

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 411**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12711492 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2681235**

54 Título: **Macroциclos sustitutos de enlace de hidrógeno como moduladores de Ras**

30 Prioridad:

04.03.2011 US 201161449472 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)
70 Washington Square
New York, NY 10012, US**

72 Inventor/es:

**ARORA, PARAMJIT;
BAR-SAGI, DAFNA;
PATGIRI, ANUPAM y
YADAV, KAMLESH**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 586 411 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

Macrociclos sustitutos de enlace de hidrógeno como moduladores de Ras

5 Antecedentes de la invención

La señalización aberrante del receptor de tirosina quinasa (RTK) es una causa subyacente importante de diversos trastornos del desarrollo y enfermedades hiperproliferativas (Blume-Jensen et al., "Oncogenic kinase signalling". Nature 2001, 411, 355). Un mecanismo de transducción principal por el cual las señales de RTK se propagan a rutas intracelulares implica la activación dependiente de ligando de la proteína Ras de unión de nucleótidos de guanina pequeña (Figura 1) (Buday et al., "Many faces of Ras activation." Biochim. Biophys. Acta 2008, 1786, 178). De acuerdo con lo anterior, el diseño de inhibidores de la ruta de señalización Ras ha sido un área activa de investigación para la terapia contra el cáncer (Downward et al., "Targeting ruta de señalización Ras in cancer therapy." Nat. Rev. Cancer 2003, 3, 11). La etapa limitante de velocidad en el proceso de activación de Ras es la conversión de Ras-GDP a Ras GTP a través de una reacción de intercambio que es catalizada por el factor Sos de intercambio de nucleótidos de guanina específica a Ras (Figura 2). El dominio catalítico altamente conservado (Rem + cdc25) de Sos interactúa con Ras en una horquilla helicoidal compuesta de hélices α -H y α -I (Figura 3). La horquilla helicoidal puede ser capaz de disociación de nucleótidos desde Ras y posterior regulación a la baja de la ruta Ras (Sacco et al., "The isolated catalytic hairpin of the Ras-specific guanine nucleotide exchange factor Cdc25(Mm) retains nucleotide dissociation activity but has impaired nucleotide exchange activity." Febs Lett. 2005, 579, 6851). Las estructuras de alta resolución de este complejo sugieren que la hélice α -H es la única porción de la horquilla helicoidal que hace contacto directo con Ras, mientras que la hélice α -I solo puede servir para estabilizar la conformación α -H (Boriack-Sjodin, et al. "The structural basis of the activation of Ras by Sos." Nature 1998, 394, 337).

Los inhibidores de las interacciones Ras-Sos serían valiosos como herramientas para diseccionar esta ruta de señalización compleja y como pistas para el diseño de fármacos contra el cáncer. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de una estructura cristalina de alta resolución del complejo de Ras/Sos desde 1998, no se han reportado inhibidores directos de este complejo.

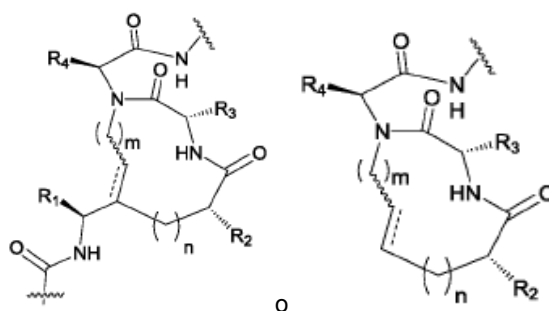
Los péptidos que imitan la hélice alfa-H de Sos se divulgan por Patgiri et al (Patgiri et al. "Solid phase synthesis of hydrogen bond surrogate derived [alpha]-helices: resolving the case of a difficult amide coupling", Organic & Biomolecular Chemistry 2010, 8, 8, 1773 and Patgiri et al. "Solid-phase synthesis of short [alpha]-helices stabilized by the hydrogen bond surrogate approach", Nature Protocols 2010, 5, 11, 1857).

Por lo tanto, subsiste la necesidad de métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos del desarrollo y enfermedades hiperproliferativas al inhibir las actividades indeseables asociadas con las proteínas Ras, por ejemplo mediante inhibición del complejo Ras/Sos. La invención aborda estas y otras necesidades.

40 Resumen de la Invención

En un aspecto, la invención proporciona un péptido que comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZLXZEXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de una proteína capaz de interactuar con una proteína Ras. En algunas realizaciones, la proteína capaz de interactuar con una proteína Ras es Sos. Por ejemplo, el péptido copia los aminoácidos 929-944 de la hélice α H de Sos, y en donde el péptido no comprende la secuencia FEGYRLELLKAEEN. Por ejemplo, el péptido comprende una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZLXZEXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo. En otras realizaciones, el péptido tiene una hélice alfa internamente limitada que abarca los residuos 1 a 4 de la secuencia de aminoácidos.

55 En algunas realizaciones, el péptido comprende la fórmula:



donde

5 es un enlace carbono a carbono sencillo o doble;

es un enlace sencillo y es cis o trans cuando es un enlace doble;

n es 1 o 2;

m es cero o cualquier entero positivo;

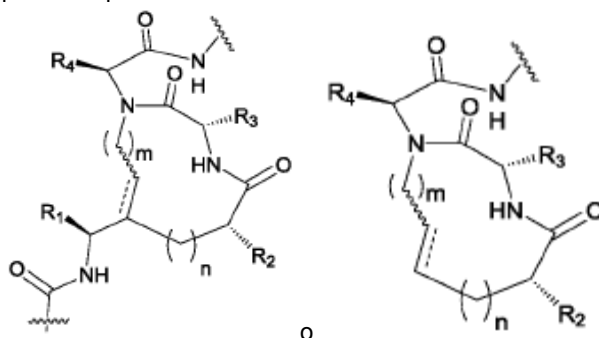
R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo.

Por ejemplo, m es 1 o 2. En otras realizaciones, n es 1 o 2.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido para uso en un método terapéutico para inhibir señalización Ras en una célula, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAIYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice α -H de Sos. En una realización, el péptido copia los aminoácidos 929-944 de la secuencia α -H de Sos. Por ejemplo, el péptido comprende una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo. En otras realizaciones, el péptido tiene una hélice alfa internamente limitada que abarca los residuos 1 a 4 de la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el péptido comprende la fórmula:



donde

es un enlace carbono a carbono sencillo o doble;

es un enlace sencillo y es cis o trans cuando es un enlace doble;

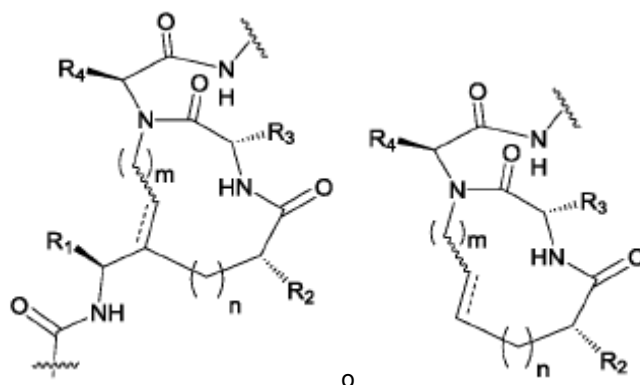
n es 1 o 2;

m es cero o cualquier entero positivo;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo.

Por ejemplo, m es 1 o 2. En otras realizaciones, n es 1 o 2.

La invención adicionalmente proporciona un péptido para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAIYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice α H de Sos. En otras realizaciones, el péptido tiene una hélice alfa internamente limitada que abarca los residuos 1 a 4 de la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido comprende la fórmula:



donde

— es un enlace carbono a carbono sencillo o doble;

~~~~ es un enlace sencillo y es cis o trans cuando — es un enlace doble;

n es 1 o 2;

m es cero o cualquier entero positivo;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo.

#### Breve Descripción de los Dibujos

Las características novedosas de la invención se establecen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá mediante referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos acompañantes de los cuales:

La Figura 1 muestra un esquema de la ruta de señalización Ras.

La Figura 2 muestra la relación entre Ras y Sos. La actividad de Ras es facilitada por el factor Sos de intercambio de nucleótido específico a guanina. El Ras activado controla una multitud de rutas de transducción de señalización.

La Figura 3 muestra la interfaz  $\alpha$ -helicoidal clave entre Ras y Sos (Número de acceso PDB 1BKD).

La Figura 4 muestra inhibición de actividad de intercambio de nucleótido de guanina mediada por Sos por composiciones de la invención.

La Figura 5A muestra cambios seleccionados en espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de resonancias Ras marcadas  $^{15}\text{N}$  luego de adición de tres y cinco equivalentes de HBS 7.

La Figura 5B muestra una gráfica de las diferencias de desplazamiento químico promedio que ilustra los cambios luego de la adición de los aumentos de cantidades de HBS 7.

La Figura 6 muestra inhibición de el complejo Ras/Sos por HBS 7 tal como se evaluó en un ensayo "pull-down" GST en la presencia de Sos 40 nM y GST-Ras 100 nM.

La Figura 7 muestra un esquema de la red de señalización RTK/Ras/MAPK que lleva a la expresión génica.

Las Figuras 8a-d muestran el efecto de los péptidos HBS de la invención luego las proteínas de ruta RTK/Ras según se determina por los experimentos sobre cultivos celulares. La Figura 8a muestra atenuación de activación de Ras inducida por EGF por HBS 7. La Figura 8b muestra regulación a la baja de activación de Ras mediante interferencia directa con el complejo Ras/Sos. La Figura 8c muestra supresión de activación de ERK inducida por EGF por HBS 7. La Figura 8d muestra una reducción en la intensidad y duración de activación de ERK inducida por EGF luego de tratamiento con HBS 7.

La Figura 9 muestra espectros de dicroísmo circular y helicidad de péptidos HBS.

La Figura 10 muestra la afinidad de unión de péptidos HBS para Ras según se determina por un ensayo de polarización de fluorescencia.

La Figura 11 muestra la absorción celular de péptidos HBS en células HeLa vivas.

La Figura 12 muestra un esquema sintético para la preparación de HBS 13 y compuestos relacionados.

La Figura 13 muestra un esquema sintético para preparación de HBS 7 y compuestos relacionados.

La Figura 14 muestra un esquema sintético para preparación de diversos péptidos HBS de la invención.

La Figura 15 muestra un esquema sintético para preparación de péptidos HBS que contienen un residuo de glicina en la tercera desde el terminal N.

#### Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se relaciona con  $\alpha$ -hélices derivadas de enlace de hidrógeno sustituto ("HBS") capaz de interrumpir la ruta de señalización Ras. Estas hélices HBS pueden funcionar potencialmente como los inhibidores in vivo de interacción de Ras/Sos.

Un primer aspecto de la presente invención se relaciona con un péptido que comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAIYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZLXZEXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido que tiene una o más  $\alpha$ -hélice internamente, más estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia los aminoácidos 929-944 de la hélice  $\alpha$ H de Sos, y en donde el péptido no comprende la secuencia FEGYRLELLKAEEN.

El término "imitador" se refiere a la capacidad de una composición de la invención para efectuar una actividad similar a la proteína natural Sos. Un "imitador" abarca tanto imitadores funcionales como estructurales de dichas proteínas. Por ejemplo, el imitador es una proteína que comparte un cierto porcentaje de homología (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, o 95% de homología) con la proteína objetivo. Alternativamente, el imitador se deriva de una secuencia diferente que no obstante es capaz de interactuar con Ras de una forma funcionalmente similar, por ejemplo mediante al interactuar con el mismo sitio activo.

Los péptidos de acuerdo con la invención imitan una porción de la secuencia de la proteína de Sos. La proteína Sos comprende dos dominios estructurales de alfa-helicoidal, incluyendo un dominio N-terminal (aminoácidos 568-741, que abarca alfa-hélices  $\alpha$ 1 través  $\alpha$ 6) y un dominio C-terminal (aminoácidos 752 a 1044, que comprende alfa-hélices  $\alpha$ A - $\alpha$ K). El dominio C-terminal de la proteína Sos está involucrada principalmente en la interacción con Ras. En particular, hélice  $\alpha$ H juega un papel importante en el mecanismo de intercambio de nucleótidos.

Los péptidos adecuados de la invención imitan la hélice  $\alpha$ H de Sos. En algunas realizaciones, los péptidos de la invención imitan los aminoácidos 929 a 944 de la proteína Sos.

Se espera que estas  $\alpha$ -hélices artificiales para interferir de forma competitiva con hélices Sos para unirse con Ras, modulando de esta manera la interacción de Ras y Sos.

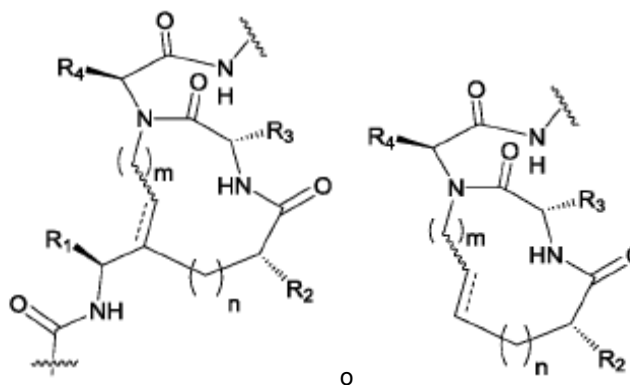
A modo de ejemplo, las  $\alpha$ -hélices artificiales de la presente invención imitan por lo menos una porción de la proteína Sos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Hélices de Ras/Sos de Ej

| Nombre              | Secuencia           | Solubilidad  | % de Inhibición |
|---------------------|---------------------|--------------|-----------------|
| wt (Sos929-944)     | FFGIYLTNILKTEEGN    | insoluble    | <10             |
| 1                   | FEGYRTDILRTEEGN     | parcialmente | 13              |
| HBS 1               | FEGYRTDILRTEEGN     | parcialmente | 11              |
| 2                   | FGEGYRTDILRTEEGN    | parcialmente | <10             |
| 3                   | AEGYRTDILRTEEGN     | parcialmente | <10             |
| 4                   | AEGYRADILRTEEGN     | parcialmente | <10             |
| 5                   | FEGYRTDILR          | soluble      | <10             |
| 6                   | FEGYRTELLKAEEN      | soluble      | 20              |
| HBS 6               | FEGYRTELLKAEEN      | soluble      | 40              |
| 7                   | FEGYRLELLKAEEN      | soluble      | 37              |
| HBS 7               | FEGYRLELLKAEEN      | soluble      | 64              |
| HBS 7mut            | AEGYRLELLKAEAAA     | soluble      | 15              |
| 8                   | FEGYRLELLK          | soluble      | <5              |
| HBS 8               | FEGYRLELLK          | soluble      | <5              |
| HBS 9               | FEGLRLWLRKAibEEAN   | soluble      | 35              |
| 10                  | FEGLRLWLRKAibEEAibN | soluble      | 50              |
| HBS 10              | FEGLRLWLRKAibEEAibN | soluble      | 60              |
| 11                  | FEGYRLELLKAibEEAibN | soluble      | 30              |
| HBS 11              | FEGYRLELLKAibEEAibN | soluble      | 20              |
| 12                  | FEGLRLWLRKAEEAN     | soluble      | 50              |
| HBS 12              | FEGLRLWLRKAEEAN     | soluble      | 55              |
| 13                  | FEAIYRLELLKAEEN     | soluble      | 40              |
| HBS 13              | FEAIYRLELLKAEEN     | soluble      | 50              |
| 15                  | FEAIYRLEKLKAEEN     | soluble      | 50              |
| HBS 15 <sup>^</sup> | FEAIYRLEK*LKAE*EAN  | soluble      | <10             |
| HBS 16              | FEGYRLEKLKAEENRR    | soluble      | 56              |

5 El diseño de péptidos y hélices HBS que imitan la secuencia  $\alpha$ -H Sos929-944. "A" se refiere a péptidos que contienen un puente lactama entre residuos K\* y E\* (por ejemplo HBS 15). "% de inhibición" representa la inhibición del intercambio de nucleótidos mediados por Sos desde Ras. El valor se normaliza para el intercambio de nucleótido de Ras en presencia y ausencia de Sos.

10 Generalmente, los péptidos adecuados de la presente invención incluyen aquellos que incluyen la fórmula:



donde

15 es un enlace carbono a carbono sencillo o doble;

es un enlace sencillo y es cis o trans cuando es un enlace doble;

n es 1 o 2;

20 m es cero o cualquier entero positivo;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo.

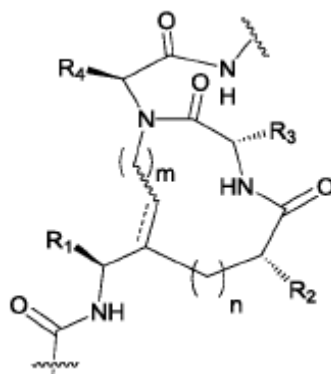
La variable  $m$  puede ser cero o cualquier entero positivo, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones,  $m$  es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones,  $m$  es 0. En otras realizaciones,  $m$  es 1 o 2.

5 La variable  $n$  puede ser 1 o 2. En otras realizaciones,  $n$  es 1. En aún otras realizaciones,  $n$  es 2.

Los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo. Por ejemplo,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son cadenas laterales de aminoácidos. En algunas realizaciones,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son cadenas laterales de aminoácidos de origen natural. En otras realizaciones, por lo menos una cadena lateral de aminoácido es una cadena natural de origen no natural.

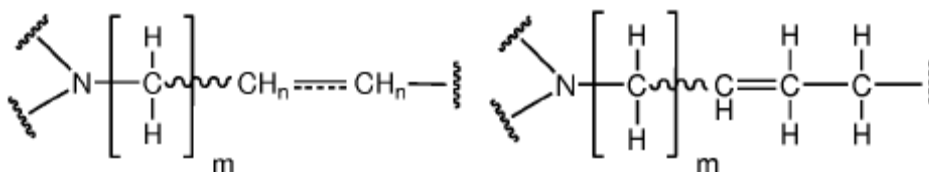
En algunas realizaciones,  $R_3$  es un péptido que comprende una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo. En otra realización, un péptido de la presente invención tiene una región  $\alpha$ -helicoidal internamente limitada que abarca los residuos 1 a 4 de la secuencia de aminoácidos.

Como será evidente para un experto normal en la técnica, se pueden utilizar los métodos de la presente invención para preparar péptidos que tienen  $\alpha$ -hélices limitadas internamente, altamente estabilizadas. El límite se puede colocar en cualquier lugar dentro del péptido, no sólo en el terminal N. Por ejemplo, un compuesto preparado de acuerdo con los métodos de la presente invención puede tener la fórmula

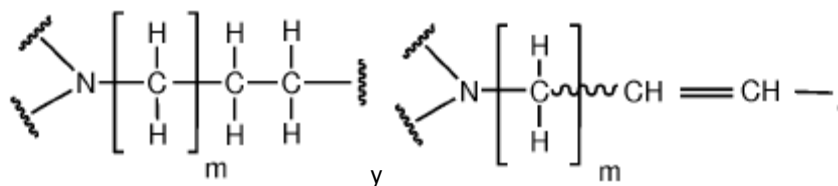


Los péptidos producidos de acuerdo con los métodos de la presente invención, por ejemplo, pueden ser menores de 40, 30, 25, 20, o 15 aminoácidos, que incluyen, por ejemplo, menos de 10 residuos de aminoácidos.

La presente invención también se relaciona con péptidos que tienen una o más  $\alpha$ -hélices estables, limitadas internamente. La una o más estructuras estables, limitadas internamente incluyen los siguientes motivos:



donde  $\text{---}$  es un enlace sencillo o doble, es un enlace sencillo y es cis o trans cuando  $\text{---}$  es un enlace doble;  $n$  es 1 o 2; y  $m$  es cualquier número. Ejemplos de dichos motivos incluyen:

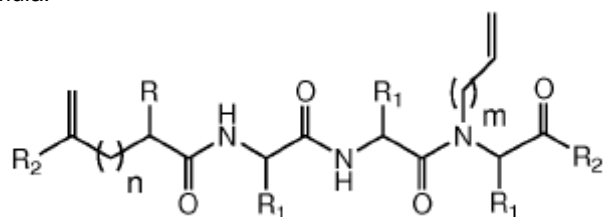


Las  $\alpha$ -hélices HBS de la presente invención se obtienen al reemplazar un enlace de hidrógeno de cadena principal de terminal N i e i + 4 con un enlace carbono a carbono a través de una reacción de metátesis de cierre del anillo, como se muestra en la Figura 2 (Patente Estadounidense No. 7,202,332 en Arora et al.; Chapman & Arora, "Optimized Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate Helices: Surprising Effects of Microwave Heating on the Activity of Grubbs Catalysts," Org. Lett. 8:5825-8 (2006); Chapman et al., "A Highly Stable Short  $\alpha$ -Helix Constrained by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate," J. Am. Chem. Soc. 126:12252-3 (2004); Dimartino et al., "Solid-phase Synthesis of

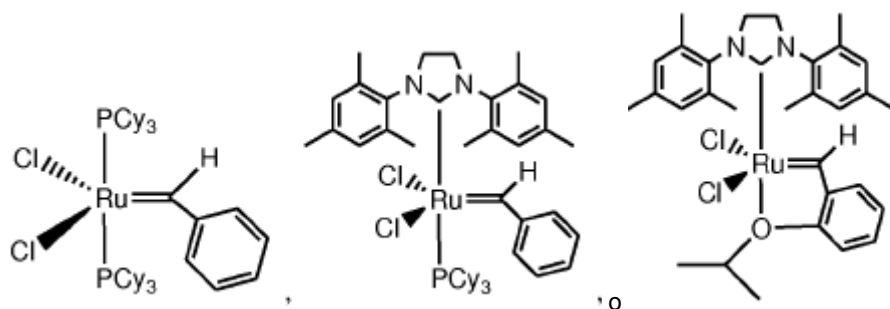
Hydrogen-bond Surrogate-derived  $\alpha$ -Helices," *Org. Lett.* 7:2389-92 (2005)). El sustituto de enlace de hidrógeno pre-organiza una  $\alpha$ -vuelta y estabiliza la secuencia de péptidos en una conformación  $\alpha$ -helicoidal. Se ha mostrado que las  $\alpha$ -hélices HBS adoptan conformaciones  $\alpha$ -helicoidales estables a partir de una variedad de secuencias de péptidos cortas (Wang et al., "Evaluation of Biologically Relevant Short  $\alpha$ -Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate," *J. Am. Chem. Soc.* 128:9248-56 (2006)). También se ha demostrado que estas  $\alpha$ -hélices artificiales se pueden dirigir a su receptor de proteína esperado con alta afinidad (Wang et al., "Enhanced Metabolic Stability and Protein-binding Properties of Artificial  $\alpha$  Helices Derived from a Hydrogen-bond Surrogate: Application to Bcl-xL," *Angew. Chem. Int'l Ed. Engl.* 44:6525-9 (2005), originally published at *Angew. Chem.* 117:6683-7 (2005)).

- 10 La preparación de un compuesto de la invención implica proporcionar un compuesto precursor del péptido y promover la formación de enlaces carbono-carbono que resultan en una, alfa-hélice internamente limitada, estable.

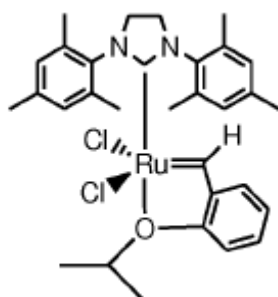
El precursor puede tener la fórmula:



- 15 Se puede hacer reaccionar el compuesto de la fórmula anterior en condiciones efectivas para promover la formación de un enlace carbono-carbono. Dicha reacción puede ser, por ejemplo, de metátesis. La tolerancia de grupo funcional excepcional mostrada por los catalizadores de metátesis de olefinas para la introducción fácil de limitaciones carbono-carbono no nativas en la preparación de peptidomiméticos sugiere que X e Y pueden ser dos átomos de carbono conectados a través de una reacción de metátesis de olefinas, como se muestra en el Esquema 2. (Hoveyda et al., "Ru Complexes Bearing Bidentate Carbenes: From Innocent Curiosity to Uniquely Effective Catalysts for Olefin Metathesis," *Org. Biomolec. Chem.* 2:8-23 (2004); Trnka et al., "The Development of L2X2Tu = CHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story," *Accounts Chem. Res.* 34:18-29 (2001)).
- 20 Por ejemplo, esto puede implicar una reacción de metátesis de olefinas de cierre de anillo. Una reacción de metátesis de olefinas acopla dos enlaces dobles (olefinas) para producir dos nuevos enlaces dobles (uno de los cuales es normalmente gas de etileno). Una metátesis de olefinas de cierre de anillo utiliza una reacción de metátesis de olefinas para formar un macrociclo. En esta reacción, se conectan dos enlaces dobles dentro de una cadena. La reacción se puede llevar a cabo con un catalizador de metátesis, por ejemplo de la fórmula



El catalizador de metátesis puede ser de la fórmula



- 35 Se puede realizar la reacción de metátesis, por ejemplo, a una temperatura entre aproximadamente 25°C y 110°C, y más preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente 50°C.

La reacción de metátesis se puede realizar con un solvente orgánico, tal como diclorometano, dicloroetano, tricloroetano, o tolueno.

Las reacciones aquí, por ejemplo, se pueden llevar a cabo sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen partículas, hebras, precipitados, geles, láminas, tubos, esferas, recipientes, capilares, almohadillas, tajadas, películas, placas, portaobjetos, discos, membranas, etc. Estos soportes sólidos se pueden elaborar de una amplia variedad de materiales, que incluyen polímeros, plásticos, cerámicas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, o compuestos de los mismos. El sustrato es preferiblemente plano, pero puede tomar una variedad de configuraciones de superficie alternativas. Por ejemplo, el sustrato puede contener regiones elevadas o deprimidas en las que tiene lugar la síntesis. El sustrato y su superficie preferiblemente se forman un soporte rígido sobre la que se lleva a cabo las reacciones descritas aquí. Otros materiales de sustrato serán fácilmente evidentes para aquellos expertos comunes en la técnica luego de la revisión de esta descripción.

La reacción de metátesis realizada puede producir inicialmente un compuesto en el que el enlace carbono-carbono recién formado es un enlace doble. Este enlace doble se puede convertir posteriormente a un enlace simple por métodos de hidrogenación conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido para uso en un método terapéutico para inhibir la señalización de Ras en una célula, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice  $\alpha$ H de Sos. En algunas realizaciones, la célula está en un organismo vivo. La célula puede ser, por ejemplo, una célula de cáncer tal como una célula de tumor líquido o sólido. La invención proporciona adicionalmente un péptido para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice  $\alpha$ H de Sos.

Como será evidente para un experto común en la técnica, la administración del péptido se puede llevar a cabo utilizando métodos generalmente conocidos.

Se puede lograr la administración ya sea a través de administración sistémica al sujeto o a través de la administración dirigida a células afectadas. Las rutas de administración de ejemplo incluyen, sin limitación, por inoculación intratraqueal, aspiración, instilación de las vías respiratorias, aerosolización, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, por vía tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraarterial (tal como a través de la arteria pulmonar), inyección intramuscular, instilación intrapleural, intraventricular, intralesional, por aplicación a las membranas mucosas (tales como las de la nariz, garganta, bronquios, genitales y/o el ano), o implante de un vehículo de liberación sostenida.

Normalmente, se administrará el péptido de la presente invención a un mamífero como una formulación farmacéutica que incluye el agente terapéutico y cualesquier adyuvantes farmacéuticamente aceptables, vehículos, excipientes, y/o estabilizadores, y pueden estar en forma sólida o líquida, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Las composiciones preferiblemente contienen de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 99 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 60 por ciento en peso, del agente terapéutico junto con los adyuvantes, portadores y/o excipientes. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una unidad de dosificación adecuada.

Los agentes se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se puede encerrar en cápsulas de cubierta dura o blanda, o se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, estos compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y utilizar en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener por lo menos 0.1% del agente. El porcentaje del agente en estas composiciones puede, por supuesto, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2% a aproximadamente 60% del peso de la unidad. La cantidad del agente en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

Los comprimidos, cápsulas y similares pueden contener también un aglutinante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrante tal como

almidón de maíz, almidón de papa, o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite graso.

5 Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos se pueden recubrir con goma laca, azúcar, o ambos. Un jarabe puede contener, además del ingrediente activo(s), sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja.

10 Los agentes también se pueden administrar parenteralmente. Las soluciones o suspensiones del agente se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensoactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. Los aceites ilustrativos son aquellos de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. 15 Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), mezclas 25 adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Los agentes de acuerdo con este aspecto de la presente invención también se pueden administrar directamente a las vías respiratorias en forma de aerosol. Para uso como aerosoles, los compuestos de la presente invención en solución o suspensión se pueden empacar en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes de hidrocarburos como propano, butano, o isobutano con adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención también se pueden administrar en una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador. 30

Los agentes de la presente invención se pueden administrar directamente a un tejido objetivo, por ejemplo, el tejido que es susceptible a la condición que se va a tratar. Adicionalmente y/o alternativamente, el agente se puede administrar a un área no objetivo junto con uno o más agentes que facilitan la migración del agente (y/o la absorción por) un tejido, órgano o célula objetivo. Como será evidente para un experto normal en la técnica, el agente terapéutico en sí mismo se modifica para facilitar su transporte a (y absorción por) el tejido, órgano o célula deseado. 35

Los dispositivos de administración de ejemplo incluyen, sin limitación, nebulizadores, atomizadores, liposomas, parches transdérmicos, implantes, composiciones de depósito de proteína implantables o inyectables, y jeringas. Otros sistemas de suministro que son conocidos por los expertos en la técnica también se pueden emplear para lograr el suministro deseado del agente terapéutico al órgano, tejido o células deseado in vivo. 40

