor -50, (=TREND(C50:C0,%50;%0,-50)). Se calcularon las concentraciones GI 50 (Growth Inhibition) (inhibición de crecimiento) para cada péptido utilizando la función de línea de tendencia para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0 µg/ml), los porcentajes correspondientes y el valor 50 (=TREND (C₅₀:C₀,%₅₀;%₀,50)).

2.5. Cultivo celular

Se cultivaron células "CCR5" en medio de DMEM con 4500 mg/ml de glucosa, 10% de suero fetal bovino (FBS), suplementado con 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Pen/Strept.). Se mantuvieron células Hut/4-3 en medio RPMI, 10% FBS, suplementado con Pen/Strept. y 10 mM HEPES. Se mantuvieron células HELA y células CCRF-CEM en RPMI1640 más 5% FBS, Pen/Strept y 2 mM L-Glutamina. Se cultivaron células Cos-7 en medio de DMEM con 4500 mg/ml de glucosa suplementada con 10% FCS, Pen/Strept. y 2 mM L-Glutamina. Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C a 5% CO₂. Se adquirieron los medios celulares, suplementos de medios, tampón PBS, HEPES, Pen/Strept., L-Glutamina y sueros de Gibco (Paisley, UK). Todos los productos de química fina procedían de Merck (Darmstadt, Alemania).

2.6. Hemólisis

Los péptidos fueron comprobados en cuanto su actividad hemolítica contra glóbulos rojos de sangre humana (hRBC). hRBC recientes fueron lavados tres veces con solución salina con tampón fosfato (PBS) por centrifugación durante 10 min a 2000 x g. Se incubaron péptidos con una concentración de 100 µM con 20% v/v hRBC durante 1 hora a 37°C. La concentración final de eritrocitos fue aproximadamente de 0,9x10⁹ células por ml. Se determinó un valor de 0% respecto 100% de lisis celular por incubación de los hRBC en presencia de PBS sólo y respectivamente 0,1% Tritón X-100 en H₂O. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue diluido 20 veces en tampón PBS y la densidad óptica (OD) de la muestra fue medida a 540 nM. El valor de lisis 100% (OD₅₄₀H₂O) proporcionó un OD₅₄₀ de aproximadamente 1,3-1,8. El porcentaje de hemólisis fue calculado de la manera siguiente: (péptido OD₅₄₀/ OD₅₄₀H₂O) x100%.

2.7. Ensayo quimiotáctico (ensayo de migración de células)

La respuesta quimiotáctica de células CCRF-CEM a un gradiente de factor 1α derivado de células de estroma (SDF-1) fue medida utilizando placas de ensayo de un solo uso de Neuroprobe (tamaño de poros 5 µ) (Gaithersburg, MD), de acuerdo con las directrices del fabricante y referencias contenidas [especialmente ref. 8, más adelante]. De forma breve, se lavó un matraz de 175 cm³ una vez con solución salina con tampón fosfato de Dubecco (DPBS), y se tripsinizó durante 10 minutos o hasta el levantamiento de las células. La tripsina fue neutralizada por la adición de medio fresco conteniendo suero y las células fueron reducidas a pellets, lavadas una vez en DPBS, y resuspendidas a 1-0,5 x 10⁷ células/ml en RPMI + 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). 45µl de suspensión de células se mezclaron con 5 µl de péptido PEM concentrado 10 veces, diluido en el mismo medio de ensayo. 35 µl de esta mezcla fueron aplicados a la parte superior del filtro de ensayo. Las células se dejaron emigrar (a 37°C) al fondo de la cámara de la placa de ensayo conteniendo 1 nM SDF-1. Después de 4 horas, el filtro fue retirado y se añadió MTT a las células emigradas hasta la concentración final de 0,5 mg/ml, y se incubaron durante otras 4 horas. Después de marcar con MTT, se retiró todo el medio y se añadió a las células 100 µl de isopropanol + 10 mM HCl. Se leyó la absorbencia óptica a 595 nm (ABS₅₉₅) utilizando un lector de placas Tecan Genios con software Magellan. El número de células emigradas se determinó comparando valores de ABS₅₉₅ contra una curva estándar generada con un número conocido de células en la placa de ensayo y se representaron con respecto a la concentración de SDF-1 para obtener una curva sigmoidal y determinar los valores de IC₅₀. Los valores para IC₅₀ se determinaron utilizando la función Trendline de Microsoft Excel ajustando una curva logarítmica a los puntos de datos promediados.

2.8. Estabilidad del plasma

405 µl de solución de plasma/albumina fueron colocados en un tubo de polipropileno (PP) proyectando 45 µl de compuesto de una solución B 100 µM, derivada de 135 µl de PBS y 15 µl de 1 mM péptido en PBS, pH 7,4. Partes

alícuotas de 150 µl fueron transferidas a pocillos individuales de la placa de filtro de 10 kDa (Millipore MAPPB 1010 membrana Biomax). Para “controles 0 minutos”: se colocaron 270 µl de PBS en un tubo de PP y 30 µl de solución base B se añadieron y se sometieron a vórtex. Se colocaron 150 µl de solución de control en un pocillo de la placa de filtro que sirve como “control de filtrado”.

