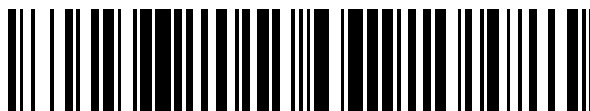


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 928**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/54** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2008 E 08728649 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2118123**

54 Título: **Péptidos p53 estabilizados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**31.01.2007 US 887526 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.02.2016**

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.  
(50.0%)  
450 Brookline Avenue  
Boston, MA 02115, US y  
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERNAL, FEDERICO;  
WALENSKY, LOREN D.;  
VERDINE, GREGORY L. y  
KORSMEYER, STANLEY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

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

**ES 2 558 928 T3**

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

## Descripción

Péptidos p53 estabilizados y usos de los mismos

### Antecedentes

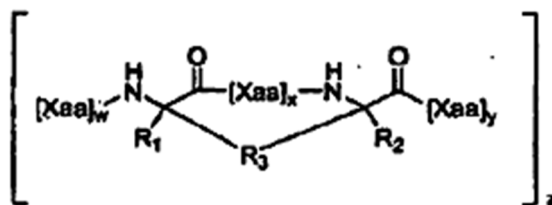
- 5 El factor de transcripción p53 humano induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño del ADN<sup>1</sup> y el estrés celular<sup>2</sup>, jugando por lo tanto un papel crítico en la protección de células frente a la transformación maligna. La ubiquitina ligasa E3 HDM2 controla los niveles de p53 a través de una interacción de unión directa que neutraliza la actividad de transactivación de p53, exporta p53 nuclear, y lo dirige a la degradación a través de la vía proteasomal de ubiquitinación.<sup>3,4</sup> La pérdida de la actividad de p53, ya sea por delección, mutación, o expresión en exceso de HDM2, es el defecto más común en el cáncer humano.<sup>5</sup> Los tumores con una expresión conservada de p53 de tipo salvaje se vuelven vulnerables a causa de enfoques farmacológicos que estabilizan el p53 nativo. En este contexto, el direccionamiento de HDM2 se ha convertido en un enfoque validado para restaurar la actividad de p53 y resensibilizar las células cancerosas a la apoptosis *in vitro* e *in vivo*.<sup>6</sup> También se ha identificado HDMX (HDM4) como un regulador de p53. Por otra parte, los estudios han mostrado una similitud entre la interfaz de unión a PS3 de HDM2 y la de HDMX.<sup>6e</sup>
- 10
- 15 Documento WO2005/118620; Walensky et al. (2004), Science 305, 1466-1470; Walensky et al. (2006), Molecular Cell 24, 199-210 y documento WO2005/044839 describen que los péptidos se pueden ciclar. Picksley et al. (1994), Oncogene 9, 2523-2529 y Uesugi et al. (1999) PNAS 96, 14801-14806 ilustran la interacción de p53 y HDM2.

- 20 La interacción p53- proteína HDM2 está mediada por el dominio de transactivación  $\alpha$ -helicoidal de 15 residuos de p53, que se inserta en una hendidura hidrófoba en la superficie de HDM2.<sup>7</sup> Tres residuos dentro de este dominio (F19, W23 y L26) son esenciales para la unión a HDM2.<sup>8,9</sup>

### Compendio

- A continuación se describen péptidos entrecruzados de forma estable relacionados con una porción de p53 humana ("péptidos p53 grapados"). Estos péptidos entrecruzados contienen al menos dos aminoácidos modificados que juntos forman un entrecruzamiento interno (también conocido como traba) que puede ayudar a estabilizar la estructura secundaria de la hélice alfa de una porción de p53 que se piensa que es importante para la unión de p53 a HDM2. En consecuencia, un polipéptido entrecruzado descrito en la presente memoria puede tener una mejor actividad biológica con respecto a un polipéptido correspondiente que no está entrecruzado. Se cree que los péptidos p53 grapados interfieren en la unión de p53 a HDM2 inhibiendo de este modo la destrucción de p53. El péptido p53 grapado descrito en la presente memoria puede ser utilizado terapéuticamente, p. ej., para tratar una variedad de cánceres en un sujeto. Por ejemplo, los cánceres y otros trastornos caracterizados por un nivel indeseablemente bajo o una baja actividad de p53 y/o los cánceres y otros trastornos caracterizados por un nivel indeseablemente alto de actividad de HDM2. Los péptidos modificados también pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier trastorno asociado con la regulación alterada de la vía transcripcional de p53, dando lugar a condiciones de exceso de supervivencia y proliferación celular (p. ej., cáncer y autoinmunidad), además de las condiciones de detención del ciclo celular inadecuada y apoptosis (p. ej., neurodegeneración y deficiencia inmunitaria).
- 25
- 30
- 35

Se describe en la presente memoria un polipéptido modificado de Fórmula (I),



Fórmula (I)

- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
en donde;

cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es independientemente H o un alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, o heterociclilalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>;

R<sub>3</sub> es alquileo, alqueniлено o alquinileno, o [R<sub>4</sub><sup>1</sup>-K-R<sub>4</sub>]<sub>n</sub>; cada uno de los cuales está sustituido con 0-6 R<sub>5</sub>;

R<sub>4</sub> y R<sub>4</sub>' son independientemente alquileo, alquenileno o alquinileno (p. ej., cada uno es independientemente un alquileo, alquenileno o alquinileno C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 o C10);

R<sub>5</sub> es halo, alquilo, OR<sub>6</sub>, N(R<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, SR<sub>6</sub>, SOR<sub>6</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, CO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, R<sub>6</sub>, un radical fluorescente o un radioisótopo;

K es O, S, SO, SO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, CONR<sub>6</sub>, o



aziridina, episulfuro, diol, amino alcohol;

R<sub>6</sub> es H, alquilo, o un agente terapéutico;

n es 2, 3, 4 ó 6;

x es un número entero de 2 a 10;

10 w e y son independientemente un número entero de 0 a 100;

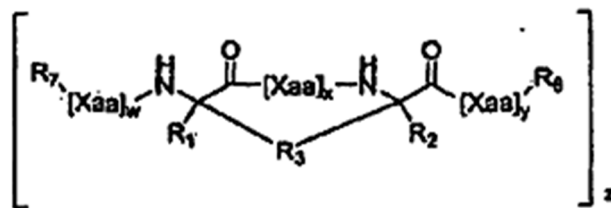
z es un número entero de 1 a 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); y

cada Xaa es independientemente un aminoácido (p. ej., uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural);

15 en donde el polipéptido comprende al menos 8 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 1 (p53 humano) o una variante del mismo, SEQ ID NO: 2 o una variante del mismo, u otra secuencia de polipéptido descrita en la presente memoria, excepto que: (a) dentro de los 8 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 1 las cadenas laterales de al menos un par de aminoácidos separados por 3, 4 o 6 aminoácidos se sustituyen por el grupo conector, R<sub>3</sub>, que conecta los carbonos alfa del par de aminoácidos representado en la Fórmula I; y (b) el carbono alfa del primero del par de aminoácidos está sustituido por R<sub>1</sub> como se representa en la fórmula 1 y el carbono alfa del segundo del par de aminoácidos está sustituido por R<sub>2</sub> como se representa en la Fórmula I.

20 La presente invención proporciona un polipéptido alfa helicoidal que se une a doble minuto 2 humano (HDM2) y/o a doble minuto X humano (HDMX) de Fórmula (I), como se muestra anteriormente en donde cada R<sub>3</sub> se extiende a través de dos vueltas helicoidales del polipéptido y es independientemente alquileo o alquenileno o alquinileno, x es 6 y en donde el polipéptido modificado comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia Leu<sub>1</sub> Ser<sub>2</sub> Gln<sub>3</sub> Glu<sub>4</sub> Thr<sub>5</sub> Phe<sub>6</sub> Ser<sub>7</sub> Asp<sub>8</sub> Leu<sub>9</sub> Trp<sub>10</sub> Lys<sub>11</sub> Leu<sub>12</sub> Leu<sub>13</sub> Pro<sub>14</sub> Glu<sub>15</sub> Asn<sub>16</sub>, excepto que las cadenas laterales de Ser<sub>7</sub> y Pro<sub>14</sub> se sustituyen por el grupo conector R<sub>3</sub>, y en donde hasta 6 aminoácidos distintos de los aminoácidos que llevan el grupo conector R<sub>3</sub>, Phe<sub>6</sub>, Trp<sub>10</sub> y Leu<sub>13</sub> se sustituyen independientemente por cualquier otro aminoácido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se describe en la presente memoria un polipéptido modificado de Fórmula (II),



Fórmula (II)

30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
en donde;

cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es independientemente H o un alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, o heterociclicilalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>;

35 R<sub>3</sub> es alquileo, alquenileno o alquinileno, o [R<sub>4</sub>'-K-R<sub>4</sub>]<sub>n</sub>; cada uno de los cuales está sustituido por 0-6 R<sub>5</sub>;

R<sub>4</sub> y R<sub>4</sub>' son independientemente alquileo, alquenileno o alquinileno (p. ej., cada uno es independientemente un alquileo, alquenileno o alquinileno C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 o C10);

R<sub>5</sub> es halo, alquilo, OR<sub>6</sub>, N(R<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, SR<sub>6</sub>, SOR<sub>6</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, CO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, R<sub>6</sub>, un radical fluorescente o un radioisótopo;

K es O, S, SO, SO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, CONR<sub>6</sub>, o



aziridina, episulfuro, diol, amino alcohol;

R<sub>6</sub> es H, alquilo, o un agente terapéutico;

5 n es 2,3,4 ó 6;

x es un número entero de 2 a 10;

w e y son independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); y

10 cada Xaa es independientemente un aminoácido (p. ej., uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural);

R<sub>7</sub> es PEG, una proteína tat, una etiqueta de afinidad, un radical de direccionamiento, un grupo acilo derivado de ácido graso, un radical biotina, una sonda fluorescente (p. ej., fluoresceína o rodamina) unido a través de, p. ej., un enlace tiocarbamato o carbamato;

R<sub>9</sub> es H, OH, NH<sub>2</sub>, NHR<sub>8a</sub>, NR<sub>8a</sub>R<sub>8b</sub>;

15 en donde el polipéptido comprende al menos 8 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 1 (p53 humano) o una variante del mismo, SEQ ID NO: 2 o una variante del mismo, u otra secuencia de polipéptidos descrita en la presente memoria, excepto que: (a) dentro de los 8 aminoácidos contiguos del SEQ ID NO: 1 las cadenas laterales de al menos un par de aminoácidos separados por 3, 4 o 6 aminoácidos se sustituye por el grupo conector, R<sub>3</sub>, que conecta los carbonos alfa del par de aminoácidos como se representa en la fórmula I; y (b) el carbono alfa del primero del par de aminoácidos está sustituido por R<sub>1</sub> como se representa en la Fórmula II y el carbono alfa del segundo del par de aminoácidos está sustituido por R<sub>2</sub> como se representa en la Fórmula II.

20

En el caso de la Fórmula I o la Fórmula II, los siguientes casos se encuentran entre los descritos.

25 En los casos en los que x = 2 (es decir, conexión i, i + 3), R<sub>3</sub> puede ser un alquileo, alquenileno C<sub>7</sub>. Cuando es un alquenileno, puede haber uno o más dobles enlaces. En los casos en los que x = 6 (es decir, conexión i, i + 7), R<sub>3</sub> puede ser un alquileo o alquenileno C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> o C<sub>13</sub>. Cuando es un alquenileno puede haber uno o más dobles enlaces. En los casos en los que x = 3 (es decir, conexión i, i + 4), R<sub>3</sub> puede ser un alquileo, alquenileno C<sub>8</sub>. Cuando es un alquenileno puede haber uno o más dobles enlaces.

30 El SEQ ID NO: 1 es la secuencia del p53 humano. Los péptidos grapados pueden incluir la secuencia Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn (SEQ ID NO: 2; corresponde a los aminoácidos 14 a 29 del SEQ ID NO: 1). El péptido grapado también puede incluir la secuencia Phe Ser Asn Leu Trp Arg Leu Leu Pro Gln Asn (SEQ ID NO: 5) o la secuencia Gln Ser Gln Gln Thr Phe Ser Asn Leu Trp Arg Leu Leu Pro Gln Asn (SEQ ID NO: 6). En estas secuencias como en los SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4), las cadenas laterales de dos aminoácidos separadas por 2, 3, 4 o 6 aminoácidos pueden ser sustituidas por el grupo conector R<sub>3</sub>. Por ejemplo, en el SEQ ID NO: 5, las cadenas laterales de Ser y Pro pueden ser sustituidas por el grupo conector R<sub>3</sub>.

35

El polipéptido grapado puede incluir la totalidad o parte (p. ej., al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13) de la siguiente secuencia de aminoácidos:

40 Xaa<sub>1</sub>Ser<sub>2</sub>Gln<sub>3</sub>Xaa<sub>4</sub>Thr<sub>5</sub>Phe<sub>6</sub>Xaa<sub>7</sub>Xaa<sub>8</sub>Leu<sub>9</sub>Trp<sub>10</sub>Xaa<sub>11</sub>Leu<sub>12</sub>Leu<sub>13</sub>Xaa<sub>14</sub>Xaa<sub>15</sub>Asn<sub>16</sub>. (SEQ ID NO: 3) en donde cada uno de Xaa<sub>1</sub>, Xaa<sub>4</sub>, Xaa<sub>7</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>11</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub> son cualquier aminoácido (p. ej., cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural).

En algunas situaciones:

Xaa<sub>1</sub> = Leu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>4</sub> = Glu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>7</sub> = Ser o el grupo conector R<sub>3</sub>

45 Xaa<sub>8</sub> = Asp o cualquier aminoácido distinto de Asp y Glu (preferiblemente Asn; p. ej., Xaa<sub>8</sub> puede ser Asp o Asn) o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>11</sub> = Lys o un aminoácido cargado positivamente (preferiblemente Arg) o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>14</sub> = Pro o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>15</sub> = Glu o cualquier aminoácido distinto de Asp y Glu (preferiblemente Gln) o el grupo conector R<sub>3</sub>.

5 En algunas situaciones, el péptido comprende el SEQ ID NO: 3 en el que Xaa<sub>1</sub> = Leu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>4</sub> = Glu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>7</sub> = Ser o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>8</sub> = Asp, Asn o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>11</sub> = Lys, Arg o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>14</sub> = Pro o el grupo conector R<sub>3</sub>; Xaa<sub>15</sub> = Glu, Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>. En los péptidos grapados, cualquier posición ocupada por Gln puede ser Glu en su lugar y cualquier posición ocupada por Glu puede ser Gln en su lugar. Del mismo modo, cualquier posición ocupada por Asn puede ser Asp en su lugar y cualquier posición ocupada por Asp puede ser Asn en su lugar. La elección de Asn o Arg y Gln o Glu dependerá de la carga deseada del péptido grapado.

10 En algunos casos, el péptido comprende una porción del SEQ ID NO: 3 que tiene la secuencia: Gln<sub>3</sub>Xaa<sub>4</sub>Thr<sub>5</sub>Phe<sub>6</sub>Xaa<sub>7</sub>Xaa<sub>8</sub>Leu<sub>9</sub>Trp<sub>10</sub>Xaa<sub>11</sub>Leu<sub>12</sub>Leu<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 4).

Dentro del SEQ ID NO: 3, los pares de aminoácidos que pueden ser entrecruzados incluyen, pero no se limitan a: los aminoácidos 5° y 12°; los aminoácidos 4° y 11°; los aminoácidos 7° y 11°; y los aminoácidos 7° y 14°.

15 En algunos casos, el péptido modificado se une a HDM2 (p. ej., Núm. de Acceso GenBank®: 228952; GI: 228952) y/o HDM4 (también referido como HDMX; Núm. de Acceso GenBank®: 88702791; GI: 88702791). En algunos casos puede ser útil crear un péptido grapado inactivo mediante la sustitución de uno o más (p. ej., los tres) de Phe<sub>6</sub>, Trp<sub>10</sub>, Leu<sub>13</sub> por otro aminoácido, p. ej., Ala.

20 Los péptidos útiles adicionales incluyen péptidos no entrecruzados que tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa<sub>1</sub>Ser<sub>2</sub>Gln<sub>3</sub>Xaa<sub>4</sub>Thr<sub>5</sub>Phe<sub>6</sub>Xaa<sub>7</sub>Xaa<sub>8</sub>Leu<sub>9</sub>Trp<sub>10</sub>Xaa<sub>11</sub>Leu<sub>12</sub>Leu<sub>13</sub>Xaa<sub>14</sub>Xaa<sub>15</sub>Asn<sub>16</sub>. (SEQ ID NO: 3) en donde cada uno de Xaa<sub>1</sub>, Xaa<sub>4</sub>, Xaa<sub>7</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>11</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub> es cualquier aminoácido (p. ej., cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural).