Se puede utilizar cualquier método adecuado para suministro de los agentes. Normalmente, el agente se puede administrar a un paciente en un vehículo que suministra el agente(s) a la célula, tejido, u órgano objetivo. 45

Un método para suministrar agentes en las células implica el uso de liposomas. Básicamente, esto implica proporcionar un liposoma que incluye el agente(s) que se va a suministrar, y después poner en contacto la célula, tejido, u órgano objetivo con los liposomas en condiciones eficaces para suministro del agente en la célula, tejido u órgano. 50

Los liposomas son vesículas compuestas de uno o más concéntricamente ordenadas en bicapas lipídicas que encapsulan una fase acuosa. Normalmente no son permeables, pero pueden llegar a ser permeable si se produce un agujero o poro en la membrana, si se disuelve la membrana o se degrada, o si la temperatura de la membrana se aumenta a la temperatura de transición de fase. Los métodos actuales de suministro de fármacos mediante liposomas requieren que el portador de liposomas en última instancia se convierte en permeable y libera el fármaco encapsulado en el sitio objetivo. Esto se puede lograr, por ejemplo, de una manera pasiva en la bicapa del liposoma se degrada con el tiempo a través de la acción de diversos agentes en el cuerpo. Cada composición de liposoma 60 tendrá una característica de vida media en la circulación o en otros sitios en el cuerpo y, por lo tanto, al controlar la vida media de la composición de liposomas, se pueden regular en cierta medida la velocidad a la que se degrada la bicapa.

En contraste con la liberación de fármaco pasiva, la liberación del fármaco activo implica el uso de un agente para inducir un cambio de permeabilidad en la vesícula del liposoma. Las membranas de los liposomas se pueden construir para que se vuelvan desestabilizadas cuando el entorno se vuelve ácido cerca de la membrana del 65

liposoma (véase, por ejemplo, Wang & Huang, "pH-Sensitive Immunoliposomes Mediate Target-cell-specific Delivery and Controlled Expression of a Foreign Gene in Mouse," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:7851-5 (1987)). Cuando los liposomas se someten a endocitosis por una célula objetivo, por ejemplo, se pueden dirigir a endosomas ácidos que desestabilizarán el liposoma y resultarán en la liberación del fármaco.

Alternativamente, la membrana del liposoma se puede modificar químicamente de tal manera que una enzima se coloca como un recubrimiento sobre la membrana, que desestabiliza la enzima lentamente del liposoma. Dado que el control de liberación del fármaco depende de la concentración de enzima colocado inicialmente en la membrana, no hay forma real efectiva para modular o alterar la liberación del fármaco para conseguir suministro de fármacos "bajo demanda". El mismo problema existe para liposomas sensibles al pH en que tan pronto como la vesícula del liposoma entra en contacto con una célula objetivo, se envuelve y una caída en el pH dará lugar a la liberación del fármaco.

Este sistema de suministro de liposomas también se puede hacer para acumular en un órgano, tejido, o célula objetivo a través de la segmentación activa (por ejemplo, al incorporar un anticuerpo o hormona en la superficie del vehículo liposomal). Esto se puede lograr de acuerdo con métodos conocidos.

Se pueden preparar diferentes tipos de liposomas de acuerdo con Bangham et al., "Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids," *J. Mol. Biol.* 13:238-52 (1965); Patente Estadounidense No. 5,653,996 otorgada a Hsu; Patente Estadounidense No. 5,643,599 otorgada a Lee et al.; Patente Estadounidense No. 5,885,613 otorgada a Holland et al.; Patente Estadounidense No. 5,631,237 otorgada a Dzau & Kaneda; y Patente Estadounidense No. 5,059,421 otorgada a Loughrey et al..

Se pueden producir estos liposomas de tal manera que contienen, adicionalmente a los agentes terapéuticos de la presente invención, otros agentes terapéuticos, tales como agentes anti-inflamatorios, que luego se liberan en el sitio objetivo (por ejemplo, Wolff et al., "The Use of Monoclonal Anti-Thy1 IgG1 for the Targeting of Liposomes to AKR-A Cells in Vitro and in Vivo," *Biochim. Biophys. Acta* 802:259-73 (1984)).

Un método alternativo para suministro de proteínas o agentes de polipéptidos (por ejemplo, los péptidos de la presente invención) implica la conjugación de la proteína o polipéptido deseado a un polímero que se estabiliza para evitar la degradación enzimática de la proteína o polipéptido conjugado. Las proteínas o polipéptidos de este tipo conjugados se describen en la Patente Estadounidense No. 5,681,811 otorgada a Ekwuribe.

Sin embargo, otro método para el suministro de proteínas o agentes de polipéptidos implica la preparación de proteínas químicas de acuerdo con la Patente Estadounidense N° 5,817,789 otorgada a Heartlein et al. La proteína química puede incluir un dominio de ligando y el agente de polipéptido (por ejemplo, la  $\alpha$ -hélice artificial de la presente invención). El dominio de ligando es específico para receptores situados en una célula objetivo. Por lo tanto, cuando se suministra la proteína química por vía intravenosa o de otra manera se introduce en la sangre o la linfa, la proteína química se adsorberá a la célula objetivo, y la célula objetivo se internalizará la proteína química.

La administración se puede llevar a cabo con tanta frecuencia como sea necesario y durante una duración que sea adecuada para proporcionar un tratamiento efectivo. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo con una única formulación de dosificación de liberación sostenida o con múltiples dosificaciones diarias.

Por supuesto la cantidad que se va a administrar variará dependiendo del régimen de tratamiento. Generalmente, se administra un agente para lograr una cantidad efectiva para una mejora en el estado del paciente (es decir, una cantidad terapéuticamente efectiva). Por lo tanto, en el caso del cáncer, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad que sea capaz de reducir por lo menos parcialmente del tamaño de un tumor, reducir el número de células cancerosas en el cuerpo, o ralentizar el aumento en el número de células de cáncer en el cuerpo. La dosis requerida para obtener una cantidad efectiva puede variar dependiendo del agente, formulación, cáncer y el individuo al que se administra el agente.

La determinación de las cantidades efectivas también puede incluir ensayos in vitro en los que se administran diferentes dosis de agente a células en cultivo y concentración de agente efectivo para inhibir el crecimiento de células de cáncer se determina con el fin de calcular la concentración requerida in vivo. Las cantidades efectivas también se pueden basar en estudios con animales in vivo. Una cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar empíricamente por aquellos expertos en la técnica.

Uso en métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, los péptidos de la invención se utilizan para tratar cánceres. También pueden ser útiles en la prevención y/o diagnóstico de cánceres y afecciones neoplásicas. Como se utiliza aquí, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o afección anormal caracterizada por un crecimiento celular de rápida proliferación. Los estados de enfermedades hiperproliferativas y neoplásicas se pueden categorizar como patológicos, es decir, que caracterizan

o constituyen un estado de enfermedad, o se pueden clasificar como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociado a un estado de enfermedad. Se entiende que el término incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, que incluyen pero no se limitan a aquellos de origen de mama, pulmón, hígado, colon y ovario. Las células “hiperproliferativas patológicas” se producen en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento del tumor maligno. Ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas. Ejemplos de trastornos proliferativa y/o de diferenciación celular incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, o trastornos metastásicos. Los compuestos pueden ser nuevos agentes terapéuticos para controlar el cáncer de mama control, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de dichos cánceres y similares.

Ejemplos de cánceres o afecciones neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, un fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de cerebro, carcinoma de células epidermoides, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, 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.

Ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se utiliza aquí, el término “trastornos neoplásicos hematopoyéticos” incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de linajes mielóide, linfóide o eritroide, o células precursoras de los mismos. Preferiblemente, las enfermedades surgen a partir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ejemplo adicionales incluyen, pero no se limitan a, leucemia aguda promielóide (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus (1991), Crit Rev. Oncol./Hematol. 11: 267-97); las neoplasias linfoides incluyen, pero no se limitan a la leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T de adulto (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Stenberg.

Ejemplos de trastornos proliferativos celulares y/o de diferenciación de mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de mama proliferativa que incluyen, por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante, y papilomas de conducto pequeño; tumores, por ejemplo, tumores estromales tales como fibroadenoma, tumor filoides y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma de conducto grande; carcinoma de mama que incluyen carcinoma in situ (no invasivo) carcinoma que incluye carcinoma ductal in situ (que incluyen enfermedad de Paget) y carcinoma lobular in situ, y carcinoma invasivo (infiltrante) que incluye, pero no se limitan a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, medular carcinoma, carcinoma coloide (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasivo y diversas neoplasias malignas. Los trastornos de mama masculinos incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

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

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

Ejemplos de trastornos proliferativos celulares y/o de diferenciación del hígado incluyen, pero no se limitan a, hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, incluyendo carcinoma primario del hígado y tumores metastáticos.

