

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 387**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 10195495 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2332968**

54 Título: **Péptidos alfa helicoidales adecuados para activar o inhibir la muerte celular**

30 Prioridad:

05.11.2003 US 517848 P

27.07.2004 US 591548 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

(50.0%)

450 Brookline Avenue

Boston, MA 02215, US y

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD

COLLEGE (50.0%)

72 Inventor/es:

WALENSKI, LOREN D.;

VERDINE, GREGORY y

KORSMEYER, STANLEY J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 586 387 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 alfa helicoidales adecuados para activar o inhibir la muerte celular

Antecedentes

La apoptosis, o muerte celular programada, ejerce un papel crítico en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis en todos los organismos pluricelulares. La sensibilidad a la apoptosis varía notablemente entre las células y está influenciada por episodios celulares tanto internos como externos. Se han definido proteínas reguladoras positivas y negativas que actúan como mediadoras del destino celular, y la desregulación de estas redes de señalización de proteínas se ha documentado en la patogenia de un amplio espectro de enfermedades humanas, incluyendo una variedad de cánceres. La BCL-2 es el miembro fundador de esta familia de proteínas apoptóticas y se identificó por primera vez en el punto de ruptura cromosómica de linfomas t (14; 18) (q32; q21) (Bakhashi et al. 1985. Cell 41:899; Cleary et al. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7439).

La reconfiguración génica coloca a BCL-2 bajo el control de la transcripción del locus de cadena pesada de inmunoglobulina, generando inadecuadamente altas concentraciones de BCL-2 y la supervivencia celular patológica resultante. Dichas aberraciones en la apoptosis se han identificado en las leucemias linfocítica y mielógena y en muchos otros tumores malignos, y se han relacionado con la evolución tumoral y la resistencia adquirida a la apoptosis provocada por la quimioterapia. La familia BCL-2 de proteínas se ha ampliado considerablemente y comprende tanto moléculas pro- como anti-apoptóticas que proporcionan los controles y equilibrios que rigen la sensibilidad a la muerte celular (FIG. 1). No es sorprendente que las proteínas apoptóticas se han convertido en objetivos clave para el desarrollo de productos terapéuticos tanto para prevenir la muerte celular precipitada en las enfermedades de pérdida de células como para activar vías de muerte celular en tumores malignos.

La familia BCL-2 está definida por la presencia de hasta cuatro dominios conservados (BH) "homología BCL-2" denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, todos los cuales comprenden segmentos α helicoidales (Chittenden et al. 1995 EMBO 14:5589; Wang et al. 1996 Genes Dev. 10:2859). Las proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-2 y BCL-X_L, presentan conservación de secuencias en todos los dominios BH. Las proteínas proapoptóticas se dividen en miembros "multidominio" (por ejemplo, BAK, BAX), que poseen homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, y los miembros del "dominio BH3 sólo" (por ejemplo, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA), que contienen homología de secuencias exclusivamente en el segmento α -helicoidal anfipático de BH3. Los miembros de la familia BCL-2 tienen capacidad para formar homo- y heterodímeros, lo que sugiere que la unión competitiva y la relación entre las concentraciones de proteínas pro- y antiapoptóticas fijan la sensibilidad a los estímulos de muerte. Las proteínas antiapoptóticas funcionan para proteger a las células del exceso proapoptótico, es decir, de excesiva muerte celular programada. Las medidas de "seguridad" adicionales comprenden la regulación de la transcripción de proteínas proapoptóticas y su mantenimiento como conformeros inactivos, que requiere la activación proteolítica, desfosforilación o cambio de configuración inducido por el ligando para activar las funciones que favorecen la mortalidad. En determinados tipos de células, las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática desencadenan apoptosis por una vía mitocondrial (figura 2). Las mitocondrias pueden servir como guardián de la muerte celular al secuestrar el citocromo c, un componente crítico de un complejo citosólico que activa la caspasa 9, lo que conduce a actividades proteolíticas mortales aguas abajo. Las proteínas multidominio tales como BCL-2/BCL-X_L y BAK/BAX representan papeles de duelo de guardián y verdugo en la membrana mitocondrial, con sus actividades reguladas además por los miembros de sólo BH3 aguas arriba de la familia BCL-2. Por ejemplo, BID es un miembro del subconjunto "sólo dominio BH3" de proteínas proapoptóticas, y transmite las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática a las proteínas proapoptóticas efectoras en la membrana mitocondrial. BID tiene la capacidad exclusiva de interactuar tanto con proteínas proapoptóticas como antiapoptóticas y tras la activación por la caspasa 8, desencadena la liberación del citocromo c y la apoptosis mitocondrial. Los estudios de eliminación y mutagenia determinaron que el segmento BH3 α -helicoidal anfipático de miembros proapoptóticos de la familia funciona como un dominio de muerte y por lo tanto representa un motivo estructural fundamental para la interacción con las proteínas multidominio apoptóticas. Estudios estructurales han demostrado que la hélice BH3 interactúa con proteínas antiapoptóticas mediante la inserción en una ranura hidrófoba formada por la interfaz de los dominios BH1, 2 y 3. Las proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, BCL-2 y BCL-X_L) pueden estar asociadas y ser secuestradas por BID activado y éste puede desencadenar la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, lo que conduce a la liberación de citocromo c y un programa de apoptosis mitocondrial.

BAD es también un miembro de la familia proapoptótica "sólo dominio BH3" cuya expresión igualmente desencadena la activación de BAX/BAK. A diferencia de BID, sin embargo, BAD presenta unión preferente a los miembros antiapoptóticos, BCL-2 y BCL-X_L. Mientras que el dominio BH3 de BAD presenta una alta afinidad de unión a BCL-2, péptido BH3 de BAD es incapaz de activar la liberación del citocromo c de las mitocondrias in vitro, lo que sugiere que BAD no es un activador directo de BAX/BAK. Las mitocondrias que sobreexpresan BCL-2 son resistentes a la liberación de citocromo c provocada por BID, pero el tratamiento conjunto con BAD puede restablecer la sensibilidad de BID. La provocación de la apoptosis mitocondrial por BAD parece ser el resultado de: (1) el desplazamiento de los activadores BAX/BAK, tales como las proteínas BID y similares a BID, del punto de unión de BCL-2/BCL-X_L, o (2) la ocupación selectiva del punto de unión de BCL-2/BCL-X_L por BAD para evitar el secuestro de proteínas similares a BID por proteínas antiapoptóticas. Por lo tanto, dos clases de proteínas "sólo dominio BH3" han surgido, las proteínas similares a BID que activan directamente la apoptosis mitocondrial y

proteínas similares a BAD, que tienen capacidad de sensibilizar las mitocondrias a las proteínas proapoptósicas ocupando los puntos de unión de proteínas de multidominio antiapoptósicas.

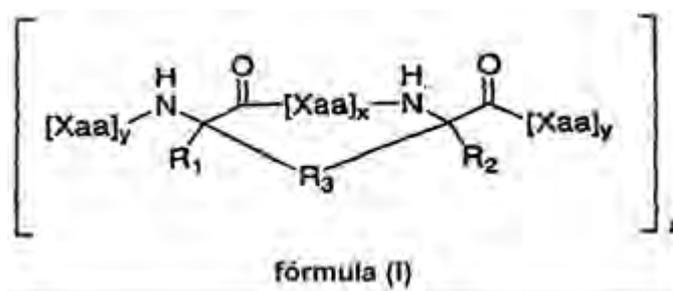
El objetivo de la identificación o la generación de pequeñas moléculas para probar las funciones de las proteínas apoptósicas in vitro y manipular específicamente las vías apoptósicas in vivo ha sido un desafío. La detección sistemática de alto rendimiento ha identificado varias moléculas que inhiben la interacción del dominio BH3 de BAK con BCL-X_L a afinidades micromolares. Además del potencial inconveniente de la identificación de compuestos de baja afinidad, la técnica está limitada en su capacidad de generar grupos de compuestos adaptados a sutiles especificidades de unión de cada uno de los miembros de las familias de proteínas. Las estrategias alternativas a la manipulación de las vías de apoptosis proceden de la ingeniería de péptidos, técnica que utiliza la secuencia de péptidos no específica para generar compuestos con estructuras tridimensionales deseadas. Una aplicación de esta técnica implicó la generación de hélices α "proapoptósicas" compuestas por la secuencia de péptidos no específica utilizado para provocar la muerte celular hélices por rotura de las membranas mitocondriales.

La hélice alfa es uno de los principales componentes estructurales de las proteínas y a menudo se encuentra en la interfaz de contactos de proteínas, que participan en una amplia variedad de actividades biológicas intermoleculares de reconocimiento. Teóricamente, péptidos helicoidales, tales como la hélice de BH3, podrían utilizarse para interferir selectivamente con las interacciones proteína-proteína o estabilizarlas, y de ese modo manipular procesos fisiológicos. Sin embargo, los motivos helicoidales biológicamente activos dentro de las proteínas suelen tener poca estructura cuando se consideran fuera del contexto de las proteínas completas y se coloca en solución. Por lo tanto, la eficacia de los fragmentos peptídicos de las proteínas como en los reactivos in vivo se ha visto afectada por la pérdida de la estructura secundaria helicoidal, la sensibilidad a la degradación proteolítica y la incapacidad para penetrar en las células intactas. Considerando que se han descrito varias estrategias para la estabilización de hélices covalentes, la mayoría de las metodologías implican reticulaciones polares y/o lábiles (Phelan et al. 1997. J. Am. Chem. Soc. 119:455; Leuc et al. 2003 Proc Nat'l. Acad. Sci. USA 100:11273; Bracken et al., 1994. J. Am. Chem. Soc. 116:6432; Yan et al. 2004. Bioorg. Med. Chem. 14:1403). Posteriormente, Verdine y colegas desarrollaron una estrategia basada en la metátesis alternativa, que emplea aminoácidos sintéticos α,α-disustituídos que contienen fijaciones a alquilo (Schafineister et al., 2000. J. Am. Chem. Soc.122:5891; Blackwell et al. 1994 Angew Chem. Int. Ed. 37:3281). En Genes Dev, 14, 2000, páginas 2060-2071, describe que tBID libera citocromo c.

Sumario

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que reticulando de forma estable un polipéptido que tiene por lo menos dos aminoácidos modificados (proceso denominado "grapado de hidrocarburos") pueden ayudar a conferir desde el punto de vista de la configuración la estructura secundaria natural de este polipéptido. Por ejemplo, la reticulación de un polipéptido predispuesto a tener una estructura secundaria en hélice alfa puede limitar el polipéptido a su configuración alfa helicoidal natural. La estructura secundaria limitada puede aumentar la resistencia del polipéptido a la escisión proteolítica y también aumentar la hidrofobia. Inesperadamente, en algunos casos, los polipéptidos pueden penetrar la membrana celular (por ejemplo, mediante un mecanismo de transporte dependiente de la energía, por ejemplo, pinocitosis). Por consiguiente, los polipéptidos reticulados descritos en la presente memoria pueden tener una actividad biológica mejorada con relación a un polipéptido correspondiente no reticulado. Por ejemplo el polipéptido reticulado puede incluir un dominio de hélice alfa de un polipéptido miembro de la familia BCL-2 (por ejemplo, dominio BID-BH3), que puede unirse a BAK/BAX y/o BCL-2/BCL-X_L para estimular la apoptosis en un individuo. En algunos casos, el polipéptido reticulado se puede utilizar para inhibir la apoptosis. Los polipéptidos reticulados descritos en la presente memoria pueden utilizarse terapéuticamente, por ejemplo, para tratar el cáncer en un individuo.

En un aspecto, la invención presenta polipéptidos de fórmula (I),



en la que;

cada R₁ y R₂ son independientemente H o un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclilalquilo C₁ a C₁₀;

R₃ es alquilo, alqueniilo, alquinilo; [R₄-K-R₄]_n; cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 6 R₅;

R₄ es alquilo, alqueniilo, o alquinilo;

R₅ es halógeno, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, un resto fluorescente o un radioisótopo;



K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆, o

5 R₆ es H, alquilo, o un agente terapéutico;

n es un número entero de 1 a 4;

x es un número entero de 2 a 10;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

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

10 cada X_{aa} es independientemente un aminoácido; y

donde el polipéptido es transportado o transportado activamente a través de la membrana celular, según se determina en un ensayo que comprende preparar un polipéptido marcado con fluorescencia, aplicando el polipéptido marcado con fluorescencia a una célula intacta, y sometiendo a ensayo a la célula en cuanto a fluorescencia celular por microscopía o detección de fluorescencia celular de alto rendimiento.

15 En algunos casos, el polipéptido se une a una proteína de la familia BCL-2. El polipéptido puede unirse a una proteína antiapoptósica. El polipéptido puede unirse a una proteína proapoptósica. El polipéptido puede unirse y activar BAX y BAK. En algunos casos, el polipéptido se une a un dominio BH1, BH2 y/o BH3.

En algunos casos, el polipéptido activa la muerte celular, por ejemplo el polipéptido puede desencadenar la liberación del citocromo c y activar la muerte celular mitocondrial.

20 En otros casos, el polipéptido puede inhibir la muerte celular.

En algunos casos, el polipéptido comprende un dominio BH3.

En algunos casos, x es 2, 3 o 6.

En algunos casos, cada y es independientemente un número entero entre 3 y 15.

En algunos casos cada y es independientemente un número entero entre 1 y 15.

25 En algunos casos, R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C₁-C₆.

En algunos casos, R₁ y R₂ son cada uno independientemente alquilo C₁-C₃.

En algunos casos, por lo menos uno de R₁ y R₂ es metilo. Por ejemplo, R₁ y R₂ son ambos metilo.

En algunos casos R₃ es alquilo (por ejemplo, alquilo C₈) y x es 3

En algunos casos, R₃ es alquilo C₁₁ y x es 6.

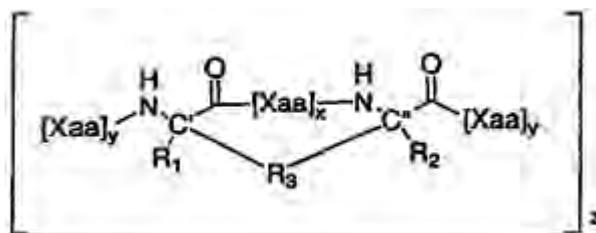
30 En algunos casos, R₃ es alqueniilo (por ejemplo, alqueniilo C₈) y x es 3.

En algunos casos, x es 6 y R₃ es alqueniilo C₁₁.

En algunos casos, R₃ es un alquilo, alqueniilo o alquinilo de cadena lineal.

En algunos casos, R₃ es -CH₂-CH₂-CH₂-CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-.

35 En determinadas realizaciones los dos estereocentros alfa, alfa disustituido están ambos en la configuración R o en la configuración S (por ejemplo, reticulación i, i+4), o una estereocentro es R y el otro es S (por ejemplo, reticulación i, i+7). Por lo tanto, donde la fórmula I se representa como



los estereocentros C' y C'' disustituidos pueden estar ambos en la configuración R o ambos pueden estar en la configuración S, por ejemplo cuando X es 3. Cuando x es 6, el estereocentro C' disustituido está en la configuración R y el estereocentro C'' disustituido está en la configuración S. El doble enlace en R₃ puede estar en la configuración estereoquímica E o Z.

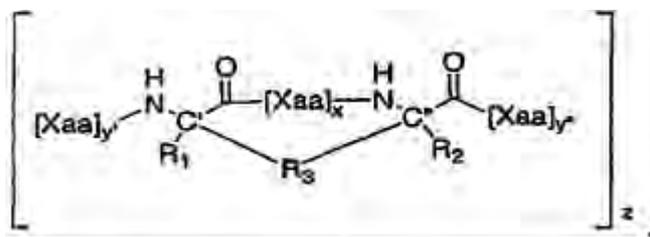
En algunos casos R₃ es [R₄-K-R₄]_n; y R₄ es un alquilo, alqueno, o alquino de cadena lineal.

En algunos casos, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 60% (70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de EDIIRNI*RHL*QVGDSN_LDRSIW (SEC. ID. n°: 112), en la que * es un aminoácido fijado. Por ejemplo, pueden producirse 1, 2, 3, 4, 5 o más cambios de aminoácidos, por ejemplo, cambios conservadores.

La fijación puede incluir un grupo alquilo, alqueno, o alquino (por ejemplo, alquilo C₅, C₈ o C₁₁ o un alqueno C₅, C₈ o C₁₁ o alquino C₅, C₈ o C₁₁). El aminoácido fijado puede ser alfa disustituido (por ejemplo, C₁-C₃ o metilo). En algunos casos, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 60% (70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de EDIIRNIARHLA*VGD*N_LDRSIW (SEC. ID. n°: 110), en la que * es un aminoácido fijado. Por ejemplo, pueden producirse 1, 2, 3, 4, 5 o más cambios de aminoácidos, por ejemplo, cambios conservadores. En algunos casos, el polipéptido es transportado a través de la membrana de la célula (por ejemplo, mediante un mecanismo de transporte activo o endocitótico o por transporte pasivo). En determinadas realizaciones el polipéptido no comprende Cys o Met.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende, por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, o más aminoácidos contiguos de un dominio BCL-2 o similar a BCL-2, por ejemplo, un dominio BH3 o un dominio similar a BH3 por ejemplo, un polipéptido representado en cualquiera de las figuras 5a, 5b, y 28a-28h. Cada [Xaa]_y es un péptido que puede comprender independientemente por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o más aminoácidos contiguos de un dominio BCL-2 o similar a BCL-2, por ejemplo, un dominio BH3 o similar a BH3, por ejemplo, un polipéptido representado en cualquiera de las figuras 5a, 5b, y 28a - 28h. [Xaa]_x es un péptido que puede comprender 3 o 6 aminoácidos contiguos de ácidos de un dominio BCL-2 o similar a BCL-2, por ejemplo, de un dominio BH3 o similar a BH3, por ejemplo, un polipéptido representado en cualquiera de las figuras 5a, 5b y 28a 28h.

El polipéptido puede comprender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 aminoácidos contiguos de ácidos de un dominio BCL-2 o similar a BCL-2, por ejemplo, un dominio BH3 o similar a BH3, por ejemplo, un polipéptido representado en cualquiera de las FIG. 5a, 5b, y 28a-28h (SEC. ID. n°:) en las que dos aminoácidos que están separadas por tres aminoácidos (o seis aminoácidos) se sustituyen por sustitutos de aminoácidos que están unidos por R₃. Por lo tanto, por lo menos dos aminoácidos pueden estar sustituidos por aminoácidos fijados o sustitutos de aminoácidos fijados. Por lo tanto, en donde la fórmula I se representa como



[Xaa]_y y [Xaa]_{y'} puede comprender, cada uno secuencias de polipéptidos contiguos de los mismos o diferentes dominios BCL-2 o similares a BCL-2.

La invención presenta polipéptidos reticulados principalmente 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 dominio BCL-2 o similar a BCL-2, por ejemplo, un dominio BH3 o similar a BH3, por ejemplo, un polipéptido representado en cualquiera de las FIG. 5a, 5b (SEC. ID. n°: 84-114), y 28a-28h (SEC. ID. n°: 1-83) en las que los carbonos alfa de dos aminoácidos que están separadas por tres aminoácidos (o seis aminoácidos) están unidos por R₃, uno de los dos carbonos alfa está sustituido por R₁ y el otro está sustituido por R₂ y cada uno está unido por enlaces peptídicos a aminoácidos adicionales.

En algunas realizaciones el polipéptido tiene actividad apoptósica.

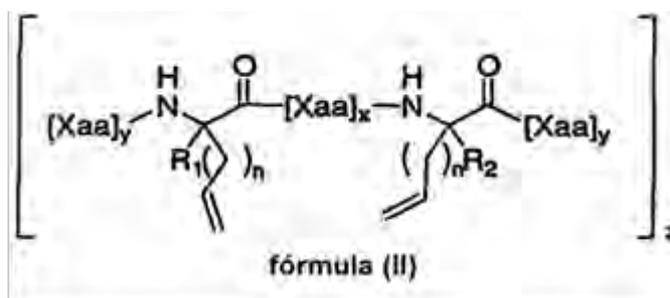
En algunos casos, el polipéptido también comprende un resto fluorescente o un radioisótopo.

En algunos casos, el polipéptido comprende 23 aminoácidos; R₁ y R₂ son metilo; R₃ es alquilo C₈, alquilo C₁₁, alquenilo C₈, alquenilo C₁₁, alquinilo C₈ o alquinilo C₁₁ y x es 2, 3, o 6.

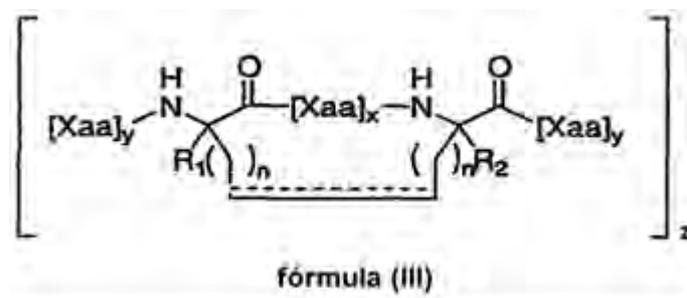
5 En algunos casos, el polipéptido comprende un marcador de afinidad, un resto de selección de diana (targeting moiety) y/o un resto de biotina.

En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido seleccionado del grupo que consta de los polipéptidos representados en las FIG. 28a-h y 5a-b (SEC. ID. n°: 1-83) y 5a-b (SEC. ID. n°: 84-114). En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento de preparación de un polipéptido de fórmula (III), principalmente proporcionar un polipéptido de fórmula (II); y

10



tratar el compuesto de fórmula (II) con un catalizador para favorecer una metátesis de cierre de anillo, proporcionando de este modo un compuesto de fórmula (III)



15 en la que

cada R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo; heteroarilalquilo o heterociclicilalquilo;

cada n es independientemente un número entero de 1 al 15;

x es 2, 3 o 6

20 cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1-10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); y

cada Xaa es independientemente un aminoácido.

En algunos casos, el polipéptido se une a una proteína miembro de la familia BCL-2.

En algunos casos, el catalizador es un catalizador de rutenio.

25 En algunos casos, el método también incluye proporcionar un agente reductor u oxidante con posterioridad a la metátesis de cierre del anillo.

En algunos casos, el agente reductor es H₂ o el agente oxidante es tetróxido de osmio.

En algunos casos, la invención presenta un procedimiento de tratamiento de un sujeto que comprende la administración al sujeto de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria. En algunos casos, el procedimiento también comprende la administración de un agente terapéutico adicional.

5 En algunos casos, la invención presenta un procedimiento de tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración al sujeto de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria. En algunos casos, el procedimiento también comprende la administración de un agente terapéutico adicional.

En algunos casos, la invención presenta una librería de los compuestos descritos en la presente memoria.

En algunos casos, la invención presenta un procedimiento de identificación de un compuesto experimental para la estimulación de la apoptosis, que incluye:

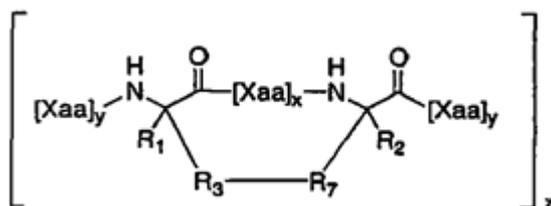
10 proporcionar mitocondrias;

poner en contacto las mitocondrias con cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria;

determinar la liberación del citocromo c; y

15 comparar la liberación de citocromo c en presencia del compuesto con la liberación de citocromo c en ausencia del compuesto, en el que un aumento en la liberación de citocromo c en presencia del compuesto de fórmula 1 identifica el compuesto como un compuesto candidato para la estimulación de la apoptosis.

En algunos casos, la invención presenta un polipéptido de la fórmula (IV),



en la que;

20 cada R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclilalquilo;

R₃ es alquilo, alqueno, alquino; [R₄-K-R₄]_n o una cadena lateral de aminoácidos de origen natural; cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 6 R₅;

R₄ es alquilo, alqueno o alquino;

R₅ es halógeno, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, un resto fluorescente, o un radioisótopo;

25 K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆, o ;

R₆ es H, alquilo o un agente terapéutico;

R₇ es alquilo, alqueno, alquino; [R₄-K-R₄]_n o una cadena lateral de aminoácidos de origen natural; cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 6 R₅;

n es un número entero de 1 a 4;

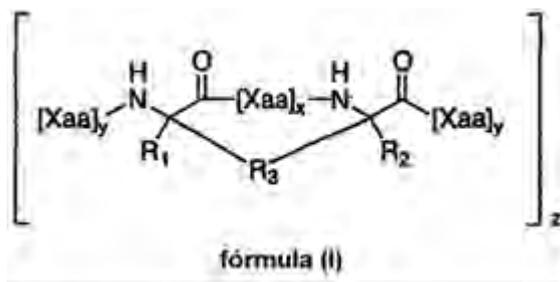
30 x es un número entero de 2 a 10;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

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

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

En algunos casos, la invención presenta un polipéptido de fórmula (I)



en la que;

cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclicilalquilo;

5 R_3 es alquilo, alqueno, alquino; $[R_4-K-R_4]_n$; cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 6 R_5 ;

R_4 es alquilo, alquino, o alquino;

R_5 es halógeno, alquilo, OR_6 , $N(R_6)_2$, SR_6 , SOR_6 , SO_2R_6 , CO_2R_6 , R_6 , un resto fluorescente, o un radioisótopo;



K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , $CONR_6$, o

R_6 es H, alquilo, o un agente terapéutico;

10 n es un número entero de 1 a 4;

x es un número entero de 2 a 10;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

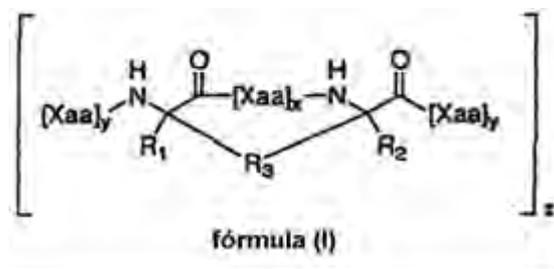
z es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); y

15 cada Xaa es independientemente un aminoácido;

en el que el polipéptido tiene por lo menos 5% de helicidad alfa en solución acuosa determinada por dicroísmo circular.

En algunos casos, el polipéptido tiene por lo menos 15%, por lo menos 35%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de helicidad alfa determinada por dicroísmo circular.

20 En algunos casos, la invención presenta un polipéptido de fórmula (I),



en la que;

cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclicilalquilo;

25 R_3 es alquilo, alqueno, alquino; $[R_4-K-R_4]_n$; cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 6 R_5 ;

R_4 es alquilo, alquino o alquino;

R_5 es halógeno, alquilo, OR_6 , $N(R_6)_2$, SR_6 , SOR_6 , SO_2R_6 , CO_2R_6 , R_6 , un resto fluorescente, o un radioisótopo;

K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆, o 

R₆ es H, alquilo, o un agente terapéutico;

n es un número entero de 1 a 4;

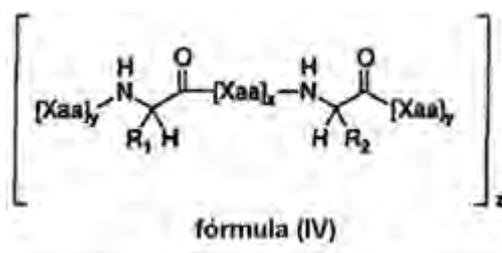
x es un número entero de 2 a 10;

5 cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

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

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

en la que el polipéptido tiene por lo menos un aumento de 1,25 veces en helicidad alfa determinado por dicroísmo circular en comparación con el polipéptido de fórmula (IV)



10

en la que R₁, R₂, Xaa, x, y, y z son todos como se han definido para la fórmula (I) anterior.

15 En algunos casos, el polipéptido tiene por lo menos 1,5 veces, por lo menos 1,75 veces, por lo menos 2,0 veces, por lo menos 2,5 veces, por lo menos 3 veces, o por lo menos 4 veces de aumento en helicidad alfa determinada por dicroísmo circular en comparación con el polipéptido de fórmula (IV).

En algunos casos, la invención presenta un método para identificar un compuesto candidato para la inhibición de la apoptosis, que incluye;

proporcionar mitocondrias;

poner en contacto las mitocondrias con un compuesto descrito en la presente memoria;

20

determinar la liberación de citocromo c; y

comparar la liberación del citocromo c en presencia del compuesto descrito en la presente memoria con la liberación de citocromo c en ausencia del compuesto descrito en la presente memoria, en la que una disminución en la liberación de citocromo c en presencia del compuesto descrito en la presente memoria identifica el compuesto descrito en la presente memoria como un compuesto candidato para la inhibición de la apoptosis.

25

Las combinaciones de sustituyentes y variables previstas por la presente invención son sólo las que dan como resultado la formación de compuestos estables. El término "estable", como se emplea en la presente memoria, se refiere a los compuestos que poseen estabilidad suficiente para permitir la preparación del compuesto y que mantiene la integridad del mismo durante un periodo suficiente para ser útil en el contexto de la presente memoria (por ejemplo, la administración terapéutica a un sujeto o la generación de reactivos para estudiar o descubrir una vía biológica ya sea in vitro o in vivo).

30

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más centros asimétricos y por lo tanto presentarse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Los compuestos de esta invención 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 (por ejemplo, la alquilación de un sistema de anillo puede dar lugar a alquilación en múltiples sitios, la invención comprende expresamente todos estos productos de reacción). Todas estas formas isoméricas de dichos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente memoria se incluyen expresamente en la presente invención.

35

40

- 5 El término "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Los aminoácidos adecuados comprenden, sin limitación, tanto los isómeros D como L de los aminoácidos de origen natural 20 comunes que se encuentran en péptidos (por ejemplo, A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V (como se conocen por las abreviaturas de una letra)), así como los aminoácidos de origen natural y sintético preparados por síntesis orgánica o por otras vías metabólicas.
- Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede alterarse a partir de la secuencia natural de un polipéptido (por ejemplo, un dominio BH3) sin suprimir o alterando sustancialmente su actividad. Un resto de aminoácido "esencial" es un resto que, cuando se altera en la secuencia natural del polipéptido, ocasiona la supresión o sustancialmente la supresión de la actividad del polipéptido.
- 10 Una "sustitución conservadora de aminoácido" es en la que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido BH3, por ejemplo, se reemplaza preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.
- 15
- 20 El símbolo  cuando se utiliza como parte de una estructura molecular se refiere a un enlace sencillo o a un doble enlace trans o cis.
- La expresión "cadena lateral de aminoácido" se refiere a un resto unido al carbono α en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácido de alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácido de fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácido de cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácido de aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácido de tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etc. Están incluidas también otras cadenas laterales de aminoácidos sintéticos, por ejemplo, las naturales (por ejemplo, un metabolito de aminoácido) o los que se preparan por síntesis (por ejemplo, un aminoácido disustituido en alfa).
- 25
- 30 El término polipéptido comprende dos o más aminoácidos de origen natural o sintético unidos por un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida). Los polipéptidos tal como se describe en la presente memoria comprenden proteínas completas (por ejemplo, proteínas completamente elaboradas), así como secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, fragmentos de proteínas de origen natural o fragmentos de polipéptidos sintéticos).
- 35 El término "halógeno" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo. El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser una cadena lineal o ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀ indica que el grupo puede tener de 1 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. En ausencia de designación numérica, "alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono en la misma. El término "alquileno" se refiere a un alquilo divalente (es decir, -R-).
- 40 El término "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. El resto alquenilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo puede tener de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en el mismo. La expresión "alquenilo inferior" se refiere a una cadena de alquenilo C₂-C₈. En ausencia de designación numérica, "alquenilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en la misma.
- 45 El término "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. El resto alquinilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo puede tener de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en el mismo. El término "alquinilo inferior" se refiere a una cadena de alquinilo C₂-C₈. En ausencia de designación numérica, "alquinilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en la misma.
- 50 El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 6 carbonos o bicíclico de 10 carbonos en el que 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo puede estar sustituido por un sustituyente. Los ejemplos de grupos arilo comprenden fenilo, naftilo y similares. El término "arilalquilo" o el término "aralquilo" se refiere a alquilo sustituido con un arilo. El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con arilo.

5 El término "cicloalquilo" como se emplea en la presente memoria comprende grupos de hidrocarburos cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen 3 a 12 átomos de carbono, preferentemente 3 a 8 carbonos, y más preferentemente de 3 a 6 carbonos, en los que el grupo cicloalquilo además puede estar opcionalmente sustituido. Los grupos cicloalquilo preferidos comprenden, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

10 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 8 eslabones, bicíclico de 8 a 12 eslabones, o tricíclico de 11 a 14 eslabones que tiene 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionados dichos heteroátomos de entre O, N, o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1 a 3, 1 a 6 o 1 a 9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico, o tricíclico, respectivamente), en los que 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo puede ser sustituido por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heteroarilo comprenden piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo y similares. El término "heteroarilalquilo" del término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con heteroarilo.

15 El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5 a 8 eslabones, bicíclico de 8 a 12 eslabones, o tricíclico de 11 a 14 eslabones que tiene 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionados dichos heteroátomos de entre O, N, o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1 a 3, 1 a 6, o 1 a 9 heteroátomos de N, O, o S si es monocíclico, bicíclico, o tricíclico, respectivamente), en los que 0, 1, 2 o 3 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos por un sustituyente.
20 Los ejemplos de grupos heterociclilos comprenden piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo y similares.

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

Los detalles de una o más realizaciones de la invención en la presente memoria se indican en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

30 La figura 1 representa miembros de la familia BCL-2 que tienen uno o más dominios de homología BCL-2 (BH) conservados.

La figura 2 representa un modelo de apoptosis mitocondrial en el que interviene como mediador BID. FNT-RI/Fas provoca la escisión de BID, que se desplaza a las mitocondrias y activa la apoptosis.

35 La figura 3 representa una estrategia de síntesis para la generación de aminoácidos sintéticos α,α -disustituidos quirales que contienen cadenas laterales olefinicas.

La figura 4a representa las estructuras químicas de determinados aminoácidos sintéticos.

La figura 4b representa la reticulación de los aminoácidos sintéticos en las posiciones i e i+4 e i e i+7 por metátesis de olefinas.

40 La figura 5a representa compuestos SAHB3 generados por sustitución de aminoácidos sintéticos y metátesis de olefinas (SEC. ID. n° 84 a n°108, respectivamente).

La figura 5b representa determinados péptidos reticulados utilizados en los estudios descritos en la presente memoria (SEC. ID. n° 109 a n° 114, respectivamente).

La figura 6 representa los resultados de un estudio que muestra el grado de helicidad α de los dominios BH3 de los miembros de la familia BCL-2 seleccionados.

45 La figura 7 representa los resultados de un estudio que muestra que la reticulación química mejora la helicidad alfa de los compuestos SAHB3_{BID} en comparación con el péptido BID BH3 no modificado.

La figura 8 representa los resultados de un estudio que muestra que un mutante gly \rightarrow glu del polipéptido SAHB3_{BID} A muestra similar contacto helicoidal que el correspondiente polipéptido que contiene gly.

50 La figura 9 representa los resultados de un estudio que muestra que el truncamiento del polímero de 23 eslabones SABH3_{BID}B ("SAHB3b") a un polímero de 16 eslabones ocasiona la pérdida de helicidad α .

La figura 10a representa los resultados de un estudio que muestra que la cinética de proteolisis de tripsina in vitro se retarda 3,5 veces por la reticulación de SABH3_{BID}A.