En algunos casos de tales péptidos no entrecruzados:

25 Xaa<sub>1</sub> = Leu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>4</sub> = Glu o Gln o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>7</sub> = Ser o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>8</sub> = Asp o cualquier aminoácido distinto de Asp y Glu (preferiblemente Asn) o el grupo conector R<sub>3</sub>

Xaa<sub>11</sub> = Lys o un aminoácido cargado positivamente (preferiblemente Arg) o el grupo conector R<sub>3</sub>

30 Xaa<sub>14</sub> = Pro o el grupo conector R<sub>3</sub>

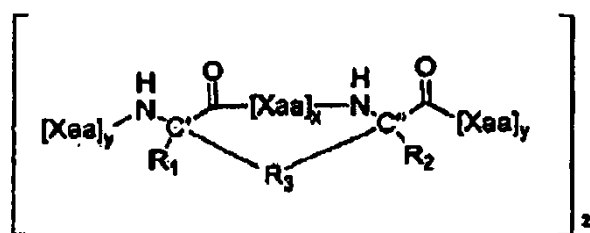
Xaa<sub>15</sub> = Glu o cualquier aminoácido distinto de Asp y Glu (preferiblemente Gln) o el grupo conector R<sub>3</sub>

En algunos casos, el péptido no entrecruzado comprende una porción del SEQ ID NO: 3 que tiene la secuencia: Gln<sub>3</sub>Xaa<sub>4</sub>Thr<sub>5</sub>Phe<sub>6</sub>Xaa<sub>7</sub>Xaa<sub>8</sub>Leu<sub>9</sub>Trp<sub>10</sub>Xaa<sub>11</sub>Leu<sub>12</sub>Leu<sub>13</sub> (SEQ ID NO: 4).

35 En algún caso el péptido modificado comprende adicionalmente, por ejemplo: PEG, un ácido graso, o un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo que dirige el péptido modificado a una célula que expresa p53, HDM2 o HDM4).

40 En algunos casos, cada w es independientemente un número entero entre 3 y 15. En algunos casos cada y es independientemente un número entero entre 1 y 15. En algunos casos, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En algunos casos, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. En algunos casos, al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es metilo. Por ejemplo R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos metilo. En algunos casos R<sub>3</sub> es alquilo (p. ej., alquilo C<sub>8</sub>) y x es 3. En algunos casos, R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>11</sub> y x es 6. En algunos casos, R<sub>3</sub> es alqueno (p. ej., alqueno C<sub>8</sub>) y x es 3. En algunos casos x es 6 y R<sub>3</sub> es alqueno C<sub>11</sub>. En algunos casos, R<sub>3</sub> es un alquilo, alqueno o alqueno de cadena lineal. En algunos casos R<sub>3</sub> es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. En algunos casos R<sub>3</sub> es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. En algunos casos R<sub>3</sub> es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

45 En ciertos casos, los dos estereocentros alfa, alfa disustituidos (carbonos alfa) están ambos en configuración R o configuración S (p. ej., entrecruzamiento i, i + 4), o un estereocentro es R y el otro es S (p. ej., entrecruzamiento i, i + 7). Por lo tanto, cuando la Fórmula I se representa como



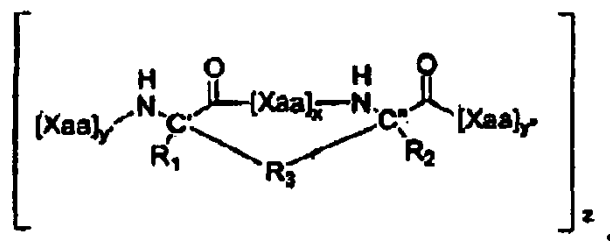
los estereocentros C' y C'' disustituidos pueden estar ambos en configuración R o ambos pueden estar en configuración S, por ejemplo, cuando x es 3. Cuando x es 6, el estereocentro disustituido C' está en configuración R y el estereocentro disustituido C'' está en configuración S. El doble enlace de R<sub>3</sub> puede estar en configuración estereoquímica E o Z. Son posibles configuraciones similares para los carbonos de la Fórmula II correspondientes a C' y C'' en la fórmula representada inmediatamente antes.

En algunos casos, R<sub>3</sub> es [R<sub>4</sub>-KR<sub>4</sub>]<sub>n</sub>; y R<sub>4</sub> y R<sub>4</sub>' son independientemente alquileo, alquenileno o alquinileno (p. ej., cada uno es independientemente alquileo, alquenileno o alquinileno C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> o C<sub>10</sub>).

En algunos casos, el polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos que, además de las cadenas laterales de aminoácidos que son reemplazadas por un entrecruzamiento, tienen 1, 2, 3, 4 o 5 cambios de aminoácidos en cualquiera de los SEQ ID NO: 1-4.

La traba puede incluir un radical alquilo, alquenilo, o alquinilo (p. ej., alquilo C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>11</sub> o alquenilo C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>11</sub>, o alquinilo C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> o C<sub>11</sub>). El aminoácido trabado puede estar disustituido en alfa (p. ej., C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o metilo). [Xaa]<sub>y</sub> y [Xaa]<sub>w</sub> son péptidos que pueden comprender independientemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o más aminoácidos contiguos (preferiblemente 2 o 5 aminoácidos contiguos) de un polipéptido de p53 (p. ej., cualquiera de los SEQ ID NO: 1-4) y [Xaa]<sub>x</sub> es un péptido que puede comprender 3 o 6 aminoácidos contiguos de ácidos de un péptido p53.

El péptido puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 aminoácidos del polipéptido p53. Los aminoácidos son contiguos excepto que uno o más pares de aminoácidos separados por 3 o 6 aminoácidos se sustituyen por sustitutos de aminoácidos que forman un entrecruzamiento, p. ej., a través de R<sub>3</sub>. Así, al menos dos aminoácidos pueden ser sustituidos por aminoácidos trabados o sustitutos de aminoácidos trabados. Por lo tanto, cuando la Fórmula I se representa como



[Xaa]<sub>y</sub>, [Xaa]<sub>x</sub> y [Xaa]<sub>y'</sub> pueden comprender cada uno secuencias de polipéptidos contiguos de los mismos o diferentes péptidos p53. Lo mismo es cierto para la Fórmula II.

Los péptidos pueden incluir 10 (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más) aminoácidos contiguos de un polipéptido p53 en donde los carbonos alfa de dos aminoácidos que están separados por tres aminoácidos (o seis aminoácidos) están conectados a través de R<sub>3</sub>, uno de los dos carbonos alfa está sustituido por R<sub>1</sub> y el otro está sustituido por R<sub>2</sub> y cada uno está conectado a través de enlaces peptídicos a aminoácidos adicionales.



En algunos casos el polipéptido actúa como inhibidor negativo dominante de la degradación de p53. En algunos casos, el polipéptido también incluye un radical fluorescente o un radioisótopo o un radical que puede quelar un radioisótopo (p. ej., mercaptoacetilglicina o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA)) quelado a un isótopo radiactivo de Re, In o Y). En algunos casos, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo; R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>8</sub>, alquilo C<sub>11</sub>, alquenilo C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>11</sub>, alquinilo C<sub>8</sub>, o alquinilo C<sub>11</sub>; y x es 2, 3, o 6. En algunos casos, el polipéptido incluye un conector PEG, una proteína tat, una marca de afinidad, un radical de direccionamiento, un grupo acilo derivado de ácido graso, un radical de biotina, una sonda fluorescente (p. ej., fluoresceína o rodamina).


También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un sujeto que incluye administrar al sujeto cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria. En algunos casos, el método también incluye la administración de un agente terapéutico adicional, p. ej., un agente quimioterapéutico.

Los péptidos pueden contener uno o más centros asimétricos y por lo tanto presentarse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas e isómeros

geométricos (p. ej., *Z* o *cis* y *E* o *trans*) de cualquier olefina presente. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Los compuestos también pueden estar representados en múltiples formas tautoméricas, en tales casos, la invención incluye expresamente todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria (p. ej., la alquilación de un sistema de anillos puede dar como resultado la alquilación en múltiples sitios, la invención incluye expresamente todos estos productos de reacción). Se incluyen todas estas formas isoméricas de dichos compuestos al igual que todas las formas cristalinas.

Los aminoácidos que contienen tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unido a un carbono son referidos como carbono alfa. También se encuentran unidos al carbono alfa un hidrógeno y una cadena lateral. Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, tanto los isómeros D- como L- de los 20 aminoácidos de origen natural comunes encontrados en los péptidos (p. ej., A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V (como son conocidos por las abreviaturas de una letra)), así como los aminoácidos de origen natural y no natural producidos por medio de síntesis orgánica u otras rutas metabólicas. La tabla siguiente proporciona las estructuras de las cadenas laterales para cada uno de los 20 aminoácidos de origen natural comunes. En esta tabla el "-" en el lado derecho de cada estructura es el enlace con el carbono alfa.

Aminoácido	Una Letra	Tres Letras	Estructura de la cadena lateral
Alanina	A	Ala	CH <sub>3</sub> -
Arginina	R	Arg	HN=C(NH <sub>2</sub> )-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
Asparagina	N	Asn	H <sub>2</sub> N-C(O)-CH <sub>2</sub> -
Ácido aspártico	D	Asp	HO(O)C-CH <sub>2</sub> -
Cisteína	C	Cys	HS-CH <sub>2</sub> -
Glutamina	Q	Gln	H <sub>2</sub> N-C(O)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
Ácido glutámico	E	Glu	HO(O)C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
Glicina	G	Gly	H-
Histidina	H	His	<b>N=CH-NH-CH=C-CH<sub>2</sub>-</b> 
Isoleucina	I	Ile	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )-
Leucina	L	Leu	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -
Lisina	K	Lys	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -
Metionina	M	Met	CH <sub>3</sub> -S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
Fenilalanina	F	Phe	Fenil-CH <sub>2</sub> -
Prolina	P	Pro	<b>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH-</b> 
Serina	S	Ser	HO-CH <sub>2</sub> -
Treonina	T	Thr	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-

Aminoácido	Una Letra	Tres Letras	Estructura de la cadena lateral
Triptófano	W	Trp	<b>Fenil-NH-CH=C-CH<sub>2</sub>-</b> 
Tirosina	Y	Tyr	4-OH-Fenil-CH <sub>2</sub> -
Valina	V	Val	CH <sub>3</sub> -CH(CH <sub>2</sub> )-

5 Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo salvaje de un polipéptido (sin anular o alterar su actividad sustancialmente). Un residuo de aminoácido "esencial" es un residuo que, cuando se altera a partir de la secuencia de tipo salvaje del polipéptido, da como resultado la anulación o la anulación sustancial de la actividad del polipéptido.

10 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales alcalinas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

15 El símbolo ~~15~~ "

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

20 El término "cadena lateral de aminoácido" se refiere a un radical anclado al carbono  $\alpha$  en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácido para la alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácido para la fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácido para la cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácido para el aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácido para la tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etc. También se incluyen otras cadenas laterales de origen no natural, por ejemplo, aquellas que se producen en la naturaleza (p. ej., un metabolito aminoácido) o aquellas que están elaboradas sintéticamente (p. ej., un aminoácido di-sustituido en alfa).

25 El término polipéptido abarca dos o más aminoácidos de origen natural o sintéticos unidos por un enlace covalente (p. ej., un enlace amida). Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen proteínas completas (p. ej., proteínas totalmente procesadas), así como secuencias de aminoácidos más cortas (p. ej., fragmentos de proteínas de origen natural o fragmentos de polipéptidos sintéticos).

30 El término "halo" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo. El término "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> indica que el grupo puede tener de 1 a 10 (inclusive) átomos de carbono en el mismo. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono en la misma. El término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo divalente (es decir, -R-).

35 El término "alqueno" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más enlaces carbono-carbono en cualquier configuración geométrica Z o E. El radical alqueno contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> indica que el grupo puede tener de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en el mismo. El término "alqueno inferior" se refiere a una cadena de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>. En ausencia de cualquier designación numérica, "alqueno" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en la misma.

45 El término "alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. El radical alquino contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> indica que el grupo puede tener de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en el mismo. El término "alquino inferior" se refiere a una cadena de alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquino" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono



en la misma.

El término "arilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 6 carbonos o bicíclico de 10 carbonos en donde 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de los grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y similares. El término "arilalquilo" o el término "aralquilo" se refieren a alquilo sustituido con un arilo. El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con arilo.

El término "cicloalquilo" tal como se emplea en la presente memoria, incluye grupos hidrocarbonados cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen 3 a 12 carbonos, preferiblemente de 3 a 8 carbonos, y más preferiblemente de 3 a 6 carbonos, en donde el grupo cicloalquilo adicionalmente puede estar opcionalmente sustituido. Los grupos cicloalquilo preferidos incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular monocíclico de 5 a 8 miembros aromático, bicíclico de 8 a 12 miembros, o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o de 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos entre O, N, o S (p. ej., átomos de carbono y de 1 a 3, de 1 a 6, o de 1 a 9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico, o tricíclico, respectivamente), en donde 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de los grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo, y similares. El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refieren a un grupo alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con heteroarilo.

El término "heterociclilo" se refiere a un sistema anular monocíclico no aromático de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros, o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o de 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos entre O, N, o S (p. ej., átomos de carbono y de 1 a 3, de 1 a 6, de 1 a 9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico, o tricíclico, respectivamente), en donde 0, 1, 2 ó 3 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de los grupos heterociclilo incluyen piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, aziridinilo, oxirilo, tiirilo, morfolinilo, tetrahidrofuranoilo, y similares.

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

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos, y de las reivindicaciones.

### Descripción de los dibujos

**FIG. 1** Síntesis, Secuencia y Análisis Bioquímico de péptidos SAH-p53. (A) Los aminoácidos no naturales se sintetizaron como se describe y se entrecruzaron por medio de metátesis de olefinas de cierre del anillo catalizada por rutenio. (B) Los compuestos SAH-p53 se generaron por medio de grapado de la secuencia p53<sub>14-29</sub> en las posiciones indicadas. La carga, la cualidad de hélice  $\alpha$ , la afinidad de unión a HDM2, la permeabilidad celular, y la viabilidad celular se indican para cada compuesto. (C, E) Los espectros de dicroísmo circular revelaron una mejora de la cualidad de la hélice alfa para los compuestos SAH-p53. (D, F) El análisis de polarización de fluorescencia utilizando péptidos-FITC y HDM2<sub>17-125</sub> demostró afinidades de unión a HDM2 subnanomolares para seleccionar péptidos SAH-p53. Nota: UAH-p53-8 es la forma "no grapada" de SAH-p53-8.

**FIG. 2** SAH-p53-8 reactiva la ruta transcripcional de p53. Se expusieron células SJSA-1 que expresaban en exceso HDM2 a los péptidos indicados y se llevaron a cabo análisis Western para p53, HDM2 y p21 a las 8 - 30 h del tratamiento.

**FIG. 3** Reactivación de la apoptosis en células SJSA-1 tratadas con SAH-p53-8. SAH-p53-8 demostró una citotoxicidad y una inducción de la apoptosis dependientes de la dosis, específicas. Análisis de viabilidad celular de las células SJSA-1 tratadas con péptidos SAH-p53 (A). Análisis de activación con caspasa-3 de las células SJSA-1 tratadas con péptidos SAH-p53 (B). Comparación de la activación por caspasa-3 en células SJSA-1, HCT-116 p53<sup>+/+</sup>, y HCT-116 p53<sup>-/-</sup> tratadas con péptidos SAH-p53 (25  $\mu$ M) (C).

**FIG. 4** Espectro de masas por electropulverización (modo de ion positivo) del péptido SAH-p53-4.

**FIG. 5** Para determinar si los péptidos SAH-p53 habían aumentado la estabilidad proteolítica, se expusieron el péptido p53<sub>14-29</sub> de tipo salvaje y SAH-p53-4 a suero *ex vivo*. SAH-p53-4 mostró una vida media en suero ( $t_{1/2}$ ) casi cuatro veces más larga que la del péptido de tipo salvaje sin modificar.