Ejemplos de trastornos proliferativos celulares y/o de diferenciación del ovario incluyen, pero no se limitan a, los tumores de ovario tales como, tumores de epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales superficiales; tumores de células germinales, tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos,

teratomas malignas inmaduras, disgerminoma, tumor de seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores estromales cordones sexuales, tales como, tumores de células de granulosa-teca, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células colina y gonadoblastoma; y tumores metastáticos tales como tumores de Krukenberg.

- 5 Se pueden utilizar los péptidos de la invención para tratar un cáncer mediado por una proteína Ras mutada. Las cánceres que se sabe implican con frecuencia dichas mutaciones incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón de célula no pequeña (adenocarcinoma), cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cánceres de tiroides (por ejemplo, folicular, papilar indiferenciada o papilar), seminoma, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de riñón, síndrome mielodisplásico y leucemia mielógena aguda.

10  
Cáncer de mama

Pueden ser útiles los péptidos de la invención en métodos de tratamiento de cáncer de mama. El cáncer de mama incluye carcinomas de mama invasivos, tales como carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma cribiforme invasivo, carcinoma medular, carcinoma mucinoso y otros tumores con mucina abundante, cistadenocarcinoma, carcinoma mucinoso de células columnares, carcinoma de células en anillo de sello, tumores neuroendocrinos (que incluyen carcinoma neuroendocrino sólido, tumor carcinoide atípico, carcinoma de células pequeñas/células de avena o carcinoma neuroendocrino de células grandes), carcinoma papilar invasivo, carcinoma micropapilar invasor, carcinoma apocrino, carcinomas de metaplasia, carcinomas de metaplasia del epitelio puro, carcinomas epiteliales/ de metaplasia mesenquimales mezclados, carcinoma rico en lípidos, carcinoma secretor, carcinoma oncocítico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma de células acinares, carcinoma de células claras rico en glucógeno, carcinoma sebáceo, el carcinoma inflamatorio o carcinoma de mama bilateral; tumores mesenquimales tales como hemangioma, angiomas, hemangiopericitoma, hiperplasia estromal pseudoangiomatous, miofibroblastoma, fibromatosis (agresivo), tumor inflamatorio miofibroblástico, lipoma, angiolipoma, tumor de células granulares, neurofibroma, schwannoma, angiosarcoma, liposarcoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, leiomioma, o Leiomyosarcoma; lesiones mioepiteliales como mioepiteliosis, adenositis adenomioepitelial, adenomioepitelioma, o mioepitelioma maligno; tumores fibroepiteliales como fibroadenoma, tumor filoides, sarcoma del estroma periconductal de bajo grado, o hamartoma mamario; y tumores en el pezón como adenoma de pezón, adenoma siringomatoso, o enfermedad de Paget del pezón.

30 Se puede efectuar el tratamiento del cáncer de mama en combinación con cualquier terapia adicional, como una terapia que es parte de la cuidado estándar. Una técnica quirúrgica como lumpectomía o mastectomía se puede realizar antes de, durante, o después del tratamiento con los compuestos de la invención. Alternativamente, se puede utilizar terapia de radiación para el tratamiento de cáncer de mama en combinación con los compuestos de la invención. En otros casos, los compuestos de la invención se administran en combinación con un segundo agente terapéutico. Dicho agente puede ser un agente quimioterapéutico tal como un fármaco individual o combinación de fármacos y terapias. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser un tratamiento quimioterapéutico adyuvante tal como CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo); FAC o CAF (5-fluorouracilo, doxorrubicina, ciclofosfamida); CA o CA (doxorrubicina y ciclofosfamida); AC-Taxol (AC seguido de paclitaxel); TAC (docetaxel, doxorrubicina y ciclofosfamida); FEC (5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida); FEC-D (FEC seguido por docetaxel); TC (docetaxel y ciclofosfamida). Además de la quimioterapia, también se puede agregar trastuzumab al régimen dependiendo de las características del tumor (es decir, estado HER2/neu) y riesgo de recaída. La terapia hormonal también puede ser apropiada antes, durante o después del tratamiento quimioterapéutico. Por ejemplo, el tamoxifeno se pueden administrar o un compuesto en la categoría de inhibidores de aromatasa, que incluyen, pero no se limitan a aminoglutetimida, anastrozol, exemestano, formestano, letrozol, o vorozol. En otras realizaciones, un agente antiangiogénico se puede utilizar en terapia de combinación para el tratamiento de cáncer de mama. El agente antiangiogénico puede ser un agente anti-VEGF, que incluye, pero no limitado a bevacizumab.

50  
Cáncer de ovario

Se pueden utilizar los compuestos de la invención para tratar el cáncer de ovario. Los cánceres ováricos incluyen tumores de ovario tales como, tumores de epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales superficiales; tumores de células germinales, tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmico, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor de seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores estromales de cordones sexuales, tales como, tumores de células granulosa-teca, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células colina y gonadoblastoma; y tumores metastáticos tales como tumores de Krukenberg.

60 Se pueden administrar los compuestos de la invención en combinación con una segunda terapia dicha terapia es parte del estándar de cuidado. La cirugía, inmunoterapia, quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia o una combinación de éstos son algunos de los tratamientos posibles disponibles para el cáncer de ovario. Algunos de los posibles procedimientos quirúrgicos incluyen reducción de volumen, y una ooforectomía unilateral o bilateral y/o una salpingectomía unilateral o bilateral.

Los medicamentos contra el cáncer que se pueden utilizar incluyen ciclofosfamida, etopósido, altretamina, e ifosfamida. La terapia hormonal con el fármaco tamoxifeno se puede utilizar para reducir los tumores ováricos. La terapia de radiación puede ser el tratamiento y/o braquiterapia con radiación de haz externa.

## 5 Cáncer de próstata

Se pueden utilizar los compuestos de la invención para tratar el cáncer de próstata. Los cánceres de próstata incluyen adenocarcinomas y adenocarcinomas con metástasis. Los compuestos de la invención se pueden administrar en combinación con una segunda terapia como una terapia que es parte del estándar de cuidado. El tratamiento para el cáncer de próstata puede incluir cirugía, terapia de radiación, Ultrasonido Enfocado de Alta Intensidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal, o cualquier combinación de los mismos. La cirugía puede involucrar prostatectomía, prostatectomía radical perineal, prostatectomía radical laparoscópica, resección transuretral de próstata u orquiectomía. La terapia radiación puede incluir terapia y/o braquiterapia con radiación de haz externo. La terapia hormonal puede incluir orquiectomía; administración de antiandrógenos tales como flutamida, bicalutamida, nilutamida o acetato de ciproterona; medicamentos que inhiben la producción de andrógenos adrenales, tales como DHEA, tales como el ketoconazol y aminoglutetimida; y antagonistas de GnRH o agonistas tales como Abarelix (Plenaxis®), Cetrorelix (Cetrotide®), Ganirelix (Antagon®), leuprolida, goserelina, triptorelina, o buserelina. El tratamiento con un agente anti-andrógenos, que bloquea la actividad de andrógenos en el cuerpo, es otra terapia disponible. Dichos agentes incluyen flutamida, bicalutamida, y nilutamida. Esta terapia normalmente se combina con la administración de análogo de LHRH o una orquiectomía, que se denomina un bloqueo androgénico combinado (CAB). La quimioterapia incluye, pero no se limita a, administración de docetaxel, por ejemplo, con un corticosteroide como la prednisona. Los fármacos contra el cáncer, tales como doxorrubicina, estramustina, etopósido, mitoxantrona, vinblastina, paclitaxel, carboplatino también se pueden administrar para retardar el crecimiento del cáncer de próstata, reducir los síntomas y mejorar la calidad de vida. También se pueden administrar compuestos adicionales, tales como bisfosfonatos.

## Cáncer renal

Se pueden utilizar los compuestos de la invención para tratar el cáncer renal. Los cánceres renales incluyen, pero no se limitan a, carcinomas de células renales, metástasis de neoplasias extra-renal primaria, linfomas renales, carcinomas de células epidermoides, tumores yuxtglomerulares (reninomas), carcinomas de células de transición, angiomiolipomas, oncocitomas y tumores de Wilm. Los compuestos de la invención se pueden administrar en conjunto con una segunda terapia como una terapia que es parte de el estándar de cuidado. El tratamiento para el cáncer renal puede implicar cirugía, tratamientos percutáneos, terapias de radiación, quimioterapia, vacunas, u otro medicamento. Las técnicas quirúrgicas útiles para el tratamiento de cáncer renal en combinación con los compuestos de la invención incluyen nefrectomía, que puede incluir eliminación de la glándula adrenal, ganglios linfáticos retroperitoneales y cualesquier otros tejidos circundantes afectados por la invasión del tumor. Las terapias percutáneas incluyen, por ejemplo, terapias guiadas por imágenes que pueden incluir formación de imágenes de un tumor, seguido de su destrucción objetivo por ablación por radiofrecuencia o crioterapia. En algunos casos, otros medicamentos quimioterapéuticos u otros medicamentos útiles en el tratamiento del cáncer renal pueden ser alfa-interferón, interleucina-2, bevacizumab, sorafenib, sunitib, temsirolimus u otros inhibidores de quinasa.