- La figura 10b representa los resultados de un estudio de estabilidad en suero ex vivo de péptidos, que demuestra un aumento de 10 veces en la vida media del péptido reticulado en comparación con el péptido no modificado.
- La figura 10c representa los resultados de un estudio in vivo que demuestra que SAHB3_{BID}A se mantiene a concentraciones séricas más elevadas con el tiempo en comparación con el péptido BID BH3.
- 5 La figura 11a representa los resultados de un estudio que demuestra que los péptidos SAHB3_{BID} muestran gran afinidad de unión a GST-BCL2 en un ensayo de unión competitiva de polarización con fluorescencia.
- La figura 11b representa los resultados de un estudio que demuestra que los mutantes del punto Gly a Glu de referencia negativa de SAHB3_{BID}A y B son aglutinantes relativamente mediocres.
- 10 La figura 11c representa los resultados de un estudio que demuestra que el truncamiento de SAHB3_{BID}B desde un polímero de 23 eslabones hasta un polímero de 16 eslabones da como resultado una caída de más de 6 veces en K_i, coincidente con una disminución significativa en el porcentaje de helicidad del compuesto truncado.
- La figura 11d representa los resultados de un ensayo de unión directa de polarización con fluorescencia de BCL-2 que demuestran una mejora de más de 6 veces en la afinidad de unión de SAHB3_{BID}A comparado con BID BH3 no modificado.
- 15 La figura 11e representa los resultados de un ensayo de unión directa de polarización con fluorescencia de BAX que demuestran que la incorporación de una reticulación produce la unión mensurable de SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A a un miembro proapoptósico de la familia BCL-2 de multidominio. El péptido BID BH3 no modificado no presenta ningún enlace.
- 20 La figura 11f representa los espectros de HSQC que demuestran un cambio de configuración en BCL-X_L marcado con 15N tras la unión a SAHB3_{BID}A, que es similar a la observada tras la unión a BID BH3, lo que confirma que SAHB3_{BID}A se une al punto hidrófobo definido de BCL-X_L.
- Las figuras 12a y 12b representan los resultados de los estudios que muestran el porcentaje de citocromo c liberado por los compuestos SAHB3_{BID} de mitocondrias de hígado de ratón purificados.
- 25 Las figuras 13a y 13b representan los resultados de un estudio que demuestra que la liberación de citocromo c provocada por SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID}B es más rápida y más potente que la del péptido no modificado.
- La figura 14 representa los resultados de un estudio que demuestra que la mutación Gly a Glu de SAHB3_{BID}A elimina selectivamente la liberación de citocromo dependiente de Bak, lo que pone de relieve la especificidad de acción de la liberación S de citocromo c provocada por SAHB3_{BID}A mostrada en la figura 13.
- 30 La figura 15 representa los resultados de un estudio que demuestra que las células Jurkat de leucemia de linfocitos T, tras la exposición a FITC-BID BH3 y hélice 6 de FITC-BID, carecen de marcaje fluorescente mientras que las células de leucemia linfocitos T de Jurkat, tras la exposición a FITC-SAHB3_{BID} demuestran una señal positiva de FITC, y que estos resultados no se alteran significativamente por tratamiento con tripsina de las células.
- 35 La figura 16a representa los resultados de un estudio que demuestra que los linfocitos T de Jurkat expuestos a péptidos reticulados con FITC-SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A demostraron marcaje fluorescente, mientras que los linfocitos T de Jurkat expuestos a péptidos FITC-BID y FITC-BID(G→S) de BH3 no modificado no lo hicieron.
- La figura 16b representa los resultados de un estudio que demuestra que la importación celular de FITC-SAHB3_{BID}A depende del tiempo a 37°C, según se evaluó por análisis FACS.
- 40 Las figuras 17a y 17b representan los resultados de un estudio que muestra linfocitos T Jurkat tratados con FITC-péptidos a 4°C y 37°C. La figura 17a muestra que FITC-BID BH3 no marca las células, ni a una ni a otra temperatura, y FITC-SAHB3_{BID}A marcó las células a 37°C, pero no a 4°C. La figura 17b muestra que la hélice 6 de FITC-BID marca pero también permeabiliza las células independientemente de la temperatura. Sin embargo, por el contrario, FITC-SAHB3_{BID}A sólo marca las células a 37°C y lo hace sin permeabilización celular, en consonancia con el transporte activo de SAHB3_{BID}A por vía endocítica.
- 45 La figura 17c representa los resultados de un estudio que demuestra que las linfocitos T Jurkat, cuando se preincubaban con o sin azida de sodio y 2-desoxiglucosa seguido de tratamiento con FITC-péptidos, no mostraban ningún marcaje ni para una ni para otra de estas condiciones con el polipéptido FITC-BID BH3. Las células mostraron una reducción de marcaje para FITC-SAHB3_{BID}A bajo azida de sodio y las condiciones de 2-desoxiglucosa, y mostraron marcaje con la hélice 6 de FITC-BID en ambas condiciones. Estos resultados están en consonancia con una absorción celular dependiente de ATP (por ejemplo, vía endocitosis) para importación de SAHB3_{BID}.
- 50 La figura 18 representa los resultados de un estudio que demuestra que la absorción de FITC-SAHB3_{BID}A no se inhibe por tratamiento celular con el glicosaminoglicano heparina, lo que indica que hay distinciones entre el

mecanismo de unión y absorción de FITC-SAHB3_{BID}A comparado con otros péptidos de penetración celular (PPC), tales como TAT de VIH y péptidos de Antennapedia.

5 La figura 19 representa los resultados de un estudio que demuestra que los compuestos FITC-SAHB3_{BID}A presentan marcaje citoplásmico con una distribución vesicular en linfocitos T Jurkat, mientras que en la membrana plasmática la fluorescencia no es evidente. Por otra parte, FITC-BID BH3 no presenta marcaje celular de las células y la hélice 6 de FITC-BID 6 marca las células difusamente y produce destrucción estructural significativa.

La figura 20 representa los resultados de un estudio que demuestra que FITC-SAHB3_{BID}A se localiza junto con un marcador de membrana mitocondrial en linfocitos T Jurkat.

10 La figura 21a y la figura 21b representa los resultados de un estudio que demuestra que FITC-SAHB3_{BID}A localiza en vivo junto con linfocitos T Jurkat que sobreexpresan BCL-2 con endosomas marcados con dextrano pero no endosomas de transferencia marcados, lo que indica que FITC-SAHB3_{BID}A es importado en las células por pinocitosis en fase líquida.

La figura 21c representa los resultados de un estudio que demuestra que 24 horas después del tratamiento, FITC-SAHB3_{BID}A se localiza en las células vivas junto con mitocondrias marcados por MitoTracker.

15 Las figuras 22a, 22b y 22c representan los resultados de un estudio que demuestra que FITC-SAHB3_{BID}A desencadena la interrupción metabólica de manera sensible a la dosis en las estirpes celulares de leucemia ensayadas, mientras que BID BH3 y SAHB3_{BID (G→E)}A no tenían esencialmente ningún efecto en este intervalo de dosis.

20 La figura 23 representa los resultados de un estudio que demuestra que SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID}B provocaban apoptosis hasta en el 50% de las células Jurkat intactas a 10 μM, un efecto inhibido específicamente por la sobreexpresión de BCL-2 (barras negras). El péptido BH3 BID no modificado y los mutantes gly a glu no tuvieron ningún efecto en comparación con el control sin tratamiento.

25 La figura 24 representa los resultados de un estudio que muestra la respuesta de dosis de células Jurkat que sobreexpresan BCL-2 tratadas con SAHB3_{BID}A, SAHB3_{BID(G→E)} y SAHB3_{BID(G→S)}A. Mientras SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A puede superar la inhibición con BCL-2 de la apoptosis en este intervalo de dosis, el mutante puntual gly a glu no tiene efecto.

La figura 25 representa los resultados de un estudio que demuestra que SAHB3_{BID}A trató estirpes celulares REH, MV4 de leucemia; 11, y SEMK2 se sometió a provocación de apoptosis específica, mientras que el mutante puntual SAHB3_{BID(G→E)}A gly a glu no tuvo ningún efecto sobre las células.

30 Las figuras 26a y 26b representan los resultados de un estudio que demuestra que tanto SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A suprimieron el crecimiento de leucemia de SEMK2 en ratones NOD-SCID, con SAHB3_{BID(G→E)}A lo que demuestra una potencia mayor que SAHB3_{BID}A.

35 La figura 27a y la figura 27b representan los resultados de un estudio que demuestra que SAHB3_{BID}A mitiga la evolución de la leucemia de SEMK2 respecto al vehículo en ratones NOD-SCID. Un efecto sensible a la dosis se observa en la FIG. 27a.

Las figuras 27c, 27d y 27e ilustran los resultados de un estudio en animales que demuestra que SAHB3_{BID}A inhibe el crecimiento de RS4; la leucemia 11 respecto al vehículo en ratones SCID de color beige, con una prolongación estadísticamente significativa de la supervivencia en ratones tratados con SAHB3_{BID}A en comparación con las referencias del vehículo.

40 La figura 27f representa los resultados de un nuevo estudio en animales que demuestra que SAHB3_{BID}A produce remisión de RS4; leucemia 11 en ratones SCID de color beige, a diferencia de los ratones tratados SAHB3_{BID(G→E)}A y con el vehículo que demuestran evolución de la leucemia.

Las figuras 28a-28h representan ejemplos de varios dominios alfa helicoidales de proteínas miembros de la familia BCL-2 (SEC. ID. n° 1 a n° 83, respectivamente) sensibles a la reticulación.

45 Descripción detallada

50 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que polipéptidos con dominio helicoidal alfa reticulados de proteínas de la familia BCL-2 han mejorado las propiedades farmacológicas sobre sus equivalentes no reticulados (por ejemplo, aumento de la hidrofobicidad, resistencia a la escisión proteolítica, afinidad de unión, actividad biológica in vitro e in vivo). Por otra parte, se ha descubierto inesperadamente que los polipéptidos reticulados pueden penetrar la membrana celular mediante un mecanismo de transporte dependiente de la temperatura y la energía (por ejemplo, endocitosis, específicamente pinocitosis en fase líquida). Los polipéptidos comprenden una fijación entre dos aminoácidos sintéticos, fijación que mejora significativamente la estructura secundaria alfa helicoidal del polipéptido. En general, la fijación se extiende a través de la longitud de una o dos espiras helicoidales

(es decir, aproximadamente 3, 4 o aproximadamente 7 aminoácidos). Por consiguiente, 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 la reticulación. Así, por ejemplo, donde un péptido tiene la secuencia ... Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉..., las reticulaciones entre Xaa₁ y Xaa₄, o entre Xaa₁ y Xaa₅, o entre Xaa₁ y Xaa₈ son útiles como lo son las reticulaciones entre Xaa₂ y Xaa₅, o entre Xaa₂ y Xaa₆, o entre Xaa₂ y Xaa₉, etc. Además, se preparó un modelo de polipéptido que incorpora dos conjuntos de reticulaciones con uno situado entre Xaa₁ y Xaa₅ y otro entre Xaa₉ y Xaa₁₃. La doble reticulación se consiguió mediante control cuidadoso de la estereoquímica de las reacciones de metátesis de dobles enlaces. Por lo tanto, la invención comprende la incorporación de más de una reticulación dentro de la secuencia del polipéptido para estabilizar aún más la secuencia o facilitar la estabilización de los tramos de polipéptidos más largos. Si los polipéptidos son demasiado largos para ser fácilmente sintetizados en una parte, péptidos reticulados sintetizados de forma independiente pueden combinarse por una técnica denominada ligadura química natural (Bang, et al., J. Am. Chem. Soc. 126:1377).

Los nuevos polipéptidos reticulados son útiles, por ejemplo, para imitar o estudiar proteínas o polipéptidos que tienen uno o más dominios alfa-helicoidales. Una familia de proteínas, donde los miembros de la familia tienen por lo menos un dominio alfa helicoidal es la familia BCL-2 de proteínas. Estas proteínas están implicadas en las rutas apoptósicas celulares. Algunos miembros de la familia BCL-2 tienen una función proapoptósica, otros tienen una función antiapoptósica, y aún otros cambian las funciones con un cambio en las condiciones celulares. Por consiguiente, es deseable preparar polipéptidos estabilizados que imiten uno o más motivos de los miembros de la familia BCL-2, modulando de este modo una variedad de actividades relacionadas con BCL-2.

20 *Síntesis química de un grupo de compuestos SAHB₃_{BID}*

Se sintetizaron cadenas laterales olefínicas de longitud variable que contienen aminoácidos sintéticos α,α -disustituidos según el esquema en la FIG. 3 (Williams et al. 1991. J. Am. Chem. Soc. 113:9276; Schafmeister et al. 2000 J. Am. Chem. Soc. 122:5891). Se diseñaron péptidos BID BH3 químicamente reticulados sustituyendo dos o cuatro aminoácidos de origen natural por los aminoácidos sintéticos correspondientes (FIG. 4a). Las sustituciones se hacen en posiciones discretas, es decir, las "posiciones i e $i+4$ " o las " i e $i+7$ posiciones", que facilitan la química de reticulación colocando restos de reactivos en la misma cara de la hélice α (figura 4b). Aminoácidos muy conservados entre las proteínas apoptósicas, además de las secuencias que resultan ser importantes en las interacciones proteína-proteína basadas en estudios cristalográficos de rayos X y de RMN (Muchmore et al. 1996. Nature 381:335; Sattler et al. 1997 Science 275:983), no se sustituyeron específicamente en determinadas circunstancias, los aminoácidos conservados podrían sustituirse por otros aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos sintéticos de origen artificial) para mejorar la actividad (este efecto se puede observar en los mutantes de SAHB₃_{BID} descritos en la presente memoria). Se generaron compuestos SAHB₃_{BID} por síntesis de péptidos en fase sólida seguido de reticulación de los aminoácidos sintéticos basada en metátesis de olefinas mediante sus cadenas laterales que contienen olefinas. Las variaciones de los compuestos SAHB₃_{BID} generados se ilustran en la FIG. 5a. Las variantes de SAHB₃_{BID} (SAHB_A) que incorporan mutaciones específicas conocidas por alterar la función de BID (Wang et al. 1996 Genes Dev. 10:2859) también se construyeron para servir como referencias negativas en los experimentos biológicos (FIG. 5a). Los terminales amino de los compuestos seleccionados se modificaron además con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o lisina conjugada con biotina para generar compuestos SAHB₃_{BID} marcados para estudios de permeabilidad celular y ensayos bioquímicos, respectivamente (figura 5a). En varias síntesis, se añadió triptófano en el terminal C a la secuencia para servir como un marcador de UV para purificación y determinación de la concentración; el ácido glutámico del terminal N se eliminó en varios péptidos para aumentar el pI total del compuesto para facilitar potencialmente la penetración celular (ver a continuación). El método de metátesis se aplicó fácilmente a la generación de SAHB₃ alternativos, incluyendo SAHB₃_{BAD} y SAHB₃_{BIM} (figura 5a).

Los aminoácidos sintéticos (enantiómeros R y S del aminoácido olefínico en el carbono 5 y el enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 8) se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) (Varian Mercury 400) y espectrometría de masas (Micromass LCT). La síntesis de péptidos se llevó a cabo en manual o en un sintetizador automático de péptidos (Applied Biosystems, modelo 433A), utilizando condiciones en fase sólida, resina AM de amida de Rink (Novabiochem) y química del grupo protector Fmoc de la cadena principal. Para el acoplamiento de aminoácidos naturales protegidos con Fmoc (Novabiochem), se emplearon 10 equivalentes de aminoácido y una relación molar de 1:1:2 de reactivos de acoplamiento HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA. Los aminoácidos artificiales (4 equiv.) se acoplaron con una relación molar 1:1:2 de HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA. Se llevó a cabo la metátesis de olefinas en la fase sólida utilizando catalizador de Grubbs 10 mM (Blackwell et al. 1994 mencionado anteriormente) (Strem Chemicals) disuelto en diclorometano desgasificado y se hizo reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los terminales amino de los compuestos seleccionados se modificaron además con b-alanina e isotiocianato de fluoresceína (FITC [Sigma]/DMF/DIEA) para generar compuestos marcados con fluorescencia. Se incorporó un triptófano en el terminal C para servir como marcador de UV para la purificación y determinación de la concentración; se sintetizaron también compuestos SAHB_A sin el triptófano en el terminal C y ácido glutámico en el terminal N, la última modificación se realizó para aumentar el pI total de las moléculas. El aislamiento de compuestos metatesizados se consiguió por desprotección en la que interviene como mediador el ácido trifluoroacético y escisión, precipitación en éter para dar el producto en bruto, y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Varian ProStar) en una columna C₁₈ de

fase inversa (Varian) para proporcionar los compuestos puros. La composición química de los productos puros se confirmó por espectrometría de masas LC/MS (Micromass LCT interconectado con el sistema Agilent 1100 HPLC) y análisis de aminoácidos (Applied Biosystems, modelo 420A).

5 La figura 5b representa esquemáticamente un subconjunto de los péptidos en la figura 5a, incluyendo la estereoquímica de los aminoácidos olefínicos (enantiómeros R y S del aminoácido olefínico en el carbono 5 y el enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 8).

Los compuestos SAHB3_{BID} presentan aumento de helicidad α

10 Se examinó el porcentaje de helicidad de los dominios BH3 proapoptósicos, y se encontró que estos péptidos no modificados eran predominantemente espirales al azar en solución, con un contenido de helicoidal α total inferior al 25% (figura 6). En resumen, se disolvieron los compuestos en solución acuosa 50 mM de fosfato de potasio de pH 7 a concentraciones de 25-50 mM. Se obtuvieron espectros CD en un espectropolarímetro Jasco J-710 a 20°C utilizando los siguientes parámetros estándar de medición: longitud de onda, 190-260 nm; resolución de la etapa, 0,5 nM; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; ancho de banda, 1 nm; longitud de la trayectoria, 0,1 cm. El contenido en α -helicoidal de cada péptido se calculó dividiendo la elipticidad media de resto $[\phi]_{222\text{obs}}$ por el $[\phi]_{222\text{obs}}$ descrito para un modelo deca péptido helicoidal (Yang et al. 1986 Methods Enzymol. 130:208).

15 En cada caso, la reticulación química o las reticulaciones químicas aumentaron el porcentaje de α -helicidad del dominio BH3 de BID, con SAHB3_{BID}A y B que consiguen aumento de más de 5 veces (FIG. 7). SAHB3_{BID(G-E)}A, mutante de SAHB3_{BID}A en el punto Gly a Glu de referencia negativa, presenta contenido helicoidal similar a SAHB3_{BID}A (figura 8). Así pues, la reticulación de todos los hidrocarburos puede transformar un péptido apoptósico que es esencialmente una espiral aleatoria en solución acuosa en uno que es predominantemente de estructura α -helicoidal. Curiosamente, la importancia de la cuarta espira de la hélice en la estabilización de péptidos BID BH3 se pone de relieve por la disminución de la helicidad observada cuando el polímero de 23 eslabones SAHB3_{BID}B se trunca en el polímero de 16 eslabones, SAHB3_{BID(tr)}B (figura 9).

La reticulación de todos los hidrocarburos aumenta resistencia a la proteasa de los compuestos SAHB3_{BID}

25 El enlace amídico del eje central del péptido es sensible a la hidrólisis por las proteasas, lo que hace vulnerable a los compuestos peptídicos a una rápida degradación in vivo. La formación de la hélice peptídica, sin embargo, entierra el eje central amídico y por lo tanto le protege de la escisión proteolítica. SAHB3_{BID}A se sometió a proteólisis in vitro con tripsina para evaluar cualquier cambio en la velocidad de degradación en comparación con el péptido BID BH3 no modificado. SAHB3_{BID}A y el péptido no modificado se incubaron con tripsina agarosa y las reacciones se inactivaron en varios puntos de tiempo por centrifugación y posterior inyección en HPLC para cuantificar el sustrato residual por absorción ultravioleta a 280 nm. En resumen, los compuestos BID BH3 y SAHB3_{BID}A (5 mcg) se incubaron con tripsina agarosa (Pierce) (S/E ~ 125) para 0, 10, 20, 90 y 180 minutos. Las reacciones se inactivaron en centrifugadora de sobremesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se analizó cuantitativamente por detección del pico en HPLC a 220 nm. La reacción proteolítica presentaba cinética de primer orden y la constante de velocidad, k, se determinó en una gráfica de ln [S] en función del tiempo ($k = -1 \times$ pendiente) (FIG. 10a). El experimento, realizado por triplicado, demostró un aumento de 3,5 veces en la resistencia de la tripsina de SAHB3_{BID}A en comparación con el péptido no modificado. Por lo tanto, una mayor protección de enlaces amida sensibles a la tripsina al enterrarlos en el núcleo de la hélice α proporciona un compuesto peptídico más estable, y por lo tanto puede hacer que dichos compuestos sean particularmente estables en el suero.

30 Para los estudios de estabilidad en suero ex vivo, los péptidos BID BH3 y SAHB3_{BID}A (2,5 mcg) conjugados con FITC se incubaron con suero fresco de ratón (20 ml) a 37°C durante 0, 1, 2, 4, 8, y 24 horas. La concentración de compuesto FITC intacto se determinó por congelación ultrarrápida de las muestras de suero en nitrógeno líquido, liofilización, extracción en acetonitrilo/agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% 50:50, seguida de análisis cuantitativo por HPLC utilizando detección de fluorescencia en los ajustes de excitación/emisión de 495/530 nm. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 10b.

35 Para investigar la estabilidad in vivo de SAHB3_{BID}A, se inyectaron 10 mg/kg de péptido BH3 de BID conjugado con FITC y SAHB3_{BID}A en ratones NOD-SCID y muestras de sangre extraídas a las 0, 1, 4 y 22 horas tras la inyección. A continuación, se determinaron las concentraciones de compuesto FITC intacto en 25 μ l de suero fresco. Los resultados de este análisis, representados en la figura 10c, demuestran que SAHB3_{BID}A era fácilmente detectable durante un período de 22 horas, con el 13% del aporte todavía cuantificable a las 22 horas. Por el contrario, sólo el 12% de BID BH3 era detectable una hora después de la inyección.

Los compuestos SAHB3_{BID} mantienen una alta afinidad de unión antiapoptósica

40 Las reticulaciones de todos los hidrocarburos se colocaron selectivamente en la cara cargada de la hélice anfipática de BID BH3 para evitar interferencias con las interacciones críticas entre el punto de unión de proteínas multidominio apoptósicas y los restos hidrófobos de la hélice de BID BH3. Se realizaron experimentos de unión competitiva de polarización con fluorescencia para evaluar la eficacia de los compuestos SAHB3_{BID} en competencia con el péptido BID BH3 sin modificar marcado con FITC para la unión de GST-BCL-2. Todos los compuestos SAHB3_{BID}

demuestran alta afinidad de unión a GST-BCL2, con SAHB3_{BID}A y B, los dos compuestos con el mayor porcentaje de helicidad, presentando asimismo la más alta afinidad de unión (FIG. 11a). A destacar, la mutación Gly a Glu de SAHB3_{BID}A y B elimina el enlace de alta afinidad, como se predijo a partir de los estudios anteriores (figura 11b). Se determinó además que la mutación Gly a Ser de SAHB3_{BID}A suprime el enlace a BCL-2 en este ensayo (datos no representados). El truncamiento del polímero de 23 eslabones SAHB3_{BID}B a un polímero de 16 eslabones da como resultado la pérdida de afinidad de unión a BCL-2, coincidente con la disminución en helicidad α descrita anteriormente (figura 11c).

El péptido BID BH3 marcado con FITC se une a BCL-2 con una KD de 220 nM, y una vez unido, se produce el desplazamiento de esta interacción por BID BH3 no marcado con una CI50 de 838 nM. Esto apoya un modelo mediante el cual la unión de BH3 a BCL-2 desencadena un cambio de configuración general que favorece la interacción, dando como resultado la necesidad de cantidades en exceso de péptido no marcado para desplazar el FITC-BID BH3 marcado con FITC preunido. Además se ha demostrado que BAD del dominio BH3 tiene una KD aumentada de 41 nM para la unión a BCL-2, y que se puede desplazar FITC-BID BH3 preunido con una CI50 de 173 nM. En un experimento similar, se descubrió que SAHB3_{BID}A desplaza a FITC-BID BH3 de BCL-2 con una CI50 de 62 nM, lo que refleja un aumento de más de 13 veces en la potencia de desplazamiento en comparación con el péptido BID BH3 sin modificar. Estos datos confirman que SAHB3_{BID}A se une con mayor afinidad a BCL-2 en comparación con péptidos BH3 no modificados, y sugieren que la preorganización de la estructura α -helicoidal por reticulación química proporciona una ventaja cinética para la unión a la diana.

Los ensayos de unión directa por polarización de fluorescencia demostraron que la incorporación de la reticulación en péptido BID BH3 dio como resultado una mayor afinidad de unión de SAHB3_{BID}A tanto para BCL-2, proteína multidominio antiapoptósica, como para BAX, proteína multidominio proapoptósica, en comparación con péptido BID BH3 sin modificar (figuras 11d y 11e). Un ensayo de unión por polarización de fluorescencia de BCL-2 directa demostró un aumento de 6 veces en la afinidad de unión a BCL-2 de SAHB3_{BID}A (KD, 38,8 nM) en comparación con el péptido BID BH3 sin modificar (KD, 269 nM) (figura 11d). Una mutación Gly a Glu, SAHB_{A(G→E)} (KD, 483 nM), elimina la alta afinidad de unión y sirve como referencia útil (figura 11d). En resumen, BL21 de *Escherichia coli* (DE3) que contiene el plásmido que codifica GST-BCL-2 suprimida del terminal C se cultivaron en caldo de cultivo Luria que contiene ampicilina y se provocaron con IPTG 0,1 mM. Los sedimentos bacterianos se volvieron a poner en suspensión en tampón de lisis (1 mg/ml de lisozima, 1% de Triton X-100, 0,1 mg/ml de PMSF, 2 μ g/ml de aprotinina, 2 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de pepstatina A en PBS) y se expusieron a ultrasonidos. Tras la centrifugación a 20.000 \times g durante 20 min., el sobrenadante se aplicó a una columna de perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Las perlas se lavaron con PBS y se trataron con glutatión 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) para eluir la proteína, que a continuación se dializó frente a tampón de ensayo de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 [pH 7,4]). Los compuestos con fluorescencia (25 nM) se incubaron con GST-BCL2 (25 nM-1000 nM) en tampón de unión a temperatura ambiente. Se midió la actividad de unión por polarización de fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B de Perkin-Elmer. Los valores de KD se determinaron por análisis de regresión no lineal utilizando el programa informático Prism (GraphPad). Se preparó la proteína BAX completa como se ha descrito anteriormente (Suzuki et al., Cell, 103:645) y el ensayo de polarización de fluorescencia se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

SAHB3_{BID}A se une a BCL-X_L

Para determinar si SAHB3_{BID}A interactúa específicamente con la ranura de unión definida de una proteína multidominio antiapoptósica, se registró un espectro de BCL-X_L marcada con 15N con correlación de un solo cuanto heteronuclear 15N/1H de dos dimensiones (HSQC) antes y después de la adición de SAHB3_{BID}A y se comparó con el espectro de BID BH3/15N-BCL-X_L correspondiente. En resumen, BL21 de *Escherichia coli* (DE3) que contiene el plásmido que codifica BCL-X_L suprimido del terminal C se cultivaron en medio mínimo M9 que contenía 15NH₄Cl (Cambridge Isotope Laboratories) para generar la proteína marcada con 15N de manera uniforme. Las proteínas recombinantes se aislaron de las bacterias. Se generaron y se purificaron los péptidos SAHB3_{BID}A y BID BH3 como se describió anteriormente. Se prepararon los complejos siguientes 1:1 a 0,1 mM en fosfato de potasio 50 mM (pH 7), cloruro de sodio 50 mM, 5% de DMSO en D₂O o H₂O/D₂O (95:5):15N-BCL-X_L/BID BH3 sin marcar, 15N-BCL-X_L/SAHB3_{BID}A sin marcar. Se registraron espectros mono cuánticos heteronucleares 15N/1H en dos dimensiones para los dos complejos y se analizaron los cambios en la resonancia tras la unión del ligando.

La similitud general de los espectros de HSQC indica que los cambios estructurales que se producen en BCL-X_L después de la adición de SAHB3_{BID}A son casi idénticos a los observados con el péptido BID BH3 (FIG. 11f).

Los compuestos SAHB3_{BID} desencadenan una liberación rápida y específica de citocromo c mitocondrial

Para evaluar la actividad biológica de los compuestos SAHB3_{BID} in vitro, se realizaron ensayos de liberación de citocromo c utilizando mitocondrias de hígado de ratón purificados. Se incubaron mitocondrias (0,5 mg/ml) durante 40 minutos con 1 μ M y 100 nM de compuestos SAHB3_{BID} y a continuación los sobrenadantes y fracciones mitocondriales se aislaron y se sometieron a ensayo ELISA de citocromo c. La liberación del citocromo c de fondo (10-15%) se sustrajo de liberación total para cada muestra, y se determinó el porcentaje real de liberación de citocromo c (figura 12). El experimento idéntico se llevó a cabo simultáneamente en mitocondrias de hígado de ratón aislados de ratones Bak-/-, que no liberan citocromo c mitocondrial en respuesta a la activación de BID-BH3; los

datos de las mitocondrias BAK^{-/-} por lo tanto, sirven como referencia negativa para la liberación del citocromo c en la que interviene como mediador BAK en respuesta a tratamientos con SAHB3_{BID}. En cada caso, excepto para el SAHB3_{BID}E doble reticulado (que puede carecer de aminoácidos críticos para la actividad biológica o, en este caso, estar excesivamente limitado por las dobles reticulaciones), existe aproximadamente una duplicación de la liberación del citocromo c en respuesta a compuestos SAHB3_{BID} 1 μM en comparación con el péptido sin modificar (figura 12a). A esta dosis se observa liberación de citocromo c independiente de BAK con SAHB3_{BID}A, B, y, en particular, D. Considerando que esta liberación de citocromo c puede representar un efecto no específico de las hélices α perturbador de la membrana, la función de un componente de liberación de citocromo c, independiente de BAK, provocado por SAHB3_{BID}, es digna de una exploración más profunda. Curiosamente, el compuesto SAHB3_{BID} que provoca el nivel más significativo de liberación del citocromo c independiente de BAK, SAHB3_{BID}D, es también el más hidrófobo de los compuestos SAHB3_{BID}; SAHB3_{BID}D eluye de la columna C18 de fase inversa a 95% de acetonitrilo/5% de agua, en comparación con otros compuestos de SAHB3_{BID} que eluyen en acetonitrilo 50-75%. Los mutantes de BID con dominios BH3 defectuosos pueden activar la movilización del citocromo c independiente de BAK (Scorrano et al., Dev. Cell, 2:55), y la hélice 6 de BID muy hidrófoba se ha implicado en esta actividad (L. Scorrano, S.J. Korsmeyer, resultados no publicados). Es plausible que SAHB3_{BID}D muestre liberación del citocromo c tanto dependiente como independiente de BAK al imitar las características de las hélices 3 y 6 de BID. A la dosificación diez veces menor SAHB3_{BID} A y B mantienen la actividad selectiva de liberación de citocromo c dependiente de BAK (FIG. 12b). La potencia de SAHB3_{BID}B, en particular, se compara favorablemente con la proteína BID miristolada activada al máximo, que libera aproximadamente el 65% del citocromo c en estas condiciones a dosis de 30 nM.

Los compuestos SAHB3_{BID} más activos, A y B, se sometieron a estudios cinéticos adicionales para determinar si la organización helicoidal previa puede desencadenar la liberación más rápida del citocromo c en comparación con el péptido no modificado. Al igual que en el experimento anterior, las mitocondrias de hígado de ratón de ratones naturales y Bak^{-/-} se expusieron a los compuestos a diferentes concentraciones y se ensayó la liberación del citocromo c a intervalos de 10 y 40 minutos. Mientras que a los 10 minutos el péptido no modificado da lugar a la liberación de menos de 10% en la dosis más alta probada (1 μM), SAHB3_{BID}B tiene una CE50 para la liberación en este punto de tiempo de poco menos de 400 nM, con la liberación de citocromo casi máxima a 1 μM (figura 13a). Del mismo modo, SAHB3_{BID}A desencadena una liberación significativa de citocromo c en el intervalo de tiempo de 10 minutos. La EC50 para la liberación de citocromo c en 40 minutos es 2,9 μM para el péptido no modificado y 310 y 110 nM para SAHB3_{BID}A y B, respectivamente (figura 13b). Por lo tanto, SAHB3_{BID}A y B presentan una mejora de 10 a 25 veces en la actividad de liberación de citocromo c en el punto de tiempo de 40 minutos. Mientras que la liberación de citocromo c dependiente de BAK aumenta con el tiempo, la liberación independiente de BAK no cambia entre los puntos de tiempo de 10 y 40 minutos, lo que sugiere que esta liberación distinta ocurre temprano y se alcanza el máximo en 10 minutos. A destacar que el mutante del punto Gly a Glu de referencia negativa de SAHB3_{BID}A, SAHB3_{BID}(G→E)A, sólo genera liberación de citocromo c independiente de Bak, lo que confirma que SAHB3_{BID}A funciona por la vía de la apoptosis mitocondrial dependiente de Bak (figura 14). Considerados en conjunto, estos datos de liberación de citocromo c indican que SAHB3_{BID}A y B son capaces de inducir específicamente la liberación de citocromo c dependiente de BAK con potencia y cinética notablemente mayores en comparación con el péptido no modificado.

40 *Los compuestos SAHB3_{BID} penetran en las células intactas*

Unos compuestos SAHB3_{BID} modificados con fluoresceína, péptidos BID BH3, y un péptido de la hélice 6 de BID se incubaron con células Jurkat de leucemia de linfocitos T en cultivo durante 4 a 24 horas y posteriormente se clasificaron por FACS para determinar el porcentaje de marcador de las células de leucemia. A fin de evitar confundir los resultados de los compuestos unidos a la superficie celular, las células Jurkat se lavaron a fondo y se sometieron a sobredigestión con tripsina, de acuerdo con informes recientes. Para cada compuesto probado, no hubo ningún cambio significativo en el perfil de la señal con FITC después de la digestión con tripsina, lo que sugiere que en el caso de estos péptidos, pocos o ningún compuesto marcado con FITC se une a la superficie (figura 15). Mientras que las células tratadas con BH3 BID fueron negativas a FITC, tanto las células tratadas con FITC-SAHB3_{BID}A como con FITC-SAHB3_{BID}(G→E)A resultaron positivas a FITC, como se indica por un desplazamiento hacia la derecha de la señal de FITC (figura 16a). El perfil similar de FITC-SAHB3_{BID}A y FITC-SAHB3_{BID}(G→E)A en estos estudios de permeabilidad celular es particularmente importante, dada la utilización del compuesto mutante puntual como referencia negativa en experimentos biológicos. La hélice 6 de BID, péptido que perturba la membrana permeable de las células, se utilizó como referencia positiva para el marcaje con FITC en este experimento.

Inesperadamente, se descubrió que con FITC-SAHB3_{BID}A parece entrar en la célula por endocitosis, una vía de transporte dependiente de la temperatura y la energía. La importación celular de FITC-SAHB3_{BID}A se produjo en función del tiempo (figura 16b). Cuando la endocitosis celular se inhibió al realizar el experimento a 4°C (figuras 17a, 17b) o por tratamiento con los venenos energéticos azida de sodio y 2-desoxiglucosa (figuras 17c), el marcaje de células se inhibió o disminuyó notablemente, respectivamente. A destacar que las células Jurkat marcadas por FITC-SAHB3_{BID}A a 37°C son negativas a yoduro de propidio (PI), lo que confirma que el péptido reticulado no funciona meramente como un agente de permeabilización (figura 17b); por el contrario, la hélice 6 de FITC-BID penetra fácilmente a ambas temperaturas, permeabilizando eficazmente las células, como se prueba por el grado de positividad PI (figura 17b). Estos datos apoyan un mecanismo endocítico de entrada para los compuestos SAHB3_{BID},

de acuerdo con informes recientes citando la adherencia de la superficie celular seguida de endocitosis como mecanismo de entrada para otros péptidos de penetración celular (PPC), tales como el transactivador de la transcripción del VIH (TAT). Mientras que los PPC muy básicos, tales como TAT y Antennapedia, se cree que se concentran en la superficie celular por la adherencia a glucosaminoglicanos cargados negativamente la heparina no inhibió la importación de SAHB₃BID_A de una manera sensible a la dosis (figura 18). Las propiedades biofísicas de la hélice α anfipática de SAHB₃BID pueden facilitar distintos contactos celulares por interacciones electrostáticas y/o de la membrana lipídica.

Se emplearon experimentos de microscopia confocal a fin de determinar la localización intracelular de SAHB₃BID_A. Se incubaron células Jurkat de leucemia de linfocitos T con compuestos marcados con FITC como se describió anteriormente o con reposición de suero a las 4 horas seguido de otras 16 horas de incubación a 37°C, y después de lavar dos veces con PBS, se centrifugaron a 600 rpm durante 5 minutos en portaobjetos de vidrio Superfrost Plus (Fisher). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS, se incubaron con yoduro de TO-PRO-3 (100 nM) (Molecular Probes) para tñir por contraste los núcleos, se trataron con medio de montaje Vectashield (Vector) y a continuación se tomaron imágenes por microscopia confocal (BioRad 1024). Para los experimentos de doble marcaje, las células fijadas se incubaron además con anticuerpos primarios contra Tom20, y anticuerpos secundarios conjugados con rodamina antes de la tñción de contraste con TO-PRO-3. Para la microscopia confocal en vivo, se realizó doble marcaje de las células Jurkat con FITC-SAHB_A (10 μ M) y MitoTracker (100 nM, Molecular Probes), isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC)-dextrano 4,4 kD o 70 kD (25 mcg/ml, Molecular Probes), o Alexa Fluor 594-transferrina (25 mcg/ml, Molecular Probes) durante 4 horas (dextrano y transferrina) o 24 horas (MitoTracker). Debido a las limitaciones del fotoblanqueamiento, se utilizaron células Jurkat que sobreexpresan BCL-2 para microscopia confocal en vivo a fin de optimizar la formación de imágenes con FITC. El marcaje con FITC-SAHB_A de las mitocondrias era más brillante en las células Jurkat que sobreexpresan BCL-2 (de acuerdo con el mecanismo para la actividad de SAHB), y por lo tanto la captura de imágenes se facilitó utilizando estas células. Las células Jurkat tratadas se lavaron dos veces y a continuación se volvieron a poner en suspensión en PBS y preparaciones montadas en húmedo se analizaron con BioRad 1024 (Beth Israel/Deaconess Center for Advanced Microscopy) o Zeiss LSM510 microscopio confocal de barrido con láser (del Children's Hospital Boston Imaging Center).

En las secciones fijadas, los compuestos SAHB₃BID_A localizados en el borde citoplásmico de las células leucémicas, sin membrana plasmática o fluorescencia en la superficie evidente; el patrón vesicular de fluorescencia sugirió una localización específica de orgánulo (figuras 19a y 19b). En consonancia con los datos de FACS, las células Jurkat tratadas con FITC-BID BH3 no mostraron marcaje fluorescente (figura 19c). Mientras que las células tratadas con FITC-SAHB₃BID_A presentan fluorescencia intracelular selectiva y mantienen su estructura celular (figura 19a), las células tratadas con la hélice 6 de FITC-BID se marcan de manera difusa y muestran morfología celular alterada (figura 19d). Los estudios de localización conjunta con FITC-SAHB₃BID_A y un anticuerpo contra la proteína Tom20 de la membrana mitocondrial, muestran una amplia superposición de fluorescencia de SAHB₃BID_A con mitocondrias, el sitio previsto de dianas moleculares de SAHB₃BID (figura 20).