**FIG. 6** Para determinar si los péptidos SAH-p53 1-4 eran permeables a las células, se incubaron células de leucemia

de células T Jurkat con péptidos p53 con fluoresceína durante 4 horas seguido de lavado, tratamiento con tripsina, y análisis FACS para evaluar la fluorescencia celular. Ninguno de los péptidos sometidos a ensayo produjo fluorescencia celular.

5 **FIG. 7** (A) Se trataron células SJSA-1 con FITC-SAH-p53-5 y 4,4 kDa de TRITC-dextrano durante 4 horas. La microscopía confocal reveló la co-localización del péptido FITC-SAH-p53-5 con TRITC-dextrano en pinosomas. (B) Para evaluar si la permeabilidad de FITC-SAH-p53-5 era dependiente de la temperatura, se incubaron células de leucemia de células T Jurkat con péptidos p53 con fluoresceína durante 4 horas a 4°C, o a 37°C seguido de lavado, tripsinización, y análisis FACS para evaluar la fluorescencia celular. (C) Para determinar la cinética de la permeabilidad celular, las células de leucemia de células T Jurkat se expusieron al péptido FITC-SAH-p53-5 y se evaluó la fluorescencia celular mediante análisis FACS en momentos puntuales sucesivos. Las células tratadas con FITC-SAH-p53-5 mostraron un aumento dependiente del tiempo en la fluorescencia celular. (D) Se trataron células SJSA-1 con péptidos FITC-SAH-p53-8 y SAH-p53-8<sub>F19A</sub> de tipo salvaje durante 4 horas seguido de FACS y análisis de microscopía confocal. Se observó fluorescencia celular después del tratamiento con péptidos FITC-SAH-p53, pero no con FITC-péptido p53 de tipo salvaje.

15 **FIG. 8** Se incubaron células SJSA-1 con FITC-péptidos seguido de lisis e interacción y precipitación ("pull-down") anti-FITC. La HDM2 nativa inmunoprecipitó simultáneamente con FITC-SAH-p53-8 pero no con los péptidos SAH-p53-8<sub>F19A</sub> de tipo salvaje o mutantes. Izquierda: gel teñido con plata; derecha: transferencias Western.

20 **FIG. 9** Unión a anexina V como indicador de la apoptosis. Se trataron células RKO con péptidos a diferentes dosis durante 24 horas seguido de tinción con yoduro de propidio y anexina V etiquetada con FITC. La inducción de la apoptosis se cuantificó mediante FACS y los datos se analizaron con el soporte lógico FloJo.

**FIG. 10** Análisis de unión mediante polarización de fluorescencia de péptidos grapados. Se incubaron péptidos fluoresceinados (5 nM) con HDM2<sub>17-125</sub> recombinante (25 pM - 10 M) a la temperatura ambiente. La actividad de unión se midió mediante polarización de fluorescencia, y se obtuvieron valores de K<sub>d</sub> por regresión lineal.

25 **FIG. 11** Análisis de viabilidad celular. Se trataron células SJSA-1 de osteosarcoma con diferentes concentraciones de SAH-p53-8 solo o combinado con el agente quimioterapéutico doxorubicina (20 mM) durante 24 h. La viabilidad celular se analizó mediante la adición del reactivo de bioluminiscencia CellTiter-Glo™ y lectura sobre un lector de placas.

30 **FIG. 12** Competición por la polarización de la fluorescencia. Se incubó p53<sub>14-29</sub> de tipo salvaje, fluoresceinado (25 nM) con HDM2<sub>17-125</sub> recombinante. Se titularon los SAH-p53 no marcados en la mezcla, y se midió el desplazamiento del ligando marcado mediante polarización de fluorescencia.

35 **FIG. 13** Análisis de activación de caspasa-3. Se trataron células SJSA-1 de osteosarcoma con diferentes concentraciones de SAH-p53 durante 24 h. Las células se expusieron a continuación a un sustrato específico de caspasa-3 (Ac-DEVD-AMC). Se midió la fluorescencia como resultado de la escisión en un lector de microplacas. Para determinar la especificidad de la actividad, se incubaron ciertos péptidos junto con DEVD-CHO, un sustrato conocido por inhibir la caspasa-3 específicamente.

40 **FIG. 14** Inmunohistoquímica en xenoinjertos tumorales de ratón. Se trataron dos ratones que contenían cada uno tres xenoinjertos de tumor derivados de SJSA-1 con 10 mg kg<sup>-1</sup> de SAH-p53-8 (A) o vehículo (B) cada 12 horas durante dos días. Se obtuvieron secciones en parafina de los xenoinjertos tumorales y se tiñeron utilizando un anticuerpo α-p53. La deficiencia de p53 debida a la amplificación de HDM2 se evidencia en el control no tratado (B), mientras que la acumulación de p53 cerca de los capilares se observa en la muestra tratada con SAH-p53-8 (A).

**FIG. 15** Secuencia de aminoácidos de p53 humano (Núm. de Acceso GenBank® CAA42627; gi: 50637).

**FIG. 16** Secuencias de varios péptidos grapados.

#### Descripción detallada

45 Se describen en la presente memoria polipéptidos de dominio helicoidal alfa entrecruzados internamente relacionados con p53 humano. Los polipéptidos incluyen una traba (también llamada entrecruzamiento) entre dos aminoácidos no naturales que mejoran significativamente la estructura secundaria helicoidal alfa del polipéptido. Generalmente, la traba o entrecruzamiento (a veces referido como grapa) se extiende a través de la longitud de una o dos vueltas helicoidales (es decir, aproximadamente 3,4 o aproximadamente 7 aminoácidos). En consecuencia, los aminoácidos situados en  $i$  e  $i + 3$ ;  $i$  e  $i + 4$ ; o  $i$  e  $i + 7$  son candidatos ideales para la modificación química y el entrecruzamiento. Así, por ejemplo, cuando un péptido tiene la secuencia... Xaa<sub>1</sub>, Xaa<sub>2</sub>, Xaa<sub>3</sub>, Xaa<sub>4</sub>, Xaa<sub>5</sub>, Xaa<sub>6</sub>, Xaa<sub>7</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>9</sub> ... (en donde "." indica la presencia opcional de aminoácidos adicionales), los entrecruzamientos entre Xaa<sub>1</sub> y Xaa<sub>4</sub>, o entre Xaa<sub>1</sub> y Xaa<sub>5</sub>, o entre Xaa<sub>1</sub> y Xaa<sub>8</sub> son útiles como lo son los entrecruzamientos entre Xaa<sub>2</sub> y Xaa<sub>5</sub>, o entre Xaa<sub>2</sub> y Xaa<sub>6</sub>, o entre Xaa<sub>2</sub> y Xaa<sub>9</sub>, etc. Los polipéptidos pueden incluir más de un entrecruzamiento dentro de la secuencia del polipéptido para estabilizar aún más la secuencia o para facilitar la estabilización de los tramos de polipéptidos más largos. Si los polipéptidos son demasiado largos para ser sintetizados fácilmente en una parte, se pueden unir péptidos entrecruzados, sintetizados independientemente, por

medio de una técnica llamada ligación química nativa (Bang, et al., *J. Am Chem Soc.* 126: 1377).

Se describen en la presente memoria péptidos de hélice alfa estabilizada (del inglés *stabilized alpha-helix*) de p53 (SAH-p53) que muestran una alta afinidad por HDM2, y, que en contraste con el péptido p53 no modificado correspondiente, se introducen fácilmente en las células a través de un mecanismo de absorción activo. Como se describe a continuación, el tratamiento con SAH-p53 reactivó la cascada del supresor de tumor p53 mediante la inducción de la transcripción de genes sensible a p53, proporcionando el primer ejemplo de un péptido grapado que elimina las células cancerosas mediante el direccionamiento de una vía transcripcional.

Para diseñar compuestos SAH-p53, los autores de la presente invención colocaron derivados olefínicos sintéticos en las posiciones que evitaban residuos de unión a HDM2 críticos. Las grasas hidrocarbonadas que abarcaban las posiciones  $i, i + 7$  fueron generadas por metátesis de olefinas (FIG. 1A). Se sintetizó un panel inicial de cuatro péptidos SAH-p53, que contenía cada uno un entrecruzamiento claramente localizado (FIG. 1B). Para evaluar el impacto estructural de la instalación de una grapa  $i, i + 7$  en todos los hidrocarbonos, los autores de la presente invención realizaron experimentos de dicroísmo circular (CD) para determinar la cualidad de hélice  $\alpha$ . Mientras que el péptido p53 de tipo salvaje mostró 11% de contenido de hélice  $\alpha$  en agua a pH 7,0, los SAH-1-4 p53 demostraron una cualidad de hélice  $\alpha$  de 10-59% (FIG. 1B y 1C). Los análisis de unión por polarización de fluorescencia utilizando HDM2<sub>17-125</sub> y derivados marcados con FITC de SAH-p53 1-4 identificaron SAH-p53-4 como un interactor subnanomolar, que tenía una afinidad por HDM2 casi tres órdenes de magnitud mayor que la del péptido de tipo salvaje (FIG. 1B y 1D). SAH-p53-4 también demostró una mejor estabilidad proteolítica (FIG. 5).

Los autores de la presente invención encontraron que los compuestos SAH-p53 iniciales generados eran incapaces de penetrar en células T Jurkat intactas (FIG. 1B y FIG. 6). Los autores de la presente invención observaron que los SAH-p53 1-4 se cargaban negativamente (-2) a pH fisiológico. La carga positiva es un rasgo característico de ciertas clases de péptidos que penetran en las células.<sup>11</sup> En el desarrollo de una segunda generación de compuestos, los autores de la presente invención sustituyeron los ácidos aspártico y glutámico por asparraginas y glutaminas para ajustar la carga de los péptidos y mutaron aminoácidos seleccionados que se había referido anteriormente que participaban en la exportación (L14Q) y la ubiquitinación (K24R) nuclear de p53<sup>4,12</sup> (FIG. 1B). Los SAH-p53 5-8 mostraron una mejora de 2 a 8,5 veces en el contenido de hélice  $\alpha$ , conservaron una alta afinidad de unión para HDM2, y demostraron una absorción dependiente del tiempo y de la temperatura mediante FACS y microscopía confocal (FIG. 1B, 1E, 1F y 7). Los análisis de viabilidad celular utilizando células cancerosas RKO o SJSA-1 expuestas a los péptidos SAH-p53 indicaron que SAH-p53-8, que contenía mutaciones puntuales en ambos sitios de exportación y ubiquitinación nucleares, era el único ligante de HDM2 estabilizado estructuralmente, que penetra las células, y de alta afinidad que afectaba adversamente a la viabilidad celular (FIGS. 1B y 4A).

Para determinar si el direccionamiento de HDM2 por SAH-p53-8 podría restaurar específicamente los niveles nativos de p53, los autores de la presente invención trataron las células SJSA-1 con péptidos 8, y 8<sub>F19A</sub> de tipo salvaje durante 8-30 horas y se controlaron los niveles de proteína p53 por medio de análisis Western (FIG. 2). Las células expuestas a SAH-p53-8 demostraron un aumento de los niveles de proteínas p53 que alcanzaron su punto máximo a las 18 horas del tratamiento. La re-supresión de p53 sobre las 24 horas se correspondía con la regulación al alza dependiente del tiempo de HDM2 por p53, coincidiendo con un mecanismo contra-regulador de p53-HDM2 intacto.<sup>13</sup> Del mismo modo SAH-p53-8 indujo la regulación al alza del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21.<sup>14</sup> La regulación al alza de p21 en células tratadas con 8 se detectó a las 12 horas, alcanzando niveles máximos a las 18 horas. Los niveles en el momento inicial se restauraron en torno a las 30 horas, en consonancia con resupresión de p53 nativo. Los niveles de HDM2 y p21 se mantuvieron sin cambios en las células SJSA-1 tratadas con el tipo salvaje u 8<sub>F19A</sub>, destacando la especificidad de la modulación de SAH-p53-8 de la vía de señalización de p53.

Para examinar si la estabilización mediada por SAH-p53-8 de p53 nativo podría inhibir las células cancerosas mediante la reactivación de la vía apoptótica, los autores de la presente invención llevaron a cabo análisis de viabilidad y de caspasa-3 utilizando células SJSA-1 expuestas al tipo salvaje, 8, y 8<sub>F19A</sub> durante 24 horas (FIG. 3). Si bien los péptidos de tipo salvaje y 8<sub>F19A</sub> no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular, SAH-p53-8 mostró una inhibición dependiente de la dosis de la viabilidad de células SJSA-1 (CE<sub>50</sub> = 8,8  $\mu$ M) (FIG. 3A). La activación con caspasa-3 mediante seguimiento de la fluorescencia del sustrato Ac-DEVD-AMC<sup>15</sup> escindido con caspasa-3 mostró que ni el péptido de tipo salvaje, ni el 8<sub>F19A</sub> tenían ningún efecto; sin embargo, 8 desencadenó la activación de caspasa-3 dependiente de la dosis (CE<sub>50</sub> = 5,8  $\mu$ M) que fue bloqueado por DEVD-CHO, un inhibidor específico de la caspasa-3, lo que demuestra que SAH-p53-8 inhibía específicamente la viabilidad celular mediante la activación de la apoptosis en células SJSA-1 que expresaban en exceso HDM2 (FIG. 3B). Como se puede observar a partir de la FIG. 3C, la inhibición mediada por SAH-p53-8 de la viabilidad celular observada en las células SJSA-1 también se observó en células HCT 116, una línea celular de cáncer de colon, pero no en una variante de la línea celular HCT 116 que carecía de p53 (HCT 116 p53<sup>-/-</sup>).

La identificación de múltiples compuestos orgánicos y peptidomiméticos de p53 con actividad anti-HDM2<sup>8,16</sup> es una promesa para el logro de un beneficio clínico de la manipulación de la ruta de p53. Mediante la generación de un inhibidor de HDM2 basado en péptidos grapados, los autores de la presente invención han documentado una interacción *in situ* entre SAH-p53-8 y HDM2 (FIG. 8), que confirma que su actividad pro-apoptótica deriva de la restauración de la ruta de p53.

Se trataron células RKO con péptidos a diferentes dosis durante 24 horas seguido de la tinción con yoduro de propidio y anexina V etiquetada con FITC. La inducción de la apoptosis se cuantificó mediante FACS y los datos se analizaron con el soporte lógico FloJo. Como se muestra en la FIG. 9, p53-SAH-p53-6 causó una apoptosis significativa.

- 5 Se utilizó un análisis de unión por polarización de fluorescencia para evaluar la unión de los péptidos a HDM2<sub>17-125</sub>. Se incubaron péptidos fluoresceinados (5 nM) con HDM2<sub>17-125</sub> recombinante (25 pM - 10 μM) a la temperatura ambiente. La actividad de unión se midió mediante polarización de fluorescencia, y se obtuvieron valores de  $K_D$  por regresión lineal. Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 10.

- 10 El efecto de SAH-p53-8 solo o combinado con doxorrubicina se examinó como sigue. Se trataron células de osteosarcoma SJSA-1 con diferentes concentraciones de SAH-p53-8 solo o combinado con el agente quimioterapéutico doxorrubicina (20 μM) durante 24 h. La viabilidad celular se analizó mediante la adición de reactivo de bioluminiscencia CellTiter-Glo™ y lectura en un lector de placas. Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 11.

- 15 La capacidad de diversos SAH-p53 para competir con p53<sub>14-29</sub> de tipo salvaje por la unión a HDM2<sub>17-125</sub> se evaluó como sigue. Se incubó p53<sub>14-29</sub> de tipo salvaje, fluoresceinado (25 nM) con HDM2<sub>17-125</sub> recombinante. Se titularon SAH-p53 no marcados en la mezcla, y se midió el desplazamiento del ligando marcado mediante polarización de fluorescencia. Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 12.

- 20 Se examinó el efecto de diversos péptidos sobre la activación de caspasa-3 como sigue. Se trataron células de osteosarcoma SJSA-1 con diferentes concentraciones de SAH-p53 durante 24 h. Las células se expusieron a continuación a un sustrato específico de la caspasa-3. Se midió la fluorescencia como resultado de la escisión en un lector de microplacas. Para determinar la especificidad de la actividad, ciertos péptidos se incubaron junto a DEVD-CHO, un sustrato conocido por inhibir la caspasa-3 específicamente. Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 13.