Además, se colocaron 150 µl de solución de control directamente en un pocillo receptor (reservado para filtrado) y sirve como “control no filtrado”. La totalidad de la placa incluyendo tapa de evaporación fue incubada durante 60 min a 37°C. Se centrifugaron muestras de plasma (plasma de rata: Harlan Sera lab UK, plasma humano: Blutspendezentrum Zürich), como mínimo, durante 2 horas a 4300 rpm (3500 g) y 15°C facilitando 100 µl de filtrado. Para muestras de “albúmina de suero” (albúmina humana recién preparada: Sigma A-4327, albúmina de rata: Sigma A-6272, todas las concentraciones a 40 mg/ml en PBS) aproximadamente 1 hora de centrifugación es suficiente. Los filtrados en la placa receptora de PP fueron analizados por LC/MS del modo siguiente: Columna: Jupiter C18 (Phenomenex), fases móviles: (A) 0,1% ácido fórmico en agua y (B) acetonitrilo, gradiente: 5%-100% (B) en 2 minutos, ionización por electropulverización, detección de MRM (triple cuadrupolo). Las áreas pico fueron determinadas y se hizo el promedio de valores por triplicado. La unión se expresa en porcentaje del control 1 y 2 (filtrado y no filtrado en el punto de tiempo 0 min) por: $100 - (100 * T_{60}/T_0)$. El promedio de estos valores es calculado a continuación (ver referencia 9 más adelante).

3.0 Resultados

Los resultados de los experimentos descritos en los anteriores 2.2-2.7, se indican en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Ej.	Ensayo IC ₅₀ (nM) Ca ²⁺	FIGS™		Hemólisis a 100 µM	IC ₅₀ (µM) células Ensayo emigración
		% Inhibición a 200 nM	Desviación estándar a 200 nM		
1	2280	n.d.	n.d.	1,6	n.d.
2	2830	n.d.	n.d.	0,9	n.d.
3	1000	n.d.	n.d.	1,7	n.d.
4	2540	n.d.	n.d.	0,7	n.d.
6	1930	n.d.	n.d.	0,6	n.d.
n.d.: no determinado					

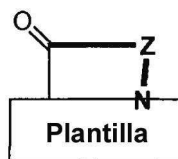
La determinación de valores IC₅₀ (nM) en el ensayo Ca²⁺ fue llevada a cabo utilizando el procedimiento 1. Para la determinación de valores de citotoxicidad se utilizó el cálculo LC₅₀.

Referencias

- Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard J-M, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. Nature. 1996, 382:833-835
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. J.Biol. Chem. 1994. 269:232-237
- D'Apauo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchors F, Baggiolini M, Moser B. Eur.J.Immunol. 1997. 27:1788-1793
- von Tscherner V, Prod'hom B, Baggiolini M, Reuter H. Nature. 1986. 324:369-72.
- Hamy F, Felder ER, Heizmann G, Lazdins J, Aboul-ela F, Varani G, Karn J, Klimkait T. Proc.Natl.Acad.Sci. 1997. 94:3548-3553.
- Mossman T.J.Immunol.Meth. 1983, 65:55-63
- Berridge MV, Tan AS. Arch.Biochem.Biophys. 1993, 303:474-482
- Frevert CW, Wong VA, Goodman RV, Goodwin R, Martin TR, J.Immunol.Meth. 1998. 213: 41-52
- Singh R., Chang, S.Y., Talor, L.C., Rapid Commun. Mass Spectrom., 1996, 10: 1019-1026

REIVINDICACIONES

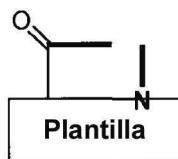
1. Compuesto de fórmula



5

(I)

en la que



10

es un residuo de dipéptido constituido por dos elementos constructivos de aminoácidos diferentes, siendo el dipéptido ^DPro-^LPro; y Z es una cadena constituida por 12 residuos de α-aminoácidos, en la que

- el residuo P1 es el residuo de Tyr;
- el residuo P2 es el residuo de Arg o Gly;
- el residuo P3 es el residuo de Cit;
- el residuo P4 es el residuo de Val, Phe, Cys, Gly Ile, Thr o Gln;
- el residuo P5 es el residuo de Arg;
- el residuo P6 es el residuo de ^DArg o Arg;
- el residuo P7 es el residuo de Arg;
- el residuo P8 es el residuo de 2-Nal o Trp;
- el residuo P9 es el residuo de Phe, Val, Cys, Gly, Ile, Thr o Gln;
- el residuo P10 es el residuo de Tyr;
- el residuo P11 es el residuo de Cit o Gly;
- el residuo P12 es el residuo de Lys;

25

Cys en P4 y P9 forman un puente de bisulfuro en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

30

2. Compuesto, según la reivindicación 1, para su uso en sustancias terapéuticamente activas.

3. Compuesto, según la reivindicación 2, que tiene actividad antagonista de CXCR4 y/o actividad anticáncer y/o actividad anti inflamatoria.