La toma de imágenes de células vivas realizada 4 horas después del tratamiento con SAHB demostró una localización conjunta inicial de FITC-SAHB_A con endosomas marcados con dextrano (4,4 kD y 70 kD) (figura 21a), pero no con endosomas marcados con transferrina (figura 21b), en consonancia con la absorción celular por pinocitosis en fase líquida (ref. 27 de manuscrito), la vía endocítica determinada para los péptidos TAT y Antp (ref. 28 de manuscrito). En un punto de tiempo de 24 horas, FITC SAHB_A intracelular presentaba mayor localización conjunta con mitocondrias marcados con MitoTracke en las células vivas (figura 21c) en consonancia con la localización mitocondrial conjunta observada en células fijadas utilizando un anticuerpo contra Tom20, proteína de la membrana externa mitocondrial (figura 20). Considerados en conjunto, los datos de FACS y de formación de imágenes confocal demuestran que la reticulación de todos los hidrocarburos permite a los compuestos SAHB₃BID_A ser importados por células intactas (por ejemplo, mediante un mecanismo de endocitosis).

Los compuestos SAHB₃BID desencadenan apoptosis de linfocitos B, linfocitos T y células de leucemia de linaje mixto (MLL)

A fin de evaluar si los compuestos SAHB₃BID podrían detener el crecimiento de las células de leucemia proliferantes en el cultivo se realizaron ensayos con MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, utilizando diluciones en serie de SAHB₃BID_A en linfocitos T (Jurkat), linfocitos B (REH) y células (MV4; 11, SEMK2, RS4; 11) de leucemia de linaje mixto (MLL) en cultivo. SAHB₃BID_A inhibió las células leucémicas a IC₅₀ de 2,2 (Jurkat), 10,2 (REH), 4,7 (MV4; 11), 1,6 (SEMK2) y 2,7 (RS4, 11) μ M (FIG. 22a). Ni el péptido BID BH3 ni el mutante puntual SAHB_{A(G→E)} tuvieron efecto en este intervalo de dosis (FIG. 22b, 22c).

Para evaluar si esta interrupción metabólica representaba provocación de apoptosis, las células Jurkat de leucemia se trataron con SAHB₃BID_A y B, SAHB₃BID_(G→E) A y B, y péptido BID BH3 sin modificar 10 μ M, en medio libre de suero durante 4 horas seguido de 16 horas de incubación en medio que contiene suero (es decir, concentraciones finales de péptido de 5 μ M), y a continuación se ensayó la apoptosis por detección por citometría de flujo de las células tratadas con anexina V. SAHB₃BID_A y B mostraron entre 40 y 60% de positividad a anexina V 20 horas después del tratamiento, mientras que el péptido no modificado y los mutantes puntuales de SAHB₃BID no tuvieron ningún efecto (figuras 23a y 23 b). Unos estudios comparables que utilizan péptidos BH3 no modificados con

reactivos portadores o hélices manipuladas con efectos perturbadores mitocondriales no específicos, necesitaron dosis de 20 a 300 μM para activar la apoptosis. Un experimento de control adicional que utiliza células Jurkat manipuladas para sobreexpresan BCL-2 se llevó a cabo posteriormente para evaluar si la apoptosis provocada por SAHB3_{BID} podría reducirse por exceso de BCL-2, lo que sugiere que los compuestos funcionan específicamente dentro de las células a través de la vía de apoptosis mitocondrial. De hecho, el efecto proapoptótico de SAHB3_{BID}A y B 10 μM en células Jurkats "naturales" se suprimió en las células que sobreexpresan BCL-2. Este efecto protector, sin embargo, puede ser superado mediante escalada de dosis de SAHB3_{BID}A, pero no de SAHB3_{BID(G→E)}A (FIG. 24); además, un mutante puntual Gly a Ser de SAHB3_{BID}A (SAHB3_{BID(G→S)}A), que no presenta afinidad de unión a BCL-2 (ver anteriormente), es igualmente eficaz como proapoptótico en las células Jurkat que sobreexpresan las "naturales" y BCL-2 (figura 24). Se realizaron además ensayos de provocación de apoptosis que utilizan SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A en las estirpes celulares REH, MV4; 11 y SEMK2 con resultados similares (figura 25). Considerados en conjunto, estos datos indican que los compuestos SAHB3_{BID} pueden penetrar y destruir las células proliferantes de leucemia. Los efectos proapoptóticos observados se suprimieron selectivamente por la mutación Gly a Glu de SAHB3_{BID}A y la sobreexpresión celular de BCL-2, resultados que ponen de relieve que los compuestos SAHB3_{BID} funcionan por la vía de la apoptosis mitocondrial definida.

SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→S)}A muestran supresión leucémica in vivo

Se sometieron ratones NOD-SCID a irradiación total del cuerpo de 300 cGy seguida de una inyección intravenosa de 4×10^6 células de leucemia SEMK2-M1 que presentan expresión estable de luciferasa. En los ratones se controló semanalmente el injerto de leucemia mediante el sistema de diagnóstico por la imagen in vivo (IVIS, Xenogen), que cuantifica la luminiscencia corporal total tras la inyección intraperitoneal de D-luciferina. El día 0, los ratones leucémicos se diagnosticaron por la imagen y después se trataron por vía intravenosa con 10 mg/kg de SAHB3_{BID}A,

SAHB3_{BID(G→S)}A, o sin inyección los días 1, 2, 3, 5, 6. La luminiscencia corporal total se midió los días 4 y 7. Haciendo referencia a la figura 26a, el análisis de la carga tumoral entre los grupos muestra supresión leucémica por SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→S)}A, en comparación con los ratones de referencia no tratados. Haciendo referencia a la figura 26b, las imágenes de luminiscencia corporal total muestran la leucemia más avanzada en el grupo sin tratar el día 7 (la densidad del color rojo, que representa alto nivel de leucemia, que se aprecia en todo el sistema esquelético) en comparación con los ratones tratados con SAHB3_{BID}A, lo que demuestra un nivel inferior y una enfermedad más localizada. Curiosamente, el mutante G→S, que no puede ser secuestrado por BCL-2 parece ser más potente que el compuesto original, SAHB3_{BID}A, en la supresión del crecimiento leucémico.

En otros experimentos con animales, los ratones leucémicos (generados como anteriormente) se diagnosticaron por imagen el día 0 y a continuación se trataron por vía intravenosa con 10 mg/kg de SAHB3_{BID}A, 5 mg/kg de SAHB3_{BID}A, o vehículo de referencia (5% de DMSO en D5W) los días 1, 2, 3, 6 y 7. La luminiscencia corporal total se midió los días 4 y 8. Haciendo referencia a la figura 27a, el análisis de la carga tumoral entre los grupos demuestra la supresión leucémica por SAHB3_{BID}A en función de la dosis en comparación con los ratones de referencia no tratados. Haciendo referencia a la figura 27b, las imágenes de luminiscencia corporal total muestran leucemia más avanzada en el grupo no tratado el día 8 (la densidad del color rojo representa alto nivel de leucemia) en comparación con los ratones tratados con SAHB3_{BID}A, cuya evolución leucémica está notablemente mitigada.

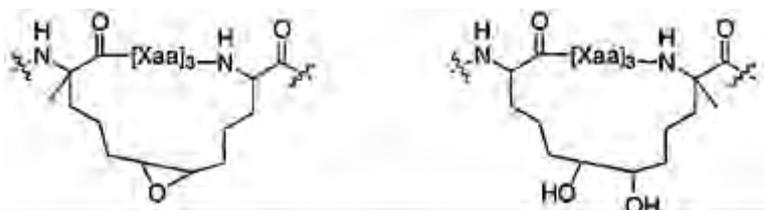
En experimentos adicionales con animales que mejor emplearon ratones SCID de color beige y células de leucemia RS4;11, el tratamiento con SAHB3_{BID}A suprimió sistemáticamente el crecimiento de la leucemia in vivo. Para el diagnóstico por la imagen in vivo de la leucemia, los ratones se anestesiaron con isoflurano inhalado (Abbott Laboratories) y se trató simultáneamente con inyección intraperitoneal de D-luciferina (60 mg/kg) (Promega). La emisión fotónica se fotografió (2 minutos de exposición) mediante el sistema de diagnóstico por la imagen in vivo (Xenogen) y bioluminiscencia corporal total cuantificado por integración del flujo fotónico (fotones/segundo) (Living Imagen Software, Xenogen). A partir del primer día del experimento, los ratones recibieron una inyección diaria en la vena caudal de SAHB3_{BID}A (10 mg/kg) o vehículo (DMSO al 5% en D5W) durante siete días. Los ratones fueron diagnosticados por la imagen los días 1, 3 y 5 y se controló la supervivencia diariamente durante todo el experimento. Las distribuciones de supervivencia de los ratones tratados con SAHB3_{BID}A y vehículo se determinaron utilizando el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba del orden logarítmico. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar la proporción de ratones en los que había fallado el tratamiento entre los días 3 y 5, en la que el fallo del tratamiento se definió como empeoramiento o muerte, y éxito como enfermedad estable o remisión. Los ratones muertos se sometieron a necropsia (Rodent Histopathology Core, DF/HCC).

Los ratones de referencia demostraron aceleración progresiva de crecimiento leucémico analizada cuantitativamente por el aumento de flujo bioluminiscente a partir de los días 1 a 5 (FIG. 27c). El tratamiento con SAHB3_{BID}A suprimió la expansión leucémica después del día 3, observándose remisión tumoral el día 5. Las imágenes representativas del ratón demuestran la infiltración leucémica progresiva del bazo y el hígado en ratones, pero remisión de la enfermedad en estos puntos anatómicos en ratones tratados con SAHB_A el día 5 de tratamiento (figura 27d). La mediana del tiempo hasta la muerte en esta cohorte fue de 5 días para los animales de referencia, mientras que ninguno de los animales tratados con SAHB_A muere durante el período de tratamiento de siete días, y en su lugar sobrevivieron durante una mediana de 11 días (figura 27e). El examen histológico de ratones tratados con SAHB_A no mostró ninguna toxicidad obvia del compuesto en el tejido normal. En un estudio adicional comparando ratones

tratados con SAHB3_{BID}A y SAHB3_{BID(G→E)}A, los animales que recibieron el mutante puntual SAHB no presentaban remisión tumoral (figura 27f), destacando la especificidad in vivo de la actividad antileucémica de SAHB3_{BID}A.

Polipéptidos

- 5 En algunos casos, las fijaciones de hidrocarburos (es decir, reticulaciones) descritas en la presente memoria pueden manipularse más. En un caso, un doble enlace de una fijación de alqueno hidrocarbonado, (por ejemplo, sintetizado utilizando una metátesis de cierre de anillo catalizada por rutenio (MCR)) puede oxidarse (por ejemplo, por epoxidación o dihidroxilación) para proporcionar uno de los compuestos siguientes.



- 10 Bien el resto epóxido o uno de los restos hidroxilo libres pueden funcionalizarse más. Por ejemplo, el epóxido se puede tratar con un nucleófilo, que proporciona funcionalidad adicional que se puede utilizar, por ejemplo, para fijar una etiqueta (por ejemplo, un radioisótopo o etiqueta fluorescente). La etiqueta puede utilizarse para ayudar a dirigir el compuesto a un lugar deseado en el cuerpo (por ejemplo, dirigir el compuesto a la tiroides cuando se utiliza una etiqueta de yodo) o hacer seguimiento de la localización del compuesto en el cuerpo. Alternativamente, un agente terapéutico adicional se puede unir químicamente a la fijación funcionalizada (por ejemplo, un agente anticanceroso, tales como rapamicina, vinblastina, taxol, etc.). Dicha modificación se puede conseguir alternativamente por manipulación sintética del terminal amino o carboxi del polipéptido o de la cadena lateral de aminoácido.

- 20 Aunque se han descrito fijaciones de hidrocarburos, también se prevén otras fijaciones. Por ejemplo, la fijación puede incluir uno o más de entre un resto de éter, tioéter, éster, amina o amida. En algunos casos, una cadena lateral de aminoácido de origen natural puede incorporarse a la fijación. Por ejemplo, una fijación puede acoplarse a un grupo funcional tal como el hidroxilo en la serina, el tiol en la cisteína, la amina primaria en la lisina, el ácido en el aspartato o el glutamato, o la amida en la asparagina o la glutamina. Por consiguiente, es posible crear una fijación utilizando aminoácidos de origen natural en lugar de utilizar una fijación que se hace acoplando dos aminoácidos artificiales. También es posible utilizar un único aminoácido artificial junto con un aminoácido de origen natural.

- 25 Se prevé además que la longitud de la fijación pueda variarse. Por ejemplo, se puede utilizar una longitud más corta de la fijación cuando se desee proporcionar un grado relativamente alto de fuerza sobre la estructura alfa-helicoidal secundaria, mientras que, en algunos casos, es deseable proporcionar menos fuerza en la estructura secundaria alfa-helicoidal en hélice alfa, y por lo tanto puede ser deseable una fijación más larga.

- 30 Además, aunque los ejemplos de fijaciones que comprenden desde los aminoácidos i a $i+3$, i a $i+4$ e i a $i+7$ se han descrito para proporcionar una fijación que está principalmente en una sola cara de la hélice alfa, pueden sintetizarse fijaciones que comprendan cualquier combinación de números de aminoácidos.

En algunos casos, aminoácidos disustituidos en alfa se utilizan en el polipéptido para mejorar la estabilidad de la estructura secundaria alfa helicoidal. Sin embargo, no se requieren aminoácidos disustituidos en alfa, y también se contemplan casos que utilizan monosustituyentes en alfa (por ejemplo, en los aminoácidos fijados).

- 35 Como puede apreciarse por expertos en la materia, los procedimientos de síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria serán evidentes para cualquier experto en la materia. Además, varias etapas de síntesis se pueden realizar en una secuencia u orden alternativo para proporcionar los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica e comprenden, por ejemplo, los descritos en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª. Ed., John Wiley and Sons (1991); 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 la misma.

- 45 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar por procedimientos de síntesis química, que son bien conocidos para cualquier experto en la materia. Véase, por ejemplo, Fields et al., capítulo 3 en *Synthetic Peptides: A User's*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, N.Y., 1992, pág. 77. Por lo tanto, los péptidos pueden sintetizarse utilizando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el α -NH₂ protegido por la química de t-Boc o F-moc utilizando protegidos por la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos modelo 430A o 431 de Applied Biosystems.

- 50 Una manera de preparar los péptidos descritos en la presente memoria es utilizar la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El terminal C del aminoácido se une a una resina de poliestireno reticulado por un enlace lábil ácido

con una molécula enlazadora. Esta resina es insoluble en los disolventes utilizados para la síntesis, haciendo que sea relativamente fácil y rápido lavar el exceso de reactivos y subproductos. El terminal N está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácidos, pero extraíble por bases. Cualquiera de los grupos funcionales de la cadena lateral están protegidos con grupos básicos estables, ácidos lábiles.

- 5 Pueden prepararse péptidos más largos por conjunción de péptidos sintéticos individuales mediante ligadura química nativa. Alternativamente, pueden sintetizarse péptidos sintéticos más largos por técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales estándares bien conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se traduce al revés para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que el gen se va a expresar. A continuación, se prepara un gen sintético, por lo general sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y algunos elementos reguladores, si es necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula hospedadora. El péptido se expresa después en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y el hospedador. El péptido se purifica y caracteriza por métodos estándar.
- 10
- 15 Los péptidos se pueden preparar de manera combinatoria, con alto rendimiento, por ejemplo, utilizando un sintetizador policanal combinatorio de alto rendimiento disponible de Advanced Chemtech.

Las figuras 28a - 28f representan diversos péptidos que comprenden dominios que son útiles para crear péptidos reticulados.

Procedimientos de tratamiento

- 20 En la presente invención se describen procedimientos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un paciente en riesgo de (o sensible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o actividad (por ejemplo, anomalías de la vía apoptótica extrínseca o intrínseca) aberrante (por ejemplo, insuficiente o excesiva) de miembros de la familia BCL-2. En el contexto de la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, corregir, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad. Un agente terapéutico comprende, pero no se limita a, moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, ribozimas y oligonucleótidos complementarios.
- 25
- 30 Es posible que algunos trastornos de tipo BCL-2 pueden producirse, por lo menos en parte, por un nivel anormal de uno o más miembros de la familia BCL-2 (por ejemplo, sobre o bajo la expresión), o por la presencia de uno o más miembros de la familia BCL-2 que presenta actividad anormal. Como tal, la reducción del nivel y/o actividad del miembro de la familia BCL-2 o la mejora del nivel y/o actividad del miembro de la familia BCL-2, que produciría la mejora de los síntomas del trastorno.
- 35 Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y enfermedades neoplásicas. Como se utiliza en la presente memoria, los términos "cáncer", "hiperproliferante" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad para crecimiento autónomo, es decir, un estado o afección anormal caracterizado por proliferar rápidamente el crecimiento celular. Las enfermedades hiperproliferantes y neoplásicas pueden clasificarse como patológicas, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad, o pueden clasificarse como no patológicas, es decir, una desviación del estado normal pero no asociada a un estado de enfermedad. Por el término se entiende principalmente todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastáticos o células, tejidos, u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Células "hiperproliferantes patológicas" se producen en enfermedades caracterizadas por el crecimiento del tumor maligno. Los ejemplos de células hiperproliferantes no patológicas comprenden la proliferación de células asociadas a la reparación de heridas.
- 40
- 45

Los ejemplos de trastornos celulares proliferantes y/o diferenciadores comprenden cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, o trastornos metastáticos. Los compuestos (es decir, los polipéptidos) pueden actuar como agentes terapéuticos novedosos para controlar el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, la metástasis de dichos cánceres y similares. Un tumor metastático puede surgir de una multitud de tipos de tumor primario, incluyendo pero sin limitarse a los de origen de mama, pulmón, hígado, colon y ovario.

50

Los ejemplos de cánceres o enfermedades neoplásicas comprenden de manera no limitativa fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomyosarcoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer rectal, cáncer de pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer cerebral, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello

55

uterino, cáncer testicular, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar amicrocítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma o sarcoma de Kaposi.

5 Los ejemplos de trastornos proliferantes comprenden trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" comprende enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, derivados de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Preferentemente, las enfermedades surgen de las leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, la leucemia eritroblástica y la leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ejemplificativos adicionales comprenden de manera no limitativa leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (LMC) (reseñado en Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol./Hemotol. 11:267-97), las neoplasias linfoides comprenden de manera no limitativa la leucemia linfoblástica aguda (LLA), principalmente LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia de tricoleucocitos (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Las formas adicionales de linfomas malignos comprenden de manera no limitativa linfoma no hodgkiniano y variantes del mismo, linfomas de linfocitos T periféricos, células (ATL), leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL), leucemia linfocítica de células grandes granulares (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

20 Los ejemplos de trastornos de proliferación y/o diferenciación celular de la mama comprenden de manera no limitativa mastopatía proliferante, como por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante y papiloma de los conductos pequeños; tumores, por ejemplo, tumores de estroma tales como fibroadenomas, tumor filoides y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma de los conductos grandes; carcinoma de la mama especialmente el carcinoma in situ (no invasivo) principalmente el carcinoma canalicular in situ (incluyendo la enfermedad de Paget) y el carcinoma lobulillar in situ, y el carcinoma invasivo (infiltrante) principalmente, pero no limitado a, carcinoma canalicular invasivo, carcinoma lobulillar invasivo, carcinoma medular, mixoma (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasivo, y diversas neoplasias malignas. Los trastornos en la mama masculina comprenden de manera no limitativa ginecomastia y carcinoma.

30 Los ejemplos de trastornos pulmonares de proliferación y/o diferenciación celulares comprenden de manera no limitativa carcinoma broncogénico, principalmente síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoide bronquial, tumores diversos, y tumores metastásicos; patologías de la pleura, principalmente los derrames pleurales inflamatorios, derrames pleurales no inflamatorios, neumotórax y tumores pleurales, principalmente los tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y el mesotelioma maligno.

35 Los ejemplos de trastornos celulares de proliferación y/o diferenciación del colon comprenden de manera no limitativa pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes familiares, carcinogénia colorrectal, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides.

Los ejemplos de trastornos celulares de proliferación y/o diferenciación del hígado comprenden de manera no limitativa hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, principalmente carcinoma primario del hígado y tumores metastásicos.

40 Los ejemplos de trastornos celulares de proliferación y/o diferenciación del ovario comprenden de manera no limitativa los tumores de ovario tales como, tumores de epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, mesonefoma, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores del epitelio superficial, tumores de las células reproductoras como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas inmaduros malignos, disgerminoma, tumor del seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores de los cordones sexuales y del estroma tales como, los tumores de células de la granulosa y de la teca, tecoma-fibromas, androblastomas, tumores de células hill, y gonadoblastoma; y tumores metastáticos tales como tumores de Krukenberg.

50 Los polipéptidos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades caracterizadas por la muerte celular hiperactiva o la muerte celular debido a lesión fisiológica etc. Algunos ejemplos de enfermedades caracterizadas por la muerte celular prematura o no deseada o la proliferación celular excesiva o, alternativamente, no deseada comprenden de manera no limitativa las enfermedades hipocelulares/hipoplásicas, acelulares/aplásicas o hipercelulares/hiperplásicas. Algunos ejemplos comprenden trastornos hematológicos principalmente, pero no limitados a, anemia de Fanconi, anemia aplásica, talasemia, neutropenia congénita y mielodisplasia.

55 Los polipéptidos de la invención que actúan para disminuir la apoptosis se pueden utilizar para tratar trastornos asociados con un nivel indeseable de muerte celular. Por lo tanto, los péptidos antiapoptóticos de la invención pueden utilizarse para tratar trastornos tales como las que conducen a la muerte celular asociada a la infección vírica, por ejemplo, infección asociada a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Una amplia variedad de enfermedades neurológicas se caracteriza por la pérdida gradual de conjuntos específicos de neuronas, y los péptidos antiapoptóticos de la infección se pueden utilizar en el tratamiento de estos trastornos. Dichos trastornos comprenden la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica

(ALS), la retinitis pigmentosa, la atrofia muscular espinal, y diversas formas de degeneración cerebelosa. La pérdida de células en estas enfermedades no provoca una respuesta inflamatoria, y la apoptosis parece ser el mecanismo de la muerte celular. Además, numerosas enfermedades hematológicas están asociadas a una disminución de la producción de células sanguíneas. Estos trastornos comprenden la anemia asociada a la enfermedad crónica, la anemia aplásica, la neutropenia crónica y los síndromes mielodisplásicos. Los trastornos de la producción de células sanguíneas, tales como el síndrome mielodisplásico y algunas formas de anemia aplásica, están asociados a un aumento de la muerte celular apoptótica en la médula ósea. Estos trastornos podrían provenir de la activación de genes que favorecen la apoptosis, las insuficiencias adquiridas en las células del estroma o factores de supervivencia hematopoyéticos, o los efectos directos de toxinas y mediadores de respuestas inmunitarias. Dos trastornos comunes asociados a la muerte celular son infartos de miocardio y el accidente cerebrovascular. En ambos trastornos, las células dentro de la zona central de la isquemia, que se produce en el caso de pérdida aguda de circulación sanguínea, parecen morir rápidamente como resultado de la necrosis. Sin embargo, fuera de la zona isquémica central, las células mueren durante un período de tiempo más prolongado y morfológicamente parecen morir por apoptosis. Los péptidos antiapoptóticos de la invención pueden utilizarse para tratar todos estos trastornos asociados con la muerte celular indeseable.

Algunos ejemplos de trastornos inmunológicos que pueden tratarse con los polipéptidos descritos en la presente memoria comprenden de manera no limitativa el rechazo del trasplante de órganos, la artritis, el lupus, EII, la enfermedad de Crone, el asma, la esclerosis múltiple, la diabetes, etc.

Algunos ejemplos de trastornos neurológicos que se pueden tratar con los polipéptidos descritos en la presente memoria comprenden de manera no limitativa la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral con amiloidosis hereditaria, tipo holandés, amiloidosis reactiva, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera, síndrome de Muckle-Wells síndrome, mieloma idiopático; mieloma asociado a macroglobulinemia, polineuropatía amiloide familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloidosis cardíaca aislada, amiloidosis senil generalizada, diabetes al comienzo de la edad adulta, insulinoma, amiloidosis auricular aislada, Carcinoma medular de la tiroides, amiloidosis familiar, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, polineuropatía amiloidótica familiar, encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina, enfermedades por priones, y la enfermedad de Huntington.

Algunos ejemplos de trastornos endocrinológicos que pueden tratarse con los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a la diabetes, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, etc.

Los ejemplos de trastornos cardiovasculares (por ejemplo, trastornos inflamatorios) que se pueden tratar o prevenir con los compuestos y procedimientos de la invención comprenden de manera no limitativa aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trombosis, aneurisma, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, angina de pecho, muerte cardíaca súbita, cardiopatía hipertensiva; angiopatía no coronaria, tales como la arteriosclerosis, microangiopatía, nefropatía, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatosis, asma, hipertensión, enfisema y neumopatía crónica; o una enfermedad cardiovascular asociada con los procedimientos de intervención ("trauma vascular por intervención quirúrgica"), tales como la restenosis tras la angioplastia, la colocación de una derivación, endoprótesis vascular, injertos de escisión sintéticos o naturales, sonda permanente, válvula u otros dispositivos implantables. Los trastornos cardiovasculares preferidos comprenden aterosclerosis, infarto de miocardio, aneurisma, y el accidente cerebrovascular.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Los compuestos de esta invención, tal como se usan aquí, incluyendo los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria, se definen de manera que incluyen derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Un "derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable" hace referencia a cualquier sal, éster, sal de un éster u otro derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la presente invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente invención. Los derivados y profármacos particularmente favorecidos son los que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando dichos compuestos se administran a un mamífero (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado oralmente se absorba más fácilmente en la sangre) o que mejoran la administración del compuesto original a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con respecto a la especie original. Los profármacos preferidos comprenden derivados en los que un grupo que mejora la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la membrana intestinal se agrega a la estructura de las fórmulas descritas en la presente memoria.

Los compuestos de esta invención pueden modificarse añadiendo funcionalidades apropiadas para mejorar las propiedades biológicas selectivas. Dichas modificaciones son conocidas en la técnica y comprenden las que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyectables, alteran el metabolismo y alteran la tasa de la excreción.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención comprenden los derivados de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales de ácidos adecuados comprenden acetato, adipato, benzoato, bencensulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, lactato, maleato, malonato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales derivadas de bases apropiadas comprenden sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), de amonio y N-(alquil)₄⁺. La presente invención también prevé la cuaternización de cualesquiera de los grupos que contienen nitrógeno básico de los compuestos expuestos en la presente memoria. Pueden obtenerse agua o productos solubles o dispersables en aceite por dicha cuaternización.

Los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria pueden administrarse, por ejemplo, por inyección, por vía intravenosa, intraarterial, por vía subdérmica, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea, o por vía oral, bucal, nasal, a través de las mucosas, o vía tópica, en un preparado oftálmico, o por inhalación, con una dosis que oscila entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o según los requisitos del fármaco concreto. Los procedimientos en la presente memoria contemplan la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición del compuesto para conseguir el efecto deseado o indicado. Por lo general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día o alternativamente, como infusión continua. Dicha administración se puede utilizar como terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una sola forma farmacéutica variará en función del hospedador tratado y del modo concreto de administración. Un preparado típico contendrá desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 95% de compuesto activo (p/p). Alternativamente, tales preparaciones contienen desde aproximadamente 20% hasta aproximadamente 80% de compuesto activo.

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

Tras la mejora de una enfermedad de un paciente, se puede administrar, si es necesario, una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención. Posteriormente, la dosis o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en el que se mantiene mejorada la enfermedad. Los pacientes pueden, sin embargo, necesitar un tratamiento intermitente de larga duración tras cualquier recaída de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente adicional como, por ejemplo, la morfina o la codeína; y cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones alternativas de la presente invención comprenden un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones definidas en la presente memoria comprenden los compuestos de las fórmulas definidas en la presente memoria, así como agentes terapéuticos adicionales si están presentes, en cantidades eficaces para conseguir una modulación de la enfermedad o síntomas de la enfermedad, principalmente trastornos en los que intervienen como mediadores miembros de la familia BCL-2 o síntomas de los mismos.

La expresión "portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o adyuvante 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 administrar una cantidad terapéutica del compuesto.

Los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) tales como succinato de d- α -tocoferol y polietilenglicol 1000, tensioactivos utilizados en presentaciones farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de administración polimérica similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polividona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros del bloque polietileno-polióxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Las ciclodextrinas tales como α -, β -, y γ -ciclodextrina, puede también utilizarse provechosamente para mejorar la administración de los compuestos de las fórmulas descritas en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, por pulverización para inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado, preferentemente por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener cualquiera de los portadores, adyuvantes o vehículos inocuos convencionales farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el pH de la formulación puede ser ajustado con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de administración. El término parenteral, como se emplea en la presente memoria comprende técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en forma de un preparado inyectable estéril, por ejemplo, en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según procedimientos conocidos en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión adecuados. El preparado inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente inocuo, parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un medio disolvente o de suspensión. Con esta finalidad, se puede emplear cualquier aceite fijo blando principalmente mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, dado que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de presentaciones farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros tensioactivos frecuentemente utilizados, tales como Tweens o Spans y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad similares que se utilizan frecuentemente en la preparación de formulaciones sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables también pueden utilizarse para su formulación.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral en cualquier presentación aceptable por vía oral entre ellas, pero no limitadas a, cápsulas, comprimidos, emulsiones, suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se utilizan normalmente contienen lactosa y almidón de maíz. También se suelen añadir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles contienen lactosa y almidón de maíz anhidro. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede estar en suspensión o disuelto en una fase oleosa combinado con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o agentes colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de la presente 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. Dichos materiales comprenden de manera no limitativa manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan según procedimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, activadores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes disolventes o dispersantes conocidos en la técnica.

Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas descritas en la presente memoria y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes en niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 a 100%, y más preferentemente entre aproximadamente 5 a 95% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia. Pueden administrarse otros agentes aparte, como parte de un régimen de politerapia, a partir de los compuestos de la presente invención. Alternativamente, esos agentes pueden formar parte de una presentación única, mezclados junto con los compuestos de la presente invención en una única composición.

Ensayos de detección

La invención proporciona métodos (también denominados en la presente memoria "ensayos de selección") para la identificación de polipéptidos que modulan la actividad de una o más de proteínas de la familia BCL-2 o que se unen a uno o más proteínas de la familia BCL-2 (por ejemplo, un polipéptido que tiene por lo menos un dominio de homología BH).

La afinidad de unión de los polipéptidos descritos en la presente memoria se puede determinar utilizando, por ejemplo, un ensayo de valoración de enlaces. Un polipéptido de la familia BCL-2 o polipéptido que comprende un

dominio BH (por ejemplo, BID, BAK, BAX, etc.) puede exponerse a concentraciones variables de un compuesto candidato (es decir, un polipéptido) (por ejemplo, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM y 10 mM) en presencia de un sustrato tal como un BH3 marcado con fluorescencia que contiene polipéptido o un fragmento del mismo (por ejemplo, BID, BAD, BAK, BAX, etc.). El efecto de cada concentración de compuesto candidato se analiza a continuación para determinar el efecto del compuesto candidato sobre la actividad de unión de la familia BCL-2 a concentraciones variables, que puede utilizarse para calcular la K_i del compuesto candidato. El compuesto candidato puede modular la actividad de tipo BCL-2 de manera competitiva o no competitiva. También pueden realizarse ensayos de enlace directo entre proteínas de la familia BCL-2 y los compuestos candidatos marcados con fluorescencia para determinar la K_d para la interacción de enlace. Los compuestos candidatos también pueden ser detectados para la actividad biológica *in vitro*, por ejemplo, mediante la determinación de su eficacia sensible a la dosis en la activación del citocromo c de mitocondrias purificadas. También están previstos ensayos de detección de permeabilidad celular, en los que los compuestos candidatos marcados con fluorescencia se aplican a las células intactas, que se analizan a continuación para detectar la fluorescencia celular por microscopía de fluorescencia celular o la detección de alta resolución.

Los ensayos descritos en la presente memoria pueden realizarse con compuestos candidatos individuales o pueden realizarse con un gran número de compuestos candidatos. Cuando los ensayos se realizan con un gran número de compuestos candidatos, los ensayos se pueden realizar utilizando mezclas de compuestos candidatos o se pueden ejecutar en reacciones paralelas con cada uno de las reacciones que tiene un solo compuesto candidato. Los compuestos o agentes de ensayo se pueden obtener utilizando cualquiera de las numerosas propuestas en procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica.

En una realización, un ensayo es un ensayo en células en el que una célula que expresa una proteína de la familia BCL-2 o una parte biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un polipéptido candidato, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de tipo BCL-2 (por ejemplo, en algunos casos aumentan la apoptosis y en otros casos disminuyen la apoptosis, por vías de muerte celular intrínsecas o extrínsecas). La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de tipo BCL-2 dentro de las células puede llevarse a cabo controlando, por ejemplo, la liberación de citocromo c de las mitocondrias u otras lecturas fisiológicas relevante (por ejemplo, tinción con anexina V, ensayo con MTT, el ensayo de actividad de la caspasa, ensayo TUNEL).

En una realización, un ensayo es un ensayo bioquímico, mediante el cual polipéptidos reticulados se pueden vincular a la resina de afinidad para purificar o identificar nuevas o conocidas parejas interactivas en la vía apoptótica.

Todas las referencias citadas en esta memoria, ya sean impresas, electrónicas, medios de almacenamiento legibles mediante ordenador u otras formas, se incorporan expresamente por referencia en su totalidad, incluyendo pero no limitándose a resúmenes, artículos, revistas, publicaciones, textos, tratados, sitios web de internet, bases de datos, patentes y publicaciones de patente.

Otras aplicaciones

Las aplicaciones biológicamente relevantes para los péptidos descritos en la presente memoria son numerosas y evidentes, como se indica por los siguientes ejemplos basados en el compartimento celular:

(1) Superficie celular - Péptidos naturales que representan regiones helicoidales clave de la proteína gp41 del VIH-1 (por ejemplo, péptido C, péptido T-20) se ha mostrado que impiden la fusión vírica, y por lo tanto, la infectividad del VIH. Los péptidos helicoidales participan en los mecanismos de fusión esenciales para muchos paradigmas de infección de células hospedadoras por virus (por ejemplo, Dengue, hepatitis C, gripe), y por lo tanto, los análogos grapados a hidrocarburos de estas regiones helicoidales críticas pueden funcionar como antibióticos eficaces inhibiendo la fusión vírica. En general, los ligandos que interactúan con los receptores de la superficie celular utilizando conexiones helicoidales para activar o inhibir las vías de señalización, representan aplicaciones adicionales para los polipéptidos descritos en la presente memoria.

(2) En el interior de la membrana – La dimerización y oligomerización de los receptores son características fundamentales de la activación y la señalización del receptor provocadas por ligandos. Los dominios helicoidales transmembranarios participan ampliamente en este tipo de reacciones de oligomerización esenciales (por ejemplo, la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR]) y secuencias de péptidos específicas se han definido que facilitan estos asociados helicoidales intramembranarios ajustados. La activación aberrante de dichos receptores a través de oligomerización está implicada en la patogenia de la enfermedad (por ejemplo, erbB y el cáncer). Por lo tanto, en la configuración adecuada, la activación o inhibición de interacciones a través de la membrana entre las hélices tendrían beneficio terapéutico.

(3) Citosólico – Los objetivos citosólicos comprenden objetivos de proteínas solubles y los asociados con orgánulos intracitosólicos específicos, incluyendo las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas. Dentro del campo de la apoptosis, hay múltiples objetivos de

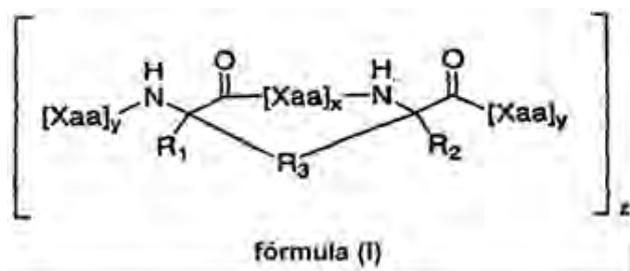
proteínas apoptóticas citosólicas y mitocondriales para los dominios de la familia BCL-2 grapados a hidrocarburos. Dentro del subgrupo sólo BH3 de proteínas proapoptóticas, se han identificado dos subconjuntos principales de los dominios BH3: (1) Los BH3 similares a BID (por ejemplo, BIM) que son "activadores" de la apoptosis, que provocan oligomerización de BAK y liberación del citocromo c en el mitocondria y (2) Los BH3 similares a BAD que son "sensibilizadores" de la apoptosis que se dirigen selectivamente a proteínas multidominio antiapoptóticas, lo que permite niveles subliminales de dominios de activación sean eficaces al máximo. Además de la unión distinta de las proteínas BH3-sólo a miembros de la familia con multidominio pro- frente a anti-apoptótico, los dominios BH3 presentan unión diferenciada entre las proteínas antiapoptóticas. Por ejemplo, se ha demostrado que BAD se une preferentemente a la BCL-2 antiapoptótica, mientras que el BIM se dirige a la MCL-1 antiapoptótica. La identificación y la exploración de estas interacciones selectivas son de importancia crítica porque diferentes miembros de la familia BCL-2 están implicados en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, la sobreexpresión de BCL-2 es la responsable del desarrollo de linfoma folicular y la resistencia a la quimioterapia en general, mientras que MCL-1 se cree que desempeña una función importante en la patogenia del mieloma múltiple. La capacidad de transformar los muchos dominios BH3 en reactivos estructuralmente estables y permeables a las células proporcionaría una oportunidad importante de explorar y manipular de forma diferenciada las vías de apoptóticas en las células cancerosas. Está previsto focalizar más interacciones dependientes de la hélice en el citosol o en orgánulos citosólicos.