- 25 Los aminoácidos no naturales α,α-disustituidos que contienen cadenas laterales olefinicas de longitud variable se pueden sintetizar por métodos conocidos (Williams et al., 1991 *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9276; Schafmeister et al. 2000 *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891). Para los péptidos en los que se utiliza una grapa i vinculada a i + 7 (dos vueltas de la hélice estabilizada) se utiliza un aminoácido S5 y uno R8 o un aminoácido S8 y un aminoácido R5. R8 se sintetiza usando la misma ruta, excepto que el coadyuvante quirale de partida confiere el estereoisómero R-alquilo. Asimismo, se utiliza 8-yodoocteno en lugar de 5-yodopenteno. Los inhibidores se sintetizan sobre un soporte sólido utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) sobre una resina MBHA.

#### Síntesis de aminoácidos y péptidos

- 35 En los estudios descritos anteriormente, los α-aminoácidos (protegidos con F-moc (distintos de los aminoácidos olefinicos Fmoc-S<sub>5</sub>-OH, Fmoc-R<sub>8</sub>-OH, Fmoc-R<sub>8</sub>-OH, Fmoc-S<sub>8</sub>-OH y Fmoc R<sub>5</sub>-OH), el hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio (HCTU), y la resina Rink Amide MBHA se adquirieron de Novabiochem (San Diego, CA). La dimetilformamida (DMF), la *N*-metil-2-pirrolidinona (NMP), la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), el ácido trifluoroacético (TFA), el 1,2-dicloroetano (DCE), el isotiocianato de fluoresceína (FITC), y la piperidina se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron tal como fueron suministrados. La síntesis de los aminoácidos olefinicos se ha descrito en otra parte.<sup>1,2</sup>

- 40 Los polipéptidos de los estudios descritos anteriormente se sintetizaron manualmente utilizando la química de péptidos en fase sólida con Fmoc sobre resina MBHA de amida Rink con niveles de carga de 0,4-0,6 mmoles/g de resina. Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se eliminó el grupo protector Fmoc con piperidina al 20% en NMP durante 30 min.

2. La resina se lavó con NMP cinco veces.

- 45 3. El aminoácido protegido con Fmoc posterior se acopló durante 30 min (60 min para un agente de entrecruzamiento) utilizando Fmoc-AA (10 equiv., 4 equiv. para un agente de entrecruzamiento), HCTU (9,9 equiv., 3,9 equiv. para un agente de entrecruzamiento), y DIEA (20 equiv., 7,8 equiv. para un agente de entrecruzamiento).

4. La resina se lavó con NMP cinco veces.

5. Repetir desde la etapa 1.

- 50 Todos los péptidos se protegieron terminalmente con un residuo de β-alanina en el extremo N. Los experimentos de CD hicieron uso de péptidos que han sido acetilados en el extremo N. La reacción de acetilación consistió en la desprotección del grupo Fmoc como se ha esbozado anteriormente, seguido de reacción con anhídrido acético y DIEA. Todos los otros experimentos mostrados hicieron uso de péptidos fluoresceinados en el extremo N. Con este fin, los péptidos con el extremo N desprotegido fueron expuestos a isotiocianato de fluoresceína en DMF durante la

noche en presencia de DIEA.

- 5 La reacción de metátesis de cierre del anillo se realizó sobre el péptido protegido terminalmente en el extremo N mientras permanecía sobre el soporte sólido en un recipiente de reacción desechable fritado. La resina se expuso a una solución 10 mM de bis(triclorohexilfosfina)encilidina - dicloruro de rutenio (IV) (Grubbs First Generation Catalyst) en 1,2-dicloroetano o diclorometano durante 2 horas. La adición de catalizador y la reacción de metátesis de 2 horas se repitieron una vez. El péptido unido a la resina se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tres veces y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

El péptido se escindió de la resina y se desprotegió mediante exposición a Reactivo K (TFA al 82,5%, tioanisol al 5%, fenol al 5%, agua al 5%, 1,2-etanoditiol al 2,5%) y se precipitó con éter metil-*terc*-butílico a 4°C y se liofilizó.

- 10 Los péptidos liofilizados se purificaron mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna  $\text{C}_{18}$  (Agilent). Los péptidos se caracterizaron por LC-MS y análisis de aminoácidos. Los espectros de masas se obtuvieron por medio de electropulverización en modo de ion positivo o por medio de MALDI-TOF. Más abajo se muestran un rastro LC representativo y el espectro de masas (FIGS. 4-A y 4-B) y los datos espectrales de masa para todos los compuestos se muestran del mismo modo a continuación en la Tabla 2.

15

Tabla 2: Datos espectrales de masa para diversos polipéptidos

Compuesto	Masa Calculada	Masa Encontrada	Método
WTp53 <sub>14-29</sub>	2033,26	2033,12 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-1	2097,41	2097,14 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-2	2132,40	2132,84 [M + Na]	MALDI-TOF
SAH-p53-3	2089,37	2089,18 [M + Na]	MALDI-TOF
SAH-p53-4	2140,48	2140,70 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-5	2138,3	2139,0 [M + H]	ESI
SAH-p53-6	2165,5	1083,2 [M/2 + H]	ESI
SAH-p53-7	2152,4	1077,2 [M/2 + H]	ESI
SAH-p53-8	2180,5	1112,9 [M/2 + Na]	ESI
SAH-p53-8 $\gamma$ <sub>19A</sub>	2104,4	1052,9 [M + H]	ESI
SAH-p53-8 no grapado	2208,5	2109,1 [M + H]	ESI
FTTC-WT p53 <sub>14-19</sub>	2401,59	2402,94 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-1	2466,74	2467,29 [M + Na]	MALDI-TOF
FTTC-SAH-p53-2	2479,74	2479,27 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-3	2437,72	2437,31 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-4	2509,81	2509,10 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-5	2401,59	2402,94 [M + Na]	MALDI-TOF
FTTC-SAH-p53-6	2512,8	1257,1 [M/2 + H]	ESI

Compuesto	Masa Calculada	Masa Encontrada	Método
FITC-SAH-p53-7	2499,8	1250,6 [M/2 + H]	ESI
PITCSAB-pS3-8	2527,8	1286,3 [M/2 + Na]	ESI
FITC-SAH-p53-8y <sub>19A</sub>	2451,7	1248,5 [M/2 + Na]	ESI
FITC-SAH-p53-8 no grapado	2555,9	1278,5 [M/2 + Na]	ESI

#### Espectroscopía de Dicroísmo circular (CD)

5 Para la espectroscopía de dicroísmo circular (CD) los compuestos se disolvieron en H<sub>2</sub>O a concentraciones que oscilaban de 10 a 50 µM. Los espectros se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 a 20°C. Los espectros se recogieron utilizando una cubeta de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0,1 cm con los siguientes parámetros de medición: longitud de onda, 185-255 nm; resolución de la etapa 0,1 nm; velocidad, 20 nm min<sup>-1</sup>; acumulaciones, 6; ancho de banda, 1 nm. El contenido helicoidal de cada péptido se calculó como se ha referido anteriormente.<sup>3</sup>

#### Estabilidad frente a proteasa ex vivo

10 Para evaluar la estabilidad frente a proteasa de los péptidos, se incubaron péptidos fluoresceinados (2,5 µg) con suero reciente de ratón (20 µl) a 37°C durante 0-24 horas. El nivel de compuesto fluoresceinado intacto se determinó por medio de congelación instantánea de los especímenes de suero en nitrógeno líquido, liofilización, extracción en CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 1:1 que contenía TFA al 0,1%, seguido de la cuantificación basada en HPLC utilizando la detección de fluorescencia a ajustes de excitación/emisión de 495/530 nm.

#### 15 Producción de proteína y polarización de la fluorescencia

La HDM<sub>217-125</sub> purificada se preparó como sigue. Se cultivó *Escherichia coli* BL21 (DE3) que contenía el plásmido que codificaba HDM<sub>17-125</sub> con una etiqueta de hexahistidina N-terminal y un sitio de escisión de trombina en caldo Luria que contenía kanamicina y cloranfenicol y se indujo con isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) 0,1 mM. Las células se recogieron después de 4 horas por centrifugación durante 20 min a 3200 rpm, se resuspendieron en tampón A (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M) y se lisaron por sonicación. Los desechos celulares se sedimentaron por centrifugación durante 30 minutos a 15.000 rpm, y el sobrenadante se incubó con Ni-NTA agarosa (QIAGEN) durante 2 h. La resina se lavó con tampón A y se hizo eluir con un gradiente de imidazol que oscilaba de 5 mM a 500 mM. Las fracciones que contenían la proteína eluida se concentraron y se diluyeron 1:1 con tampón de escisión de trombina (CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris 20 mM, pH 7,4, 1 µl ml<sup>-1</sup> de β-mercaptoetanol, y 0,8 U ml<sup>-1</sup> de trombina). La reacción de escisión se incubó durante la noche a 4°C. La reacción se concentró a 2 ml y se purificó por medio de filtración en gel utilizando una columna G75. La pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE, FPLC y MALDI-TOF y se determinó que era de >90%. Su identidad se confirmó adicionalmente mediante digestión seguido por espectrometría de masas de los fragmentos peptídicos resultantes.

30 Los compuestos fluoresceinados ( $L_T = n$  5-25 nM) se incubaron con HDM<sub>217-125</sub> en tampón de análisis de unión (NaCl 140 mM, Tris 50 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente. La actividad de unión se midió mediante polarización de fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B utilizando una cubeta que contenía una varilla de agitación o un Spectramax M5 Microplate Reader (Molecular Devices). Los valores de  $K_d$  se determinaron por medio de análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a la dosis utilizando el soporte lógico Prism 4.0 Graphpad. En el caso de los compuestos en los que  $L_T < K_d$  y bajo la suposición de que  $L_T \approx L_{libre}$ , las isotermas de unión se ajustaron a la ecuación

$$P = P_f + \left[ (P_b - P_f) \times \frac{R_T}{K_d + R_T} \right] \quad (1)$$

donde P es el valor de polarización medido,  $P_f$  es la polarización del ligando fluorescente libre,  $P_b$  es la polarización del ligando unido, y  $R_T$  es la concentración de receptor/proteína.

40 Con compuestos en los que  $L_T > K_d$ , la suposición de que  $L_T \approx L_{libre}$  no se sostiene debido al agotamiento del ligando. Como tales, las isotermas de unión se ajustaron a la ecuación más explícita

$$P = P_f + (P_b - P_f) \left[ \frac{(L_T + K_D + R_T) - \sqrt{(L_T + K_D + R_T)^2 - 4L_T R_T}}{2L_T} \right] \quad (2)$$

donde  $P$  es el valor de polarización medido,  $P_f$  es la polarización del ligando fluorescente libre,  $P_b$  es la polarización del ligando unido,  $P_b$  es la polarización total del ligando unido,  $L_T$  es la concentración total de ligando fluorescente y  $R_T$  es la concentración de receptor/proteína.<sup>4</sup> Cada punto de datos representa el promedio de una condición experimental realizada al menos por triplicado.

#### Citometría de flujo

Se cultivaron células de leucemia de células T Jurkat en medio RPMI-1640 (Gibco) con suero bovino fetal al 10%, 100 U ml<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg ml<sup>-1</sup>, glutamina 2 mM, Hepes 50 mM pH 7, y β-mercaptoetanol 50 µM. Las células SJS-1 se cultivaron en medio 5A de McCoy (ATCC) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y 100 U ml<sup>-1</sup> de penicilina. Las células Jurkat (50.000 células por pocillo) se trataron con péptidos fluoresceinados (10 µM) hasta un máximo de 4 horas a 37°C. Después de lavar con medio, las células se expusieron a digestión con tripsina (0,25%; Gibco) (30 min, 37°C), se lavaron con PBS, y se resuspendieron en PBS que contenía 0,5 mg ml<sup>-1</sup> de yoduro de propidio (BD Biosciences). La fluorescencia celular y la positividad al yoduro de propidio se analizaron por medio de un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y el soporte lógico FlowJo (TreeStar). Se realizó un experimento idéntico con 30 min de preincubación de las células a 4°C seguido de una incubación de 4 horas con péptidos fluoresceinados a 4°C para evaluar la dependencia de la temperatura del marcaje fluorescente.

#### Microscopía confocal

Se incubaron células de leucemia de células T Jurkat con compuestos fluoresceinados durante 24 horas a 37°C. Después de lavar con PBS, las células se sometieron a citocentrifugación a 600 rpm durante 5 minutos sobre portaobjetos de vidrio Superfrost plus (Fisher Scientific). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS, se incubaron con yoduro de TOPRO-3 (100 nM; Molecular Probes) para contrateñir los núcleos, se trataron con medio de montaje Vectashield (Vector), y tomaron imágenes mediante microscopía confocal (BioRad 1024 o Nikon E800).

De una manera similar, se incubaron células de osteosarcoma SJS-1 (1 x 10<sup>5</sup> células) con compuestos fluoresceinados durante 24 horas a 37°C en Portaobjetos con Cámaras Lab-Tek™-CC2 (Nunc). Después de lavar con PBS, las células se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS, y se trataron con medio de montaje Vectashield (Vector) que contenía DAPI (contratinción nuclear), se cubrieron con cubres y se tomaron imágenes mediante microscopía confocal (BioRad 1024 o Nikon E800).

#### Transferencia Western

Se trataron células de osteosarcoma SJS-1 (1 x 10<sup>6</sup>) incubadas a 37°C con péptidos p53 (20 µM) en medio libre de suero durante 4 horas, seguido de sustitución del suero e incubación adicional durante 4-26 horas más. Las células fueron lisadas (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, SDS al 0,8%, PMSF 1 mM, 1 U ml<sup>-1</sup> de benzonasa nucleasa) y los productos lisados brutos se aclararon mediante una breve centrifugación y se determinó la concentración de proteína total mediante el uso del análisis de proteína BCA Pierce. Se hicieron correr alícuotas que contenían 5 µg de proteína total sobre geles de Bis-Tris poliacrilamida al 4-12% (Invitrogen). Las proteínas se detectaron mediante reactivo de quimioluminiscencia (Perkin Elmer) utilizando anticuerpos específicos para p53 (clon DO-1; Calbiochem), HDM2 (clon IF2; EMD Biosciences), p21 (clon EA10; Calbiochem), y β-actina (Sigma-Aldrich).

#### Análisis de viabilidad celular y apoptosis de alto rendimiento

Se incubaron células de osteosarcoma SJS-1 (4 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) en placas de 96 pocillos y se trataron con los péptidos p53 en medio libre de suero durante 4 horas, seguido de la sustitución del suero y la incubación adicional durante 20 horas. La viabilidad celular se analizó mediante la adición de reactivo bioluminiscente CellTiter-Glo™ (Promega) y lectura de la luminiscencia en un lector de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices). El grado de apoptosis se midió mediante la detección de la actividad caspasa-3 exponiendo las células a un sustrato específico de caspasa-3 (Oncogene). Se midió la fluorescencia como resultado de la escisión del sustrato en un lector de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices).

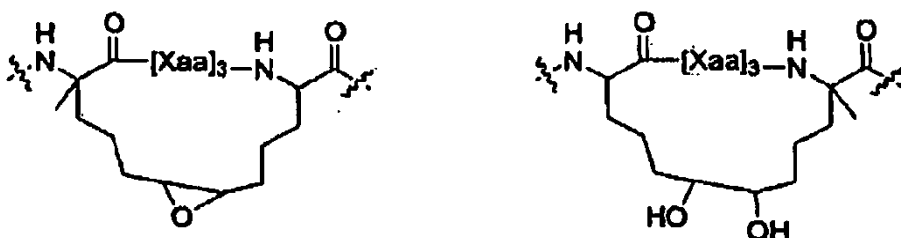
#### Co-inmunoprecipitación de péptidos FITC-SAH-p53 y HDM2 Endógena

Se trataron células de osteosarcoma SJS-1 (1 x 10<sup>6</sup>) con péptidos FITC-p53 (15 µM) en medio libre de suero durante 4 horas, seguido de sustitución del suero e incubación adicional durante 8 horas. Las células se lavaron a fondo con medios que contenían suero y PBS y se expusieron a tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Triton-X100 al 1%, PMSF 1 mM, 1 U ml<sup>-1</sup> de benzonasa nucleasa [EMD Biosciences] y comprimido inhibidor de la proteasa completo [Roche]) a temperatura ambiente. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4°C. Los

extractos se centrifugaron, y los sobrenadantes se incubaron con proteína A/G Sepharose (50  $\mu$ l de suspensión de cuentas al 50% por cada 0,5 ml de producto lisado; Santa Cruz Biotechnology). Los sobrenadantes previamente aclarados (500  $\mu$ l) se recogieron después de la centrifugación, se incubaron con 10  $\mu$ l de anticuerpo anti-FITC de cabra (AbCam) durante 1,5 h seguido de proteína A/G Sepharose durante 1,5 horas más. Las reacciones de inmunoprecipitación se sedimentaron y se lavaron tres veces con tampón de lisis. Las proteínas precipitadas se suspendieron en tampón de carga que contenía SDS, se hirieron, y los sobrenadantes se procesaron mediante SDS-PAGE sobre geles Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore). Después del bloqueo, las transferencias se incubaron con una dilución 1:100 de anticuerpo anti-HDM2 humano de ratón (clon IF2; EMD Biosciences) o con una dilución 1:200 de anticuerpo anti-FITC de conejo (Zymed) en BSA al 3% en PBS seguido de anti-IgG de ratón o de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Pharmingen). La proteína HDM2 y los péptidos FITC se visualizaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia Western Lightning™ (Perkin Elmer) y exponiéndolos a la película. Los geles se tiñeron utilizando un kit de tinción de plata (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Polipéptidos

- En algunos casos, las trabas hidrocarbonadas (es decir, los entrecruzamientos) descritos en la presente memoria pueden ser manipulados adicionalmente. En un caso, se puede oxidar un doble enlace de una traba de alqueno hidrocarbonada, (p. ej., sintetizada utilizando una metátesis de cierre del anillo catalizada por rutenio (RCM)) (p. ej., a través de epoxidación o dihidroxilación) para proporcionar uno de los compuestos de más abajo.