## Cáncer de páncreas

Se pueden utilizar compuestos de la invención en métodos de tratamiento de cáncer de páncreas, tal como un cáncer de páncreas seleccionado de los siguientes: un carcinoma epitelioide en el tejido del conducto pancreático y un adenocarcinoma en un conducto pancreático. El tipo más común de cáncer de páncreas es un adenocarcinoma, que se produce en el revestimiento del conducto pancreático. Los posibles tratamientos disponibles para el cáncer de páncreas incluyen cirugía, inmunoterapia, terapia de radiación, y quimioterapia. Las posibles opciones de tratamiento quirúrgico incluyen una pancreatectomía distal o total y una pancreaticoduodenectomía (procedimiento de Whipple). La terapia de radiación puede ser una opción para pacientes con cáncer de páncreas, específicamente la radioterapia de haz externo, donde la radiación se concentra en el tumor mediante una máquina fuera del cuerpo. Otra opción es radiación de haz de electrones intraoperatoria administrada durante una operación. La quimioterapia también se puede utilizar para tratar a los pacientes con cáncer de páncreas. Los fármacos contra el cáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo (5-FU), mitomicina, ifosfamida, doxorrubicina, estreptozocina, clorozotocina, y combinaciones de los mismos. Los métodos proporcionados por la invención pueden proporcionar un efecto beneficioso para los pacientes con cáncer de páncreas, mediante administración de un polipéptido de la invención o una combinación de administración de un compuesto y cirugía, radioterapia o quimioterapia.

## 60 Cáncer de colon

Se pueden utilizar los compuestos de la invención para el tratamiento de cáncer de colon, que incluyen, pero no se limitan a los pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes familiares, carcinogénesis colorrectal, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides. Los posibles tratamientos disponibles para el cáncer de colon que se pueden

utilizar en combinación con los compuestos de la invención incluyen cirugía, quimioterapia, terapia de radiación o terapia de fármacos dirigida.

La terapia de radiación puede incluir terapia y/o braquiterapia con radiación de haz externo. La quimioterapia se puede utilizar para reducir la probabilidad de desarrollar metástasis, reducir el tamaño del tumor, o ralentizar crecimiento del tumor. La quimioterapia se aplica a menudo después de cirugía (adyuvante), antes de cirugía (neoadyuvante), o como el tratamiento primario si la cirugía no está indicada (paliativo). Por ejemplo, los regímenes de ejemplo para la quimioterapia adyuvante implican la combinación de infusión de 5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX). Los regímenes de primera línea de quimioterapia pueden implicar la combinación de infusión de 5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX) con un fármaco dirigido, tal como bevacizumab, cetuximab o panitumumab o infusión de 5-fluorouracilo, leucovorina, e irinotecán (FOLFIRI) con fármacos dirigidos tales como bevacizumab, cetuximab o panitumumab. Otros agentes quimioterapéuticos que pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de cáncer de colon en combinación con los compuestos de la invención son Bortezomib (Velcade®), Oblimersen (Genasense®, G3139), gefitinib y erlotinib (Tarceva®) y topotecán (Hycamtin®).

#### Cáncer de pulmón

Los compuestos de la invención se pueden utilizar en métodos para el tratamiento de cáncer de pulmón. Ejemplos de trastornos proliferativos celulares y/o de diferenciación del pulmón incluyen, pero no se limitan a, carcinoma broncogénico, que incluyen síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoide bronquial, tumores diversos y tumores metastásicos; patologías de la pleura, que incluyen derrames pleurales inflamatorios, derrames pleurales no inflamatorios, neumotórax y tumores pleurales, que incluyen tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y mesotelioma maligno.

El tipo más común de cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que representa aproximadamente el 80-85% de los cánceres de pulmón y está dividido en carcinomas de células epidermoides, adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de células grandes. El cáncer de pulmón de células pequeñas, por ejemplo, carcinomas de pulmón de células pequeñas, representa el 15-20% de cánceres de pulmón. Las opciones de tratamiento para el cáncer de pulmón incluyen cirugía, inmunoterapia, terapia de radiación, quimioterapia, terapia fotodinámica, o una combinación de las mismas. Algunas de las posibles opciones quirúrgicas para el tratamiento de cáncer de pulmón son una resección segmentaria o en cuña, una lobectomía o una neumonectomía. La terapia de radiación puede ser terapia de radiación externa o braquiterapia. Algunos fármacos contra el cáncer que se pueden utilizar en la quimioterapia para tratar el cáncer de pulmón en combinación con los compuestos de la invención incluyen cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecán, etopósido, vinblastina, gefitinib, ifosfamida, metotrexato, o una combinación de los mismos. Se puede utilizar terapia fotodinámica (PDT) para tratar pacientes con cáncer de pulmón. Los métodos descritos aquí pueden proporcionar un efecto beneficioso para los pacientes de cáncer de pulmón, mediante administración de un compuesto o una combinación de administración de un compuesto y cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia fotodinámica, o una combinación de las mismas.

Ejemplos de trastornos proliferativos celulares y/o de diferenciación del hígado incluyen, pero no se limitan a, hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, que incluyen carcinoma primario del hígado y tumores metastásicos.

#### Trastornos Inmunoproliferativos

Los trastornos inmunoproliferativos (también conocidos como “enfermedades inmunoproliferativas” o “neoplasias inmunoproliferativas”) son trastornos del sistema inmunitario que se caracterizan por la proliferación anormal de células primarias del sistema inmunitario, que incluye células B, células T y células asesinas naturales (NK), o mediante producción excesiva de inmunoglobulinas (también conocidas como anticuerpos). Dichos trastornos incluyen las categorías generales de trastornos linfoproliferativos, hipergamaglobulinemias y paraproteinemias. Ejemplos de dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastorno ligado al cromosoma X linfoproliferativo, trastorno autosómico linfoproliferativo, síndrome de hiper-IgM, enfermedad de cadena pesada, y crioglobulinemia. Otros trastornos inmunoproliferativos pueden ser enfermedad del injerto contra el anfitrión (GVHD); psoriasis; trastornos inmunitarios asociados con el rechazo de trasplantes de injerto; linfoma de células T; leucemia linfoblástica aguda de células T; linfoma de células T angiocéntrico testicular; angiitis linfocítica benigna; y enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, diabetes mellitus dependiente de insulina, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, pénfigo, enfermedad de Crohn, oftalmia simpática, uveitis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis de acción crónica, colitis ulceratis, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, polimiositis, esclerodermia y enfermedad del tejido conjuntivo mixta.

#### Tratamientos de combinación

Se pueden utilizar los compuestos de la invención en el tratamiento del cáncer en combinación con alquilantes y agentes alquilantes. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clometina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y; nitrosoureas tales como carmustina, fotemustina, lomustina y estreptozocina; agentes terapéuticos de platino tales como carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, BBR3464, y satraplatino; u otros agentes, que incluyen, pero no limitado al busulfán, dacarbazina, procarbazina, temozolomida, tiotepa, treosulfano, o uramustina.

Los compuestos de la invención también se pueden utilizar en combinación con un agente antineoplásico que es un antimetabolito. Por ejemplo, dicho agente antineoplásico puede ser un ácido fólico tales como aminopterina, metotrexato, pemetrexed, o raltitrexed. Alternativamente, el agente antineoplásico puede ser una purina, que incluyen pero no limitado a la cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina. En realizaciones adicionales, el agente antineoplásico puede ser una pirimidina tales como capecitabina, citarabina, fluorouracilo, floxuridina, y gemcitabina.

También se pueden utilizar los compuestos de la invención en combinación con un agente antineoplásico que es un husillo venenoso/ inhibidor mitótico. Los agentes de esta categoría incluyen los taxanos, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel; y alcaloides vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. En aún otras realizaciones, los compuestos de la invención se pueden utilizar en combinación con un agente antineoplásico que es un antibiótico citotóxico/antitumoral de la familia de las antraciclinas tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, pixantrona, o valrubicina; un antibiótico de la familia de estreptomicinas tales como actinomicina, bleomicina, mitomicina, o plicamicina; o hidroxiurea. Alternativamente, los agentes utilizados para la terapia de combinación pueden ser inhibidores de topoisomerasa, que incluyen, pero no se limitan a camptotecina, topotecan, irinotecan, etopósido, o tenipósido.

Alternativamente, el agente antineoplásico puede ser un anticuerpo o agente derivado de anticuerpos. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo dirigido al receptor de tirosina quinasa tal como cetuximab, panitumumab, o trastuzumab. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20, tal como rituximab o tositumomab, o cualquier otro anticuerpo adecuado, que incluye pero no se limita a alemtuzumab, bevacizumab, y gemtuzumab. En otras realizaciones, el agente antineoplásico es un fotosensibilizador tal como ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero de sodio, o verteporfina. En todavía otras realizaciones, el agente antineoplásico es un inhibidor de la tirosina quinasa tales como dediranib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, o vandetanib. Otros agentes neoplásicos adecuados en el uso de la invención incluyen, por ejemplo, alitretinoína, tretinoína, altretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa (pegaspargasa), bexaroteno, bortezomib, denileukin difitox, estramustina, ixabepilona, masoprocol, o mitotano.

Los compuestos descritos aquí también se pueden utilizar para tratar, prevenir o diagnosticar afecciones caracterizadas por la muerte celular hiperactiva o la muerte celular debido a lesión fisiológica, etc. Algunos ejemplos de afecciones caracterizadas por muerte prematura o de células no deseadas que tienen proliferación celular alternativamente no deseada o excesiva incluyen, pero no se limitan a afecciones hipocelulares/hipoplásicas, acelulares/aplásicas o afecciones hipercelulares/hiperplásicas. Algunos ejemplos incluyen trastornos hematológicos que incluyen, pero no se limitan a, anemia de Fanconi, anemia aplásica, talaessemia, neutropenia congénita, y mielodisplasia.