(4) Nuclear – Los factores de transcripción nuclear y sus proteínas moduladoras conducen una gran cantidad de procesos fisiológicos basados en interacciones de péptidos helicoidales con proteínas nucleares y ácidos nucleicos. La viabilidad de generar péptidos grapados a hidrocarburos para participar en interacciones nucleares recientemente se ha demostrado por la síntesis de la presente invención de un grupo de péptidos p53 grapados a hidrocarburos, que interactúan con MDM2 en afinidades picomolares. Además de modular las interacciones proteína-proteína en el núcleo, las interacciones proteína-ácido nucleico también son objetivos evidentes. Varias familias de factores de transcripción, tales como homeodominio, hélice-bucle- hélice básica, receptor nuclear, y proteínas que contienen dedos de cinc, interactúan directamente con ADN a través de sus hélices peptídicas para activar o inhibir la transcripción génica. Como ejemplo, las proteínas de homeodominio son una familia de factores de transcripción esenciales que regulan los programas genéticos de crecimiento y diferenciación en todos los organismos pluricelulares. Estas proteínas comparten un motivo de unión al ADN conservado, denominado el homeodominio, que contiene un péptido de 60 aminoácidos de longitud que forma tres hélices α , la tercera parte de las cuales hace contacto directo con el surco mayor del ADN. Al igual que el dominio BH3 de las proteínas apoptóticas, el homeodominio es un motivo efector crítico con la suficiente variación entre homólogos para facilitar especificidades de unión y actividades fisiológicas diferenciadas. Las interacciones proteína-ADN pueden ser complejas y extensas, y presentar de este modo un desafío para el desarrollo de pequeñas moléculas con el fin de estudiar y modular selectivamente episodios de transcripción. En organismos superiores, proteínas del homeodominio se expresan mucho durante el desarrollo, especificando el plan corporal e imponiendo la diferenciación del tejido. La sobreexpresión de homeoproteínas específicos (por ejemplo, CDX4) puede activar programas de diferenciación específicos del tejido que dan como resultado, por ejemplo, formación de la sangre a partir de células madre embrionarias de ratón. La desregulación de la expresión de genes homeóticos, tales como la regulación positiva aberrante por incremento de las proteínas del homeodominio normalmente expresadas en células no diferenciadas o la regulación por disminución inadecuada de dichas proteínas normalmente expresadas en células diferenciadas, puede contribuir al desarrollo y mantenimiento de cáncer. Por ejemplo, en el rhabdomyosarcoma alveolar pediátrico, la fusión del dominio de unión a ADN PAX3 o PAX 7 para el dominio transactivador de Fork-Head ha estado implicada en la transformación celular; los desplazamientos que afectan a los dominios de unión al ADN de varios genes HOX se han relacionado con la patogenia de la leucemia. Por lo tanto, la capacidad de estabilizar químicamente hélices del factor de transcripción, tales como los péptidos del homeodominio, para administración celular tiene potencial para producir una caja de herramientas química para la investigación y la modulación de diversos programas de transcripción responsables de una multitud de procesos biológicos en la salud y la enfermedad.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Sin embargo, se entiende que se pueden hacer distintas modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, hay otras realizaciones dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

55 **Párrafos Relevantes**

1. Un polipéptido de fórmula (I),



en la que;

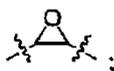
cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquil o heterociclicilalquilo;

5 R_3 es alquilo, alquenilo, alquinilo; $[R_4-K-R_4]_n$; cada uno de los cuales está sustituido con de 0 a 6 R_5 ;

R_4 es alquilo, alquenilo o alquinilo;

R_5 es halógeno, alquilo, OR_6 , $N(R_6)_2$, SR_6 , SOR_6 , SO_2R_6 , CO_2R_6 , R_6 , un resto fluorescente o un radioisótopo;

10 K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , $CONR_6$ o



R_6 es H, alquilo o un agente terapéutico;

n es un número entero de 1 a 4;

x es un número entero de 2 a 10;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

15 z es un número entero de 1 a 10; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

donde el polipéptido tiene una estructura secundaria que es sustancialmente una hélice alfa en disolución acuosa.

2. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido se une a un polipéptido de la familia BCL-2.

20 3. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido se une a un polipéptido anti-apoptósico.

4. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido se une a un dominio BH1, BH2 o BH3.

5. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido activa la muerte celular mitocondrial.

6. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido activa la muerte celular.

7. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido inhibe la muerte celular.

25 8. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido comprende un dominio BH3.

9. El polipéptido del párrafo 1, en el que x es 2, 3 ó 6.

10. El polipéptido del párrafo 1, en el que cada y es independientemente un número entero entre 3 y 15.

11. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o alquilo C_1-C_6 .

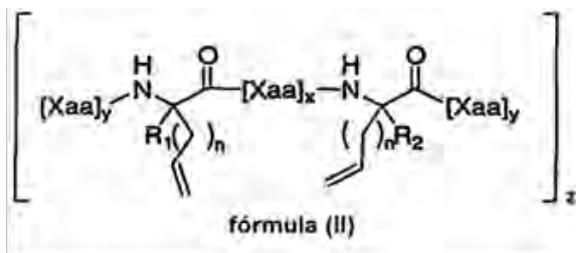
12. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_1 y R_2 son cada uno independientemente alquilo C_1-C_3 .

30 13. El polipéptido del párrafo 11, en el que al menos uno de R_1 y R_2 es metilo.

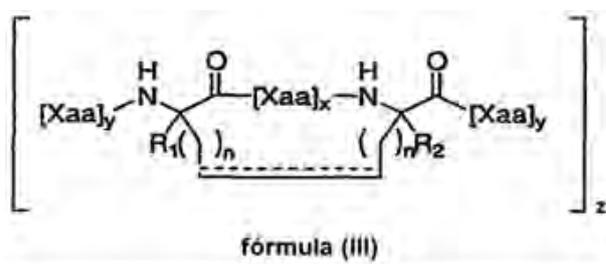
14. El polipéptido del párrafo 12, en el que R_1 y R_2 son metilo.

15. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_3 es alquilo.

16. El polipéptido del párrafo 14, en el que x es 3.
17. El polipéptido del párrafo 15, en el que R_3 es alquilo C_8 .
18. El polipéptido del párrafo 14, en el que x es 6.
19. El polipéptido del párrafo 17, en el que R_3 es alquilo C_{11} .
- 5 20. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_3 es alquenoilo.
21. El polipéptido del párrafo 18, en el que x es 3.
22. El polipéptido del párrafo 20, en el que R_3 es alquenoilo C_8 .
23. El polipéptido del párrafo 19, en el que x es 6.
24. El polipéptido del párrafo 19, en el que R_3 es alquenoilo C_{11} .
- 10 25. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_3 es una cadena lineal de alquilo, alquenoilo o alquinoilo.
26. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_3 es $[R_4-K-R_4]$ y R_4 es una cadena lineal de alquilo, alquenoilo o alquinoilo.
27. El polipéptido del párrafo 1, comprendiendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. nº: 1.
- 15 28. El polipéptido del párrafo 15, en el que R_3 es alquilo o alquenoilo.
29. El polipéptido del párrafo 15, en el que al menos uno de R_1 o R_2 es alquilo.
30. El polipéptido del párrafo 11, en el que cada R_1 y R_2 es independientemente H o alquilo C_1-C_3 .
31. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_1 y R_2 son metilo.
32. El polipéptido del párrafo 1, en el que x es 3 ó 7 y z es 0.
- 20 33. El polipéptido del párrafo 1, en el que R_3 es alquilo o alquenoilo C_8 o C_{11} .
34. El polipéptido del párrafo 1, comprendiendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. nº: 2.
35. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido es transportado a través de la membrana celular.
- 25 36. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido es transportado activamente a través de la membrana celular.
37. El polipéptido del párrafo 1, que además comprende un resto fluorescente o radioisótopo.
38. El polipéptido del párrafo 1, en el que el polipéptido comprende 23 aminoácidos;
- R_1 y R_2 son metilo;
- R_3 es alquilo C_8 , alquilo C_{11} , alquenoilo C_8 o alquenoilo C_{11} ; y
- 30 x es 2,3 ó 6.
39. El polipéptido del párrafo 1, que además comprende un marcador de afinidad.
40. El polipéptido del párrafo 1, que además comprende un resto de selección de diana.
41. El polipéptido del párrafo 1, que además comprende un resto de biotina.
- 35 42. El polipéptido del párrafo 1, donde el polipéptido es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los polipéptidos representados en la figura 5.
43. Un método para preparar un polipéptido de fórmula (III), que comprende proporcionar un polipéptido de fórmula (II); y



tratar el compuesto de fórmula (II) con un catalizador para promover una metátesis de cierre de anillo, proporcionando un compuesto de fórmula (III)



5

en la que

cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo; heteroarilalquilo o heterociclicilalquilo;

cada n es independientemente un número entero de 1 a 15;

10

x es 2, 3 ó 6;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 3; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido; y

donde el polipéptido comprende una estructura de hélice alfa en disolución acuosa.

15

44. El método del párrafo 43, en el que el polipéptido se une a un polipéptido miembro de la familia BCL-2.

45. El método del párrafo 43, en el que el catalizador es un catalizador de rutenio.

46. El método del párrafo 43, que además comprende proporcionar un agente reductor u oxidante después de la metátesis de cierre de anillo.

47. El método del párrafo 46, en el que el agente reductor es H_2 o el agente oxidante es tetróxido de osmio.

20

48. Un método para tratar a un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto del párrafo 1.

49. El método del párrafo 48, que además comprende administrar un agente terapéutico adicional.

50. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto del párrafo 1.

51. El método del párrafo 45, que además comprende administrar un agente terapéutico adicional.

25

52. Una librería de compuestos del párrafo 1, fórmula (I).

53. Un método para identificar un compuesto candidato para promover la apoptosis, que comprende;

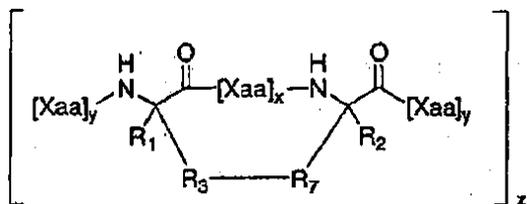
proporcionar una mitocondria;

poner en contacto la mitocondria con un compuesto del párrafo 1;

medir la liberación de citocromo c; y

comparar la liberación de citocromo c en presencia del compuesto del párrafo 1 con la liberación de citocromo c en ausencia del compuesto del párrafo 1, de manera que un aumento en la liberación de citocromo c en presencia del compuesto del párrafo 1 identifica al compuesto del párrafo 1 como compuesto candidato para promover la apoptosis.

5 54. Un polipéptido de fórmula (IV),



en la que;

cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclilalquilo;

10 R_3 es alquilo, alquenilo, alquinilo; $[R_4-K-R_4]_n$ o una cadena lateral de un aminoácido natural; cada uno de los cuales está sustituido con de 0 a 6 R_5 ;

R_4 es alquilo, alquinilo o alquinilo;

R_5 es halógeno, alquilo, OR_6 , $N(R_6)_2$, SR_6 , SOR_6 , SO_2R_6 , CO_2R_6 , R_6 , un resto fluorescente o un radioisótopo;

15 K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , $CONR_6$ ó



R_6 es H, alquilo o un agente terapéutico;

R_7 es alquilo, alquenilo, alquinilo; $[R_4-K-R_4]_n$ ó una cadena lateral de un aminoácido natural; cada uno de los cuales está sustituido con de 0 a 6 R_5 ;

n es un número entero de 1 a 4;

20 x es un número entero de 2 a 10;

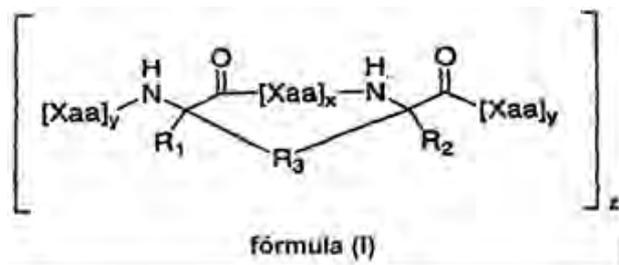
cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 3; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido; y

25 en donde el polipéptido tiene sustancialmente una estructura secundaria alfa helicoidal en disolución acuosa.

55. Un polipéptido de fórmula (I),



en la que;

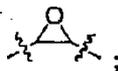
30 cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclilalquilo;

R₃ es alquilo, alquenilo, alquinilo; [R₄-K-R₄]_n; cada uno de los cuales está sustituido con de 0 a 6 R₅;

R₄ es alquilo, alquinilo o alquinilo;

5 R₅ es halógeno, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, un resto fluorescente o un radioisótopo;

K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆ ó



R₆ es H, alquilo o un agente terapéutico;

n es un número entero de 1 a 4;

x es un número entero de 2 a 10;

10 cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 3; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

donde el polipéptido tiene al menos un 5% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

15 56. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 35% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

57. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 50% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

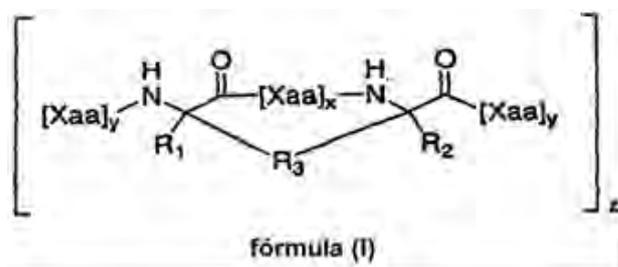
20 58. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 60% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

59. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 70% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

60. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 80% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

25 61. El polipéptido del párrafo 55, donde el polipéptido tiene al menos un 90% de alfa-helicidad en disolución acuosa según se determina por dicroísmo circular.

62. Un polipéptido de fórmula (I),



en la que;

30 cada R₁ y R₂ son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclilalquilo;

R₃ es alquilo, alquenilo, alquinilo; [R₄-K-R₄]_n; cada uno de los cuales está sustituido con de 0 a 6 R₅;

R₄ es alquilo, alquinilo o alquinilo;

35 R₅ es halógeno, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, un resto fluorescente o un radioisótopo;

K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆ ó



R₆ es H, alquilo o un agente terapéutico;

n es un entero de 1 a 4;

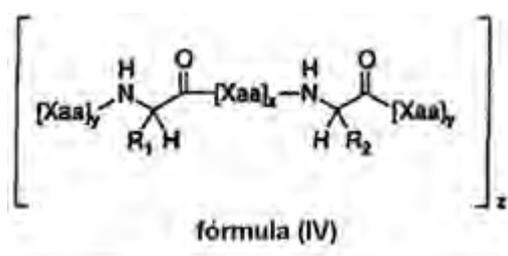
5 x es un número entero de 2 a 10;

cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;

z es un número entero de 1 a 3; y

cada Xaa es independientemente un aminoácido;

10 donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 1,25 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV)



en la que R₁, R₂, Xaa, x, y, y z son todos según se definieron antes para la fórmula (I).

63. El polipéptido del párrafo 62, formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 1,5 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

15 64. El polipéptido del párrafo 62, formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 1,75 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

65. El polipéptido del párrafo 62, formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 2,0 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

20 66. El polipéptido del párrafo 65, formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 2,5 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

67. El polipéptido del párrafo 65 formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 3 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

68. El polipéptido del párrafo 65, formula (I), donde el polipéptido tiene al menos un aumento de 4 veces en alfa helicidad según se determina por dicroísmo circular comparado con el polipéptido de fórmula (IV).

25 69. Un método para identificar un compuesto candidato para inhibir la apoptosis, que comprende;

proporcionar una mitocondria;

poner en contacto la mitocondria con un compuesto del párrafo 1;

medir la liberación de citocromo c; y

30 comparar la liberación de citocromo c en presencia del compuesto del párrafo 1 con la liberación de citocromo c en ausencia del compuesto del párrafo 1, de manera que una disminución en la liberación de citocromo c en presencia del compuesto del párrafo 1 identifica al compuesto del párrafo 1 como compuesto candidato para inhibir la apoptosis.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

5 <120> Péptidos alfa helicoidales estabilizados y utilizations de los mismos

<130> 116-038

<140> EP 04 811 198.3

10 <141> 05-11-2004

<150> PCT/US2004/038403

<151> 05-11-2004

15 <150> US 60/517,848

<151> 05-11-2003

<150> US 60/591,548

<151> 27-07-2004

20 <160> 117

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

```

Met Ala Arg Ala Arg Gln Glu Gly Ser Ser Pro Glu Pro Val Glu Gly
 1          5          10          15
Leu Ala Arg Asp Gly Pro Arg Pro Phe Pro Leu Gly Arg Leu Val Pro
 20          25          30
Ser Ala Val Ser Cys Gly Leu Cys Glu Pro Gly Leu Ala Ala Ala Pro
 35          40          45
Ala Ala Pro Thr Leu Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Cys Ala Pro Thr Ala
 50          55          60
Pro Pro Ala Val Thr Ala Ala Leu Gly Gly Ser Arg Trp Pro Gly Gly
 65          70          75          80
Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gly Pro Arg Pro Asp Gly Pro Gln Pro Ser
 85          90          95
Leu Ser Leu Ala Glu Gln His Leu Glu Ser Pro Val Pro Ser Ala Pro
 100         105         110
Gly Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Gln Ala Ala Pro Gly Val Arg Gly
 115         120         125
Glu Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met
 130         135         140
Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg Arg Arg Gln Glu Glu Gln
 145         150         155         160
Gln Arg His Arg Pro Ser Pro Trp Arg Val Leu Tyr Asn Leu Ile Met
 165         170         175
Gly Leu Leu Pro Leu Pro Arg Gly His Arg Ala Pro Glu Met Glu Pro
 180         185         190
Asn
    
```

<210> 2

<211> 193

35 <212> PRT

<213> Mus munculus

<400> 2

Met Ala Arg Ala Arg Gln Glu Gly Ser Ser Pro Glu Pro Val Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Asp Ser Pro Arg Pro Phe Pro Leu Gly Arg Leu Met Pro
 20 25 30
 Ser Ala Val Ser Cys Ser Leu Cys Glu Pro Gly Leu Pro Ala Ala Pro
 35 40 45
 Ala Ala Pro Ala Leu Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Cys Ala Pro Thr Ala
 50 55 60
 Pro Pro Ala Val Thr Ala Ala Leu Gly Gly Pro Arg Trp Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 His Arg Ser Arg Pro Arg Gly Pro Arg Pro Asp Gly Pro Gln Pro Ser
 85 90 95
 Leu Ser Pro Ala Gln Gln His Leu Glu Ser Pro Val Pro Ser Ala Pro
 100 105 110
 Glu Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Gln Ala Ala Pro Gly Val Arg Val
 115 120 125
 Glu Glu Glu Glu Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met
 130 135 140
 Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg Arg Gln Glu Glu Gln
 145 150 155 160
 His Arg His Arg Pro Ser Pro Trp Arg Val Met Tyr Asn Leu Phe Met
 165 170 175
 Gly Leu Leu Pro Leu Pro Arg Gln Pro Gly Ala Pro Glu Met Glu Pro
 180 185 190

Asn

<210> 3
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

10 <400> 3
 Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Gln Tyr
 20

15 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 4
 Ile Gly Tyr Glu Ile Gly Ser Lys Leu Ala Ala Met Cys Asp Asp Phe
 1 5 10 15

25 Asp Ala Gln Met
 20

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

<400> 5
Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe
 1 5 10 15
Val Asp Ser Phe
 20

5 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 6
Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe
 1 5 10 15
Asn Ala Tyr Tyr
 20

15 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 7
Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met
 1 5 10 15
Asp Arg Ser Ile
 20

25 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 8
Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met
 1 5 10 15
Asp Val Ser Leu
 20

35 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido natural

45 <400> 9
Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu Leu
 1 5 10 15
His Gln Arg Thr
 20

50 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

<400> 10
Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10 15
 5 **Leu Arg**

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

15 <400> 11
Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Ala Tyr
 1 5 10 15
Tyr Ala

<210> 12
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

25 <400> 12
Glu Cys Ala Thr Gln Leu Arg Arg Phe Gly Asp Lys Leu Asn Phe Arg
 1 5 10 15
Gln Lys

<210> 13
 <211> 18
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

35 <400> 13
Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1 5 10 15
Ile Pro

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 14
Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
 1 5 10 15
Phe Lys

50 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Péptido natural

<400> 15

Glu Ile Gly Ser Lys Leu Ala Ala Met Cys Asp Asp Phe Asp Ala Gln
1 5 10 15

5 **Met Met**

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Asp Ala Leu Gly His Glu Leu Pro
1 5

15 <210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 17

Leu Glu Val Leu Gly Arg Glu Leu Pro
1 5

<210> 18

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp
1 5

30 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

35 <400> 19

Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp
1 5

<210> 20

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp
1 5

45 <210> 21

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn
1 5

55 <210> 22

<211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu Leu His
 1 5

5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 23
Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val
 1 5

15

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 24
Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn
 1 5

25

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 25
Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp
 1 5

35

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26
Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu
 1 5

40

<210> 27
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Thr Leu Arg Leu Leu Glu Asp Trp Cys Arg Gly Met Asp Met Asn
 1 5 10 15
 Pro Arg Lys Ala Leu Leu Ile Ala Gly Ile Ser Gln Ser Cys Ser Val
 20 25 30
 Ala Glu Ile Glu Glu Ala Leu Gln Ala Gly Leu Ala Pro Leu Gly Glu
 35 40 45
 Tyr Arg Leu Leu Gly Arg Met Phe Arg Arg Asp Glu Asn Arg Lys Val
 50 55 60
 Ala Leu Val Gly Leu Thr Ala Glu Thr Ser His Ala Leu Val Pro Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Pro Gly Lys Gly Gly Ile Trp Arg Val Ile Phe Lys Pro Pro
 85 90 95
 Asp Pro Asp Asn Thr Phe Leu Ser Arg Leu Asn Glu Phe Leu Ala Gly
 100 105 110
 Glu Gly Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly His Glu Asn
 115 120 125
 Gly Ser Leu Asp Pro Glu Gln Gly Met Ile Pro Glu Met Trp Ala Pro
 130 135 140
 Met Leu Ala Gln Ala Leu Glu Ala Leu Gln Pro Ala Leu Gln Cys Leu
 145 150 155 160
 Lys Tyr Lys Lys Leu Arg Val Phe Ser Gly Arg Glu Ser Pro Glu Pro
 165 170 175
 Gly Glu Glu Glu Phe Gly Arg Trp Met Phe His Thr Thr Gln Met Ile
 180 185 190
 Lys Ala Trp Gln Val Pro Asp Val Glu Lys Arg Arg Arg Leu Leu Glu
 195 200 205
 Ser Leu Arg Gly Pro Ala Leu Asp Val Ile Arg Val Leu Lys Ile Asn
 210 215 220
 Asn Pro Leu Ile Thr Val Asp Glu Cys Leu Gln Ala Leu Glu Glu Val
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Thr Asp Asn Pro Arg Glu Leu Gln Val Lys Tyr Leu Thr
 245 250 255
 Thr Tyr His Lys Asp Glu Glu Lys Leu Ser Ala Tyr Val Leu Arg Leu
 260 265 270
 Glu Pro Leu Leu Gln Lys Leu Val Gln Arg Gly Ala Ile Glu Arg Asp
 275 280 285
 Ala Val Asn Gln Ala Arg Leu Asp Gln Val Ile Ala Gly Ala Val His
 290 295 300
 Lys Thr Ile Arg Arg Glu Leu Asn Leu Pro Glu Asp Gly Pro Ala Pro
 305 310 315 320
 Gly Phe Leu Gln Leu Leu Val Leu Ile Lys Asp Tyr Glu Ala Ala Glu
 325 330 335
 Glu Glu Glu Ala Leu Leu Gln Ala Ile Leu Glu Gly Asn Phe Thr
 340 345 350

5 <210> 28
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 28

```

Met Thr Leu Arg Leu Leu Glu Asp Trp Cys Arg Gly Met Asp Met Asn
 1      5      10      15
Pro Arg Lys Ala Leu Leu Val Ala Gly Ile Pro Pro Thr Cys Gly Val
      20      25      30
Ala Asp Ile Glu Glu Ala Leu Gln Ala Gly Leu Ala Pro Leu Gly Glu
      35      40      45
His Arg Leu Leu Gly Arg Met Phe Arg Arg Asp Glu Asn Lys Asn Val
      50      55      60
Ala Leu Ile Gly Leu Thr Val Glu Thr Gly Ser Ala Leu Val Pro Lys
      65      70      75      80
Glu Ile Pro Ala Lys Gly Gly Val Trp Arg Val Ile Phe Lys Pro Pro
      85      90      95
Asp Thr Asp Ser Asp Phe Leu Cys Arg Leu Asn Glu Phe Leu Lys Gly
      100      105      110
Glu Gly Met Thr Met Gly Glu Leu Thr Arg Val Leu Gly Asn Arg Asn
      115      120      125
Asp Pro Leu Gly Leu Asp Pro Gly Ile Met Ile Pro Glu Ile Arg Ala
      130      135      140
Pro Met Leu Ala Gln Ala Leu Asn Glu Ala Leu Lys Pro Thr Leu Gln
      145      150      155      160
Tyr Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Ser Val Phe Ser Gly Arg Asp Pro Pro
      165      170      175
Gly Pro Gly Glu Glu Glu Phe Glu Ser Trp Met Phe His Thr Ser Gln
      180      185      190
Val Met Lys Thr Trp Gln Val Ser Asp Val Glu Lys Arg Arg Arg Leu
      195      200      205
Ile Glu Ser Leu Arg Gly Pro Ala Phe Glu Ile Ile Arg Val Leu Lys
      210      215      220
Ile Asn Asn Pro Phe Ile Thr Val Ala Glu Cys Leu Lys Thr Leu Glu
      225      230      235      240

Thr Ile Phe Gly Ile Ile Asp Asn Pro Arg Ala Leu Gln Val Lys Tyr
      245      250      255
Leu Thr Thr Tyr Gln Lys Thr Asp Glu Lys Leu Ser Ala Tyr Val Leu
      260      265      270
Arg Leu Glu Pro Leu Leu Gln Lys Leu Val Gln Lys Gly Ala Ile Glu
      275      280      285
Lys Glu Val Val Asn Gln Ala Arg Leu Asp Gln Val Ile Ala Gly Ala
      290      295      300
Val His Lys Ser Val Arg Arg Glu Leu Gly Leu Pro Glu Gly Ser Pro
      305      310      315      320
Ala Pro Gly Leu Leu Gln Leu Leu Thr Leu Ile Lys Asp Lys Glu Ala
      325      330      335
Glu Glu Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Cys Thr
      340      345      350

```

5 <210> 29
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(329)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

15 <400> 29

```

Met Ala Met Thr Leu Leu Glu Asp Trp Cys Arg Gly Met Asp Val Asn
 1          5          10          15
Ser Gln Arg Xaa Leu Leu Val Trp Gly Ile Pro Val Asn Cys Asp Glu
 20          25          30
Ala Glu Ile Glu Glu Thr Leu Gln Ala Ala Met Pro Gln Val Ser Tyr
 35          40          45
Arg Met Leu Gly Arg Met Phe Trp Arg Glu Glu Asn Ala Lys Ala Ala
 50          55          60
Leu Leu Glu Leu Thr Gly Ala Val Asp Tyr Ala Ala Ile Pro Arg Glu
 65          70          75          80
Met Pro Gly Lys Gly Val Trp Lys Val Leu Phe Lys Pro Pro Thr
 85          90          95
Ser Asp Ala Glu Phe Leu Glu Arg Leu His Leu Phe Leu Ala Arg Glu
 100         105         110
Gly Trp Thr Val Gln Asp Val Ala Arg Val Leu Gly Phe Gln Asn Pro
 115         120         125
Thr Pro Thr Pro Gly Pro Glu Met Pro Ala Glu Met Leu Asn Tyr Ile
 130         135         140
Leu Asp Asn Val Ile Gln Pro Leu Val Glu Ser Ile Trp Tyr Lys Arg
 145         150         155         160
Leu Thr Leu Phe Ser Gly Arg Asp Ile Pro Gly Pro Gly Glu Glu Thr
 165         170         175
Phe Asp Pro Trp Leu Glu His Thr Asn Glu Val Leu Glu Glu Trp Gln
 180         185         190
Val Ser Asp Val Glu Lys Arg Arg Arg Leu Met Glu Ser Leu Arg Gly
 195         200         205
Pro Ala Ala Asp Val Ile Arg Ile Leu Lys Ser Asn Asn Pro Ala Ile
 210         215         220
Thr Thr Ala Glu Cys Leu Lys Ala Leu Glu Gln Val Phe Gly Ser Val
 225         230         235         240
Glu Ser Ser Arg Asp Ala Gln Ile Lys Phe Leu Asn Thr Tyr Gln Asn
 245         250         255
Pro Gly Glu Lys Leu Ser Ala Tyr Val Ile Arg Leu Glu Pro Leu Leu
 260         265         270

Gln Lys Val Val Glu Lys Gly Ala Ile Asp Lys Asp Asn Val Asn Gln
 275         280         285
Ala Arg Leu Glu Gln Val Ile Ala Gly Ala Asn His Ser Gly Ala Ile
 290         295         300
Arg Arg Gln Leu Trp Leu Thr Gly Ala Gly Glu Gly Pro Gly Pro Lys
 305         310         315         320
Pro Leu Ser Val Ala Gly Ala Asp Pro
 325

```

5 <210> 30
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 30

Met Ala Leu Ala Leu Leu Glu Asp Trp Cys Arg Ile Met Ser Val Asp
 1 5 10 15
 Glu Gln Lys Ser Leu Met Val Thr Gly Ile Pro Ala Asp Phe Glu Glu
 20 25 30
 Ala Glu Ile Gln Glu Val Leu Gln Glu Thr Leu Lys Ser Leu Gly Arg
 35 40 45
 Tyr Arg Leu Leu Gly Lys Ile Phe Arg Lys Gln Glu Asn Ala Asn Ala
 50 55 60
 Val Leu Leu Glu Leu Leu Glu Asp Thr Asp Val Ser Ala Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Glu Val Gln Gly Lys Gly Gly Val Trp Lys Val Ile Phe Lys Thr Pro
 85 90 95
 Asn Gln Asp Thr Glu Phe Leu Glu Arg Leu Asn Leu Phe Leu Glu Lys
 100 105 110
 Glu Gly Gln Thr Val Ser Gly Met Phe Arg Ala Leu Gly Gln Glu Gly
 115 120 125
 Val Ser Pro Ala Thr Val Pro Cys Ile Ser Pro Glu Leu Leu Ala His
 130 135 140
 Leu Leu Gly Gln Ala Met Ala His Ala Pro Gln Pro Leu Leu Pro Met
 145 150 155 160
 Arg Tyr Arg Lys Leu Arg Val Phe Ser Gly Ser Ala Val Pro Ala Pro
 165 170 175
 Glu Glu Glu Ser Phe Glu Val Trp Leu Glu Gln Ala Thr Glu Ile Val
 180 185 190
 Lys Glu Trp Pro Val Thr Glu Ala Glu Lys Lys Arg Trp Leu Ala Glu
 195 200 205
 Ser Leu Arg Gly Pro Ala Leu Asp Leu Met His Ile Val Gln Ala Asp
 210 215 220
 Asn Pro Ser Ile Ser Val Glu Glu Cys Leu Glu Ala Phe Lys Gln Val
 225 230 235 240
 Phe Gly Ser Leu Glu Ser Arg Arg Thr Ala Gln Val Arg Tyr Leu Lys
 245 250 255
 Thr Tyr Gln Glu Glu Gly Glu Lys Val Ser Ala Tyr Val Leu Arg Leu
 260 265 270
 Glu Thr Leu Leu Arg Arg Ala Val Glu Lys Arg Ala Ile Pro Arg Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Gln Val Arg Leu Glu Gln Val Met Ala Gly Ala Thr Leu
 290 295 300
 Asn Gln Met Leu Trp Cys Arg Leu Arg Glu Leu Lys Asp Gln Gly Pro
 305 310 315 320
 Pro Pro Ser Phe Leu Glu Leu Met Lys Val Ile Arg Glu Glu Glu Glu
 325 330 335
 Glu Glu Ala Ser Phe Glu Asn Glu Ser Ile Glu Glu Pro Glu Glu Arg
 340 345 350
 Asp Gly Tyr Gly Arg Trp Asn His Glu Gly Asp Asp
 355 360

<210> 31
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Leu Ser Arg Ala Leu Gly His Glu
 1 5

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32
 Leu Thr Arg Val Leu Gly Asn Arg
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 33
Leu Asp Ala Leu Gly His Glu
1 5

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10
 <400> 34
Leu Glu Val Leu Gly Arg Glu
1 5

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 35
Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu
1 5

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 36
Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser
1 5

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 37
Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu
1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 38
Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu
1 5

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 39
Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu
1 5

<210> 40
 <211> 213

<212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 40

Met Glu Val Leu Arg Arg Ser Ser Val Phe Ala Ala Glu Ile Met Asp
 1 5 10 15
 Ala Phe Asp Arg Ser Pro Thr Asp Lys Glu Leu Val Ala Gln Ala Lys
 20 25 30
 Ala Leu Gly Arg Glu Tyr Val His Ala Arg Leu Leu Arg Ala Gly Leu
 35 40 45
 Ser Trp Ser Ala Pro Glu Arg Ala Ser Pro Ala Pro Gly Gly Arg Leu
 50 55 60
 Ala Glu Val Cys Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Ile Arg Pro Ser Val Tyr Arg Asn Val Ala Arg Gln Leu His Ile Pro
 85 90 95
 Leu Gln Ser Glu Pro Val Val Thr Asp Ala Phe Leu Ala Val Ala Gly
 100 105 110
 His Ile Phe Ser Ala Gly Ile Thr Trp Gly Lys Val Val Ser Leu Tyr
 115 120 125
 Ser Val Ala Ala Gly Leu Ala Val Asp Cys Val Arg Gln Ala Gln Pro
 130 135 140
 Ala Met Val His Ala Leu Val Asp Cys Leu Gly Glu Phe Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Thr Leu Ala Thr Trp Leu Arg Arg Arg Gly Gly Trp Thr Asp Val Leu
 165 170 175
 Lys Cys Val Val Ser Thr Asp Pro Gly Phe Arg Ser His Trp Leu Val
 180 185 190
 Ala Thr Leu Cys Ser Phe Gly Arg Phe Leu Lys Ala Ala Phe Phe Leu
 195 200 205
 Leu Leu Pro Glu Arg
 210

5

<210> 41
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Ser Gly Gln Gly Pro Gly Pro Pro Arg Gln Glu Cys Gly Glu
 1 5 10 15
 Pro Ala Leu Pro Ser Ala Ser Glu Glu Gln Val Ala Gln Asp Thr Glu
 20 25 30
 Glu Val Phe Arg Ser Tyr Val Phe Tyr Arg His Gln Gln Glu Gln Glu
 35 40 45
 Ala Glu Gly Val Ala Ala Pro Ala Asp Pro Glu Met Val Thr Leu Pro
 50 55 60
 Leu Gln Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg Tyr Asp Ser Glu Phe Gln Thr Met
 85 90 95
 Leu Gln His Leu Gln Pro Thr Ala Glu Asn Ala Tyr Glu Tyr Phe Thr
 100 105 110
 Lys Ile Ala Thr Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ile Asn Trp Gly Arg Val
 115 120 125
 Val Ala Leu Leu Gly Phe Gly Tyr Arg Leu Ala Leu His Val Tyr Gln
 130 135 140
 His Gly Leu Thr Gly Phe Leu Gly Gln Val Thr Arg Phe Val Val Asp
 145 150 155 160
 Phe Met Leu His His Cys Ile Ala Arg Trp Ile Ala Gln Arg Gly Gly
 165 170 175
 Trp Val Ala Ala Leu Asn Leu Gly Asn Gly Pro Ile Leu Asn Val Leu
 180 185 190
 Val Val Leu Gly Val Val Leu Leu Gly Gln Phe Val Val Arg Arg Phe
 195 200 205
 Phe Lys Ser
 210

10

<210> 42
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5

<400> 42
 Met Asp Gly Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Gly Gly Pro Thr Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly Phe Ile Gln
 20 25 30
 Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp
 35 40 45
 Pro Val Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys
 50 55 60
 Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu Gln Arg Met Ile
 65 70 75 80
 Ala Ala Val Asp Thr Asp Ser Pro Arg Glu Val Phe Phe Arg Val Ala
 85 90 95
 Ala Asp Met Phe Ser Asp Gly Asn Phe Asn Trp Gly Arg Val Val Ala
 100 105 110