- O bien se puede funcionalizar aún más el radical epóxido o uno de los radicales hidroxilo libres. Por ejemplo, el epóxido se puede tratar con un nucleófilo, que proporciona funcionalidad adicional que se puede utilizar, por ejemplo, para anclar una etiqueta (p. ej., un radioisótopo o etiqueta fluorescente). La etiqueta se puede utilizar para ayudar a dirigir el compuesto a una ubicación deseada en el organismo o para rastrear la ubicación del compuesto en el organismo. Alternativamente, se puede anclar químicamente un agente terapéutico adicional a la traba funcionalizada (p. ej., un agente anti-canceroso, tal como rapamicina, vinblastina, taxol, etc.). Semejante derivatización, alternativamente, se puede lograr mediante la manipulación sintética del extremo amino o carboxi del polipéptido o a través de la cadena lateral de aminoácido. Otros agentes se pueden anclar a la traba funcionalizada, p. ej., un agente que facilita la entrada del polipéptido en las células.

- Aunque se han descrito trabas hidrocarbonadas, también se contemplan otras trabas. Por ejemplo, la traba puede incluir uno o más de un radical éter, tioéter, éster, amina, o amida. En algunos casos, se puede incorporar a la traba una cadena lateral de un aminoácido de origen natural. Por ejemplo, se puede acoplar una traba con un grupo funcional tal como el hidroxilo de la serina, el tiol de la cisteína, la amina primaria de la lisina, el ácido del aspartato o el glutamato, o la amida de la asparagina o la glutamina. Por consiguiente, es posible crear una traba utilizando aminoácidos naturales en lugar de utilizar una traba que se haya elaborado mediante el acoplamiento de dos aminoácidos de origen no natural. También es posible utilizar un aminoácido de origen no natural único junto con un aminoácido de origen natural.

- Se prevé además que la longitud de la traba pueda variar. Por ejemplo, se puede utilizar una longitud más corta de la traba cuando sea deseable proporcionar un grado relativamente alto de restricción sobre la estructura alfa-helicoidal secundaria, mientras que, en algunos casos, es deseable proporcionar menos restricción en la estructura secundaria alfa-helicoidal, y por lo tanto se puede desear una traba más larga.

Además, si bien se han descrito ejemplos de trabas que abarcan desde los aminoácidos  $i$  a  $i+3$ ,  $i$  a  $i+4$ ; e  $i$  a  $i+7$  con el fin de proporcionar una traba que se encuentre principalmente en una sola cara de la hélice alfa, se pueden sintetizar trabas para abarcar cualquier combinación de números de aminoácidos.

- En algunos casos, se utilizan aminoácidos alfa disustituidos en el polipéptido para mejorar la estabilidad de la estructura secundaria helicoidal alfa. Sin embargo, no se requieren aminoácidos alfa disustituido, y también se prevén casos en los que se utilizan sustituyentes mono-alfa (p. ej., en los aminoácidos trabados).

- Como pueden apreciar los expertos en la técnica, los métodos de síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria serán evidentes para los expertos normales en la técnica. Adicionalmente, las diversas etapas sintéticas se pueden realizar en una secuencia u orden alternativos para proporcionar los compuestos deseados.



Las transformaciones sintéticas químicas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos descritos por R. Larock, en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); TW Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª. Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de las mismas.

Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden elaborar mediante métodos de síntesis química, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Fields et al., Capítulo 3 en *Synthetic peptides: A User's Guide*, ed., Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1992, pág. 77. Por lo tanto, los péptidos se pueden sintetizar utilizando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> protegido por medio de la química de t-Boc o Fmoc utilizando aminoácidos con la cadena lateral protegida, por ejemplo, en un Applied Biosystems Peptide Synthesizer Modelo 430A o 431.

Una manera de elaborar los péptidos descritos en la presente memoria es mediante la utilización de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido C-terminal está anclado a una resina de poliestireno entrecruzada mediante un enlace lábil ácido con una molécula conectora. Esta resina es insoluble en los disolventes utilizados para la síntesis, por lo que es relativamente simple y rápido lavar el exceso de reactivos y subproductos. El extremo N está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácido, pero extraíble por un álcali. Cualquiera grupo funcional de las cadenas laterales está protegido con grupos estables frente a los álcalis, lábiles frente a los ácidos.

Se podrían elaborar péptidos más largos juntando péptidos sintéticos individuales mediante ligación química nativa. Alternativamente, se pueden sintetizar péptidos sintéticos más largos por medio de técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Tales técnicas se proporcionan en manuales convencionales bien conocidos con los protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de esta invención, se traduce de manera inversa la secuencia de aminoácidos para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferiblemente con codones que son óptimos para el organismo en el cual se va a expresar el gen. A continuación, se elabora un gen sintético, típicamente mediante la síntesis de oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si fuera necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta a una célula anfitriona. El péptido se expresa después en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión y el anfitrión seleccionados. El péptido se purifica y se caracteriza mediante métodos convencionales.

Los péptidos se pueden elaborar de una manera combinatoria, con un alto rendimiento, p. ej., utilizando sintetizador combinatorio de múltiples canales de alto rendimiento disponible de Advanced Chemtech.

En los polipéptidos modificados, uno o más enlaces peptídicos convencionales se reemplazan por un enlace diferente que puede aumentar la estabilidad del polipéptido en el organismo. Los enlaces peptídicos se pueden reemplazar por: un enlace retro-inverso (C(O)-NH); un enlace amida reducido (NH-CH<sub>2</sub>); un enlace tiometileno (S-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-S); un enlace oxometileno (O-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-O); un enlace etileno (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); un enlace tioamida (C(S)-NH); un enlace trans-olefina (CH=CH); un enlace trans-olefina sustituido con flúor (CF=CH); un enlace cetometileno (C(O)-CHR) o CHR-C(O) en donde R es H o CH<sub>3</sub>; y un enlace fluoro-cetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O) en donde R es H o F o CH<sub>3</sub>.

Los polipéptidos se pueden modificar adicionalmente por: acetilación, amidación, biotilación, cinnamoylación, farnesilación, fluoresceinación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Thr o Tyr), estearoilación, succinilación y sulfurilación. Los polipéptidos de la invención también se pueden conjugar, por ejemplo, con polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (p. ej., grupos alquilo lineales o ramificados C1-C20); radicales de ácidos grasos; y sus combinaciones.

#### Métodos de tratamiento

La presente descripción se refiere a los métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con una reducción de la actividad de p53. Esto es porque se espera que los polipéptidos actúen como inhibidores de p53 que se unen a HDM2 y/o HDMX. Según se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislados de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Un agente terapéutico incluye, pero no está limitado a, moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, ribozimas y oligonucleótidos antisentido.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Según se utilizan en la presente memoria, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecer de manera autónoma, es decir, un estado o afección anormales caracterizados por la rápida proliferación del crecimiento celular. Los estados de enfermedad

hiperproliferativos y neoplásicos se pueden clasificar como patológicos, es decir, que caracterizan o que constituyen un estado de enfermedad, o se pueden clasificar como no patológicos, es decir, una desviación de la normalidad pero no asociada con un estado de enfermedad. Se pretende que el término incluya todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o la fase de invasividad. Las células "hiperproliferativas patológicas" existen en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento del tumor maligno. Los ejemplos de las células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas.

Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de diferenciación celulares incluyen el cáncer, p. ej., carcinoma, sarcoma, o trastornos metastásicos. Los compuestos (es decir, polipéptidos) pueden actuar como agentes terapéuticos novedosos para controlar osteosarcomas, cáncer de colon, cáncer de mama, cánceres de células T y cánceres de células B. Los polipéptidos también pueden ser útiles para el tratamiento del carcinoma mucoepidermoide, retinoblastoma y meduloblastoma. Los compuestos se pueden utilizar para tratar trastornos asociados con la proliferación no deseada de células que tienen una actividad y/o expresión reducida de p53, en particular cuando las células producen al menos algo de p53 activo.

Los ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Según se utiliza en la presente memoria, el término "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, p. ej., derivadas de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de las mismas. Los trastornos ilustrativos incluyen: leucemias agudas, p. ej., leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Otros trastornos mieloides ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC) (revisado por Valckus, L. (1991) en Crit Rev. in Oncol./Hematol, 11: 267-97); neoplasias malignas linfoides incluyendo, pero no limitadas a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), mieloma múltiples, leucemia de células pilosas (LLP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Otras formas de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T del adulto (LTA), linfoma de células T cutáneo (LTC), leucemia de linfocitos granulares grandes (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación de la mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad proliferativa de la mama incluyendo, p. ej., hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante, y papilomas de los conductos pequeños; tumores, p. ej., tumores del estroma tales como fibroadenoma, tumores filoides, y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papilomas de conductos grandes; carcinoma de la mama incluyendo carcinoma in situ (no invasivo) que incluye carcinoma ductal in situ (incluyendo la enfermedad de Paget) y carcinoma lobular in situ, y carcinoma invasivo (infiltrante) que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma coloideo (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasivo y neoplasias malignas diversas. Los trastornos en la mama masculina incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

#### Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Según se utiliza en la presente memoria, los compuestos de la presente memoria, incluyendo los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria, se definen por incluir derivados farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos. Un "derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de éster, u otro derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de esta invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de esta invención. Los derivados y profármacos particularmente favorecidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando tales compuestos se administran a un mamífero (p. ej., permitiendo que un compuesto administrado por vía oral sea absorbido más fácilmente en la sangre) o que potencian la liberación del compuesto de origen en un compartimento biológico (p. ej., el cerebro o el sistema linfático) con respecto a la especie de origen. Los profármacos preferidos incluyen derivados en los que se añade un grupo que mejora la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la membrana del intestino a la estructura de las fórmulas descritas en la presente memoria.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden ser modificados añadiendo funcionalidades apropiadas para mejorar las propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (p. ej., sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración por medio de inyección, alteran el metabolismo y alteran la tasa de excreción.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de las sales de ácidos adecuados incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, trifluorometilsulfonato, y undecanoato. Las sales derivadas

de bases apropiadas incluyen las sales de metales alcalinos (p. ej., sodio), de metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio), de amonio y de N-(alquilo)<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esta invención también prevé la cuaternarización de cualquier grupo que contenga nitrógeno alcalino de los compuestos descritos en la presente memoria. Se pueden obtener productos solubles o dispersables en agua o aceite por medio de semejante cuaternarización.

5 Los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria pueden, por ejemplo, ser administrados por medio de inyección, por vía intravenosa, intraarterial, subdérmica, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea; o por vía oral, bucal, nasal, transmucosa, tópica, en una preparación oftálmica, o por inhalación, con una dosificación que varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o de acuerdo con los requisitos del fármaco particular. Los métodos de la presente memoria contemplan la administración de una cantidad eficaz del compuesto o la composición del compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces por día o alternativamente, en forma de una infusión continua. Semejante administración se puede utilizar como una terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del anfitrión tratado y del modo concreto de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente 5% a aproximadamente 95% de compuesto activo (p/p). Alternativamente, tales preparaciones contienen de aproximadamente 20% a aproximadamente 80% de compuesto activo.

20 Pueden ser necesarias dosis menores o mayores que las citadas anteriormente. Los regímenes de dosificación y tratamiento específicos para cualquier paciente concreto dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, la afección o los síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, la afección o los síntomas, y el criterio del médico a cargo.

25 Tras la mejora de la afección de un paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención, si es necesario. Con posterioridad, se pueden reducir la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, a un nivel en el que se conserva el estado mejorado. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir un tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria comprenden un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente adicional que incluye, por ejemplo, morfina o codeína; y cualquier portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras composiciones descritas en la presente memoria comprenden un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones definidas en la presente memoria incluyen los compuestos de las fórmulas definidas en la presente memoria, así como agentes terapéuticos adicionales si están presentes, en cantidades eficaces para lograr una modulación de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad. El término "portador o coadyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o un coadyuvante que puede administrarse a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para liberar una cantidad terapéutica del compuesto.

40 Los portadores, coadyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de liberación de fármacos auto-emulsionantes (SEDDS) tales como succinato de d- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tween u otras matrices de liberación poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas con glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógenofosfato disódico, hidrógenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polióxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Las ciclodextrinas tales como ciclodextrina  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , también se pueden utilizar ventajosamente para mejorar la liberación de los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria.

55 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar por vía oral, parenteral, por pulverización para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado, preferiblemente mediante administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden contener cualquier portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico convencional. En algunos casos, el pH de la formulación se puede ajustar con ácidos, álcalis o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de liberación. El término parenteral, según se utiliza en la presente memoria incluye inyección o técnicas de infusión subcutáneas, intracutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intraarteriales, intrasinoviales, intraesternales, intratecales, intralesionales e intracraneales.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con los mecanismos conocidos en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados estériles como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijado blando incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros tensioactivos utilizados comúnmente, tales como Tween o Span y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas, u otras farmacéuticamente aceptable también se pueden emplear para la formulación.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero no limitada a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran oralmente, el ingrediente activo puede ser suspendido o disuelto en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar mediante aerosol o inhalación nasal. Tales composiciones se preparan de acuerdo con mecanismos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Cuando las composiciones descritas en la presente memoria comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria y uno o más agentes adicionales terapéuticos o profilácticos, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 y 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente 5 y 95% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia. Los agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, a partir de los compuestos descritos en la presente memoria. Alternativamente, esos agentes pueden ser parte de una sola forma de dosificación, mezclados junto con los compuestos de esta invención en una composición única.

#### Modificación de polipéptidos

Los polipéptidos grapados pueden incluir un fármaco, una toxina, un derivado de polietilenglicol; un segundo polipéptido; un hidrato de carbono, etc. Cuando un polímero u otro agente están conectados al polipéptido grapado es/puede ser deseable que la composición sea sustancialmente homogénea.

La adición de moléculas de polietilenglicol (PEG) puede mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del polipéptido. Por ejemplo, la PEGilación puede reducir el aclaramiento renal y puede dar como resultado una concentración en plasma más estable. El PEG es un polímero soluble en agua y puede ser representado en una forma conectada al polipéptido como la fórmula:

$XO(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$  en donde n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, p. ej., un alquilo  $C_{1-4}$ ; e Y es un enlace amida, carbamato o urea a un grupo amino (incluyendo, pero no limitado a, la amina épsilon de la lisina o el extremo N-terminal) del polipéptido. Y también puede ser un enlace maleimida a un grupo tiol (incluyendo pero no limitado a, el grupo tiol de la cisteína). Otros métodos para la conexión de PEG a un polipéptido, directa o indirectamente, son conocidos por los expertos normales en la técnica. El PEG puede ser lineal o ramificado. Se encuentran disponibles en el mercado varias formas de PEG que incluyen diversos derivados funcionalizados.

Se pueden utilizar PEG que tienen enlaces degradables en la cadena principal. Por ejemplo, se puede preparar PEG con enlaces éster que se someten a hidrólisis. Los productos conjugados que tienen enlaces de PEG degradables se describen en los documentos WO 99/34833; WO 99/14259, y en la Patente de los Estados Unidos 6.348.558.