35

4. Composición farmacéutica, que contiene un compuesto, según la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente inerte.

5. Composición, según la reivindicación 4, en forma apropiada para administración oral, tópica, transdérmica, inyección, bucal, transmucosal, pulmonar o inhalación.

40

6. Composición, según la reivindicación 4 ó 5, en forma de tabletas, grageas, cápsulas, soluciones, líquidos, geles, parches, cremas, ungüentos, jarabes, emulsiones, suspensiones, pulverizaciones, nebulizadores o supositorios.

7. Utilización de un compuesto, según la reivindicación 1, para la fabricación de medicamento antagonista de CXCR4.

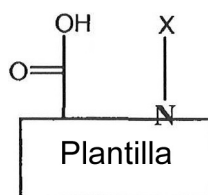
45

8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que dicho medicamento antagonista de CXCR4 está destinado a su utilización para prevenir infecciones de VIH en individuos sanos, o para hacer más lento y detener el avance vírico en pacientes infectados; o en los que resulta cáncer o es mediado, o en el caso de que una enfermedad inmunológica es mediada o resulta de actividad del receptor de CXCR4; o para tratar la inmunosupresión; o durante recogidas de células madre de sangre periférica por aferesis.

50

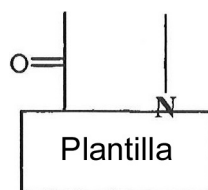
9. Procedimiento para la fabricación de un compuesto, según la reivindicación 1, que comprende

- (a) acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un derivado apropiadamente N protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 6, 7 u 8, estando igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;
- (b) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido;
- (c) acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en los productos finales deseados se encuentra una posición más próximo al residuo de aminoácido N-terminal, siendo igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional, que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;
- (d) eliminar el grupo N-protector obtenido;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) hasta que el residuo de aminoácido del terminal N ha sido introducido;
- (f) acoplamiento del producto obtenido con un compuesto de fórmula general;



II

en la que

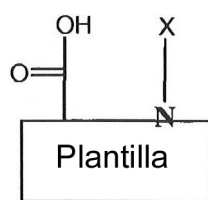


es la definida anteriormente y X es un grupo N-protector

- (g) eliminando el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (f) o en la etapa (fc);
- (h) acoplando el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 14, siendo igualmente protegido de modo apropiado cualquier grupo funcional que puede encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;
- (i) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;
- (j) acoplar el producto obtenido con un derivado apropiadamente N-protegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra una posición más alejado de la posición 14, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-protegido;
- (k) eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;
- (l) repetir las etapas (j) y (k) hasta que todos los residuos de aminoácidos han sido introducidos;
- (m) en caso deseado desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presentes en la molécula y sustituir de manera apropiada el grupo o grupos reactivos liberados de este modo:
- (n) en caso deseado formar uno, dos o tres enlaces entre hebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas de la región de hebra β ;
- (o) desacoplar el producto obtenido del soporte sólido;
- (p) ciclar el producto fraccionado del soporte sólido;
- (q) eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos y, en caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que pueden encontrarse presentes además en la molécula; y
- (r) en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.

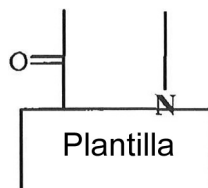
10. Procedimiento para la fabricación de un compuesto, según la reivindicación 1, que comprende

- (a') acoplamiento de un soporte sólido apropiadamente funcionalizado con un compuesto de fórmula general



II

en la que



5

es la definida anteriormente y X es un grupo N-protector

(b') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido en la etapa (a') o en la etapa (a'c);

10 (c') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final deseado se encuentra en posición 18, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(d') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

15 (e') acoplar el producto obtenido de este modo con un derivado apropiadamente N-prottegido de dicho aminoácido que en el producto final se encuentra una posición más allá de la posición 12, encontrándose igualmente protegido de forma apropiada cualquier grupo funcional que pueda encontrarse presente en dicho derivado de aminoácido N-prottegido;

(f') eliminar el grupo N-protector del producto obtenido de este modo;

20 (g') repetir las etapas (e') y (f) hasta que sean introducidos todos los residuos de aminoácidos;

(h') en caso deseado, desproteger selectivamente uno o varios grupos funcionales protegidos presente en la molécula y sustituir de manera apropiada el grupo o grupos reactivos liberados de esta forma;

(i') en caso deseado formar uno, dos o tres enlaces interhebras entre cadenas laterales de residuos de aminoácidos apropiados en posiciones opuestas de la región de la hebra β ;

25 (j') desacoplar el producto obtenido del soporte sólido;

(k') ciclar el producto fraccionado del soporte sólido;

(l') eliminar cualesquiera grupos protectores presentes en grupos funcionales de cualesquiera miembros de la cadena de residuos de aminoácidos, y en caso deseado, cualquier grupo o grupos protectores que se pueden encontrar adicionalmente presentes en la molécula; y

30 (m') en caso deseado, convertir el producto obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o inaceptable, obtenida de este modo en el compuesto libre correspondiente de fórmula I o en una sal diferente, farmacéuticamente aceptable.