 Leu Phe Tyr Phe Ala Ser Lys Leu Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys
 115 120 125
 Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ile Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu
 130 135 140
 Arg Glu Arg Leu Leu Gly Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly
 145 150 155 160
 Leu Leu Ser Tyr Phe Gly Thr Pro Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe
 165 170 175
 Val Ala Gly Val Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly
 180 185 190

10

<210> 43
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

15

<400> 43
 Met Ala Thr Pro Ala Ser Pro Asp Thr Arg Ala Leu Val Ala Asp Phe
 1 5 10 15
 Val Gly Tyr Lys Leu Arg Gln Lys Gly Tyr Val Cys Gly Ala Gly Pro
 20 25 30
 Gly Glu Gly Pro Ala Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala
 35 40 45
 Gly Asp Glu Phe Glu Thr Arg Phe Arg Arg Thr Phe Ser Asp Leu Ala
 50 55 60
 Ala Gln Leu His Val Thr Pro Gly Ser Ala Gln Gln Arg Phe Thr Gln
 65 70 75 80
 Val Ser Asp Glu Leu Phe Gln Gly Gly Pro Asn Trp Gly Arg Leu Val
 85 90 95
 Ala Phe Phe Val Phe Gly Ala Ala Leu Cys Ala Glu Ser Val Asn Lys
 100 105 110
 Glu Met Glu Pro Leu Val Gly Gln Val Gln Glu Trp Met Val Ala Tyr
 115 120 125
 Leu Glu Thr Arg Leu Ala Asp Trp Ile His Ser Ser Gly Gly Trp Ala
 130 135 140
 Glu Phe Thr Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ala Leu Glu Glu Ala Arg Arg
 145 150 155 160
 Leu Arg Glu Gly Asn Trp Ala Ser Val Arg Thr Val Leu Thr Gly Ala
 165 170 175
 Val Ala Leu Gly Ala Leu Val Thr Val Gly Ala Phe Phe Ala Ser Lys
 180 185 190

20

<210> 44
 <211> 194
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
 20 25 30
 Asn Arg Thr Glu Ala Pro Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys
 35 40 45
 Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg
 50 55 60
 Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val
 85 90 95

5

Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys
 100 105 110
 Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala
 115 120 125
 Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln
 130 135 140
 Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu
 165 170 175
 Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser
 180 185 190
 Arg Lys

<210> 45

<211> 200

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 20 25 30
 Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Pro Ala Leu Ser
 35 40 45
 Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp
 50 55 60
 Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu
 65 70 75 80
 His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val Val Glu
 85 90 95
 Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
 100 105 110
 Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser
 115 120 125
 Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg
 130 135 140
 His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val
 145 150 155 160
 Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu
 165 170 175
 Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr
 180 185 190
 Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys
 195 200

15

<210> 46

<211> 231

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 46

Ser Pro Ser Arg Gln Ala Ser Thr Arg Arg Met Ser Ile Gly Glu Ser
 1 5 10 15
 Ile Asp Gly Lys Ile Asn Asp Trp Glu Glu Pro Arg Leu Asp Ile Glu
 20 25 30
 Gly Phe Val Val Asp Tyr Phe Thr His Arg Ile Arg Gln Asn Gly Met
 35 40 45
 Glu Trp Phe Gly Ala Pro Gly Leu Pro Cys Gly Val Gln Pro Glu His
 50 55 60
 Glu Met Met Arg Val Met Gly Thr Ile Phe Glu Lys Lys His Ala Glu
 65 70 75 80
 Asn Phe Glu Thr Phe Cys Glu Gln Leu Leu Ala Val Pro Arg Ile Ser
 85 90 95
 Phe Ser Leu Tyr Gln Asp Val Val Arg Thr Val Gly Asn Ala Gln Thr
 100 105 110
 Asp Gln Cys Pro Met Ser Tyr Gly Arg Leu Ile Gly Leu Ile Ser Phe
 115 120 125
 Gly Gly Phe Val Ala Ala Lys Met Met Glu Ser Val Glu Leu Gln Gly
 130 135 140
 Gln Val Arg Asn Leu Phe Val Tyr Thr Ser Leu Phe Ile Lys Thr Arg
 145 150 155 160
 Ile Arg Asn Asn Trp Lys Glu His Asn Arg Ser Trp Asp Asp Phe Met
 165 170 175
 Thr Leu Gly Lys Gln Met Lys Glu Asp Tyr Glu Arg Ala Glu Ala Glu
 180 185 190
 Lys Val Gly Arg Arg Lys Gln Asn Arg Arg Trp Ser Met Ile Gly Ala
 195 200 205
 Gly Val Thr Ala Gly Ala Ile Gly Ile Val Gly Val Val Val Cys Gly
 210 215 220
 Arg Met Met Phe Ser Leu Lys
 225 230

5

<210> 47

<211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de consenso

<221> VARIANTE

15 <222> 77, 114, 123, 16B, 221

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 47

Met Ala Ala Pro Gln Asp Val His Val Arg Ile Cys Asn Gln Glx Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Phe Asp Leu Glu Val Lys Ala Leu Ile Gln Asp Ile Arg Asp
 20 25 30
 Cys Ser Gly Pro Leu Ser Ala Leu Thr Glu Leu Asn Thr Lys Val Lys
 35 40 45
 Glu Lys Phe Gln Gln Leu Arg His Arg Ile Gln Pro Val Leu Tyr Gln
 50 55 60
 Arg Ala Thr Ile Asn Glx Ala Ser Thr Ile Thr Thr Xaa Leu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Leu Thr Asp Phe Ser Ser Thr Gln Asn Asp Phe Asn Ser Pro Thr
 85 90 95
 Tyr Phe Val Thr Phe Ser Asp Leu Glx Gln Leu Ala Lys Glx Gln Asp
 100 105 110
 Lys Xaa Ser Glu Lys Gln Leu Leu Leu Gln Xaa Val Glu Asn Arg Lys
 115 120 125
 Lys Gln Asn Leu Lys Asn Gln Ala Ser Trp Arg Lys Ala Asn Leu Thr
 130 135 140
 Cys Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ile Arg Lys Ala Asn Leu Leu Gln Gln
 145 150 155 160
 Gln Asp Leu Leu Ala Gln Arg Xaa Thr Tyr Lys Lys Ser Leu Ala Gln
 165 170 175

Tyr Ser Ser Thr Ile Thr Lys Ser Leu Asn Gly Ile Ser Arg Gln Lys
 180 185 190
Ala Gln Gln Val Gln Gln Ser Glu Glu Ala Asn Gln Ser Leu Val Thr
 195 200 205
Ser Ser Arg Thr Ile Leu Asp Ala Lys Glu Glu Thr Xaa Ser Asn Ser
 210 215 220
Gln Thr Ile Gln Leu Gln Arg Lys Leu Ile Thr Lys Tyr Met Arg Arg
 225 230 235 240
Glx Leu Thr Asp Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Leu Arg Leu Thr Leu
 245 250 255
Ala Thr Val Leu Tyr Ile Val Lys Lys Arg Leu Phe Pro Phe
 260 265 270

5 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 48
Lys Ala Glu Leu Leu Gln Gly Gly Asp Lys Lys Arg Gln Arg
 1 5 10

15 <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 49
Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10

25 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 50
Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Leu Cys
 1 5 10

35 <210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

45 <400> 51
Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1 5 10

50 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

5 <400> 52
Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
 1 5 10

<210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

15 <400> 53
Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu Leu His Gln Arg
 1 5 10

<210> 54
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

25 <400> 54
Ser Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn
 1 5 10

30 <210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 55
Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Ala Tyr
 1 5 10

40 <210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 56
Cys Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu Gln Ile
 1 5 10

50 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 57
Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
 1 5 10

5 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 58
His Leu Thr Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg
 1 5 10

15 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 59
Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn
 1 5 10

25 <210> 60
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 60
Met Glu Pro Ser Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln
 1 5 10 15
Pro Glu Asp Gly Glu Pro Val Thr Gln Pro Gly Ser Leu Leu Ser Ala
 20 25 30
Asp Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln
 35 40 45
Leu Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Thr Ser
 50 55 60
Gln Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro
 65 70 75 80
Gly Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe
 85 90 95
Tyr Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala
 100 105 110
Val Leu Pro Ile Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Tyr Gln His Gln
 115 120 125
Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe
 130 135 140
His Arg Leu His Val Gln Gln His Gln Gln Asn Gln Asn Pro Val Trp
 145 150 155 160
Asn Gln Ile Leu Leu Phe Leu His Asn Leu Ala Leu Asn Gly Glu Glu
 165 170 175
Asn Pro Asn Gly Ala Gly Pro Arg
 180

35 <210> 61
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 61
 Met Glu Pro Pro Gln Cys Val Glu Glu Leu Glu Asp Asp Val Phe Gln
 1 5 10 15
 Ser Glu Asp Gly Glu Pro Gly Thr Gln Pro Gly Gly Leu Leu Ser Ala
 20 25 30
 Asp Leu Phe Ala Gln Ser Gln Leu Asp Cys Pro Leu Ser Arg Leu Gln
 35 40 45
 Leu Phe Pro Leu Thr His Cys Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Ile Ser
 50 55 60
 Gln Glu Asp Lys Ala Thr Gln Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Ser Gln
 65 70 75 80
 Gly Val Met Leu Pro Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Gln Arg Leu Phe
 85 90 95
 Tyr Gly Asn Ala Gly Tyr Arg Leu Pro Leu Pro Ala Ser Phe Pro Ala
 100 105 110
 Gly Ser Pro Leu Gly Glu Gln Pro Pro Glu Gly Gln Phe Leu Gln His
 115 120 125
 Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Pro Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln
 130 135 140
 Phe His Arg Leu His Thr Gln Gln His Gln Gln Asn Arg Asp Arg Ala
 145 150 155 160
 Trp Asn Gln Val Phe Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Leu Asn Arg Gln
 165 170 175
 Glu Asn Pro Glu Gly Val Gly Pro Trp
 180 185

5 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 62
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

15 <210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 63
 Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Phe Asn Ala Tyr
 1 5 10

25 <210> .64
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 64
 Ile Gly Ser Lys Leu Ala Ala Cys Asp Phe Asp Ala Gln
 1 5 10

35 <210> 65
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido natural

5 <400> 65
Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asn Arg Arg
1 5 10

<210> 66
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Péptido natural

<400> 66
Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Asp Ser Asn
1 5 10

20 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 67
Ala Leu Leu Ala Cys Ile Gly Asp Asp Val Ser
1 5 10

30 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 68
Thr Ala Ala Leu Lys Ala Gly Asp His Gln Arg
 40 **1 5 10**

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

<400> 69
Gly Arg Glu Leu Arg Arg Ser Asp Phe Val Asp Ser
1 5 10

<210> 70
 <211> 22
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

60

<400> 70
Ser Ser Ala Ala Glu Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gly Asp
1 5 10 15
Glu Leu Asp Arg Arg Tyr
20

5 <210> 71
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 71
Glu Gly Pro Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala Gly Asp
1 5 10 15
Glu Phe Glu Thr Arg Phe
20

15 <210> 72
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 72
Leu Gln Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile
1 5 10 15
Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
20

25 <210> 73
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 73
Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly
1 5 10 15
Asp Glu Leu Asp Ser Asn
20

35 <210> 74
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido natural

45 <400> 74
Ala Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Asp Phe Ser Arg Arg Tyr
20

50 <210> 75
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido natural

5 <400> 75
Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

<210> 76
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

15 <400> 76
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp
1 5 10 15
Ser Met Asp Arg Ser Ile
20

<210> 77
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

25 <400> 77
Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly
1 5 10 15
Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr
20

30 <210> 78
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 78
Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met
1 5 10 15
Asp Val Ser Leu
20

40 <210> 79
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 79
Met Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp
1 5 10 15
Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr
20

50

<210> 80
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido natural

 10 <400> 80
Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp
1 5 10 15
Glu Leu His Gln Arg Thr
20

 <210> 81
 <211> 22
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido natural

 20 <400> 81
His Gln Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp
1 5 10 15
Gln Phe His Arg Leu His
20

 <210> 82
 25 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Péptido natural

 <400> 82
Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Glu Ser Ile Leu Lys Lys Asn Ser Asp
1 5 10 15
Trp Ile Trp Asp Trp Ser
20

 35 <210> 83
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Péptido natural

 <400> 83
Gly Arg Leu Ala Glu Val Cys Ala Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu
1 5 10 15
Leu Glu Met Ile Arg Pro
20

 45 <210> 84
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 84
Leu Ala Glu Val Cys Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu
1 5 10 15
Gln Ile Arg

5 <210> 85
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 85
Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly His Glu Asn Gly Ser
1 5 10 15
Leu Asp Pro

15 <210> 86
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 86
Ala Thr Ser Arg Lys Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val
1 5 10 15
Gln Arg Asn His Glu Thr Ala
20

25 <210> 87
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido natural

<400> 87
Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp
1 5 10 15
Glu Leu His Gln Arg Thr
20

35 <210> 88
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido natural

45 <400> 88
Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp
1 5 10 15
Asp Leu Asn Ala Gln Tyr
20

50 <210> 89
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido natural

<400> 89
Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ile Gly Asp
1 5 10 15
Lys Val Tyr Cys Thr Trp
20

5

<210> 90
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Péptido natural

<400> 90
Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Cys Ala Gln Leu Arg Arg Ile Gly Asp
1 5 10 15
Lys Val Asn Leu Arg Gln
20

15

<210> 91
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Péptido natural

25

<400> 91
Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ala Asp
1 5 10 15
Trp Val Ser Asp Trp Ser
20

30

<210> 92
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Péptido generado por un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 17
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

40

<221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparigina
 <221> VARIANTE
 <222> (L)...(23)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

45

<400> 92
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp
1 5 10 15
Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20

50

<210> 93
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural

<221> VARIANTE
 <222> 12, 16
 <223> Xaa = un aminoácido fijado
 <221> VARIANTE
 5 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

 <400> 93
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile
20
 10
 <210> 94
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 17
 20 <223> Xaa = un aminoácido fijado

 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina
 25
 <400> 94
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Glu Asp
1 5 10 15
Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20
 30
 <210> 95
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 12, 16
 <223> Xaa = un aminoácido fijado
 40 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

 <400> 95
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Glu Asp Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile
20
 45
 <210> 96
 <211> 22
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 55 <222> 12, 16
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

- <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina
- 5 <400> 96
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Ser Asp Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20
- <210> 97
 <211> 22
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 15 <221> VARIANTE
 <222> 12, 16
 <223> Xaa = un aminoácido fijado
- <221> VARIANTE
 20 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina
- <400> 97
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20
- 25 <210> 98
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 12, 16
 35 <223> Xaa = un aminoácido fijado
- <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina
- 40 <400> 98
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Glu Asp Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20
- <210> 99
 45 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 50 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 8, 12
 <223> Xaa = un aminoácido fijado
- 55 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 99
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly Asp
1 5 10 15

Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20

5
 <210> 100
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 7, 11

15
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

<221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

20
 <400> 100
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly Asp Ser
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile
20

<210> 101
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 4, 8
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

30
 <400> 101
Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly Asp Ser Xaa Asp Arg
1 5 10 15
Trp

<210> 102
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 8, 12
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

40
 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

45
 <400> 102
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Glu Asp
1 5 10 15
Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20

50
 <210> 103

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 7, 11
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

10 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

15 <400> 103
 Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly Asp Ser
 1 5 10 15
 Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

<210> 104
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 7, 11

25 <223> Xaa = un aminoácido fijado
 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

30 <400> 104
 Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Xaa Asp Arg Ser Ile
 20

35 <210> 105
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 9, 13

45 <223> Xaa = un aminoácido fijado
 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

50 <400> 105
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Xaa His Leu Ala Xaa Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

<210> 106
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 10, 17
 5 <223> Xaa = un aminoácido fijado
 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> xaa = L-asparagina

10 <400> 106
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg Xaa Leu Ala Gln Val Gly Asp
1 5 10 15
Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
20

<210> 107
 <211> 23
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 20 <221> VARIANTE
 <222> 5, 9, 13, 17
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

25 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 107
Glu Asp Ile Ile Xaa Asn Ile Ala Xaa His Leu Ala Xaa Val Gly Asp
1 5 10 15
Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 30
20

<210> 108
 <211> 25
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 40 <221> VARIANTE
 <222> 14, 18
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

45 <221> VARIANTE
 <222> 15
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 108
Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Xaa Xaa Ser
1 5 10 15
Asp Xaa Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

50 <210> 109
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE

<222> 12, 16
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

<221> VARIANTE
 5 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 109
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Ala Ala Xaa Val Gly Ala Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile
20

10 <210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 12, 16
 20 <223> Xaa = un aminoácido fijado

<221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

25 <400> 110
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Ala Ala Xaa Val Glu Ala Xaa
1 5 10 15
Xaa Asp Arg Ser Ile
20

30 <210> 111
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido generado por un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 9, 13
 <223> Xaa = un aminoácido fijado

40 <400> 111
Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Xaa Ile Gly Asp Xaa Phe Asn Ala
1 5 10 15
Tyr Tyr Ala Arg Arg
20

<210> 112
 <211> 23
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 50 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 112

Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

5 <210> 113
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 10 <221> VARIANTE
 <222> 13, 17
 <223> Xaa = enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 5

15 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 113
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

20 <210> 114
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 17
 30 <223> Xaa = Enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 5

<221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

35 <400> 114
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Glu Asp
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

40 <210> 115
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 <222> 8, 12
 <223> Xaa = Enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 5

50 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

<400> 115
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

55

<210> 116
 <211> 23
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural
 <221> VARIANTE
 10 <222> 9, 13
 <223> Xaa = Enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 5

 <221> VARIANTE
 <222> 18
 15 <223> Xaa = L-asparagina

 <400> 116
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Xaa His Leu Ala Xaa Val Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

 20 <210> 117
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Péptido generado por la sustitución de un aminoácido no natural

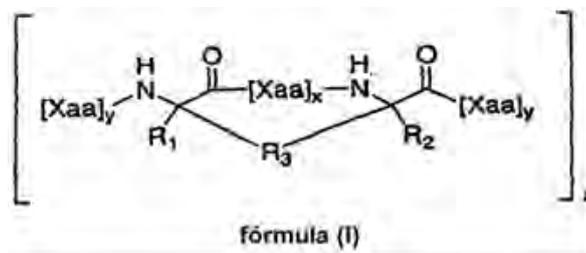
 <221> VARIANTE
 <222> 10
 30 <223> Xaa = enantiómero R del aminoácido olefínico en el carbono 5

 <221> VARIANTE
 <222> 17
 <223> Xaa = enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 8
 35
 <221> VARIANTE
 <222> 18
 <223> Xaa = L-asparagina

 40 <400> 117
 Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg Xaa Leu Ala Gln Val Glu Asp
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Asp Arg Ser Ile Trp
 20

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido α -helicoidal adecuado para activar o inhibir la muerte celular de fórmula (I):



en la que:

- 5 cada R_1 y R_2 son independientemente H, alquilo C_1 - C_{20} , alquenilo C_2 - C_{20} , alquinilo C_2 - C_{20} , arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo o heterociclicilalquilo;
- R_3 es un reticulante que es alquilo C_1 - C_{20} , alquenilo C_2 - C_{20} ó alquinilo C_2 - C_{20} ; donde R_3 está sustituido con de 0 a 6 R_5 ;
- 10 R_5 es halógeno, alquilo, OR_6 , $N(R_6)_2$, SR_6 , SOR_6 , SO_2R_6 , CO_2R_6 , R_6 , un epóxido, un resto fluorescente o un radioisótopo;
- R_6 es H, alquilo o un agente terapéutico;
- x es un número entero seleccionado de 2, 3 ó 6;
- cada y es independientemente un número entero de 0 a 100;
- z es un número entero de 1 a 10; y
- 15 cada Xaa es independientemente un alfa-aminoácido; y
- en donde el polipéptido es transportado o es transportado activamente a través de la membrana celular, según se determina en un ensayo que comprende preparar un polipéptido marcado con fluorescencia, aplicar el polipéptido marcado con fluorescencia a una célula intacta y someter a ensayo la célula en cuanto a fluorescencia celular por microscopía o detección de fluorescencia celular de alto rendimiento.
- 20 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 son H o alquilo C_{1-6} .
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es un alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es alquilo.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es alquenilo.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que z es 1.
- 25 7. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 son cada uno metilo.
8. El polipéptido de la reivindicación 7, en el que x es 3 ó 6.
9. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es alquilo C_8 ó alquenilo C_8 y x es 3.
10. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es alquilo C_{11} o alquenilo C_{11} y x es 6.
11. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que R_3 es $-CH_2-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$.
- 30 12. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une a un polipéptido de la familia BCL-2.
13. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende un dominio de homología BCL-2 o un dominio BH3.
14. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une a un dominio BH1, BH2 o BH3.
15. El polipéptido de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5, en el que R_3 es alquilo C_8 o alquilo C_{11} .

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

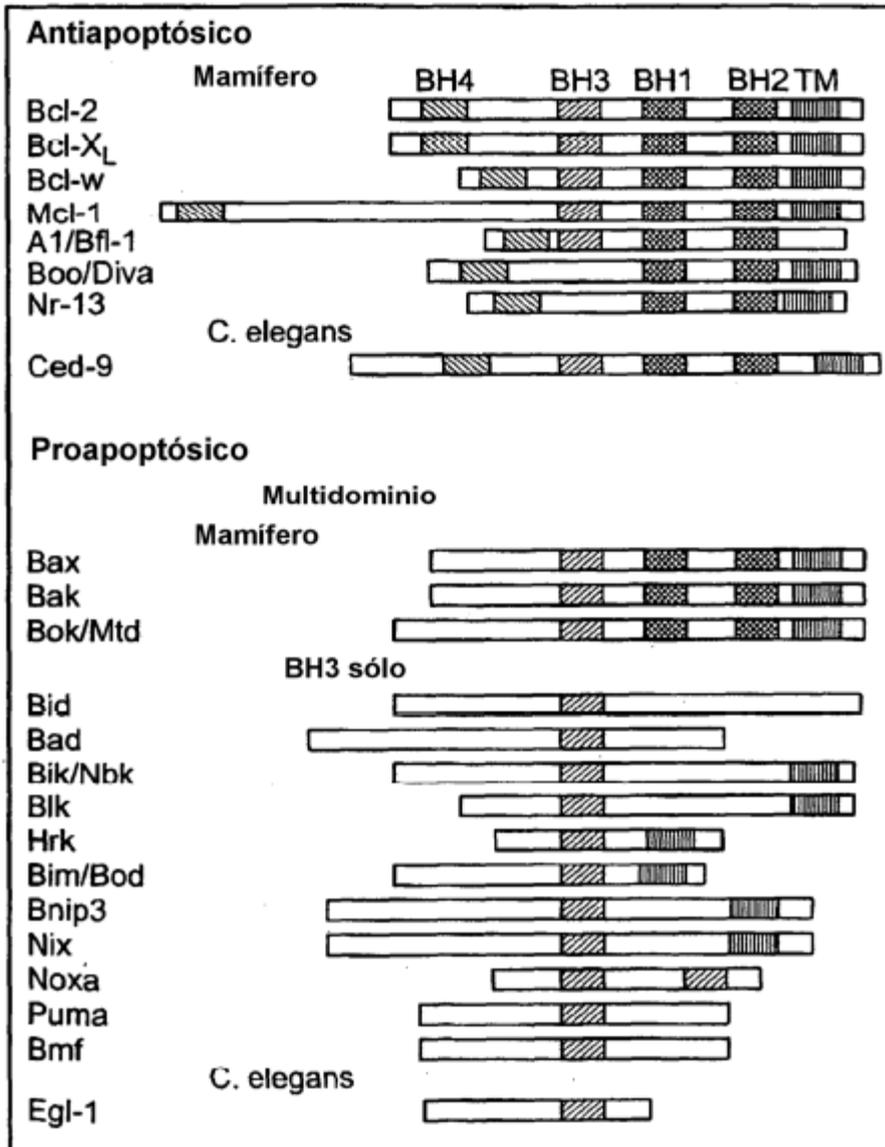


FIG. 1

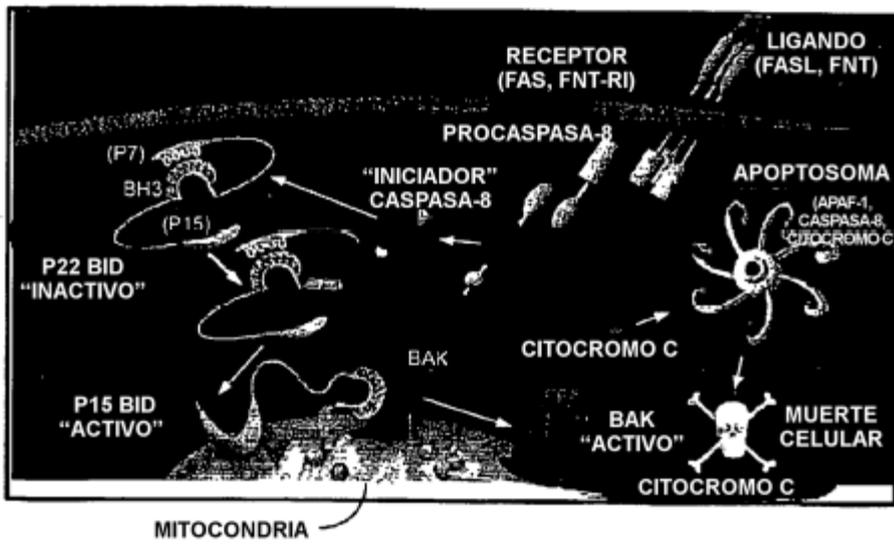


FIG. 2

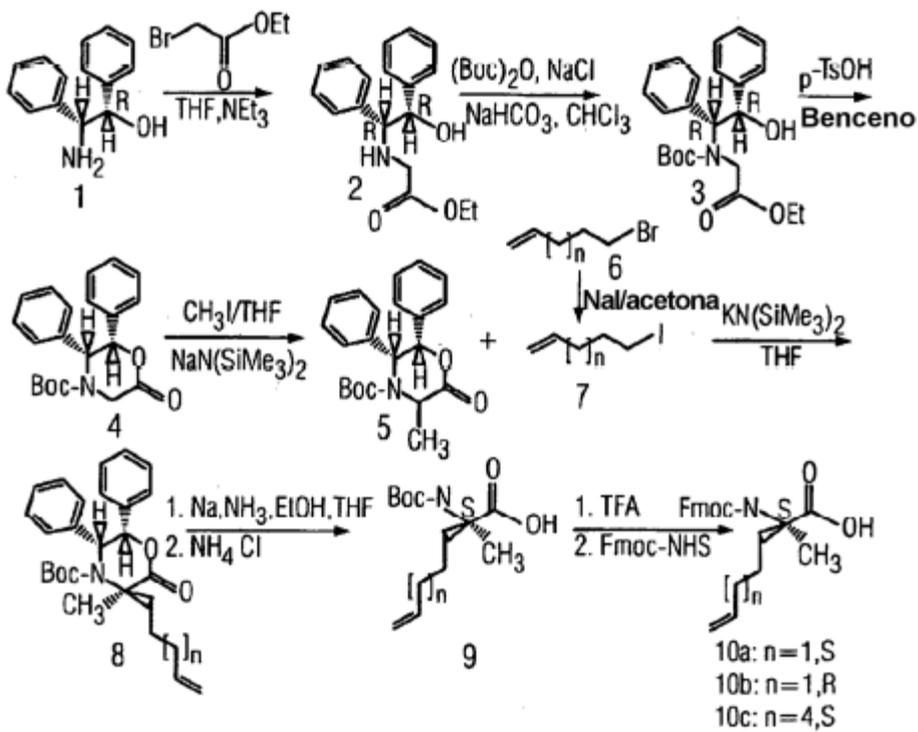


FIG. 3

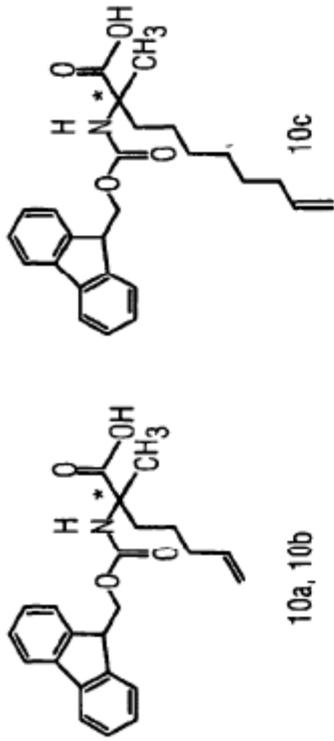
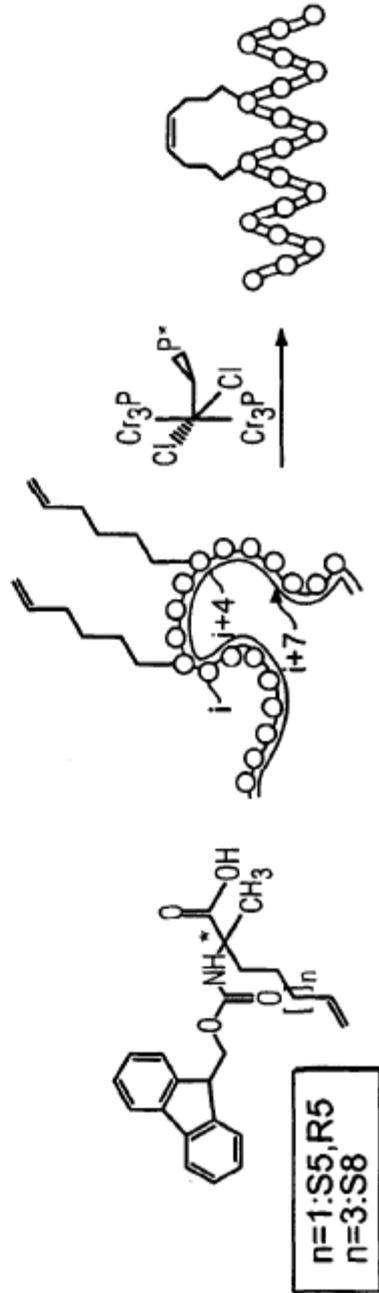


FIG. 4A



<u>Compuesto</u>	<u>Secuencia</u>	<u>HRMS</u>
SAHB3BIDA	EDIIRNIARHLA*VGD*N _L DRSIW	2752.8
SAHB3BID(-E.W)A	DIIRNIARHLA*VGD*N _L DRSI	2436.6
SAHB3BID(G→E)A	EDIIRNIARHLA*VED*N _L DRSIW	2824.8
SAHB3BID(-E.W.G→E)A	DIIRNIARHLA*VED*N _L DRSI	2507
SAHB3BID(G→S)A	DIIRNIARHLA*VSD*N _L DRSIW	2654.7
FITC-SAHB3BIDA	FITC-A _β -EDIIRNIARHLA*VGD*N _L DRSIW	3169.6
FITC-SAHB3BID(G→E)A	FITC-A _β -EDIIRNIARHLA*VED*N _L DRSIW	3242.8 * - 10a
Biot-SAHB3BIDA	K(Biot)-DIIRNIARHLA*VGD*N _L DRSIW	3108.9 # = 10b
Biot-SAHB3BID(G→E)A	K(Biot)-DIIRNIARHLA*VED*N _L DRSIW	3179.1 ^ = 10c
SAHB3BIDB	EDIIRNI*RHL*QVGDSN _L DRSIW	2825.7
SAHB3BID(-E.W)B	DIIRNI*RHL*QVGDSN _L DRSI	2511.6
SAHB3BID(tr)B	RNI*RHL*QVGDSN _L DRW	2155.8
SAHB3BID(G→E)B	EDIIRNI*RHL*QVEDSN _L DRSIW	2710.8
Biot-SAHB3BIDB	K(Biot)-DIIRNI*RHL*QVGDSN _L DRSIW	3179.73
Biot-SAHB3BID(G→E)B	K(Biot)-DIIRNI*RHL*QVEDSN _L DRSI	3066.7
SAHB3BIDC	EDIIRNIA*HLA*VGDSN _L DRSIW	2683.5
SAHB3BIDD	EDIIRNIAR#LAQVGD [^] N _L DRSIW	2785.8
SAHB3BIDE	EDII#NIA#HLA*VGD*N _L DRSIW	2691.8
SAHB3BADA	NLWAAORYGRELR*N _L SD*FVDSFKK	3090.8
FITC-SAHB3BID(-EW)A	FITC-A _β DIIRNIARHAA*VGA*N _L DRSI	2855.4
FITC-SAHB3BID(-EW.G→E)A	FITC-A _β DIIRNIARHAA*VEA*N _L DRSI	2927.5
SAHB3BID(-EW.L→A.D→A)A	DIIRNIARHAA*VGA*N _L DRSI	2352.4
SAHB3BIA	IWI AQELR*IGD*FNAYYARR	2645.4
FITC-SAHB3BIA	FITC-A _β IWI AQELR*IGD*FNAYYARR	3063.5
FITC-SAHB3BADA	FITC-A _β NLWAAORYGRELR*N _L SD*FVDSFKK	3507.7

FIG. 5A

Compuesto	Secuencia
BID BH3	EDIIRNIARHLAQVGDSN _L DRSIW
SAHB _A	EDIIRNIARHLA*VGD*N _L DRSIW
SAHB _A (G→E)	EDIIRNIARHLA*VED*N _L DRSIW
SAHB _B	EDIIRNI*RHL*QVGDSN _L DRSIW
SAHB _C	EDIIRNIA*HLA*VGDSN _L DRSIW
SAHB _D	EDIIRNIAR⊕LAQVGD*N _L DRSIW