5 En ciertos casos, el polímero macromolecular (p. ej., PEG) se ancla a un agente descrito en la presente memoria a través de un conector intermedio. En ciertas realizaciones, el conector se compone de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos se seleccionan entre los 20 aminoácidos de origen natural. Algunos de estos aminoácidos pueden estar glicosilados, como es bien sabido por los expertos en la técnica. En otras realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan entre glicina, alanina, prolina, asparragina, glutamina, y lisina. En otras realizaciones, el conector está constituido por una mayoría de aminoácidos que no tienen impedimento estérico, tales como glicina y alanina. También son posibles conectores no peptídicos. Por ejemplo, se pueden utilizar conectores alquilo tales como  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})-$ , en donde  $n = 2-20$ . Estos conectores alquilo pueden además estar sustituidos con cualquier grupo sin impedimento estérico tal como alquilo inferior (p. ej.,  $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) acilo inferior, halógeno (p. ej., Cl, Br), CN,  $\text{NH}_2$ , fenilo, etc. La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.446.090 describe un conector PEG bifuncional y su uso en la formación de productos conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del conector de PEG.

#### Análisis de escrutinio

También se describen métodos (también denominados en la presente memoria "análisis de escrutinio") para la identificación de polipéptidos, moléculas pequeñas, o derivados bifuncionales que se unen a HDM2 y/o a HDMX.

La afinidad de unión de los polipéptidos que se unen a HDM2 y/o a HDMX se puede medir utilizando los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, mediante el uso de un análisis de unión de titulación. HDM2 y/o HDMX se pueden exponer a concentraciones variables de un compuesto candidato (es decir, polipéptidos) (p. ej., 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, y 10 mM) y se puede medir la unión utilizando la resonancia de plasmón superficial para determinar la  $K_d$  para la unión. Además, las interacciones de unión de los péptidos SAH-p53 marcados con fluorescencia a HDM2 y/o HDMX se pueden utilizar en un análisis de unión competitiva para el escrutinio y la identificación de péptidos, pequeñas moléculas, o derivados bifuncionales de los mismos que compiten con los péptidos FITC-SAH-p53 y calcular adicionalmente los valores de  $K_i$  para la competición por la unión. Los compuestos candidatos también pueden ser escrutados para determinar la actividad biológica *in vivo*. También se puede utilizar análisis de escrutinio de la permeabilidad celular en los que los compuestos candidato marcados con fluorescencia se aplican a las células intactas, que luego se analizan para determinar la fluorescencia celular por microscopía o detección de fluorescencia celular de alto rendimiento.

Los análisis descritos en la presente memoria se pueden realizar con compuestos candidato individuales o se pueden realizar con una pluralidad de compuestos candidato. Cuando los análisis se realizan con una pluralidad de compuestos candidato, los análisis se pueden realizar utilizando mezclas de compuestos candidato o se pueden ejecutar en reacciones paralelas con cada reacción que tiene un único compuesto candidato. Los compuestos de ensayo o los agentes se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica.

Así, se pueden exponer HDM2 (p. ej., MDM2 purificada) o HDMX (p. ej., MDMX purificada) purificadas a un compuesto de ensayo en presencia de un péptido p53 grapado y determinar si el compuesto de ensayo reduce (inhibe) la unión del péptido p53 grapado a MDM2 o MDMX. Un compuesto de ensayo que inhibe la unión es un inhibidor candidato de la interacción entre p53 y MDM2 o MDMX (o ambas). Los compuestos de ensayo se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para inhibir la unión de MDM2 y MDMX con el fin de identificar los compuestos que son relativamente selectivos para inhibir la unión de p53. En algunos casos, se puede utilizar nutlin-3 (CAS 548472-68-0) como control puesto que nutlin-3 es un inhibidor selectivo de la unión de p53 a HDM2.

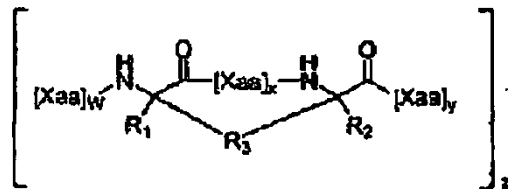
#### Referencias

- 45 (1) Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W., *Cancer Res.* 1991, 51, 6304-6311.
- (2) Wu, X.; Bayle, J. H.; Olson, D.; Levine, A. J., *Genes Dev.* 1993, 7, 1126-1 132; Yonish-Rouach, E.; Resnftzky, D.; Lotem, J.; Sachs, L.; Kimchi, A.; Oren, M., *Nature* 1991, 352, 345-347; Momand, J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, A. J., *Cell* 1992, 69, 1237.
- 50 (3) Levine, A. J.; Hu, W.; Feng, Z., *Cell Death Differ* 2006, 13, 1027; Honda, R.; Tanaka, H.; Yasuda, H., *FEBS Lett.* 1997, 420, 25; Tao, W.; Levine, A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 3077-3080.
- (4) Li, M.; Brooks, C. L.; Wu-Baer, F.; Chen, D.; Baer, R.; Gu, W., *Science* 2003, 302, 1972-1975.
- (5) Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C., *Science* 1991, 253, 49-53.
- (6) Chéne. P., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 102-109.

- (6a) Toledo, F.; Ward, G-M., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 1476-82.
- (7) Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P., *Science* 1996, 274, 948-953.
- 5 (8) Sakurai, K.; Chung, H. S.; Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 16288-16289; Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A., *Science* 2004, 303, 844-848.
- (9) Lin, J.; Chen, J.; Elenbaas, B.; Levine, A. J., *Genes Dev.* 1994, 8, 1235-1246.
- 10 (10) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 5891-5892; Walensky, L.D.; Kung, A.L.; Escher, L.; Malia, T.J.; Barbuto, S.; Wright, R.D.; Wagner, G.; Verdine, G.L.; Korsmeyer, S.J.; *Science*, 2004, 305, 1466-1470.
- (11) Vivés, E.; Leblou, B., *The Tat-Derived Cell-Penetrating Peptide. En Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications*, Langel, O., Ed. CRC Press: Boca Raton, 2002; págs. 3-21.
- (12) Zhang, Y.; Xiong, Y., *Science* 2001, 292, 1910-1915.
- 15 (13) Barak, Y.; Juven, T.; Haffner, R.; Oren, M., *EMBO J.* 1993, 12, 461-468; Juven, T.; Barak, Y.; Zauberman, A.; George, D. L.; Oren, M., *Oncogene* 1993, 8, 3411-3416.
- (14) Dulic, V.; Kauffmann, W. K.; Wilson, S. J.; Tlsty, T. D.; Lees, E.; Harper, J. W.; Elledge, S. J.; Reed, S. I., *Cell* 1994, 76, 1013; El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B., *Cell* 1993, 75, 817.
- (15) Pochampally, R.; Fodera, B.; Chen, L.; Lu, W.; Chen, J., *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 15271-15277.
- 20 (16) Duncan, S. J.; Gruschow, S.; Williams, D. H.; McNicholas, C.; Purewal, R.; Hajek, M.; Gerlitz, M.; Martin, S.; Wrigley, S. K.; Moore, M., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 554-560; Chéne, P.; Fuchs, J.; Bohn, J.; Garcia-Echeverria, C.; Furet, P.; Fabbro, D., *J. Mol. Biol.* 2000, 299, 245; Sakurai, K.; Schubert, C.; Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11000-11001; Kritzer, J. A.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 4118-4119; Kritzer, J. A.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9468-9469; Wasylyk, C.; Salvi, R.; Argentini, M.; Dureuil, C.; Delumeau, I.; Abecassis, J.; Debussche, L.; Wasylyk, B., *Oncogene* 1999, 18, 1921-1934; Garcia-Echeverria, C.; Chéne, P.; Blommers, M. J. J.; Furet, P., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 3205-3208; Grasberger, B. L., et al., *J. Med. Chem.* 2005, 48, 909-912.
- 25
- 30

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido helicoidal alfa que se une a la proteína doble minuto humana 2 (HDM2) y/o doble minuto humana 4 (HDMX) de Fórmula (1),



5 en donde:

cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  es independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, o heterociclilalquilo;

cada  $R_3$  se extiende a través de dos vueltas helicoidales del polipéptido y es independientemente alquileno, o alquenileno o alquinileno;

10 n es un número entero de 1 a 4;

x es 6;

y y w son independientemente números enteros de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 10; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

15 en donde el polipéptido modificado comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia Leu<sub>1</sub> Ser<sub>2</sub> Gln<sub>3</sub> Glu<sub>4</sub> Thr<sub>5</sub> Phe<sub>6</sub> Ser<sub>7</sub> Asp<sub>8</sub> Leu<sub>9</sub> Trp<sub>10</sub> Lys<sub>11</sub> Leu<sub>12</sub> Leu<sub>13</sub> Pro<sub>14</sub> Glu<sub>15</sub> Asn<sub>16</sub>, excepto que las cadenas laterales de Ser<sub>7</sub> y Pro<sub>14</sub> se sustituyen por el grupo conector  $R_3$ , y en donde hasta 6 aminoácidos distintos de los aminoácidos que llevan el grupo conector  $R_3$ , Phe<sub>6</sub>, Trp<sub>10</sub> y Leu<sub>13</sub> se sustituyen independientemente por cualquier otro aminoácido; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 2. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde  $R_3$  es un alquileno, alquenileno o alquinileno de cadena lineal.

3. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 2, en donde  $R_3$  es alquileno C<sub>11</sub> o alquenileno C<sub>11</sub>.

25 4. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde  $R_3$  es un grupo alquenileno.

5. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente H o alquilo C<sub>1-6</sub>.

6. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 5, en donde  $R_1$  y  $R_2$  son metilo.

30 7. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde cada y es de 1 a 15.

8. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde cada w es de 3 a 15.

35 9. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un grupo acilo derivado de ácido graso.

10. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un radical de direccionamiento.

11. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que se une a HDMX.

40 12. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que se une a HDM2.

13. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que se une a HDMX y HDM2.

5 14. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el polipéptido no tiene una carga neta negativa a pH 7.



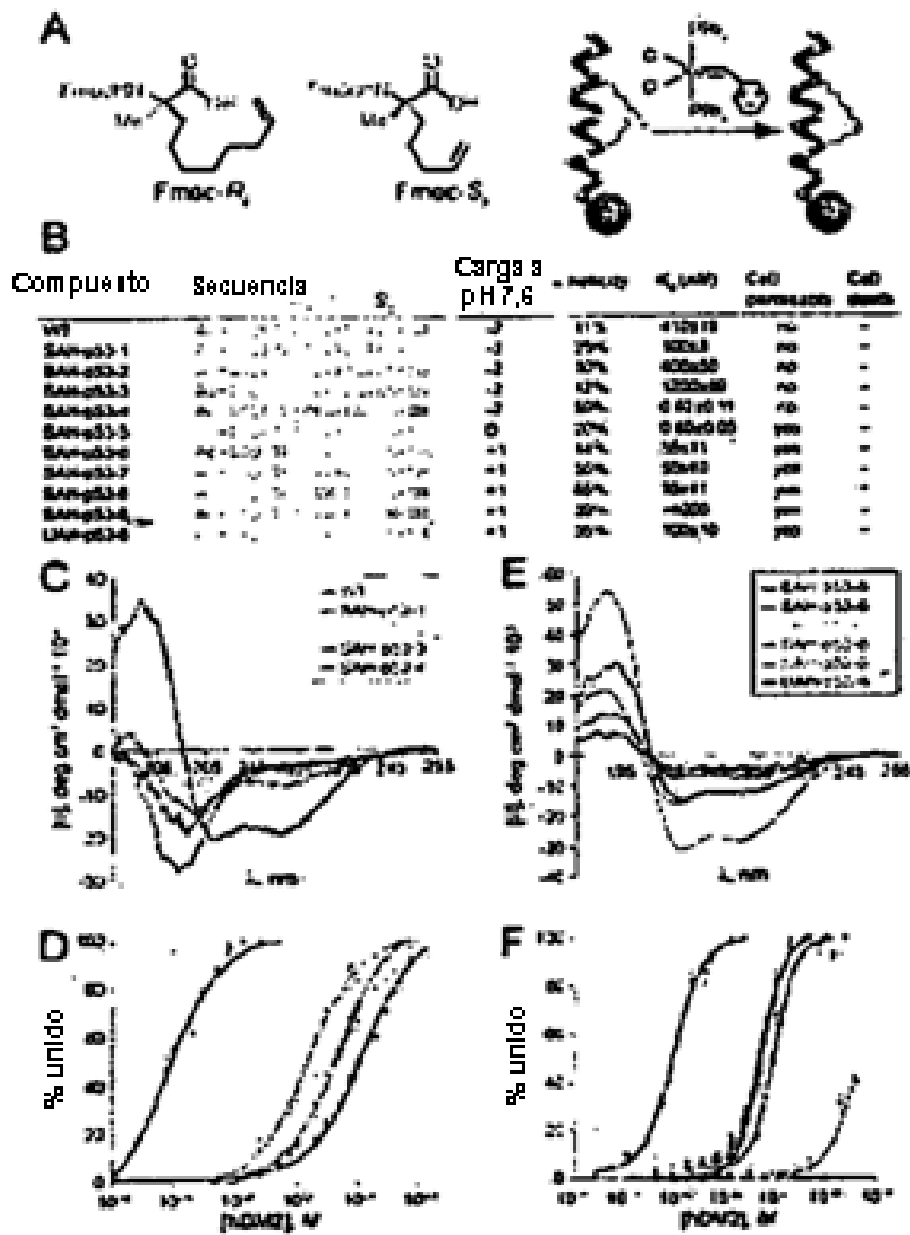


FIGURA 1

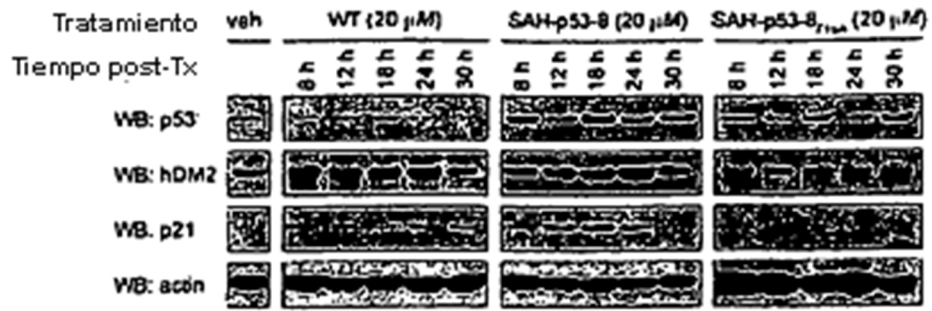


FIGURA 2

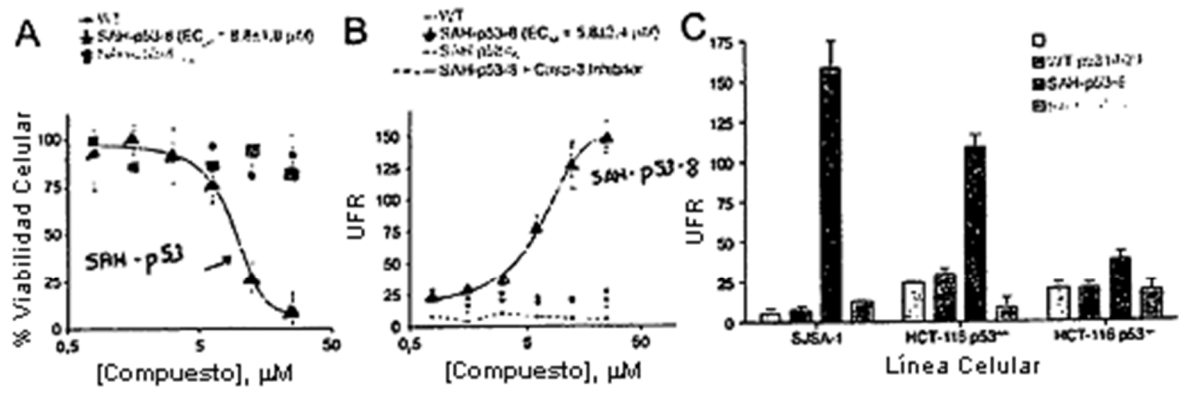


FIGURA 3

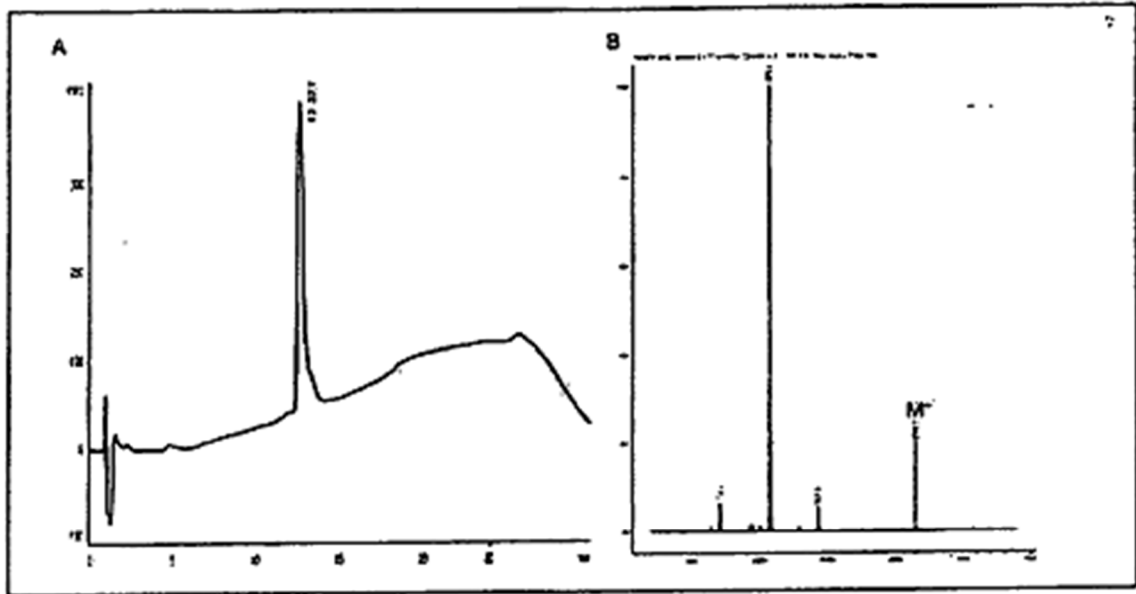
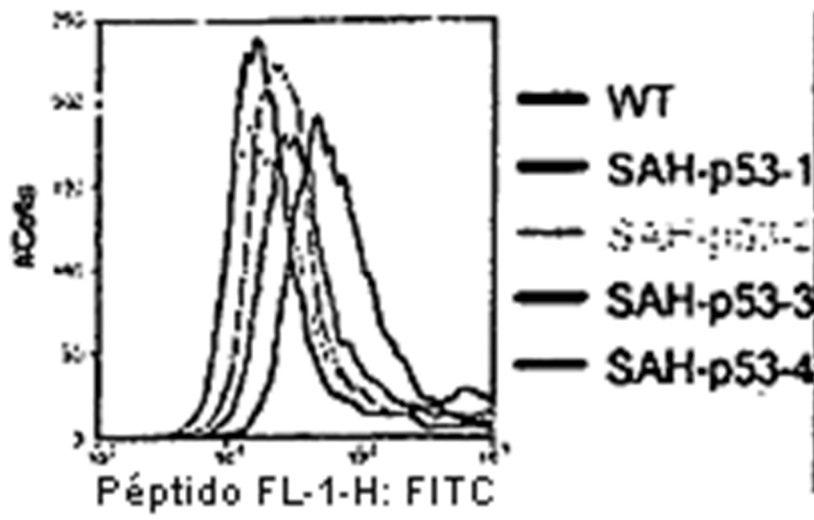


FIG. 4



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

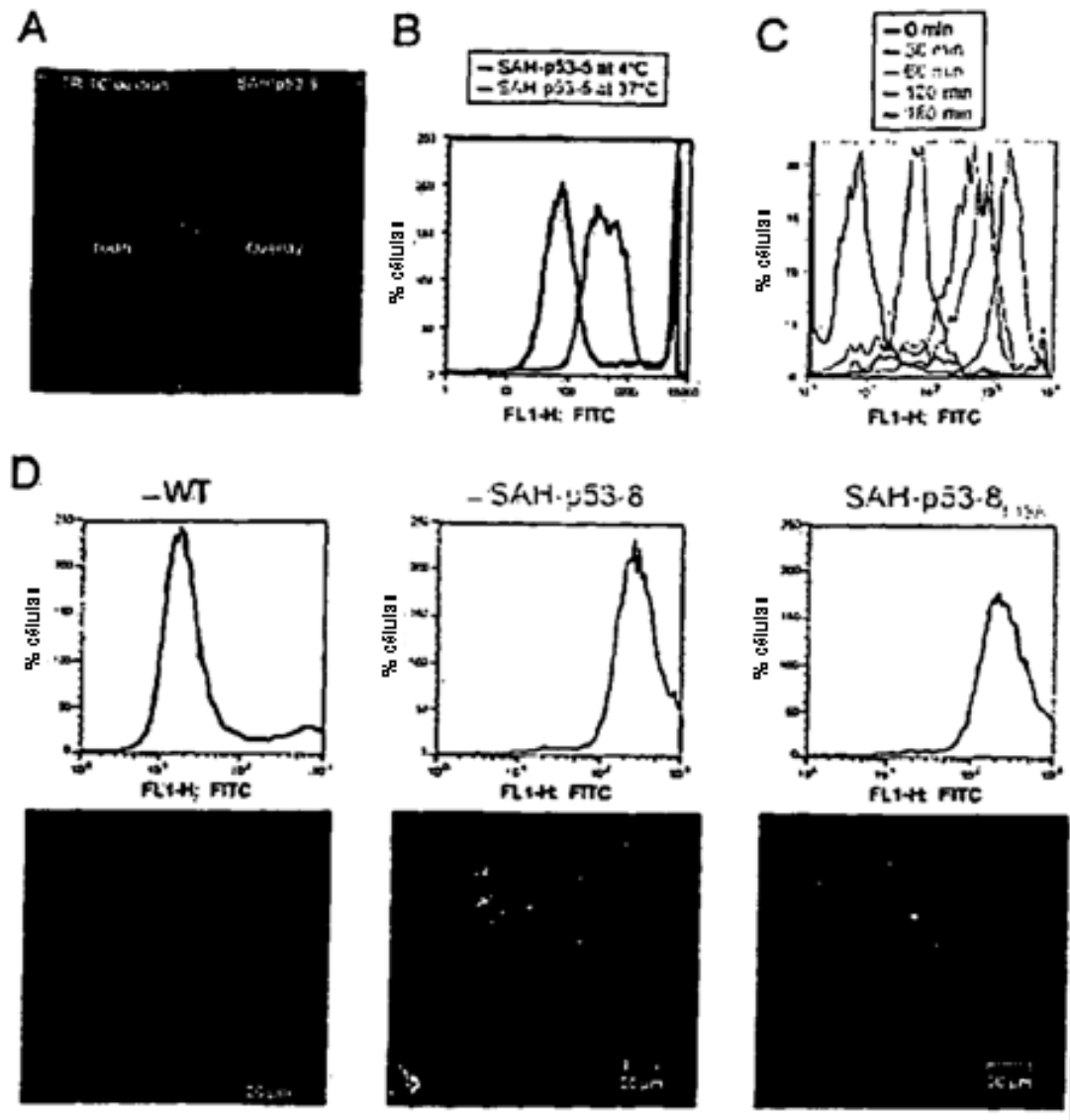


FIGURA 7

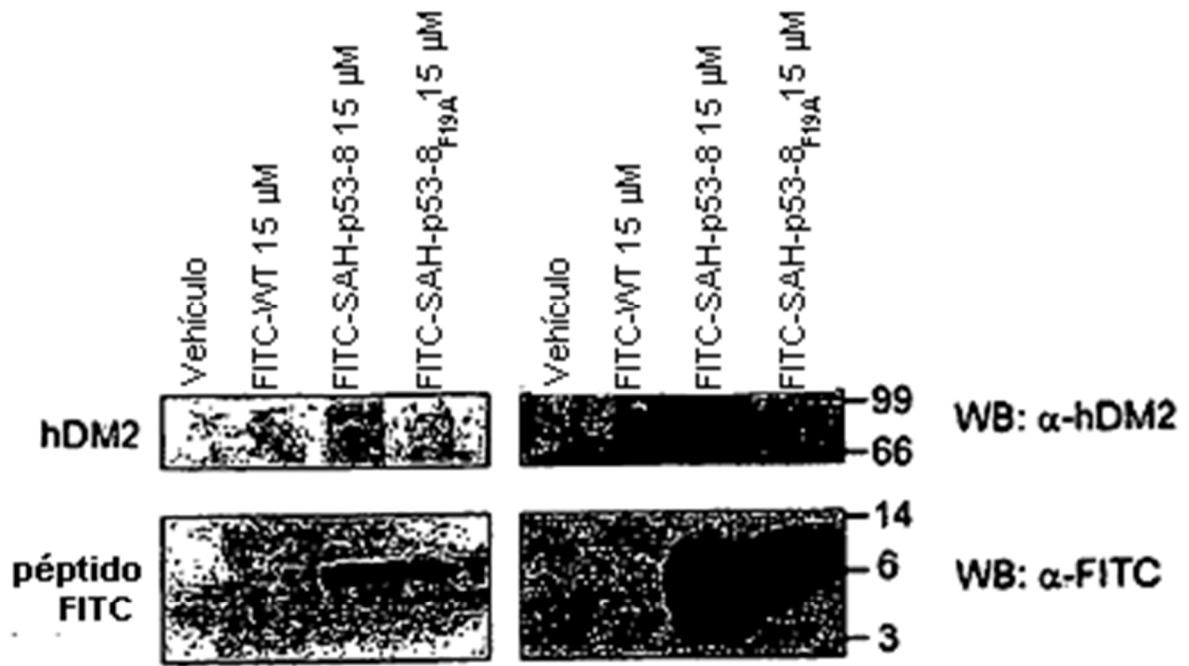
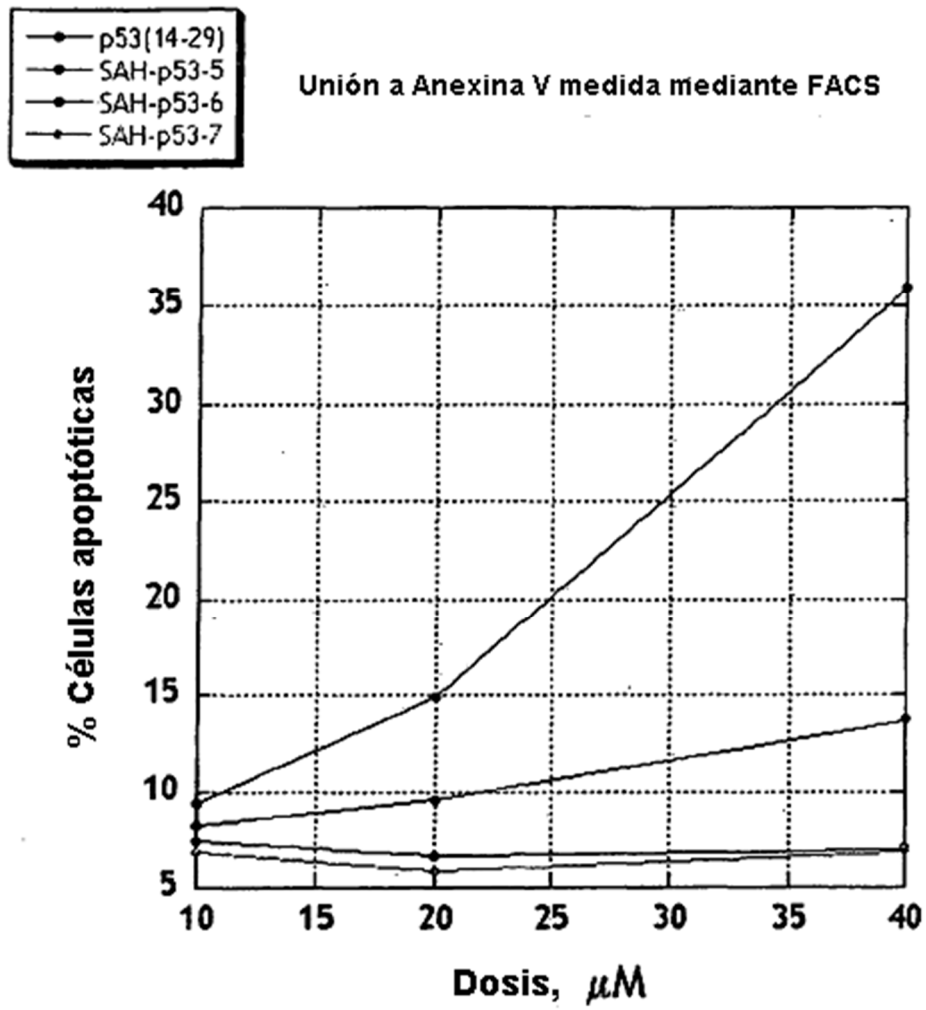


FIGURA 8





**FIGURA 9**

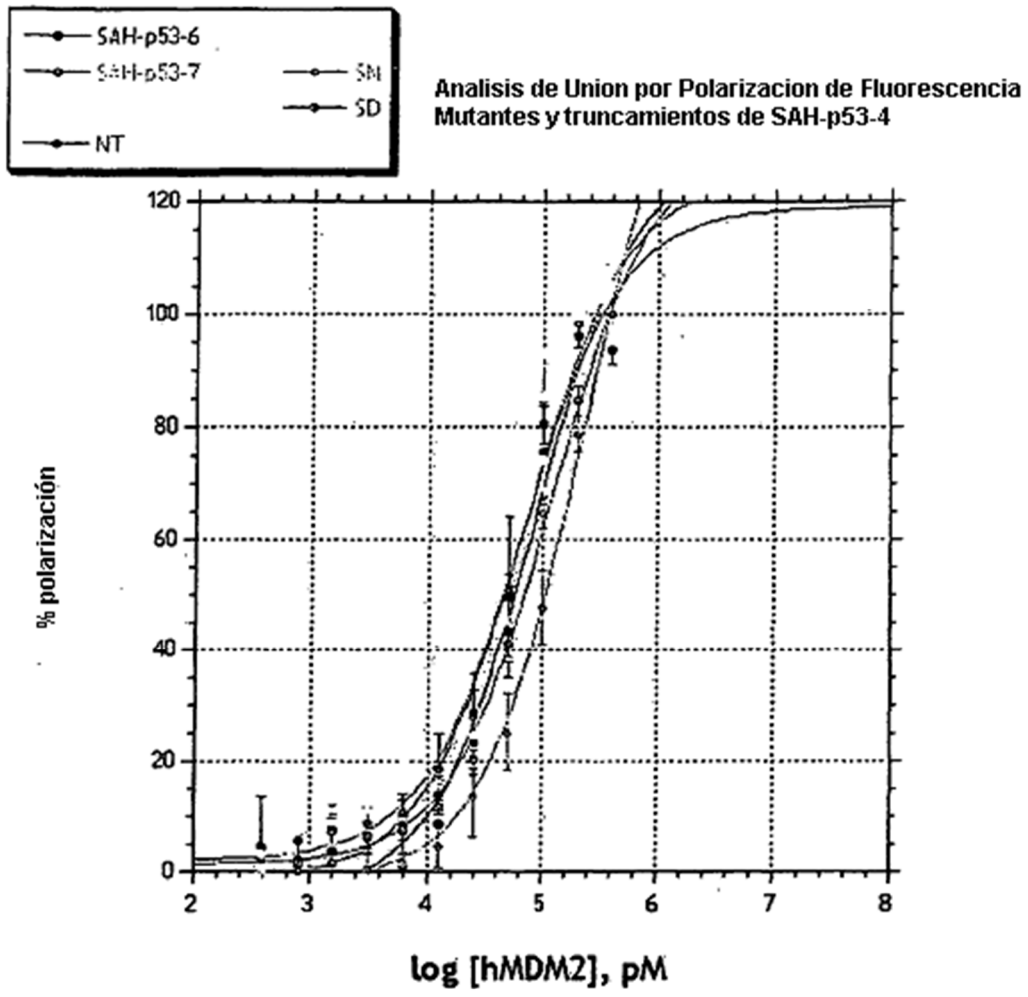


FIGURA 10

**Análisis de Viabilidad Celular**  
**Línea Celular de Osteosarcoma SJSA-1**  
**Efectos de SAF-p53-8 solo o combinado**