* = S5, ⊕ = R5, ⚭ = S8

FIG. 5B

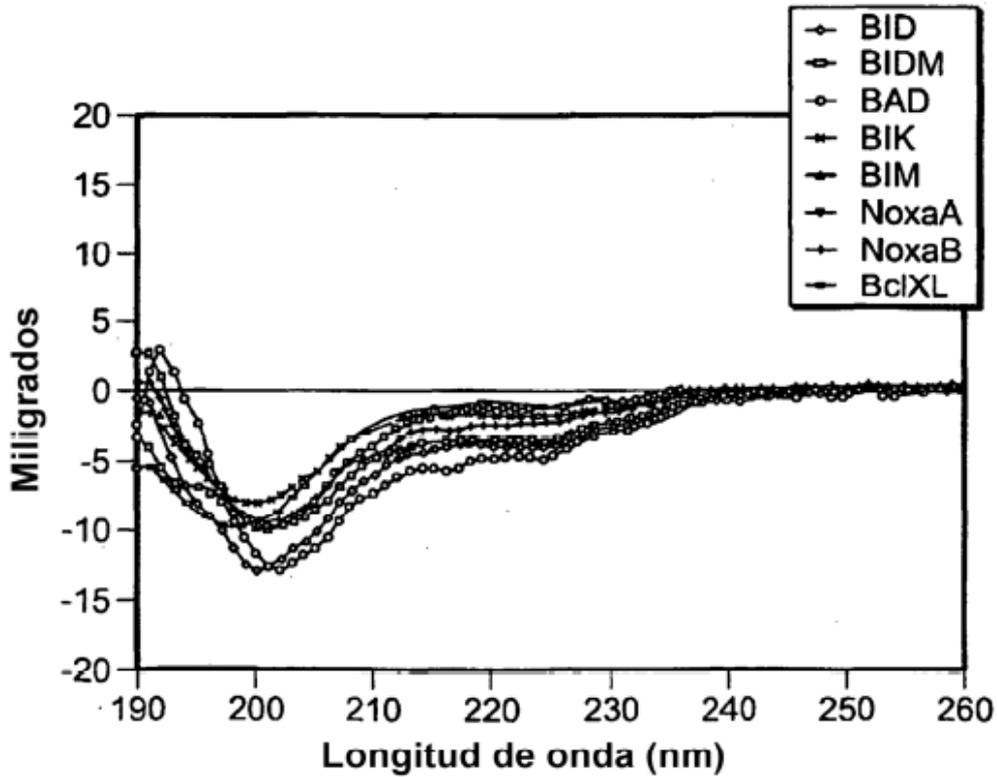


FIG. 6A

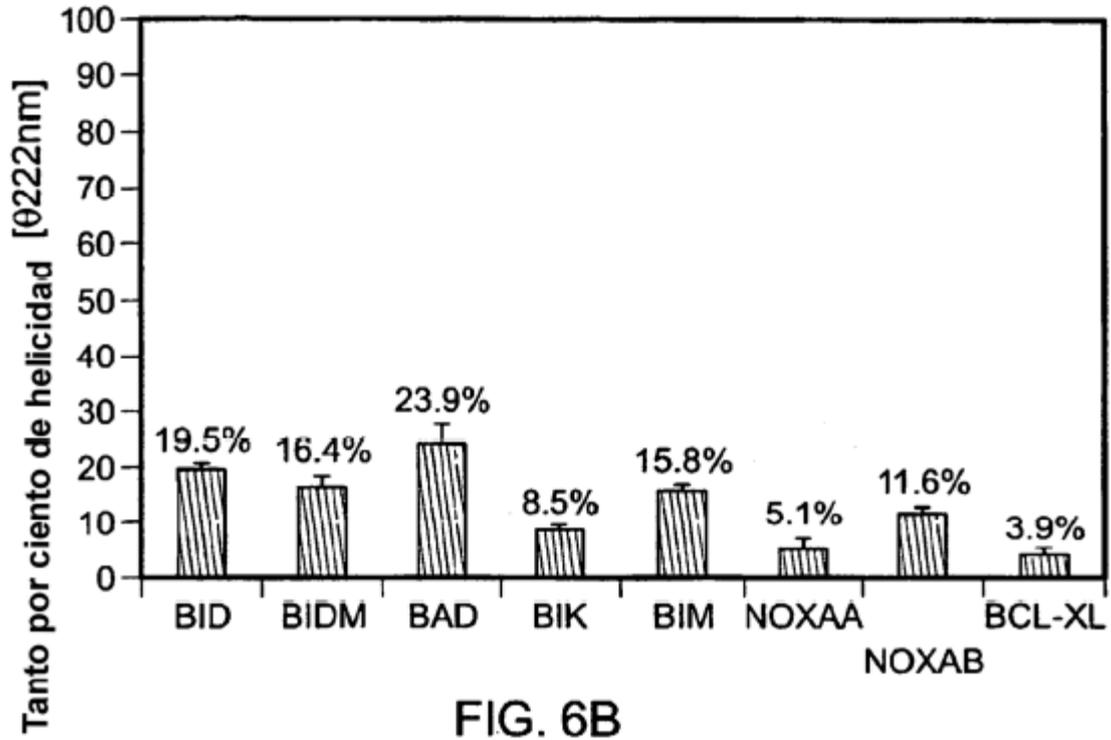


FIG. 6B

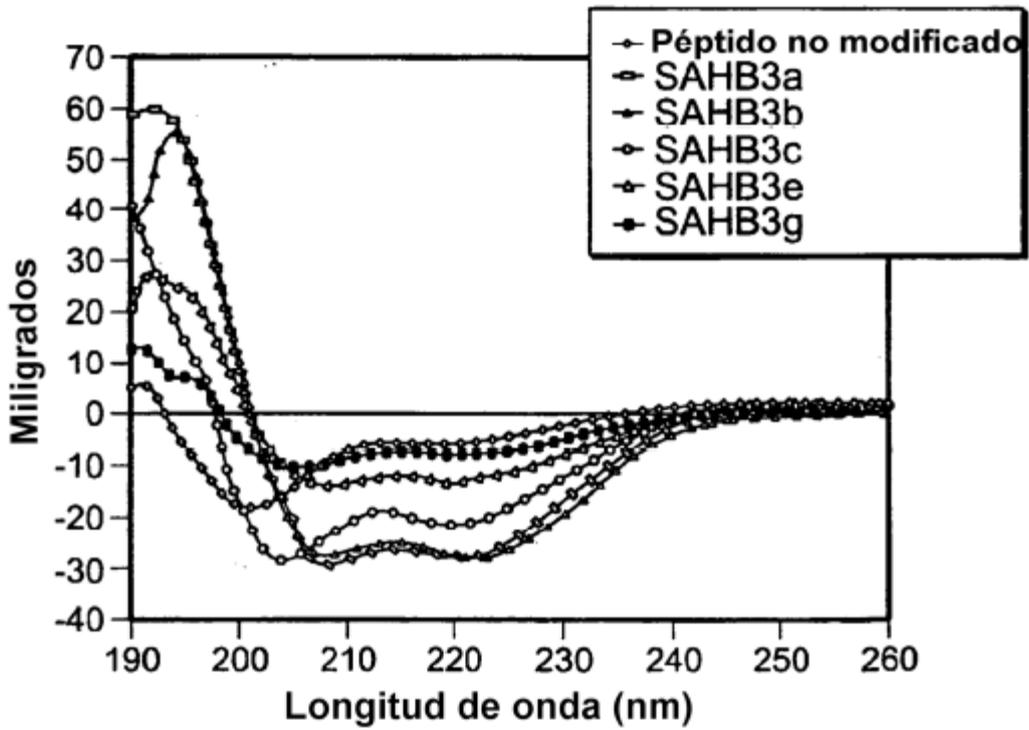
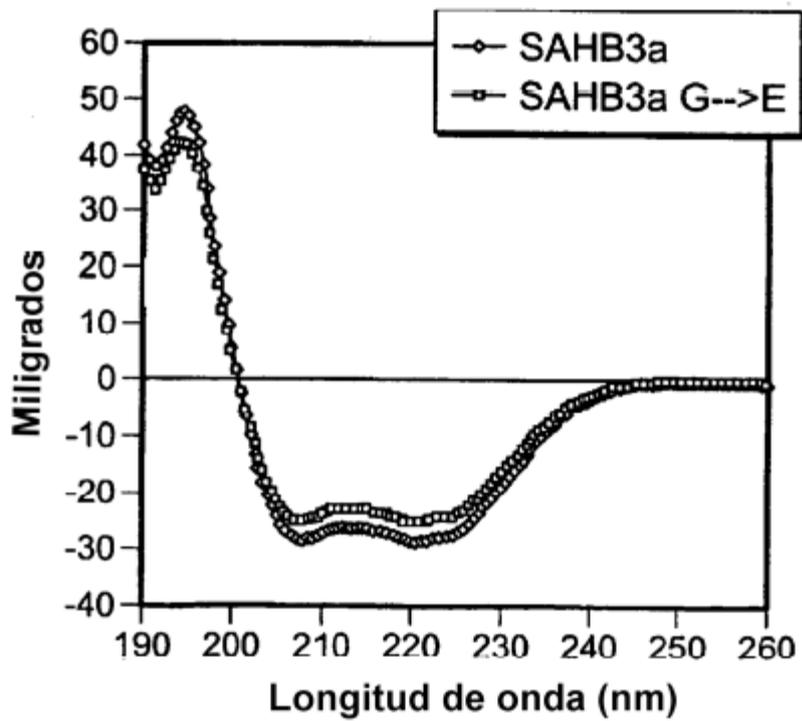
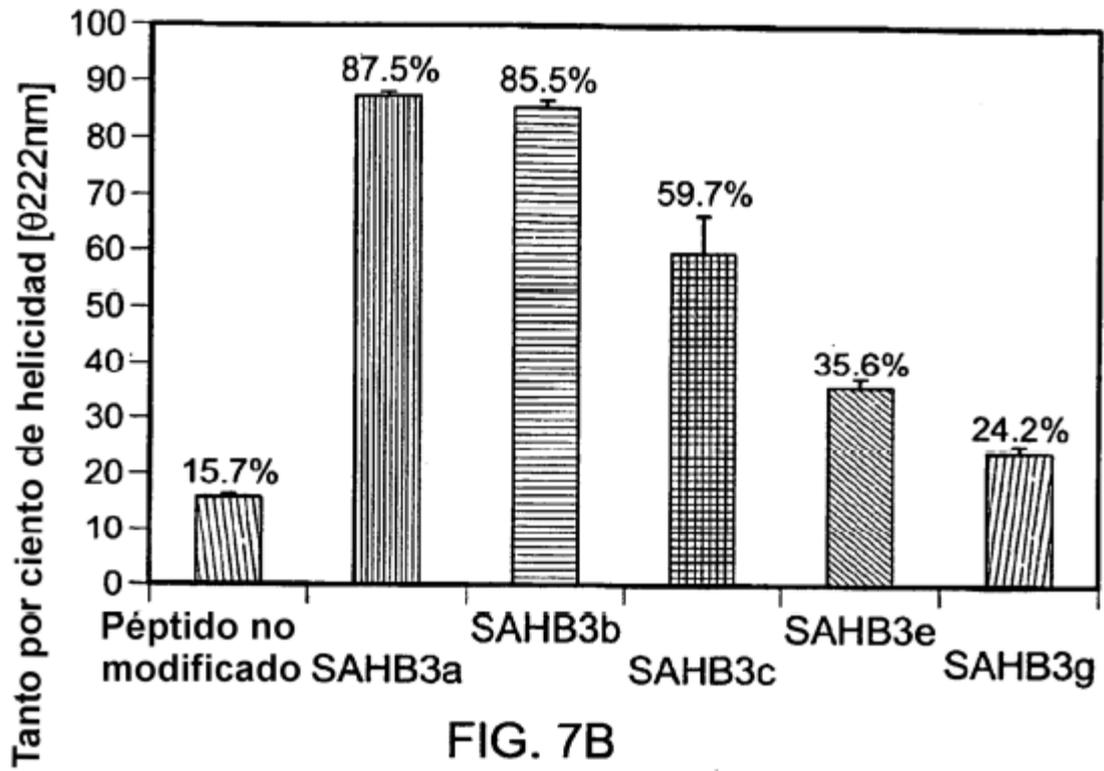