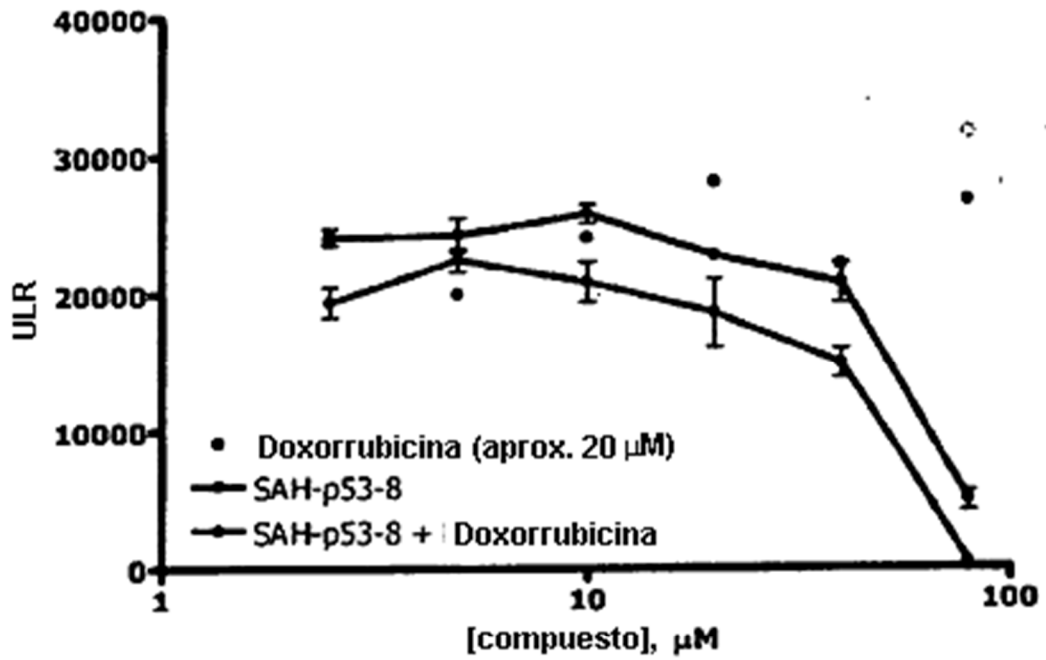


FIGURA 11

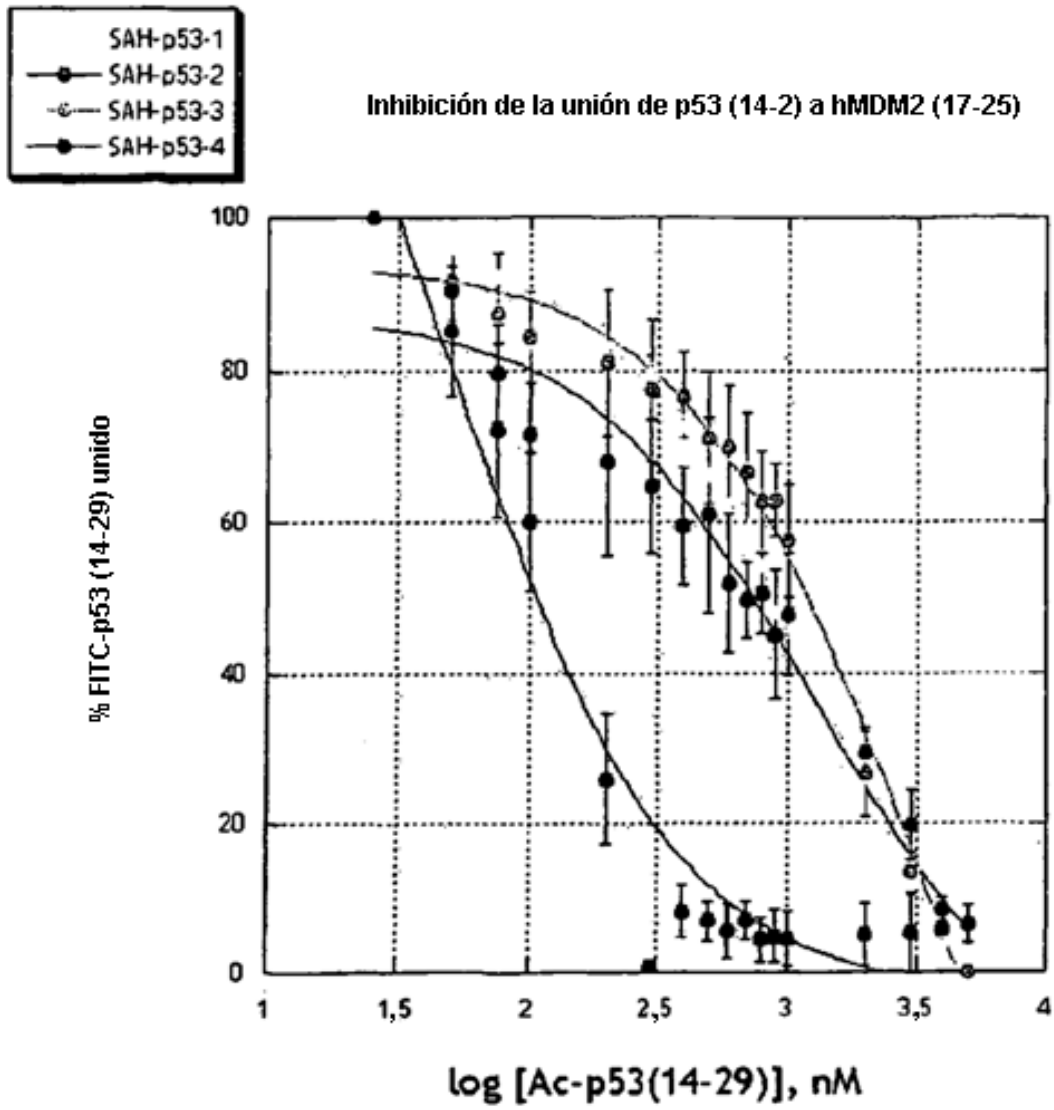


FIGURA 12

Análisis fluorométrico de caspasa-3  
24 h Tx, línea celular SJSA-1

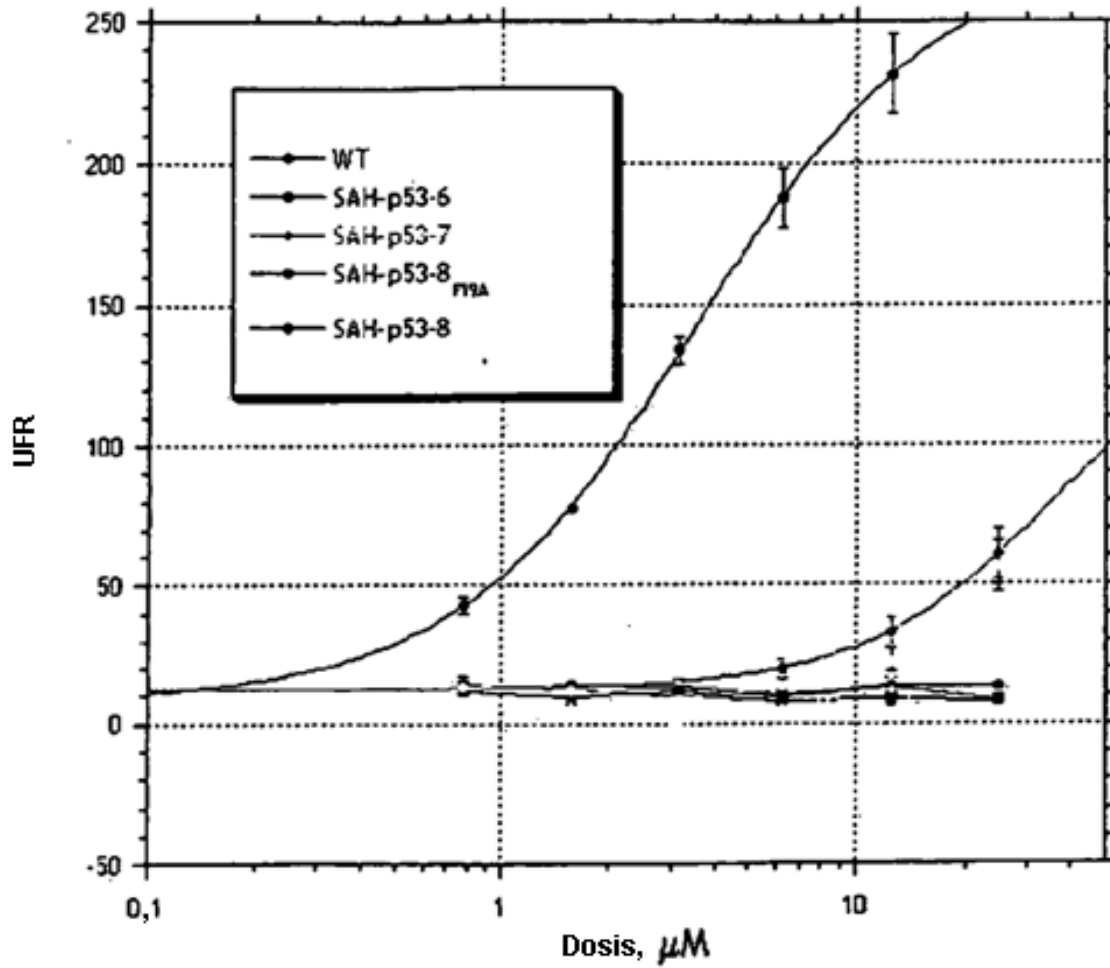
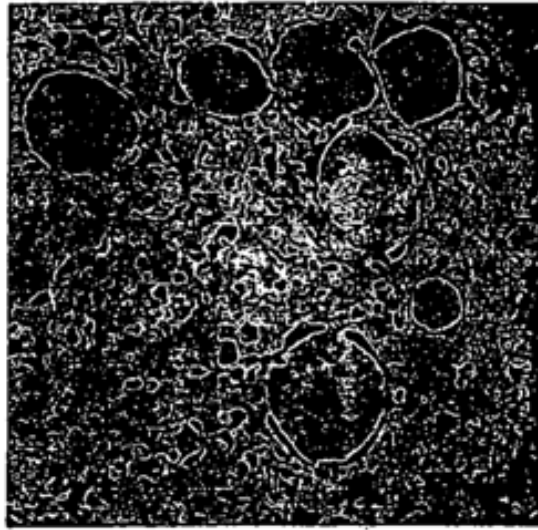


FIGURA 13



**A**



**B**

**FIGURA 14**

```
1 meepqsdpsv epllsqetfs dlwkllpenn vlsplpsqam ddmlspddi eqwftedpgp
61 deaprmpeaa prvapapaap tpaapapaps wplssavpsq ktyqgsygfr lgflhsqtak
121 svctctyspal nkmfcqlakt cpvqlwvdst pppgtrvram aiykqsqht evvrrcphe
181 rcsdsdglap pqhlirvegn lrveylddrn tfrhsvvvpy eppevgdct tihynymens
241 scmggnrrp iltiitleds sgnllgrnsf evrvcacpgr drrteenlr kkgephhelp
301 pgstkralpn ntssspqpk kpldgyftl qirgrerfem frelnealel kdaqagkepg
361 gsrhsshk skkgqstsrh kklmfktegp ds d
```

FIGURA 15

1. Protección terminal-Conector-L<sup>\*</sup>-Q-E-T-F-S-D<sup>\*</sup>-W-K-L-L-P-E-N-NH<sub>2</sub>
  2. Protección terminal-Conector-L-S-Q<sup>\*</sup>-T-F-S-D-L-W<sup>\*</sup>-L-L-P-E-N-NH<sub>2</sub>
  3. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E<sup>\*</sup>-F-S-D-L-W-K<sup>\*</sup>-L-P-E-N-NH<sub>2</sub>
  4. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E-T<sup>\*</sup>-S-D-L-W-K-L<sup>\*</sup>-P-E-N-NH<sub>2</sub>
  5. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-E-N-NH<sub>2</sub> (SAR-p53-4)
  6. Protección terminal-Conector-L<sup>\*</sup>-Q-E-T-F-S<sup>\*</sup>-L-W-K-L-L-P<sup>\*</sup>-N-NH<sub>2</sub>
  7. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E-T-F-S-D<sup>\*</sup>-W-K-L-L-P-E<sup>\*</sup>-NH<sub>2</sub>
- \* "Protección terminal" indica Ac (acetilo) o FITC (tiocarbamoil fluoresceína), "Conector" indica β-alanina o sin conector; "\*" indica los pares de aminoácidos R<sub>5</sub>-S<sub>8</sub> o R<sub>8</sub>-S<sub>5</sub> en cualquier forma no entrecruzada (no grapada, no metatesizada) o entrecruzada (grapada, metatesizada)
8. Protección terminal-Conector-L-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-E-N-NH<sub>2</sub>
  9. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  10. Protección terminal-Conector-L-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  11. Protección terminal-Conector-L-S-Q-E-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  12. Protección terminal-Conector-L-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  13. Protección terminal-Conector-L-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  14. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-K-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  15. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub> (SAR-p53-B)
  16. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-A<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub> (SAR-p53-B<sub>PRSA</sub>)
- \* "Protección terminal" indica Ac (Acetilo), FITC (tiocarbamoil fluoresceína), DOTA (criptando capaz de quelar In<sup>111</sup> radiactivo), lauroilo, heptanoilo, y miristoilo; "Conector" indica β-alanina o sin conector; "\*" indica los pares de aminoácidos R<sub>5</sub>-S<sub>8</sub> o R<sub>8</sub>-S<sub>5</sub> en cualquier forma no entrecruzada (no grapada, no metatesizada) o entrecruzada (grapada, metatesizada)
17. Protección terminal-Conector-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-E-N-NH<sub>2</sub>
  18. Protección terminal-Conector-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-NH<sub>2</sub>
  19. Protección terminal-Conector-L-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W<sup>\*</sup>-L-L-NH<sub>2</sub>
  20. Protección terminal-Conector-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-D-L-W<sup>\*</sup>-L-L-NH<sub>2</sub>
  21. Protección terminal-Conector-Q-Q-T-A<sup>\*</sup>-D-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-E-N-NH<sub>2</sub>
- \* "Protección terminal" indica Ac (acetilo), FITC (tiocarbamoil fluoresceína), lauroilo, heptanoilo, y miristoilo; "Conector" indica β-alanina o sin conector; "\*" indica los pares de aminoácidos R<sub>8</sub>-S<sub>5</sub> (peptidos 17, 18 y 21) o S<sub>8</sub>-R<sub>5</sub> (peptidos 19 y 20) en cualquier forma no entrecruzada (no grapada, no metatesizada) o entrecruzada (grapada, metatesizada)
22. Protección terminal-K(Mir)-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  23. Protección terminal-K(Biotina)-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  24. Protección terminal-K(PEG3)-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub>
  25. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-F<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub> diol
  26. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-A<sup>\*</sup>-N-L-W-R-L-L<sup>\*</sup>-Q-N-NH<sub>2</sub> diol
- \* "Protección terminal" indica Ac (acetilo) o FITC (tiocarbamoil fluoresceína); "Conector" indica β-alanina o sin conector; "\*" indica el par de aminoácidos R<sub>8</sub>-S<sub>5</sub> en cualquier forma no entrecruzada (no grapada, no metatesizada) o entrecruzada (grapada, metatesizada); "diol" indica una olefina entrecruzada dihidroxilada

FIGURA 16-1



- 27. Protección terminal-conector-Q-S-Q-Q-T-F-\*D-J-W-R-L-L-\*Q-N-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-10)
- 28. Protección terminal-conector-Q-T-F-\*N-L-W-R-L-L-\*NH<sub>2</sub> (SAH-p53-11)
- 29. Protección terminal-Conector-Q-S-Q-Q-T-F-\*N-L-W-\*L-L-P-Q-N-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-8S<sub>A</sub>)
- 30. Protección terminal-conector-Q-S-\*Q-T-F-\*N-L-W-R-L-L-P-Q-N-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-8S<sub>B</sub>)
- 31. Protección terminal-conector-\*T-F-S-\*L-W-K-L-L-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-12)
- 32. Protección terminal-conector-E-T-F-\*D-L-W-\*L-L-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-13)
- 33. Protección terminal-conector-Q-T-F-\*N-L-W-\*L-L-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-14)
- 34. Protección terminal-conector-\*S-Q-E-\*P-S-N-L-W-K-L-L-NH<sub>2</sub> (SAH-p53-15)

FIGURA 16-2