FIG. 7A



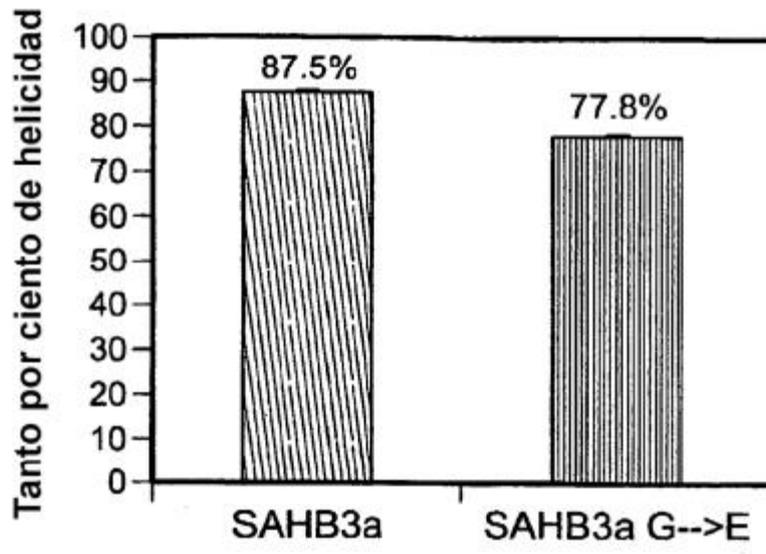


FIG. 8B

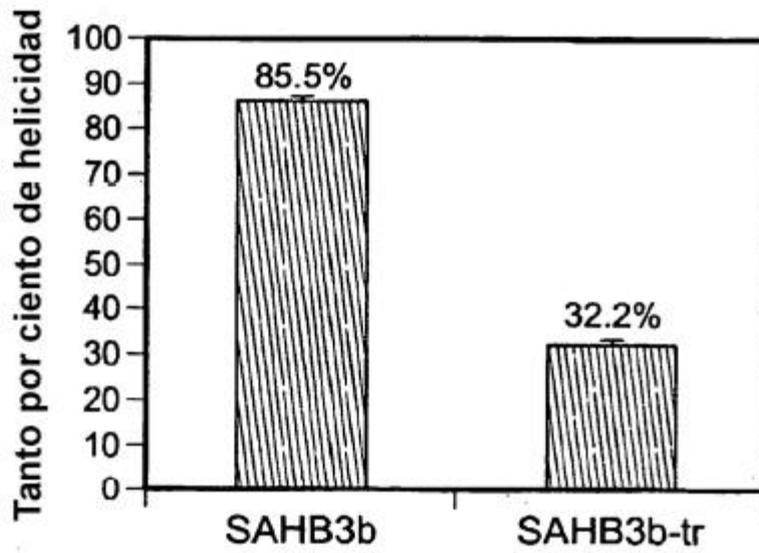


FIG. 9

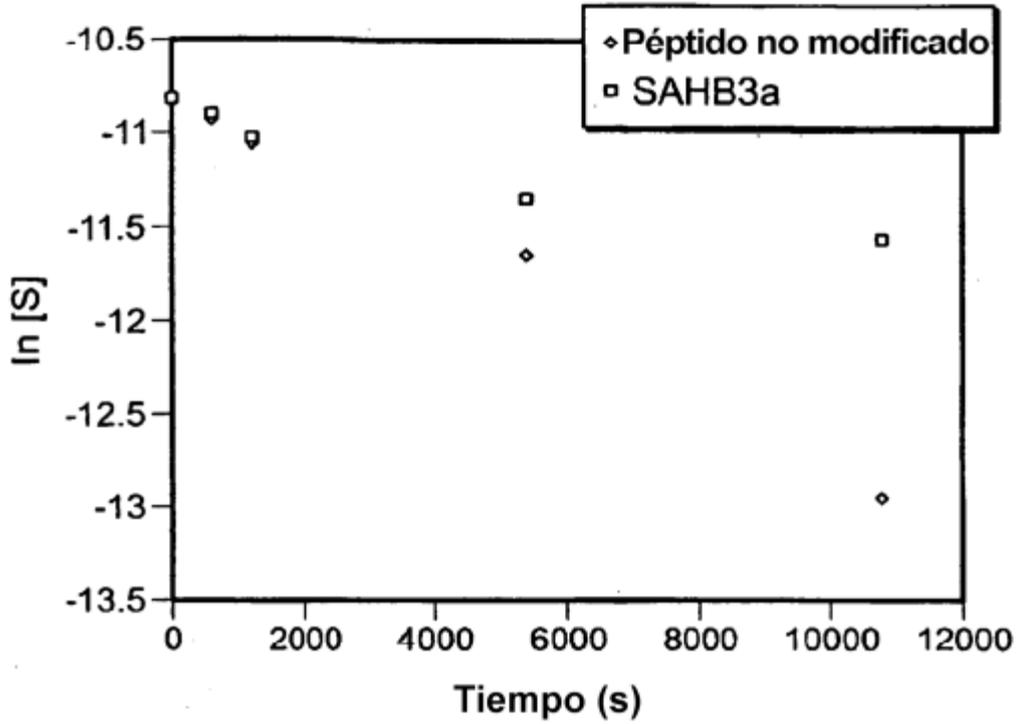


FIG. 10A

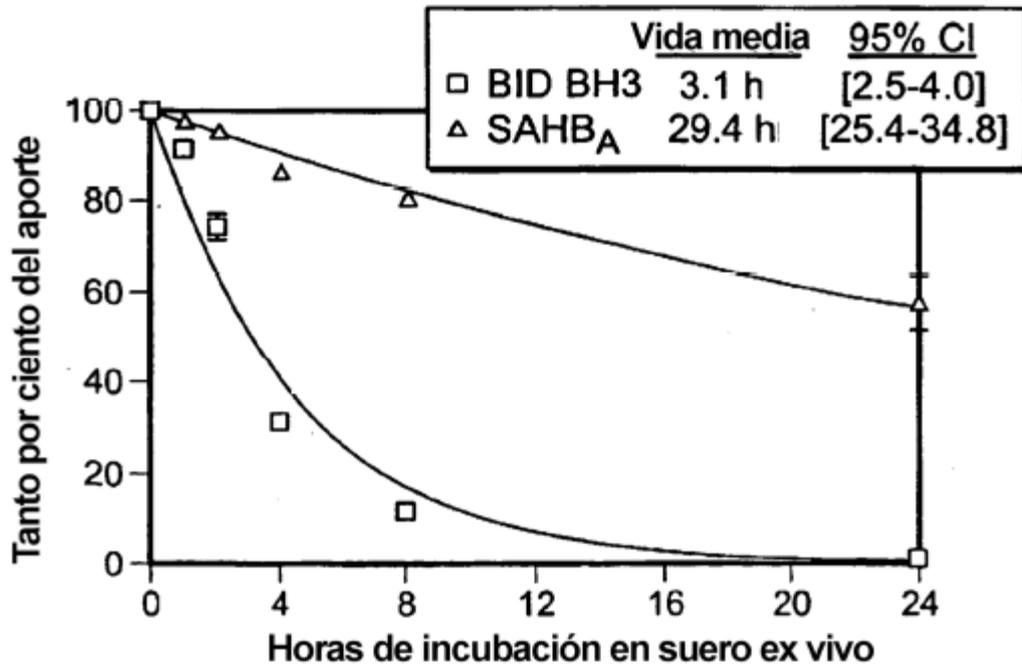


FIG. 10B

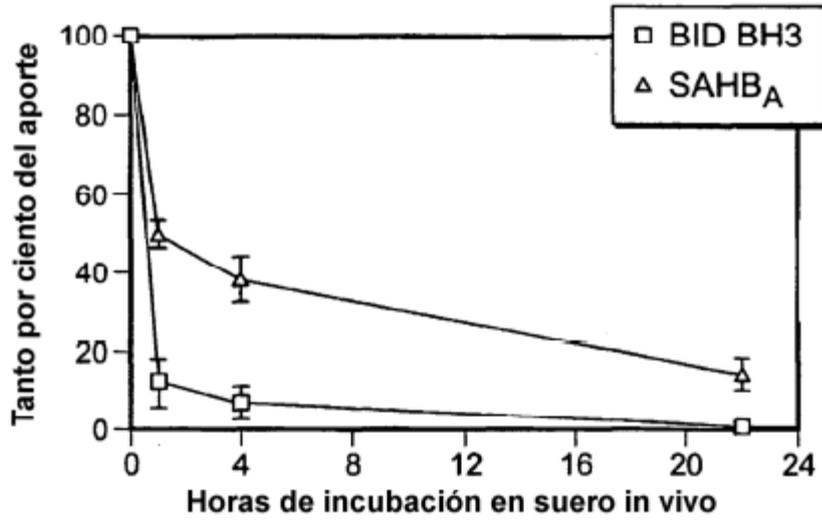


FIG. 10C

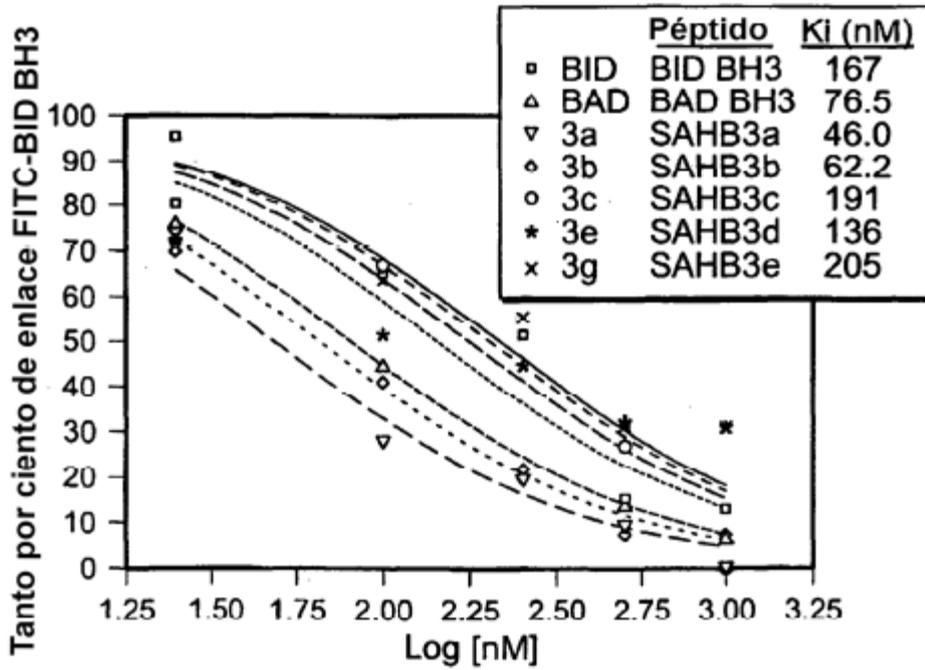


FIG. 11A

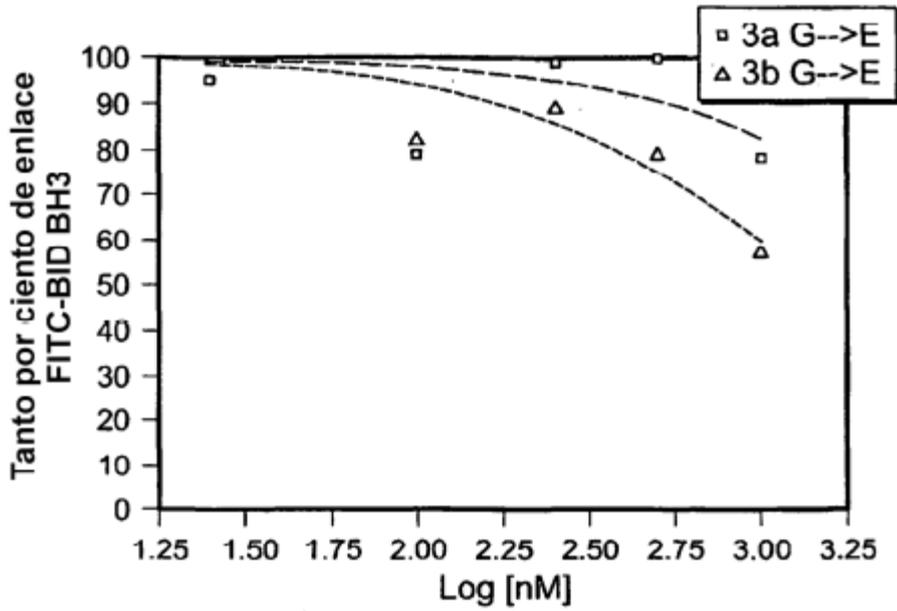


FIG. 11B

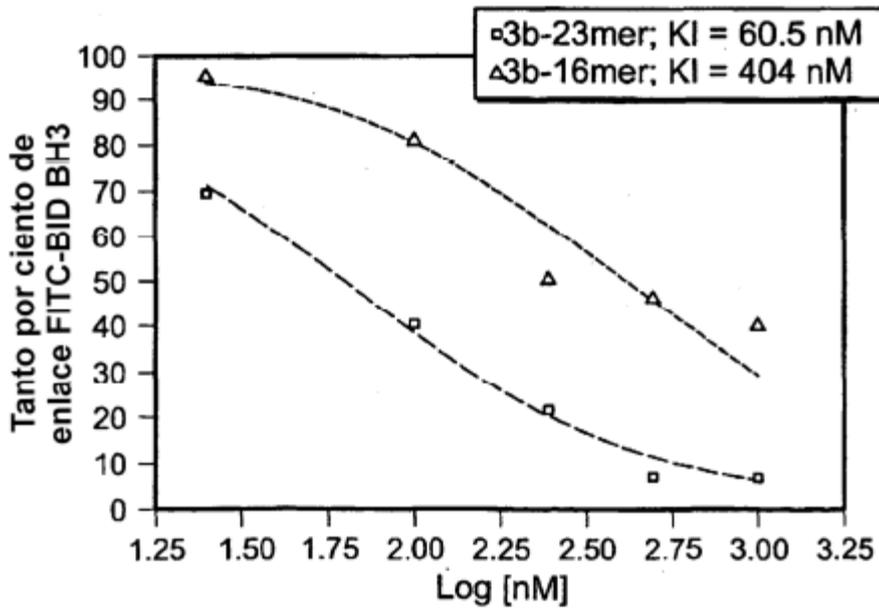


FIG. 11C

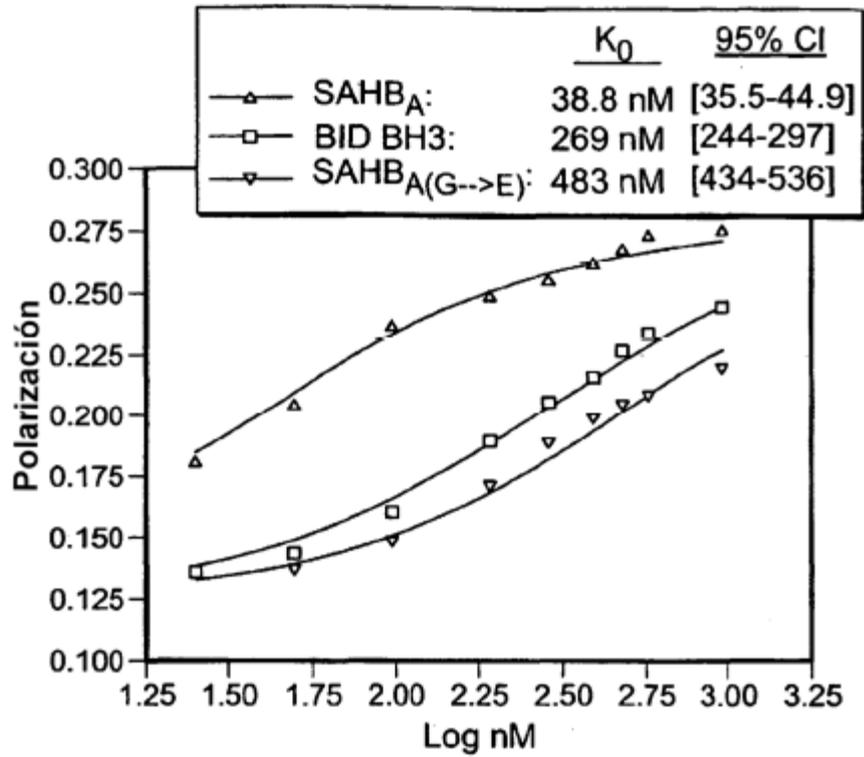


FIG. 11D

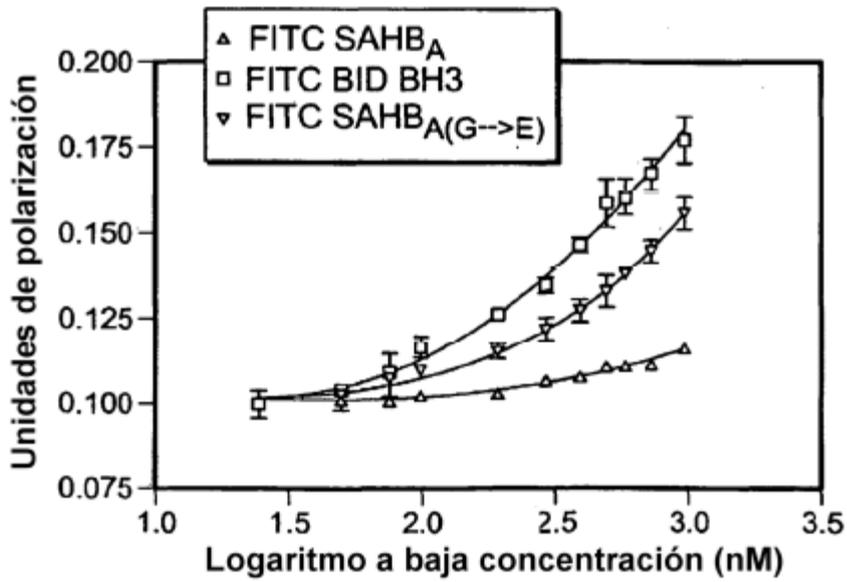


FIG. 11E

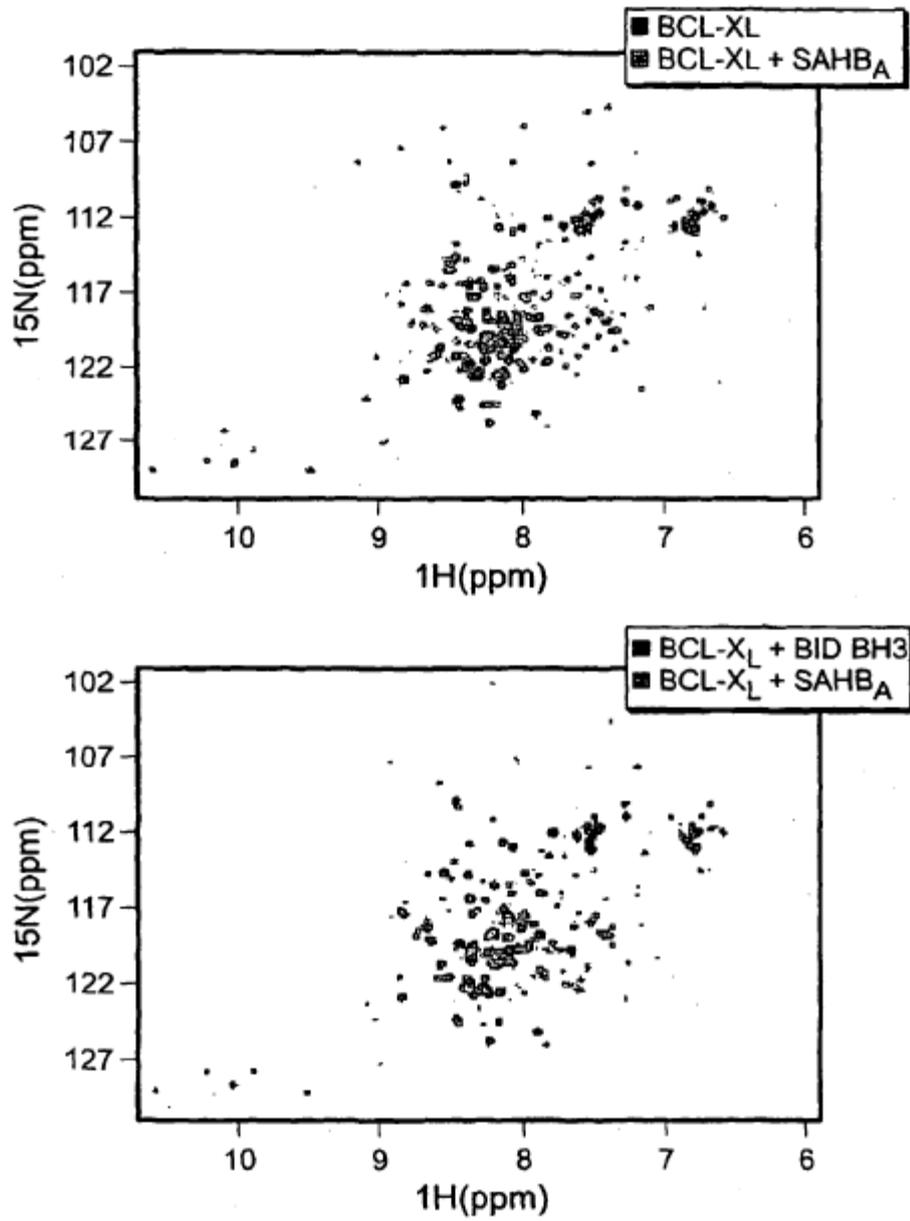


FIG. 11F

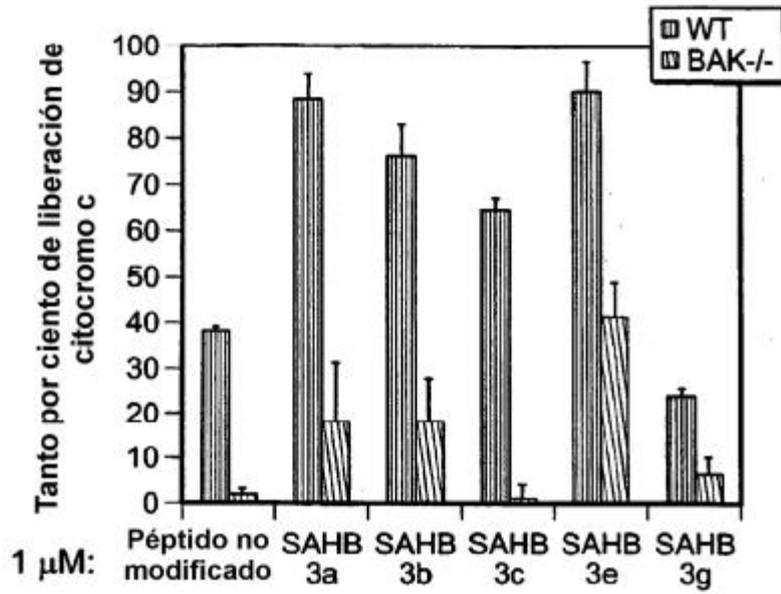


FIG. 12A

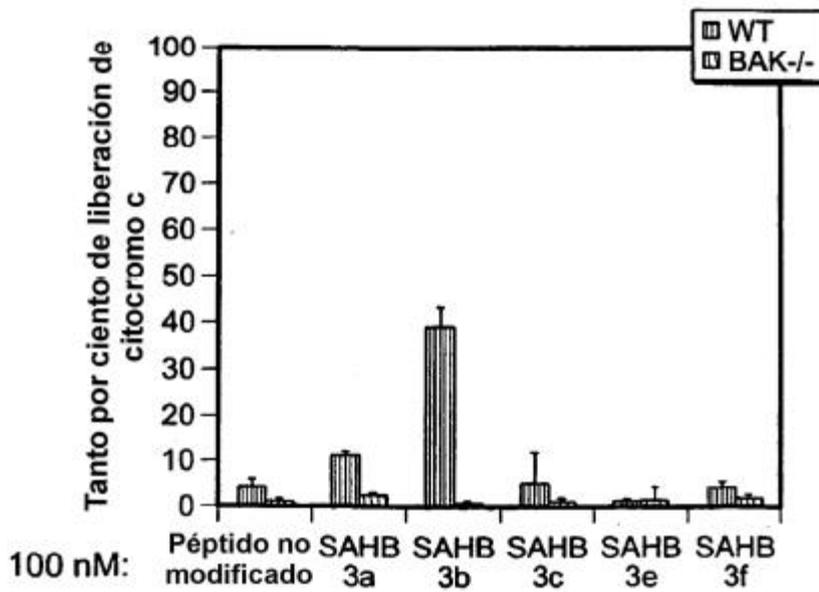


FIG. 12B

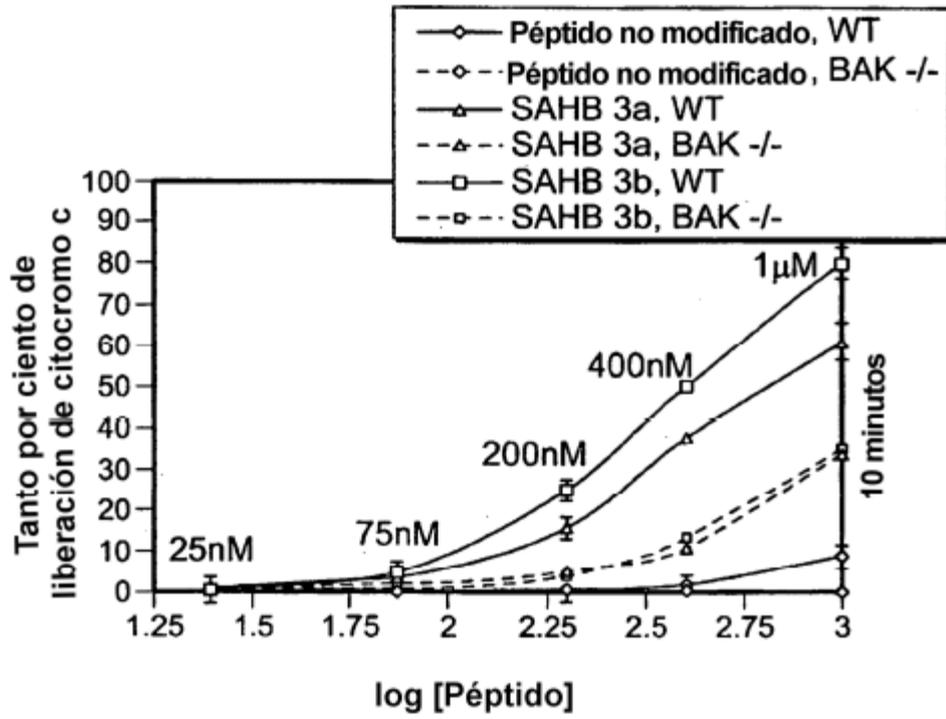


FIG. 13A

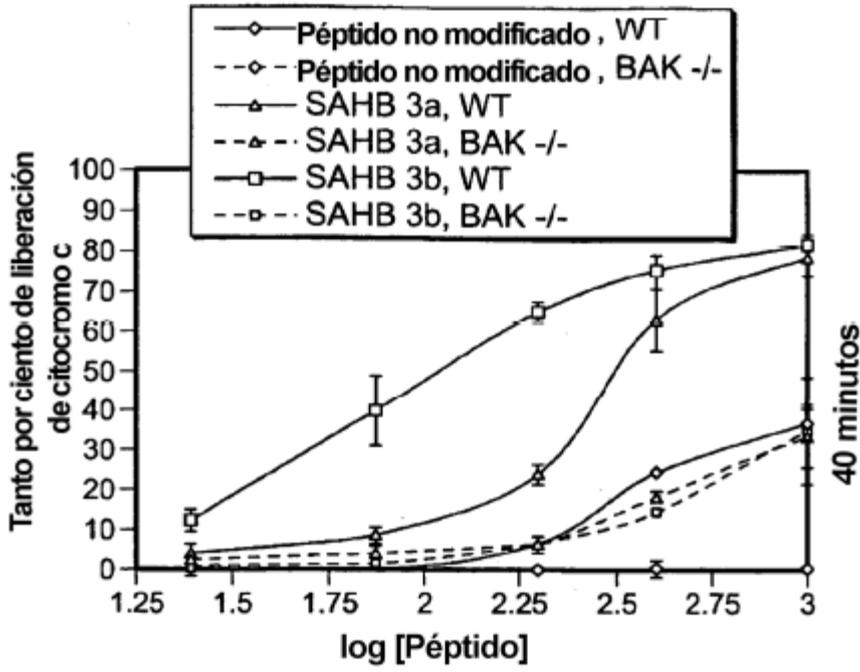


FIG. 13B

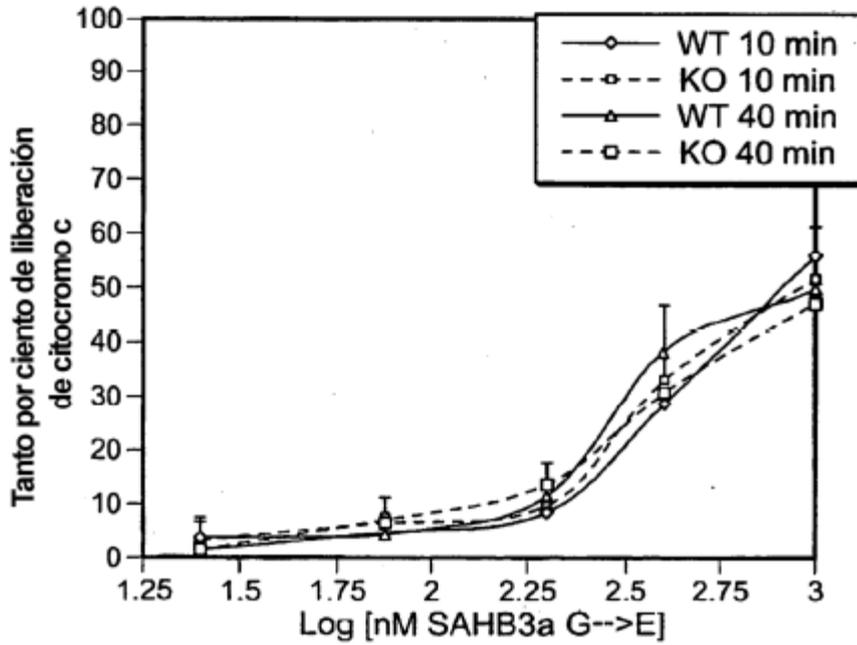


FIG. 14

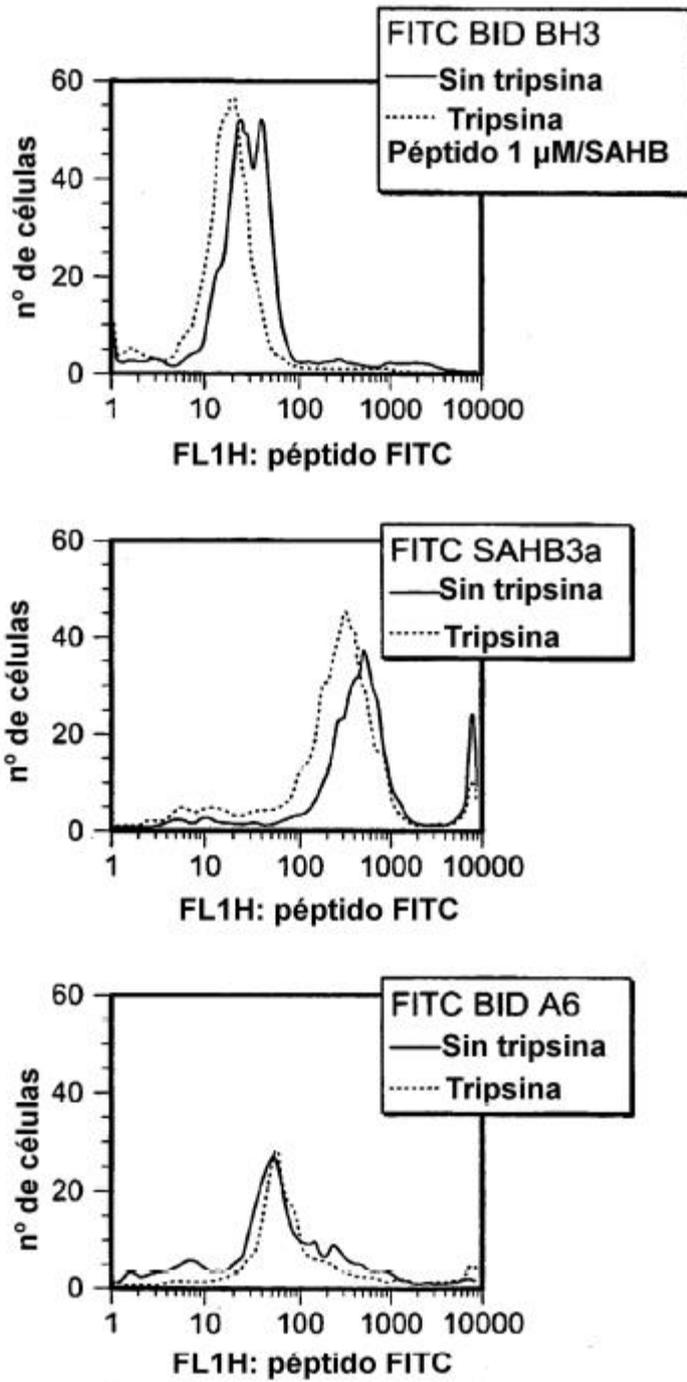


FIG. 15

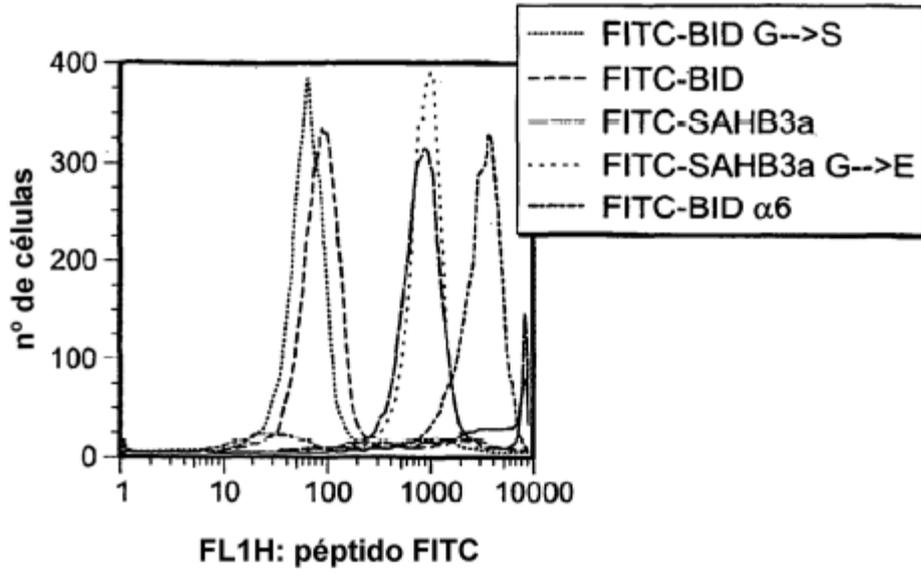


FIG. 16A

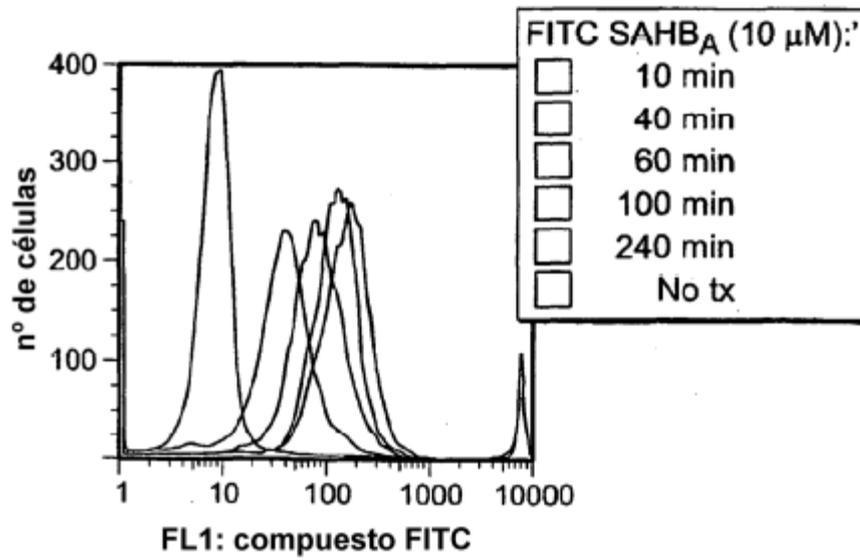


FIG. 16B

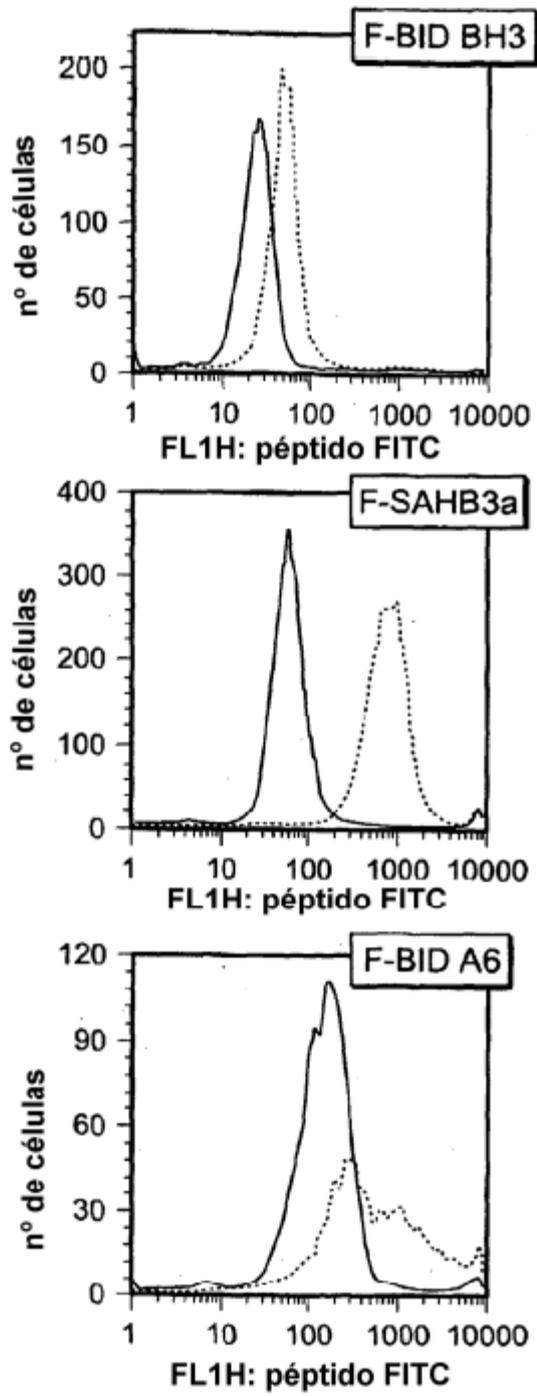


FIG. 17A

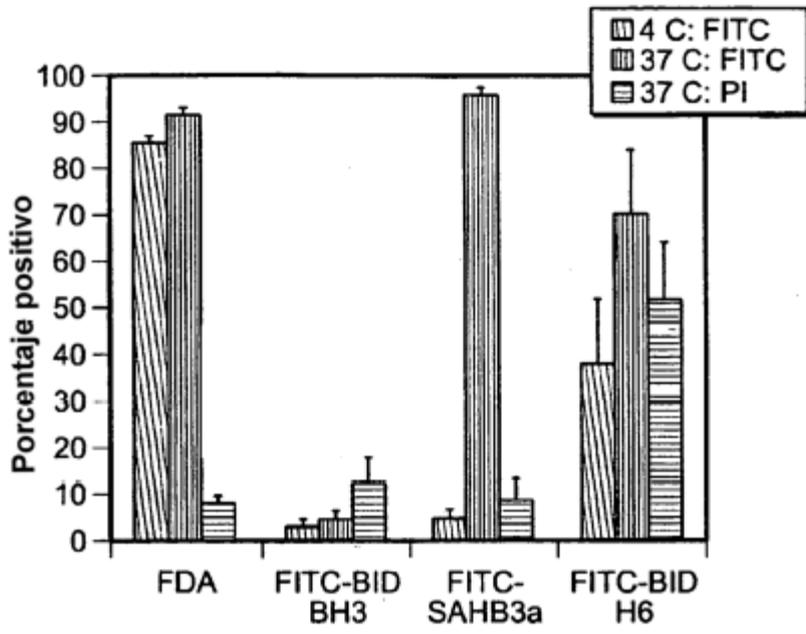


FIG. 17B

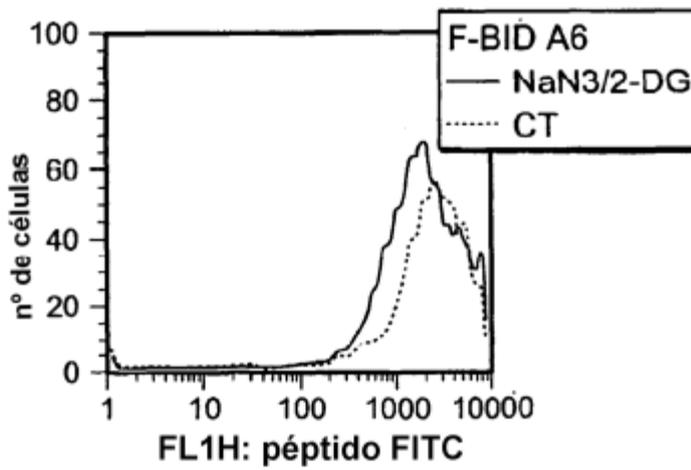
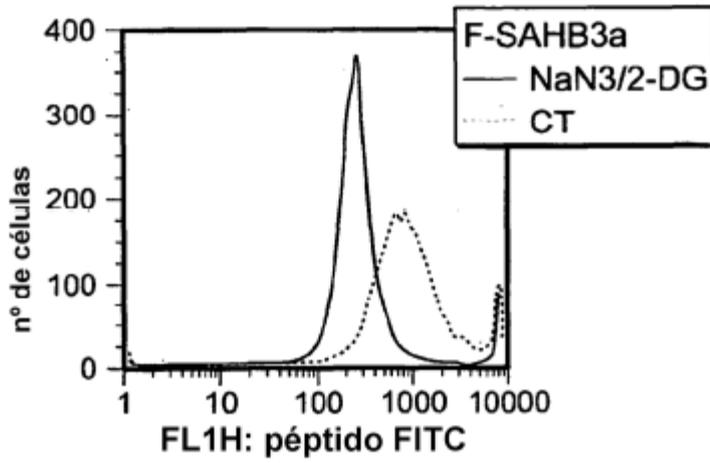
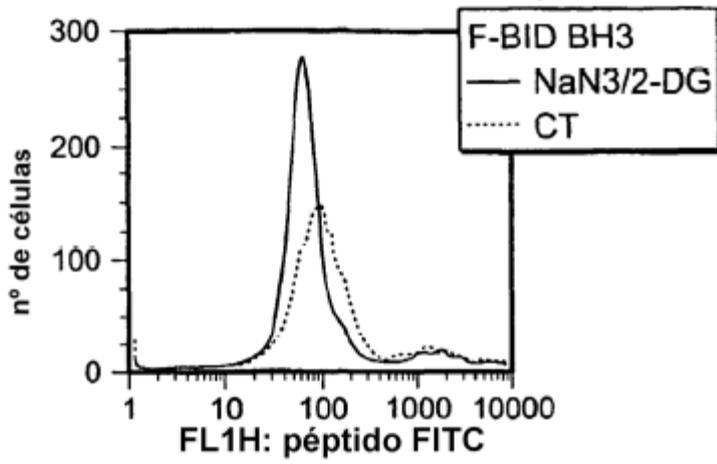


FIG. 17C.

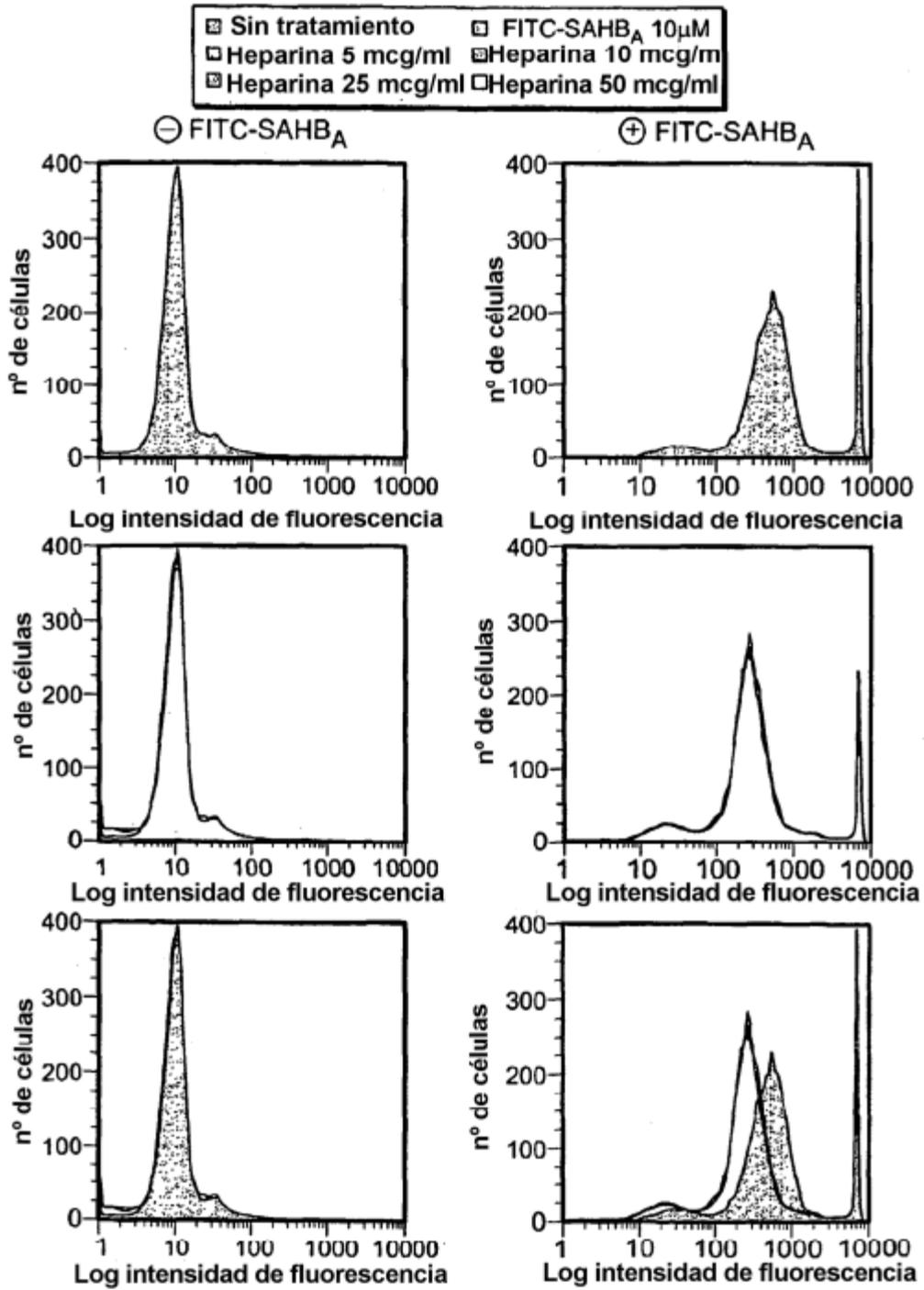
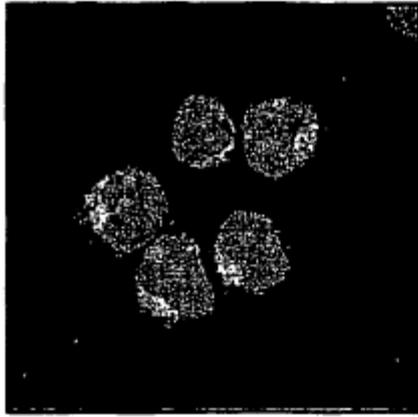
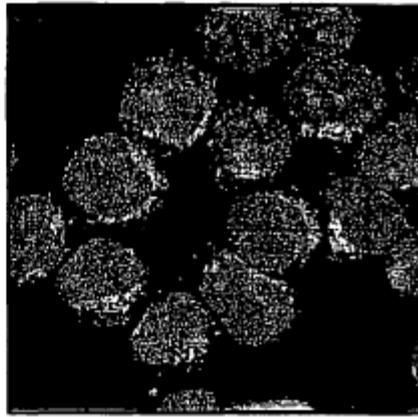


FIG. 18



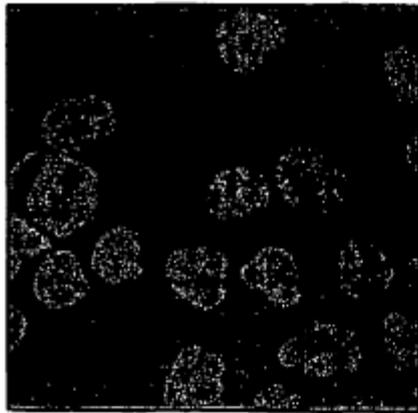
SAHB3a

FIG. 19A



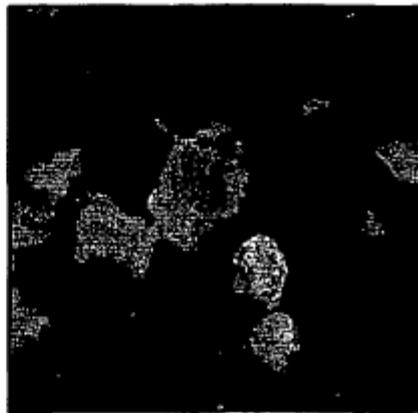
SAHB3aG-->E

FIG. 19B



BID BH3

FIG. 19C



BID α 6

FIG. 19D



SAHB3a

FIG. 20A



Tom20

FIG. 20B



Superposición

FIG. 20C

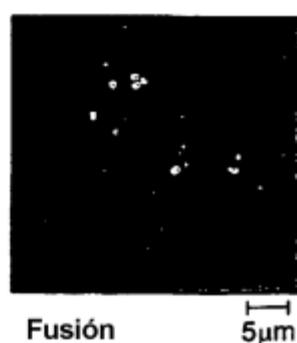
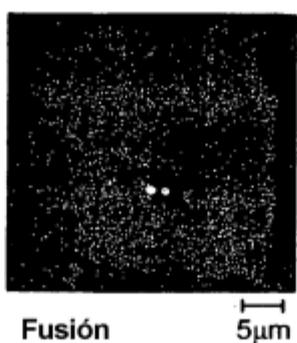
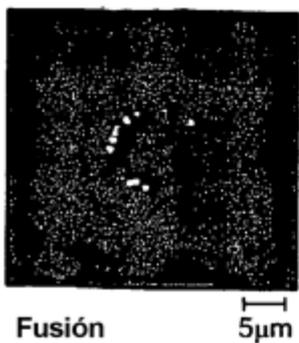
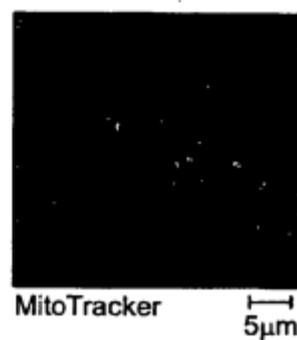
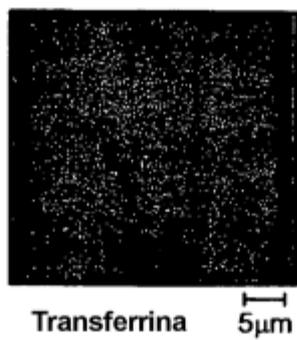
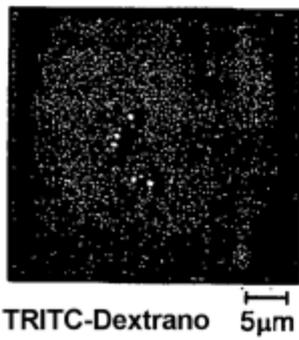
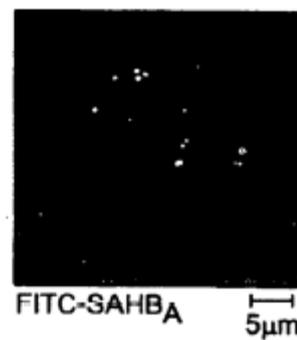
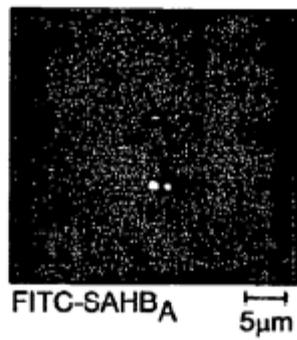


FIG. 21A

FIG. 21B

FIG. 21C

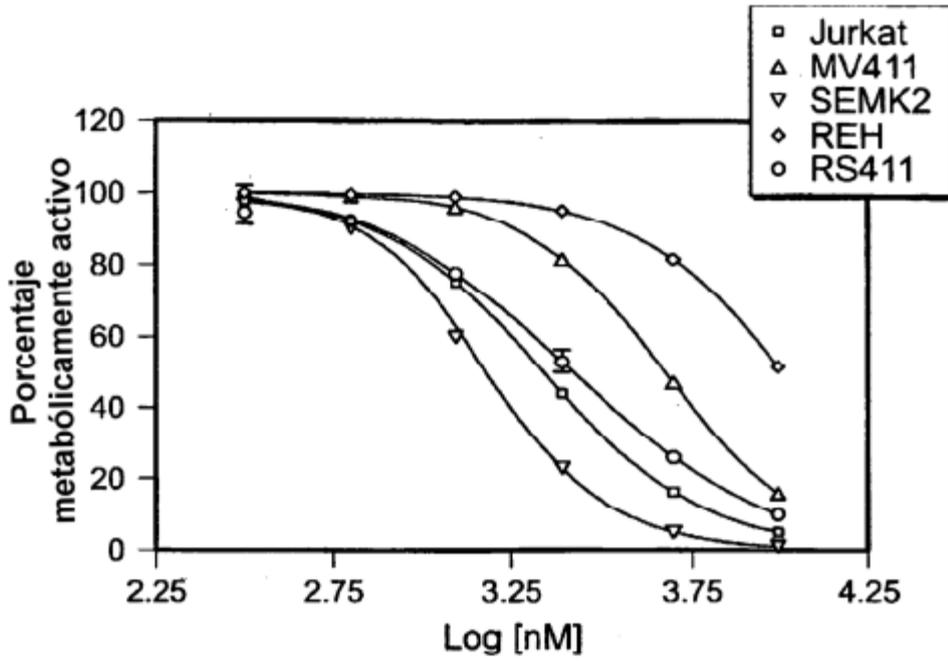


FIG. 22A

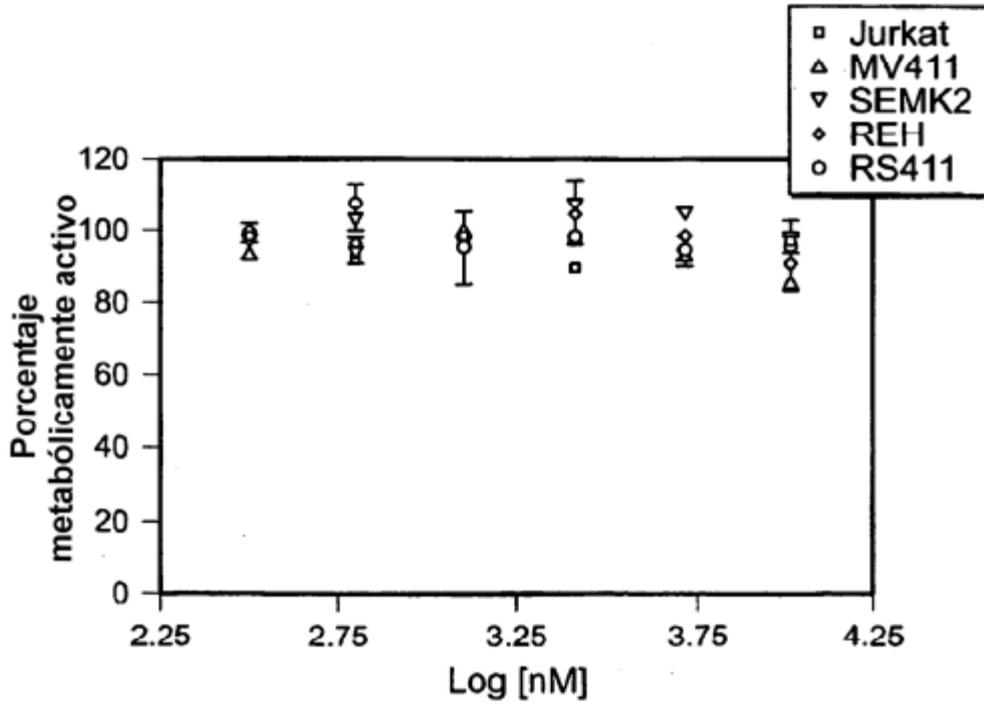
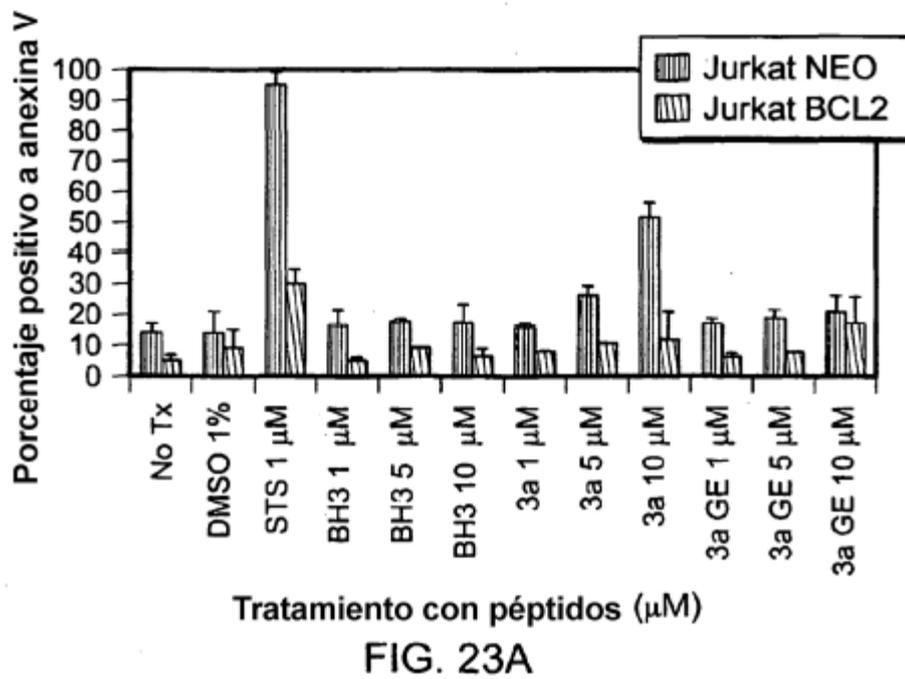
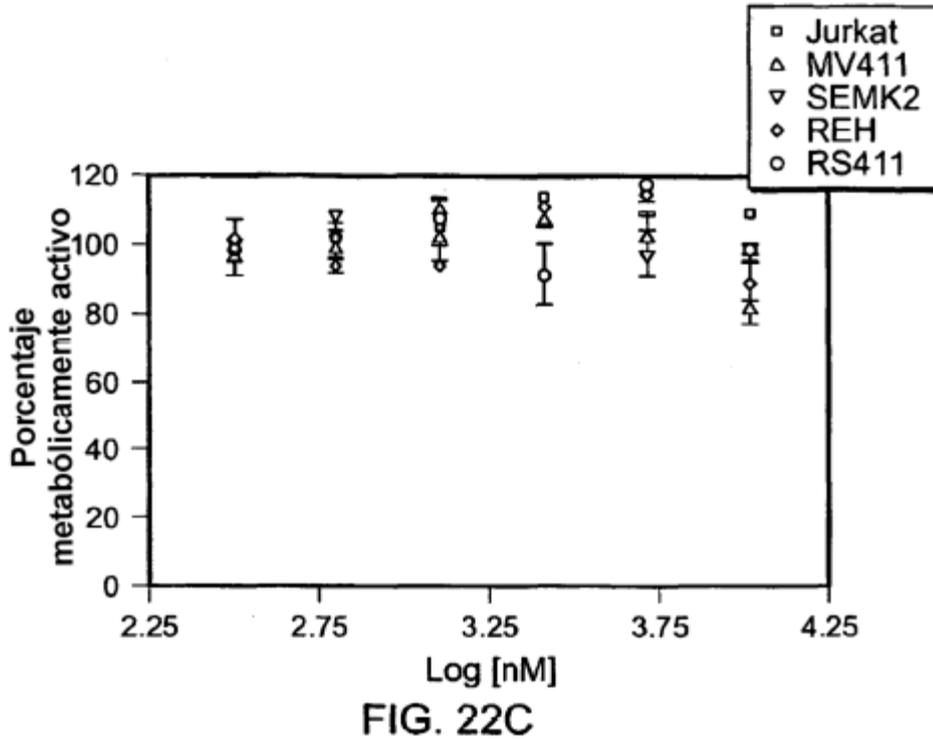


FIG. 22B



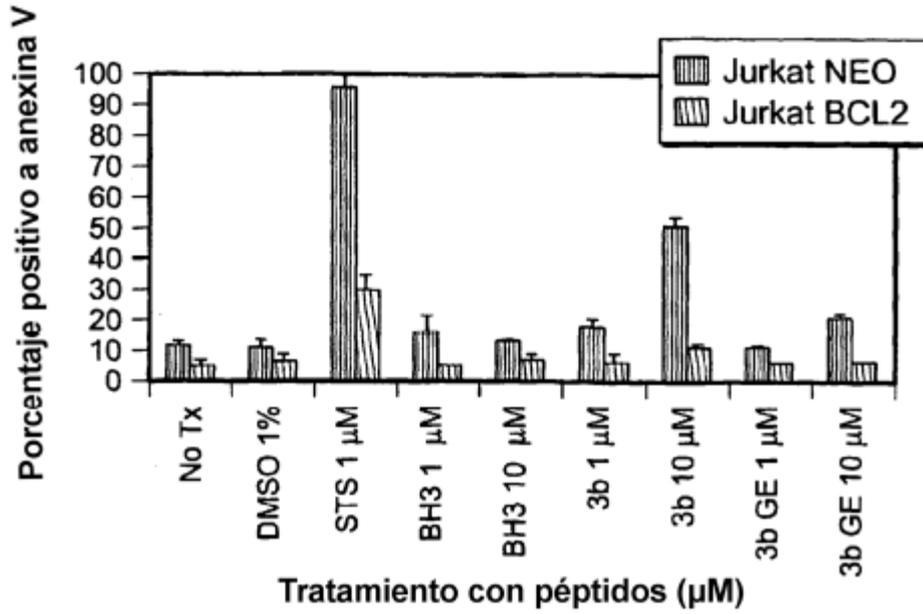


FIG. 23B

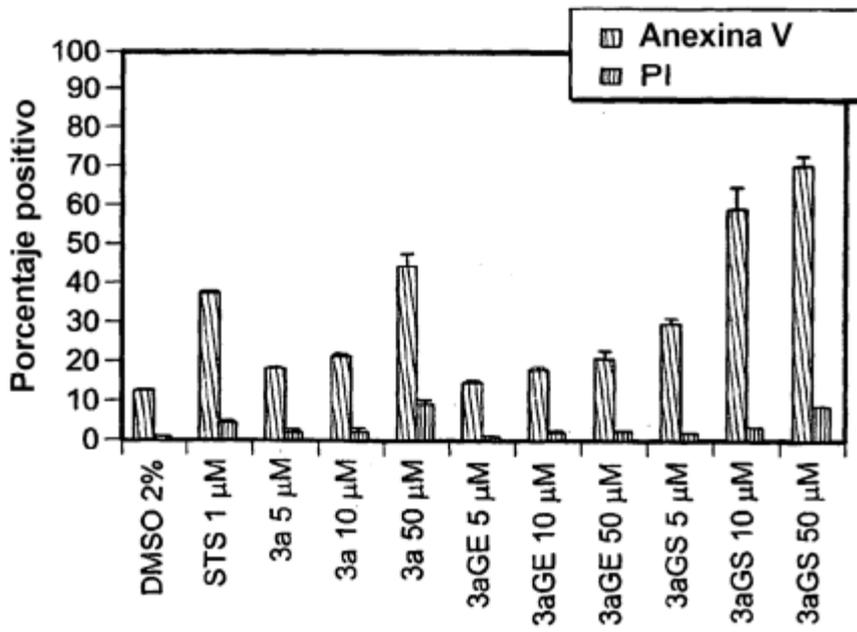


FIG. 24

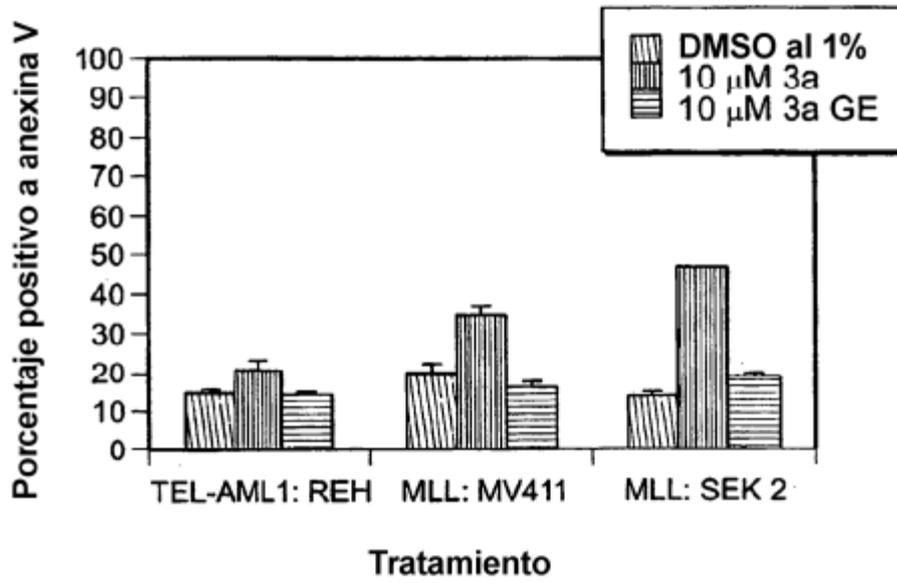


FIG. 25

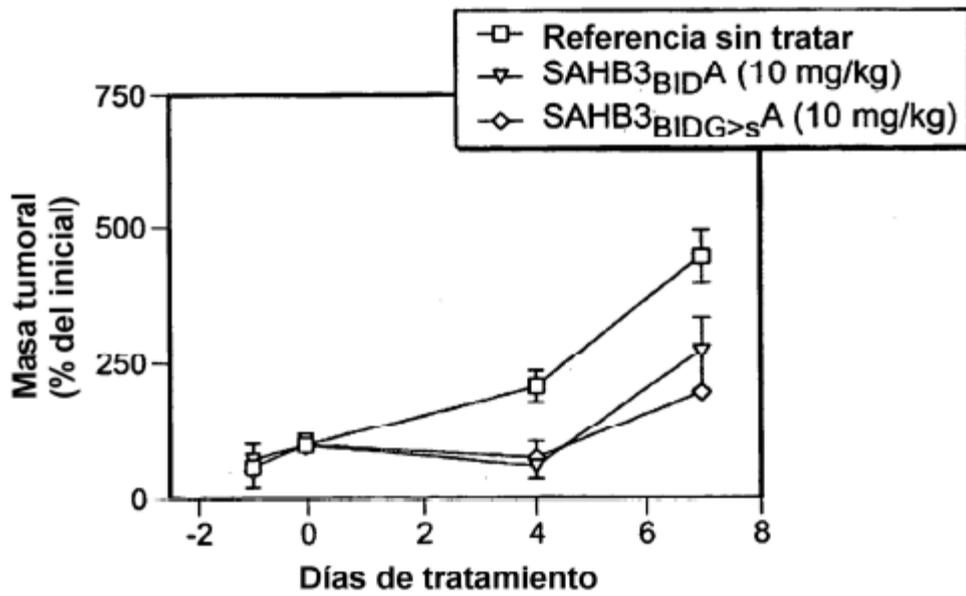


FIG. 26A

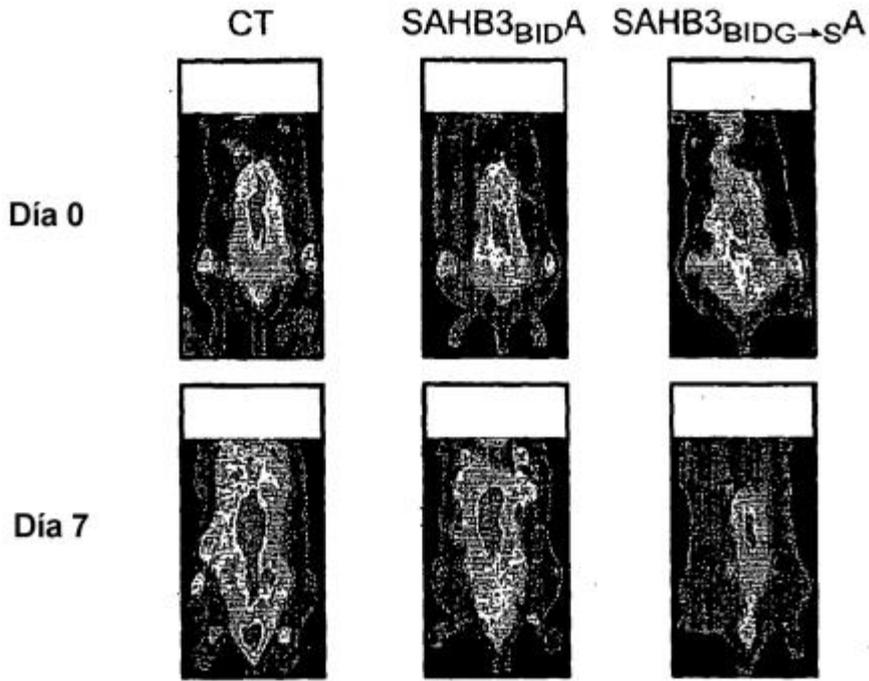


FIG. 26B

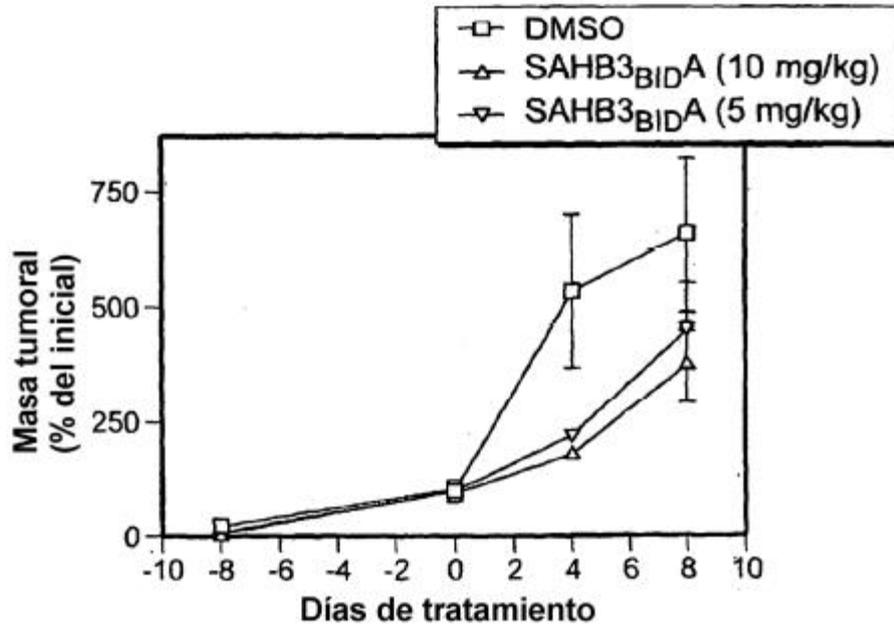


FIG. 27A

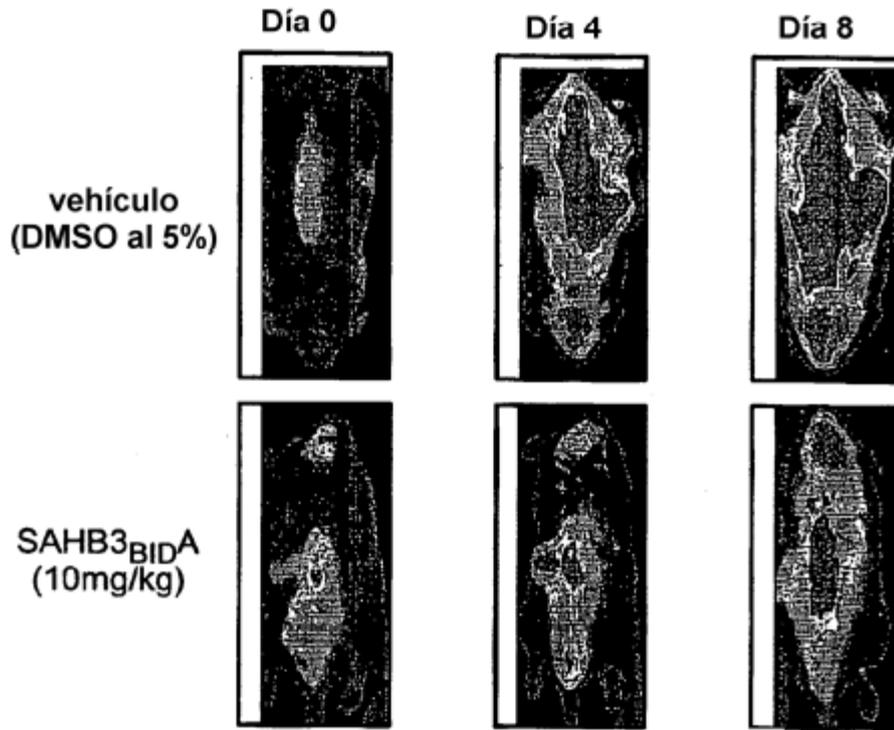


FIG. 27B

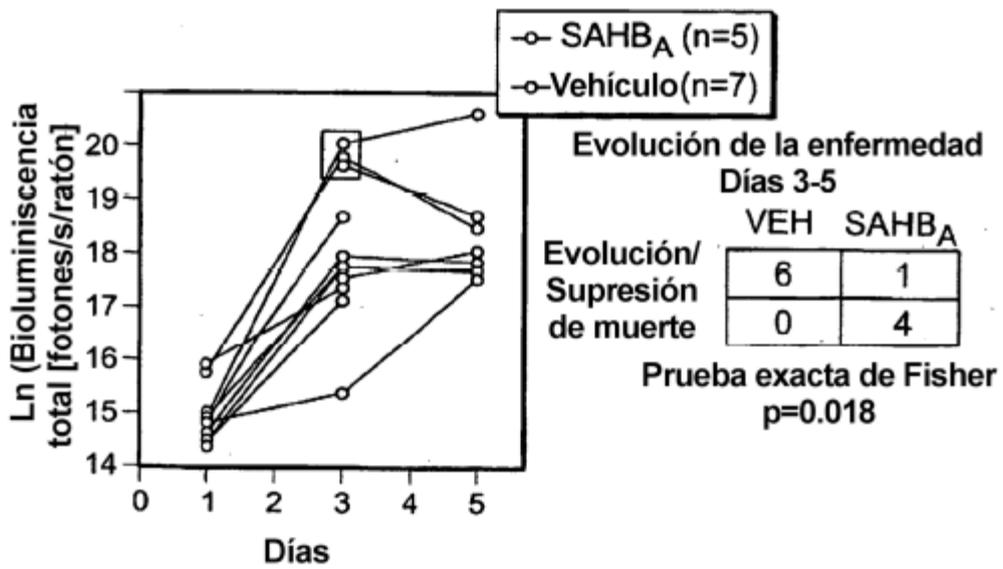


FIG. 27C

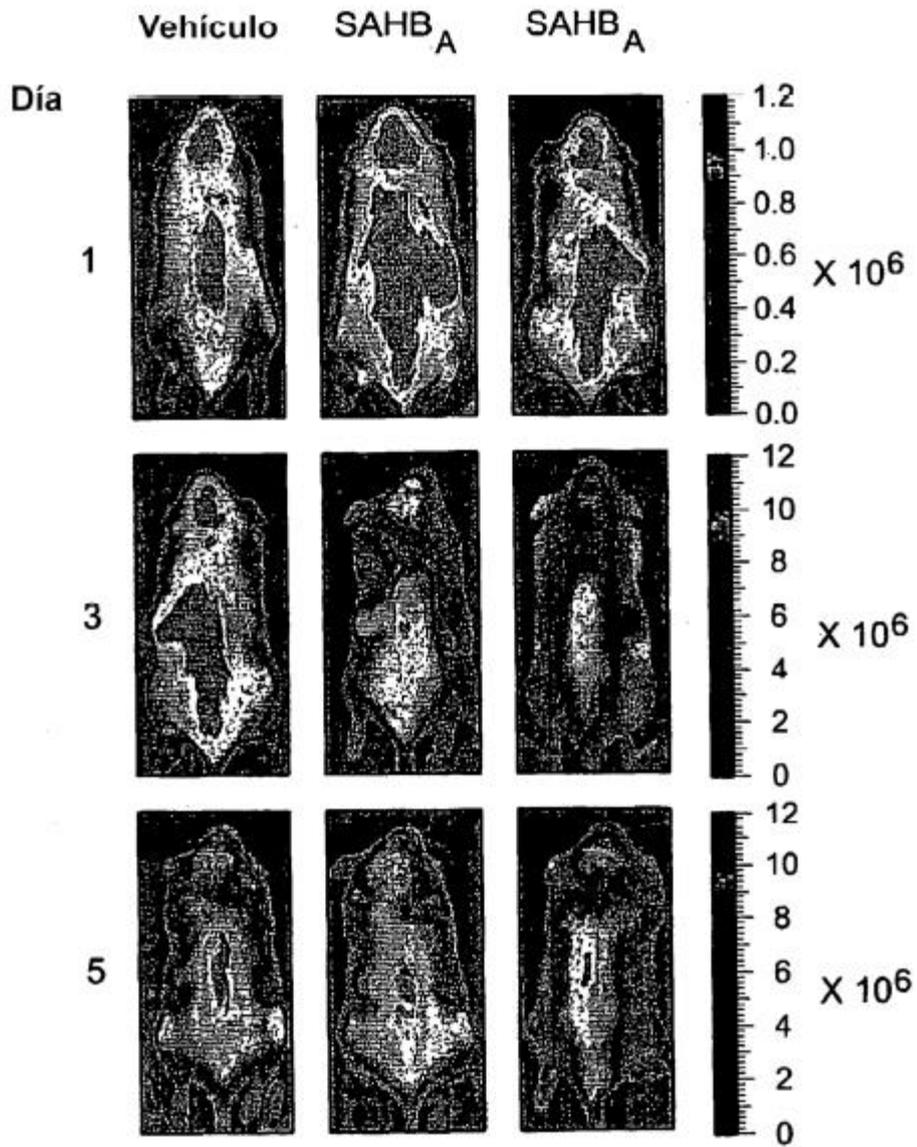


FIG. 27D

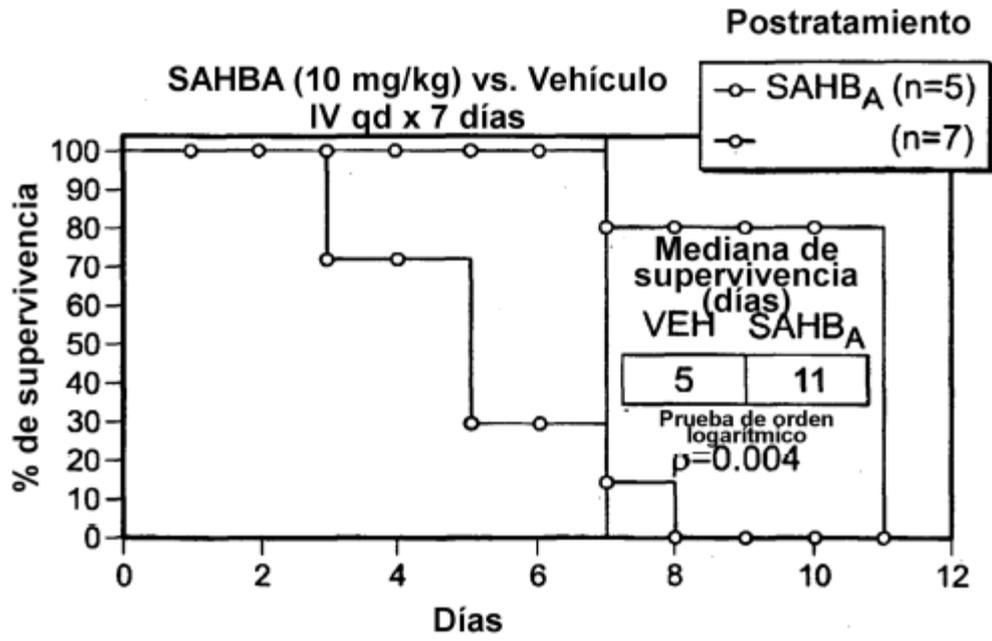


FIG. 27E

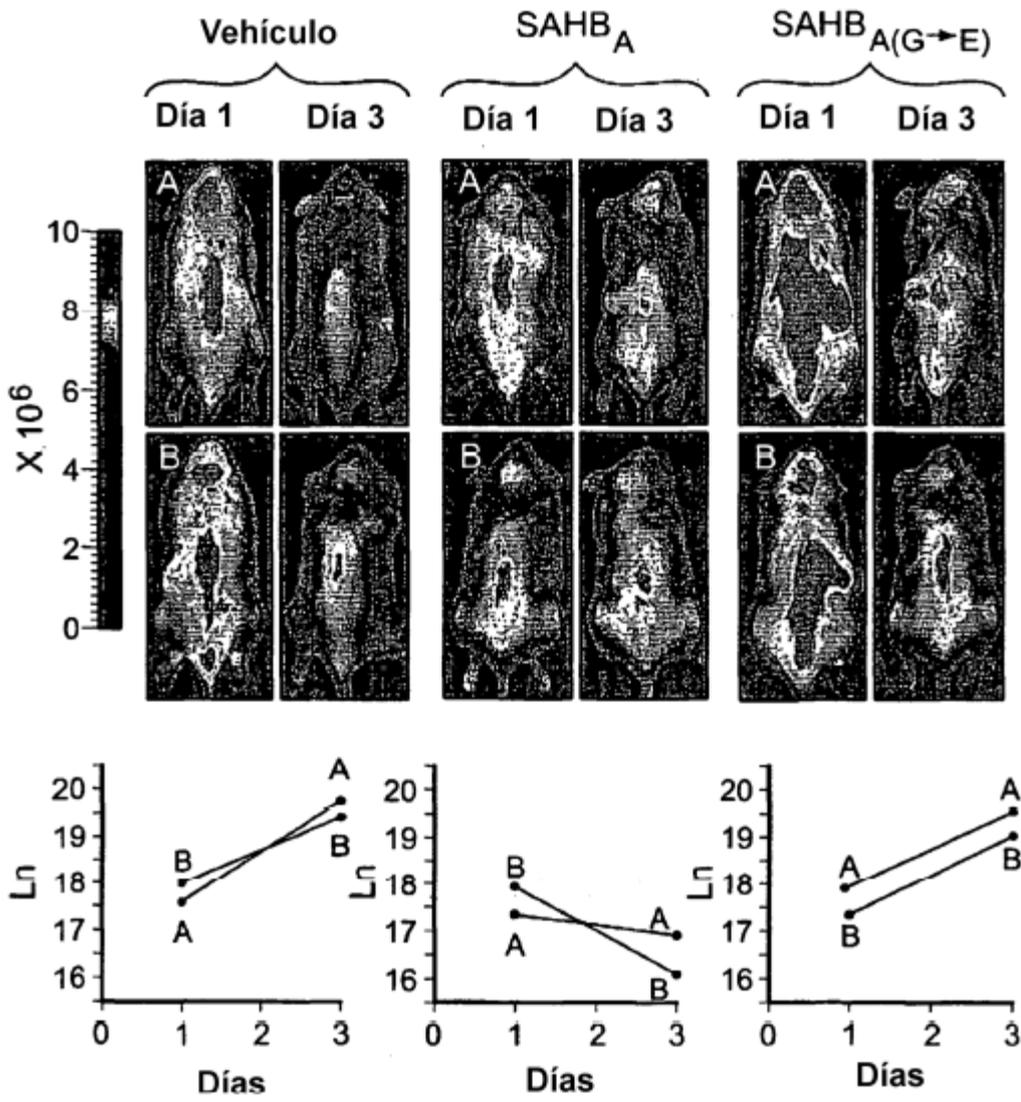


FIG. 27F

h8bc3	MARARQEGSSPEVEGLARDGPRPFPLGRLVPSAVSCGLCSPGLAAAPAA	50
m8bc3	MARARQEGSSPEVEGLARDSPRPFPLGRLMPSAVSCSLCSPGLPAAPAA	50
h8bc3	PTLLPAAYLCAPTAPPAVTAALGGSRWIPGGPRSRPRGPRPDGPPQPSLSLA	100
m8bc3	PALLPAAYLCAPTAPPAVTAALGGPRWIPGGHRSRPRGPRPDGPPQPSLSPA	100
h8bc3	EQHLESPVPSAPGALAGGPTQAAPGVRGEEEQWAREIGAQA	150
m8bc3	QQHLESPVSAPEALAGGPTQAAPGVRVEEEEQWAREIGAQA	150
h8bc3	QYERRRQEEQHRHPSMWRVLYNLIMQLLPLPRGHRAPEMEPN	193
m8bc3	QYERRRQEEQHRHPSMWRVYNYLQMLLPLPRQPGAPEMEPN	193

FIG. 28A-1

Bbc3	133	WAREIGAQLRRMADDLNAQY
Egl-1	50	IGYEIGSKLAAMCDDFDAQM
Bsd	106	AAQRYGRELRRMSDEFVDSF
BIm	84	PEIWIQAQLRRIGDEFNAYY
BId	82	IIRNIARHLAQVGDSDRSI
BIk	53	GSDALALRLACIGDEMDSL
Hrk	29	AAQLTAARLKALGDELHQRT

FIG. 28A-2

BIK	56	ALALRLACIGDEM [*] VSLR
Bim1	87	WIAQELRRIGDEFNAYYA
Noxa	24	ECATQLRRFGDKLNFRQK
Bid	85	NIARHLAQVGDSMDRSIP
Bad	109	RYGRELRRMSDEFVDSFK
EGL-1	53	EIGSKLAAMCDDFDAQMM

FIG. 28B-1

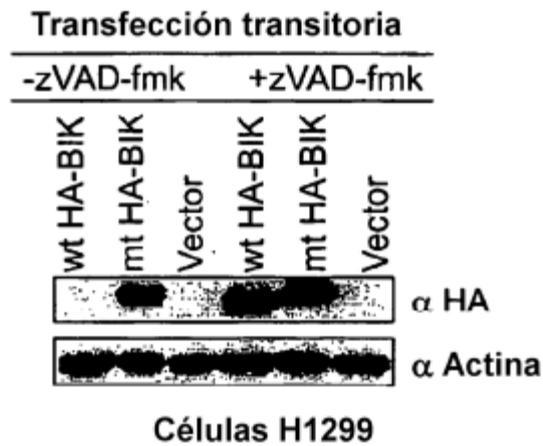


FIG. 28B-2

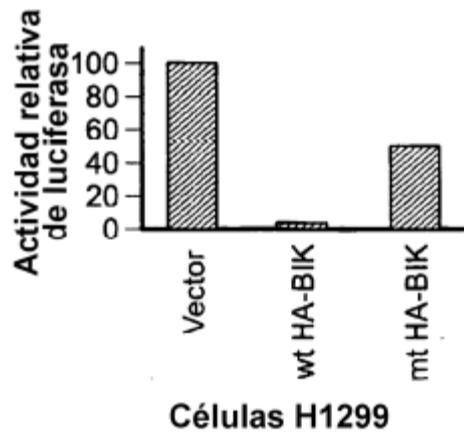


FIG. 28B-3

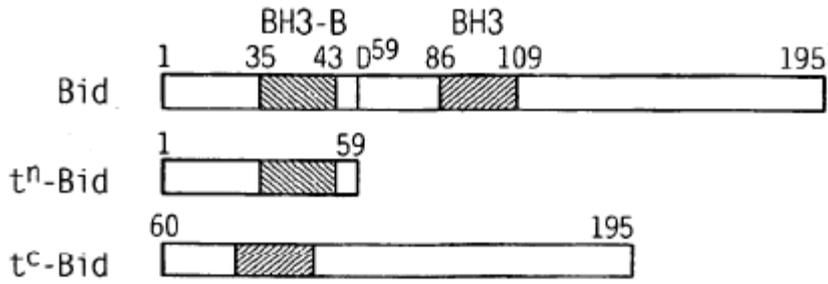


FIG. 28C-1

hBid	37	LDA	LGH	ELP	45	} BH3-B
mBid	35	LEV	LGRE	LP	43	
hBid	90	LAQ	VGD	SMD	98	} BH3
mBid	90	LAQ	IGDE	MD	98	
hBik	61	LAC	IGDE	MD	69	
hBimL	92	LRR	IGDE	FN	100	
hHrk	37	LKA	LGDEL	H	45	
hBad	113	LRR	MSDEF	V	121	
hBak	78	LAI	IGD	DTN	86	
hBax	63	LKR	IGDEL	D	71	
mMtd	71	LLR	LGDELE		79	

FIG. 28C-2

1	MTLRRLLEDWCRGMDVNNPRKALLVAGISQSSVAETEEAL	hMAP-1
1	MTLRRLLEDWCRGMDVNNPRKALLVAGIPPTCGVADEEAL	mMAP-1
1	MAHTLLEDWCRGMDVNSQRALLVAGIPVNCDEAEIEETL	hMa1
1	MALALLEDWCRITMSVDECKSLMVTGIPADFEAEIIEVL	hMa2
40	QAGLAPLGEYRLLGRMFRRDENRQVALVGLTAEISHALV	hMAP-1
40	QAGLAPLGEHRLGRMFRRDENKINVALIIGLTVETGSALV	mMAP-1
40	QAAMPQVS-YRMLGRMFWRRENAKAAELLELGAVDYAAI	hMa1
40	QETLKSLEGRYRLLGKTFRRQENANAVLLELLEDTOVSAI	hMa2
79	PKETPGKGGIWRVIFKPPDPNTFLSRLNEFLAGEGMTV	hMAP-1
79	PKEIPAKGGVWRVIFKPPDTSDFLRLNEFLKGGEMTM	mMAP-1
78	PREMPGKGGVWVLFKPPSDAEFLERLHLFLAREGATV	hMa1
79	PSEVQKGGVWVIFKTPNODTEFLERLNLFLKEGQTV	hMa2
	826	
118	GELSRALGHENGSLDPEQSLMIPENMAPHLAQALFEALQ	hMAP-1
118	GELTRMLGHRNDPLGLDPGTMIPETRAPHLAQALNEALK	mMAP-1
117	QDVARMLGFGNPT--PTPG--PEMPAEMLYTLDNVIT	hMa1
118	SGMFRALGQEGVSPAPVPCII-SPEL LAHLGQAMAHAPQ	hMa2
155	PILOCKLYKKLRVFSGRISPIEGEEFGRMFMHTTQMIK	hMAP-1
157	PTLQYLRYKKLSVFSGRDPPGPGEEEFESMFMHTSONMK	mMAP-1
151	PLVESTWYKRLTLFSGKHPRAWRGNFDPLLEHTMEVLE	hMa1
156	PLLP-MRYRKLRFVSGSAVPAPEEESFENWLEQATEIVK	hMa2
194	AWQVPPDVEKRRRLLESLRGPALDVRVLKINNPITVDE	hMAP-1
196	TWQVSDVEKRRRLLESLRGPAFETIRVLKINNPITVAE	mMAP-1
190	AWQVSDVEKRRRLMESLRGPADVIRTLKSNNPATITAE	hMa1
194	EWPVTEAEKRWLAESLRGPALDLMHIVQADNPSLISVEE	hMa2
233	CLQALEEVFGVTDNPRELQVKYLTYYKDEEKL SAYVLR	hMAP-1
235	CLKITLETIFGTIDNPRALQVKYLTYYQKDEEKL SAYVLR	mMAP-1
229	CLKALEQVFGSVESRDACTIKFLNITYONPGEKLSAYVLR	hMa1
233	CLEAFKQVFGSLESRRTAQVRVLYKTYOEEGKLSAYVLR	hMa2
272	LEPLLQKLVORGGATEKDVVNOARLDQVIAGAVHKT-IRR	hMAP-1
274	LEPLLQKLVKGGATEKEVVNOARLDQVIAGAVHKS-VRR	mMAP-1
268	LEPLLQKLVVEKGATDKDNVNOARLDQVIAGAVHSGAIRR	hMa1
272	LETLRRAVEKRAIPRRIADQVRLQDVNAGATLNQMLWC	hMa2
310	EELN-LPEGGPAPGFLQLLMLTRDYEAEE--EEEA LLOA	hMAP-1
312	ELG-LPEGSPAPGLQLLTLIKDKEA-E--EEEV LLOA	mMAP-1
307	QLW-LTGAEEGPGPKPL-----	hMa1
311	RURELKDDGPPPSFLELMKVIREEEEEASFEVESIEEP	hMa2
345	ILEGNFT	hMAP-1
346	ELEGYCT	mMAP-1
323	SVAGADP	hMa1
350	ERDGYGRWNHEGDD	hMa2

FIG. 28D-1

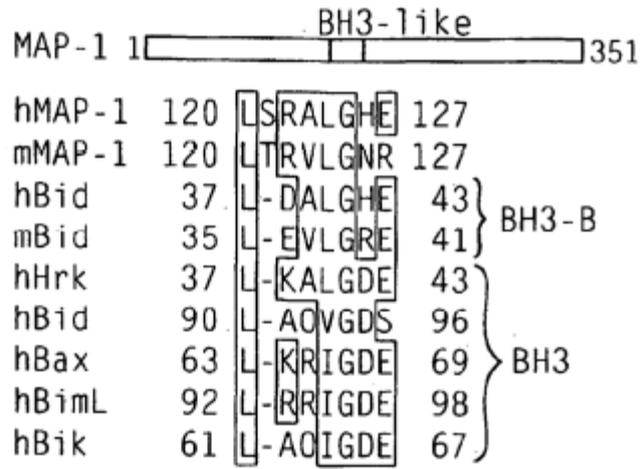


FIG. 28D-2

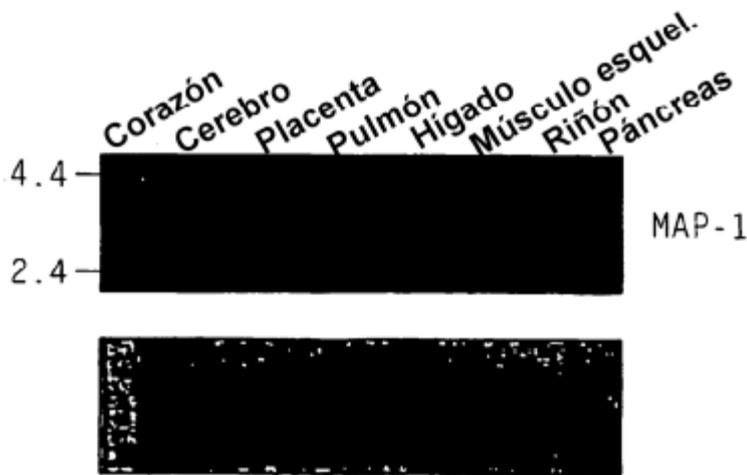


FIG. 28D-3

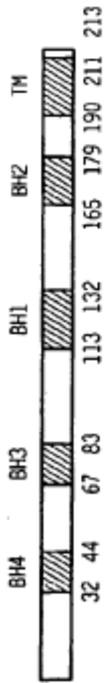


FIG. 28E-1

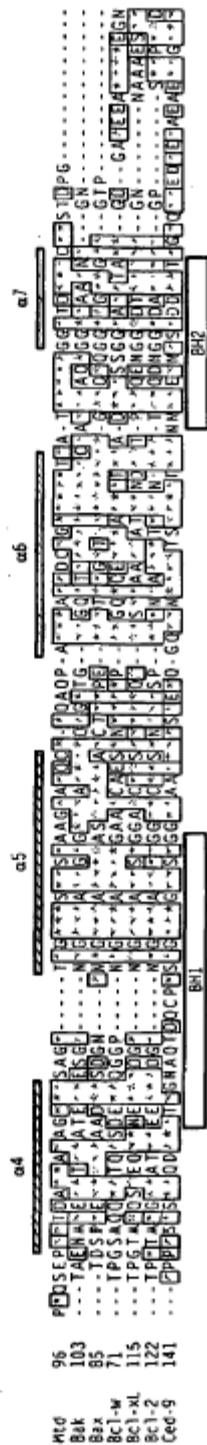
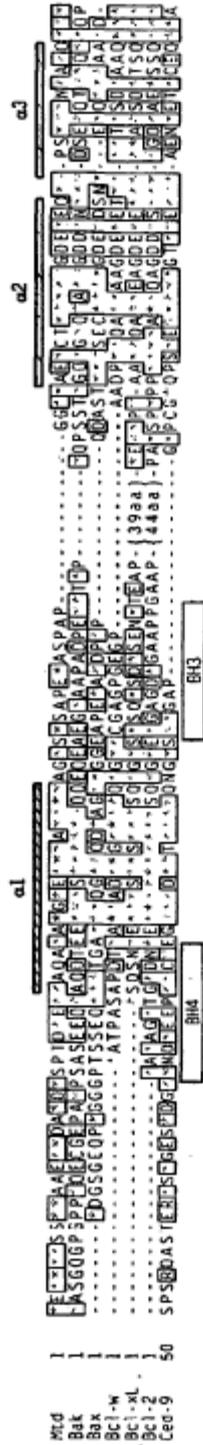
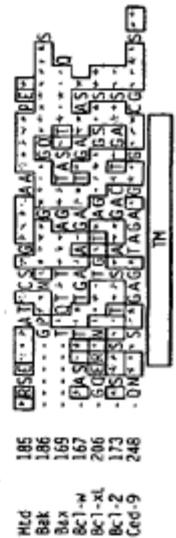


FIG. 28E-2



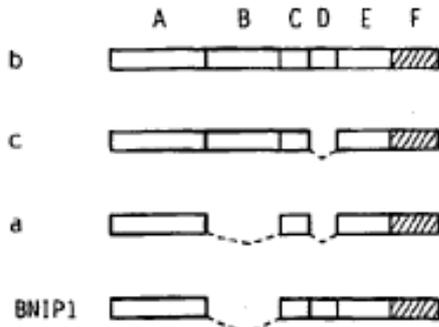


FIG. 28F-1

← BH3 →

BNIP1b	154	KAELLQGGDLLRQR	167
BIK	56	ALRLACTIGDEMDVS	69
BLK	52	ALRLACTIGDEMOLC	65
BID	87	ARHLAQVGDSDMRS	100
BAK	75	GRQLAITGDDINRR	88
HRK	34	AARLKALGDELHQR	47
BAX	60	SECLRRIGDIELDSN	73
BIM1	89	AQELRRIGDEFNAY	102
BOK	68	CTVLLRLGDELEQT	81
BCL2L1	87	KQALREAGDEFELR	100
BCL2	94	HLTLRQAGDDFSRR	107
MCL1	210	LETLLRRVGDGVORN	223

* **

FIG. 28F-3



FIG. 28F-4

```

MAAPQDVNVRTCNQZIVKTDLEVKALIQDI      30
RDCSGPLSALTRLNTKVKRKTQQLRNRIQP      60
      |
VLYQRATINZASTITTXLYYELTDFSSTQN      90
-- Present only in BNIP1b & BNIP1e --
DFNSPTYFVTFSDLZQLAKZQDKXSEKQLL      120
-----|
LQXVENRKKQNLKNOASWRKANLTCKLAID      150
      |----- Present only in
      |-----BH3-----|
NTRKANILLQDDLLAQRXYTKKSLAQYSST      180
BNIP1 & BNIP1b----|
      |----- ANK1 -----|
ITKSLNGISRDKAQVQOQSEANQSLVTSS      210
-----| |----- ANK2 --
RTILDAKEETXSNSOTIQLORKLITKYMRR      240
-----| |----- TM -----
ZLTDKLLIFLALRLTLATVLYIVKKRLFPF      271
    
```

FIG. 28F-2

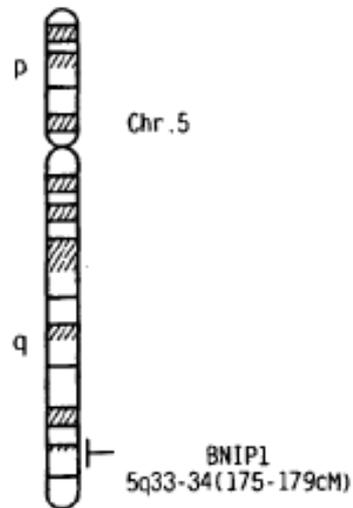


FIG. 28F-5

Alineación de dominios BH3 de miembros selectos de la familia BCL2

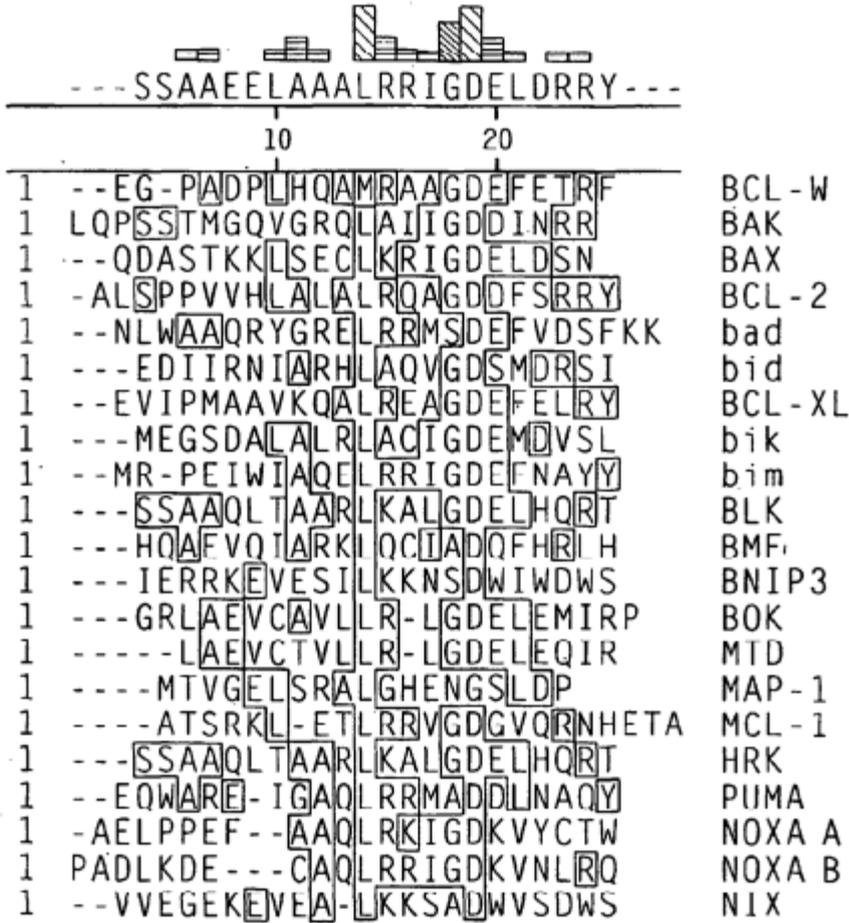


FIG. 28H