Los compuestos de la invención que actúan para disminuir la apoptosis se pueden utilizar para el tratamiento de trastornos asociados con un nivel no deseado de muerte celular. Por lo tanto, se pueden utilizar compuestos anti-apoptóticos de la invención para tratar trastornos tales como aquellos que conducen a la muerte celular asociada con la infección viral, por ejemplo, infección asociada con la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Una amplia variedad de enfermedades neurológicas se caracteriza por la pérdida gradual de conjuntos específicos de neuronas, y se utilizan los compuestos anti-apoptóticos de la invención, en algunas realizaciones, en el tratamiento de estos trastornos. Dichos trastornos incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), retinitis pigmentosa atrofia muscular espinal, y diversas formas de degeneración cerebelar. La pérdida de células en estas enfermedades no induce una respuesta inflamatoria, y la apoptosis parece ser el mecanismo de muerte celular. Además, se asocia un número de enfermedades hematológicas con una disminución en la producción de células sanguíneas. Estos trastornos incluyen la anemia asociada con enfermedad crónica, anemia aplásica, neutropenia crónica, y síndromes mielodisplásicos. Los trastornos de producción de células sanguíneas, tales como síndrome mielodisplásico y algunas formas de anemia aplásica, se asocian con el aumento de muerte celular por apoptosis dentro de la médula ósea. Estos trastornos pueden ser el resultado de la activación de genes que promueven la apoptosis, deficiencias adquiridas en las células del estroma o factores de supervivencia hematopoyética, o los efectos directos de toxinas y mediadores de respuestas inmunitarias. Dos trastornos comunes asociados con la muerte celular son los infartos de miocardio y apoplejías. En ambos trastornos, las células dentro del área central de la isquemia, que se produce en el evento de pérdida aguda de flujo de sangre, parecen morir rápidamente como resultado de la necrosis. Sin embargo, fuera de la zona isquémica central, las células mueren en un período de tiempo más prolongado y morfológicamente parecen morir por apoptosis.

Otros métodos de uso

Se pueden utilizar los compuestos anti-apoptóticos de la invención para tratar dichos trastornos asociados con la muerte celular indeseable.

5 Algunos ejemplos de trastornos inmunológicos que se tratan con los compuestos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a rechazo de trasplante de órganos, artritis, lupus, IBD, enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple, diabetes, etc.

10 Algunos ejemplos de trastornos neurológicos que se tratan con los compuestos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, Amiloidosis de Hemorragia Cerebral Hereditaria Tipo Holandés, Amiloidosis Reactiva, Nefropatía Amiloide Familiar con Urticaria y Sordera, Síndrome de Muckle-Wells, Mieloma Idiopática; Mieloma Asociado de Macroglobulinemia, Polineuropatía Amiloide Familiar, Miocardiopatía Amiloide Familiar, Amiloide Cardíaca Aislada, Amiloidosis Senil Sistémica, Diabetes de Adulto, Insulinoma, Amiloide Auricular Aislada, Carcinoma Medular de la Tiroides, Amiloidosis Familiar, Hemorragia Cerebral Hereditaria con Amiloidosis, Polineuropatía Amiloidótica Familiar, Scrapie, Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Síndrome de Gerstmann-Straussler, Encefalitis Espongiforme Bovina, enfermedad mediada por prión, y enfermedad de Huntington.

20 Algunos ejemplos de trastornos endocrinológicos que se tratan con los compuestos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a diabetes, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, etc.

25 Ejemplos de trastornos cardiovasculares (por ejemplo, trastornos inflamatorios) que se tratan o previenen con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, infarto de miocardio, apoplejía, trombosis, aneurisma, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica del corazón, angina de pecho, muerte cardíaca súbita, enfermedad cardíaca hipertensiva; enfermedad de vasos no coronaria, tales como arteriolosclerosis, enfermedad de vasos pequeños, nefropatía, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatosis, asma, hipertensión, enfisema y enfermedad pulmonar crónica; o una afección cardiovascular asociado con los procedimientos de intervención ("trauma vascular de procedimiento"), tales como reestenosis después de angioplastia, colocación de una derivación, stent, injertos de escisión sintéticos o naturales, catéter permanente, válvula u otros dispositivos implantables. Los trastornos cardiovasculares preferidos incluyen aterosclerosis, infarto de miocardio, aneurisma, y apoplejías.

#### Ejemplos

35 Ejemplo 1 - Síntesis de péptidos 1-17.

40 Los péptidos 1 a 17 se sintetizaron como se muestra en las Figuras 12-15. Los péptidos amina libres de enlace de resina se sintetizaron mediante química en fase sólida Fmoc convencional sobre Amida Rink o resina Knorr (carga = 0.4 mmol/g) en un Sintetizador de Péptidos de Microondas CEM Liberty. Los aminoácidos Fmoc estándar (y el ácido 4-petenoico) (5 equivalentes) se activaron con HBTU (4.9 equiv) en una solución de DIPEA/NMP al 6% durante 15 min y se agregan a la amina libre de enlace de resina. La mezcla resultante se agitó durante 60 minutos. La eficiencia de acoplamiento se monitorizó por el ensayo de ninhidrina. Los grupos Fmoc se desprotegeron por tratamiento con piperidina al 20% en NMP (2 x 20 min). La resina que contiene péptido -bis olefina se lavó a fondo con DMF y DCM, respectivamente, y se secó bajo vacío durante la noche.

45 Se realizaron reacciones de metátesis de cierre de anillo asistidas por microondas sobre bis-olefinas unidas a resina con el catalizador de Hoveyda- Grubbs (0.15 equiv.) en dicloroetano como se describe en Chapman & Arora, "Optimized Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate Helices: Surprising Effects of Microwave Heating on the Activity of Grubbs Catalysts," Org. Lett. 8:5825-8 (2006). La mezcla de reacción se irradió con estos ajustes: potencia máxima 250 W, 120°C, 5 minutos de tiempo de rampa, y tiempo de retención de 10 minutos. Los péptidos unidos a resina se dividieron de la resina mediante tratamiento con un cóctel de división (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H: H<sub>2</sub>O: triisopropilsilano, 95:2,5:2,5) durante 1.5 horas, y se purificaron por HPLC de fase inversa.

50 Se examinaron diversos péptidos de la invención utilizando espectrometría de masas de cromatografía líquida ("LCMS"). Se obtuvieron datos de LCMS en una serie Agilent 1100. Los resultados de LCMS se muestran en la Tabla 2.

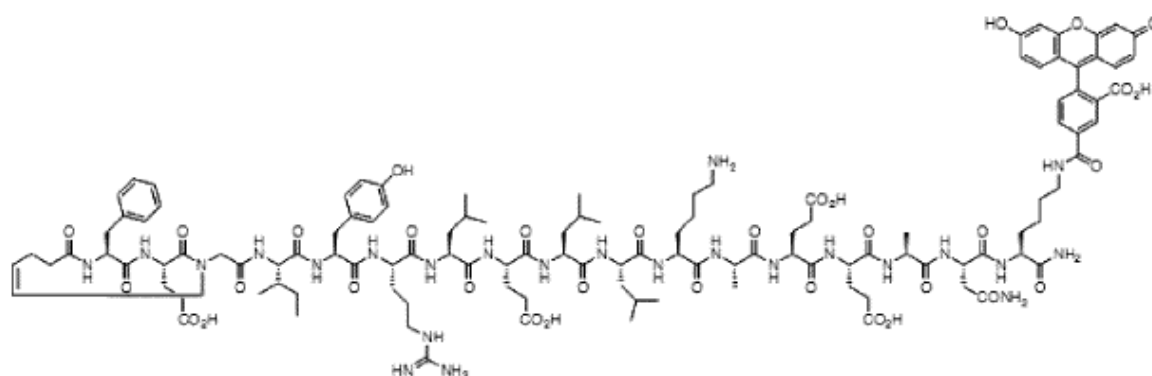
Tabla 2. Resultados de espectrometría de masa para los péptidos 1 a 12 (trampa de electropulverización LC/MSD (XCT)).

| Nombre          | Secuencia         | Masa calculada [M] <sup>+</sup> | Masa observada [M] <sup>+</sup> |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| wt (Sos929-944) | FFGIYLTNILKTEEGN  | 1900.1                          | 1900.2                          |
| 1               | FEGIYRTDILRTEEGN  | 1954.1                          | 1955.1                          |
| HBS 1           | FEGIYRTDILRTEEGN  | 2006.1                          | 1003.7                          |
| 2               | FGEGIYRTDILRTEEGN | 2011.1                          | 2012.1                          |

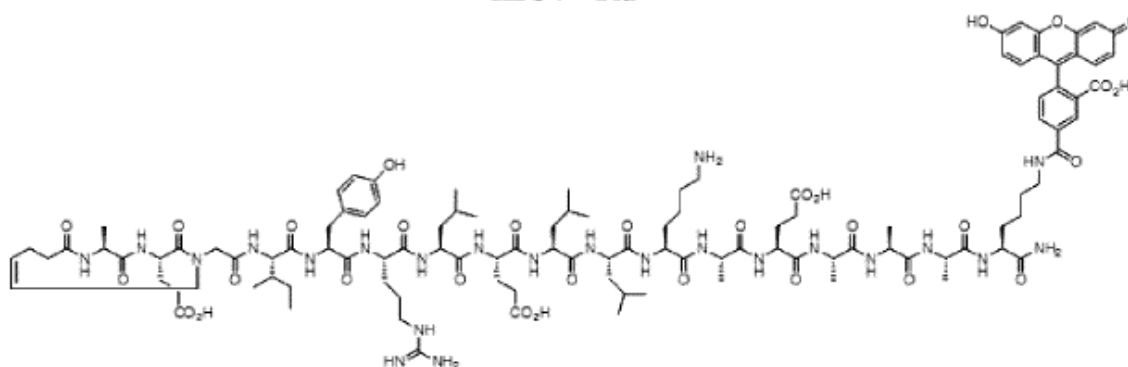
| Nombre   | Secuencia           | Masa calculada [M] <sup>+</sup> | Masa observada [M] <sup>+</sup> |
|----------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 3        | AEGYRTDILRTEEGN     | 1878.0                          | 1878.1                          |
| 4        | AEGYRADILRTEEGN     | 1847.9                          | 924.9*                          |
| 5        | FEGYRTDILR          | 1423.6                          | 1423.3                          |
| 6        | FEGYRTELLKAEEN      | 1924.1                          | 1924.1                          |
| HBS 6    | FEGYRTELLKAEEN      | 1976.1                          | 1978.2                          |
| 7        | FEGYRLELLKAEEN      | 1936.1                          | 968.7                           |
| HBS 7    | FEGYRLELLKAEEN      | 1988.2                          | 1989.9                          |
| HBS 7mut | AEGYRLELLKAEAAA     | 1811.0                          | 1813.3                          |
| 8        | FEGYRLELLK          | 1422.6                          | 711.6*                          |
| HBS 8    | FEGYRLELLK          | 1473.7                          | 1474.9                          |
| 9        | FEGLRLWLRKAibEEAN   | 2014.3                          | 672.2**                         |
| HBS 9    | FEGLRLWLRKAibEEAN   | 2052.3                          | 684.9**                         |
| 10       | FEGLRLWLRKAibEEAibN | 2014.3                          | 672.4**                         |
| HBS 10   | FEGLRLWLRKAibEEAibN | 2066.4                          | 689.7**                         |
| 11       | FEGYRLELLKAibEEAibN | 1964.2                          | 1965.1                          |
| HBS 11   | FEGYRLELLKAibEEAibN | 2016.2                          | 1009.1*                         |
| 12       | FEGLRLWLRKAEEN      | 1986.2                          | 993.4*                          |
| HBS 12   | FEGLRLWLRKAEEN      | 2038.3                          | 1019.5*                         |
| 13       | FEAIYRLELLKAEEN     | 1950.1                          | 975.6*                          |
| HBS 13   | FEAIYRLELLKAEEN     | 2001.2                          | 2003.0                          |
| 15       | FEAIYRLEKLKAEEN     | 1965.2                          | 1966.1                          |
| HBS 15   | FEAIYRLEK#LKAE#EAN  | 1999.2                          | 2000.1                          |
| HBS 16   | FEGYRLEKLKAEENRR    | 2343.6                          | 2346.0                          |

En la Tabla 2, # representa un puente de lactama entre los residuos de lisina y ácido glutámico. \* representa [M]<sup>2+</sup> y representa \*\* [M]<sup>3+</sup>.

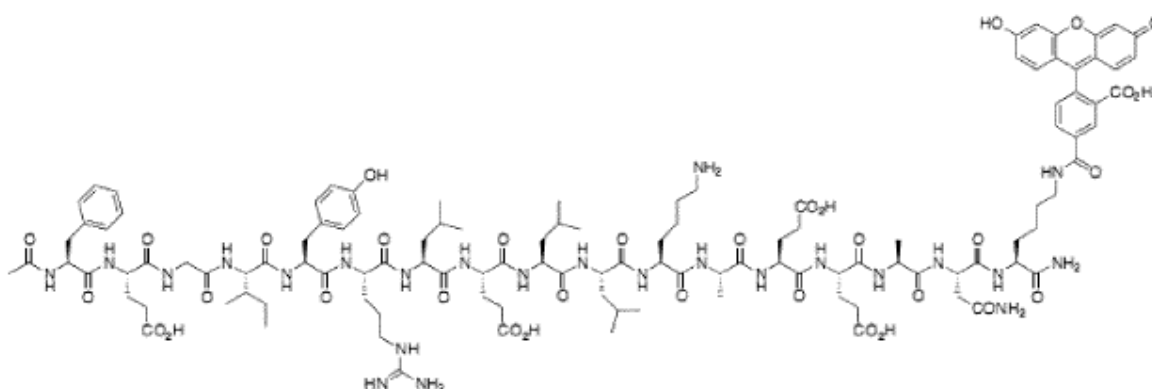
- 5 También se prepararon versiones fluoresceinadas de péptidos HBS de ejemplo de la invención y se muestran adelante:



**HBS 7 – Flu**



**HBS 7<sup>mut</sup> – Flu**

HBS 7<sup>uncon</sup> - Flu

## Ejemplo 2 - Espectroscopía de dicroísmo circular

- 5 Los espectros de CD mostrados en la Figura 9 se registraron sobre un espectrómetro de CD AVIV 202SF equipado con un controlador de temperatura utilizando células de 1 mm de longitud y una velocidad de barrido de 5 nm/min. Los espectros se promediaron sobre 10 exploraciones con el valor de referencia se resta de condiciones análogas como aquellas para las muestras. Las muestras se prepararon en solución salina regulada con fosfato 0.1 x (NaCl 13.7 mM, fosfato 1 mM, KCl 0.27 mM, pH 7.4), que contiene trifluoroetanol al 10%, con la concentración de péptido
- 10 final de 50 a 100 μM. Las concentraciones de péptidos no plegados se determinaron mediante absorción UV del residuo de tirosina en 276 nm en solución acuosa de clorhidrato de guanidinio 6.0 M. Se determinó el contenido de hélice de cada péptido desde el CD de residuo promedio a 222 nm,  $[\theta]_{222}$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) corregido para el número de aminoácidos. La helicidad porcentual se calcula a partir de la relación  $[\theta]_{222}/[\theta]_{\max}$ , donde  $[\theta]_{\max} = (-44000 + 250T)$  (1-k/n), con k = 4.0 y n = número de residuos. Para más detalles sobre los cálculos  $\theta_{\max}$  para hélices de HBS, véase Wang et al., "Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate," J. Am. Chem. Soc. 128:9248-56 (2006).

## Ejemplo 3 - Afinidad de péptidos para proteína Ras según se determina por polarización de fluorescencia.

- 20 La afinidad relativa de péptidos para Ras<sub>1-166</sub> etiquetados-His<sub>6</sub> de terminal N se determinó utilizando un ensayo de unión con base en la polarización de fluorescencia con péptidos SOS marcados con fluoresceína 7<sup>uncon</sup>-Flu, HBS 7-Flu y HBS 7<sup>mut</sup>-Flu. Los experimentos de polarización se realizaron con un Detector Multimodo DTX 880 (Beckman) a 25°C, con longitudes de onda de excitación y emisión a 485 y 525 nm, respectivamente. Todas las muestras se prepararon en placas de 96 pozos en Pluronic F-68 al 0.1% (Sigma). La adición de una concentración creciente (0
- 25 nm a 750 μM) de la proteína Ras<sub>1-166</sub> a una solución 15 nM de péptido SOS marcado con fluoresceína en regulador de diálisis Ras<sub>1-166</sub> proporcionó la curva de unión por saturación. El valor IC<sub>50</sub> obtenido a partir de esta curva de unión se encaja en la ecuación (1) para calcular la constante de disociación (K<sub>D</sub>) para el complejo de Sos/Ras<sub>1-166</sub>. Los valores de afinidad de unión (K<sub>D</sub>) informados para cada péptido son los promedios de 3 experimentos individuales, y se determinaron al ajustar los datos experimentales a un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoideal sobre GraphPad Prism 4.0. Los resultados se muestran en la Figura 10.

$$K_{D1} = (R_T * (1 - F_{SB}) + L_{ST} * F_{SB}^2) / (F_{SB} - L_{ST}) \quad (1)$$

donde:

- 35  $R_T$  = concentración total de proteína Ras<sub>1-166</sub>
- $L_{ST}$  = concentración total de péptido fluorescente Sos
- 40  $F_{SB}$  = Fracción de péptido fluorescente Sos unido

## Ejemplo 4 - Ensayo para inhibición de la actividad de intercambio de nucleótido de guanina mediado por Sos por los péptidos de la invención.

- 45 Se realizaron ensayos de intercambio de nucleótidos utilizando mantGDP como se describe por Ahmadian et al., 2002; y Margarit et al., 2003. Brevemente, el Ras purificado(residuos 1-166 de humano Ha-Ras) se incubó en una cantidad equimolar de mantGDP en presencia de EDTA 4 mM en regulador de intercambio (Tris 20 mM [pH 7.4], NaCl 50 mM). Las reacciones se detuvieron con MgCl<sub>2</sub> 14 mM. Se midieron las velocidades de disociación de nucleótidos por incubación de Ras • mantGDP 1 μM en regulador de reacción (Tris 20 mM [pH 7.4], MgCl<sub>2</sub> 14 mM, y NaCl 50 mM) suplementado con péptidos 25 μM, SOS Cat 5 μM y GDP no marcado 100 μM. Los datos se ajustaron

a una sola función de decaimiento exponencial utilizando el programa Prism (GraphPad Software Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 5 - Ensayos de GST para inhibición de Ras/Sos por péptidos de la invención.

La proteína de fusión GST-Ras (1  $\mu$ M), proteína Sos etiquetada His (1  $\mu$ M) y la cantidad indicada de HBS 7 se agregaron a 1 ml de regulador de unión (Tris 20 mM (pH 7.6), NaCl 50 mM, ditiotritol 1 mM, EDTA 5 mM, y Triton X-100 al 1%) y se incubaron a 4°C durante 30 min. Después de incubación, se agregaron 60  $\mu$ l de suspensión 1:1 perlas de glutatión-Sepharose 4B resuspendidas en regulador de unión a cada muestra. Las muestras se incubaron durante 20 minutos adicionales a 4°C. Las perlas se sedimentaron posteriormente, se lavaron cinco veces con regulador de unión, y se resuspendieron en regulador de muestra de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias Western se sondaron con anticuerpo anti-His y anticuerpo anti-GST para detectar Sos y Ras, respectivamente, y los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 6 - Ensayos de activación Ras.

El ensayo de RBD-pull down se llevó a cabo como se describe en Boykevich S, Zhao C, Sondermann H, Philippidou P, Haleboua S, Kuriyan J, Bar-Sagi D. Regulation of ras signaling dynamics by Sos-mediated positive feedback Curr Biol. 2006 Nov 7;16(21):2173-9 y como se describe aquí. Las proteínas de fusión GST-Raf-RBD se expresaron en E. coli mediante inducción con 0.5 mM de isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) durante 5 horas. Las proteínas de fusión expresadas se aislaron a partir de lisados de bacterias mediante incubación con perlas de agarosa glutatión durante 1 hora a 4°C. Se cultivaron células HeLa hasta confluencia, se privaron de suero durante 4 horas, y se incubaron con péptido 75  $\mu$ M durante 12 horas adicionales. Para los experimentos con SosCat-CAAX (SosCat con caja CAAX de HRas), las células HeLa fueron transfectadas con SosCAAX HA-etiquetados veinticuatro horas antes de inanición. Las células fueron tratadas con los péptidos indicados durante 12 horas antes de estimulación. Después de estimulación con 10 ng/ml de EGF para los intervalos indicados a 37°C, las células se lisaron en regulador de lisis RBD que contiene Tris-HCl 25 mM (pH 7.4), NaCl 120 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, 10 mg/ml de pepstatina, NaF 50 mM, aprotinina al 1%, 10 mg/ml de leupeptina, Na3VO4 1 mM, benzamidina 10 mM, 10 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja, NP40 al 1, y ácido desoxicolico de sodio al 0.25%. Los lisados se incubaron con 20  $\mu$ g de GST-Raf-RBD recombinante inmovilizado a perlas de agarosa durante 1.5 horas a 4°C. Los complejos se recogieron mediante centrifugación y se lavaron seis veces con el regulador de lisis RBD. Las proteínas unidas se eluyeron con regulador de muestra SDS, se separaron mediante SDS-12.5% PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se detectaron por transferencia con anti-HA (12CA5; 1:10.000) para anticuerpos primarios SosCatCAAX o anti-Ras10 (Millipore; 1:10000) y anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor 680 (Molecular Probes, 1:10.000) y se visualizaron con el Sistema de Formación de Imágenes de Infrarrojos Odyssey (LiCor). Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 7 - Ensayos de activación EGFR y ERK.

Las rutas de transducción de señales de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) son mecanismos generalizados de regulación de las células eucariotas (Figura 6). La MAPK está implicada en el control de actividades que incluyen metabolismo, motilidad, supervivencia, apoptosis, y diferenciación celular. La activación de Ras por Sos está estrechamente ligada a la apertura de esta ruta de señalización, que en última instancia conduce a la expresión de una variedad de genes, que incluyen aquellos controlados por el elemento de respuesta a suero dentro del promotor IEG (gen inmediato temprano). Los péptidos se probaron en un ensayo para determinar su capacidad para inhibir la activación de ERK y/o EGFR. Las células se trataron y se lisaron como se describió anteriormente, y como se describe en Boykevich S, Zhao C, Sondermann H, Philippidou P, Haleboua S, Kuriyan J, Bar-Sagi D. Regulation of ras signaling dynamics by Sos-mediated positive feedback Curr Biol. 2006 Nov 7;16(21):2173-9, and Xu L, Lubkov V, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Feedback regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination. Curr Biol. 2010 Aug 10;20(15):1372-7. Se detectaron niveles de ERK2 total y ERK fosforilados con anti-ERK2 (Upstate Biotechnology, 1:1.000) y anticuerpos fosfo-ERK1/2 (Cell Signaling, 1:1.000), respectivamente. Los niveles de fosforilación de ERK se cuantificaron con el software Odyssey y se normalizaron a la expresión de ERK total. Los niveles de EGFR y pEGFR se detectaron por transferencia con anticuerpos anti-EGFR (Santa Cruz Biotech) y pEGFR pY1068 (Cell Signaling). Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 8- Ensayos de absorción celular.

Las células HeLa se cultivaron en placas a sub-confluencia en DMEM suplementado con FBS al 10% en una placa de 96 pozos con fondo de vidrio. Al día siguiente, los medios se reemplazaron con unos suplementados con fluoresceína 1  $\mu$ M (5-FAM), solos o péptidos etiquetados con fluoresceína como se indica. Después de 12 horas, las células se lavaron dos veces con PBS caliente y se formó imagen directamente con el microscopio Zeiss Axiovert 200M.

Ejemplo 9- Experimentos de RMN.

Expresión de His6-Ras (1-166) y Sos-Cat (564 a 1049). Los HRas etiquetados con His6 (residuos 1-166) y SosCat etiquetados con His6 (residuos 550-1050), ambos en vectores de expresión pProEX HTB, se expresaron en *Escherichia coli* (BL21) por inducción con IPTG 500  $\mu$ M a una densidad celular que corresponde a una absorbancia de OD600 = 1.0. Los sedimentos se resuspendieron en regulador que contenía Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, fenilmetilsulfonilflururo 2 mM (PMSF), aprotinina al 1%, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina, benzamidina 10 mM, 10  $\mu$ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, y 10  $\mu$ g/ml de pepstatina, y se sometió a sonicación utilizando un disruptor celular Branson 200. Los lisados clarificados que contienen proteínas etiquetadas con polihistidina se incubaron con resina de níquel cargado (Invitrogen) a 4°C durante 1 hora. La resina se lavó cinco veces en regulador de resuspensión que contiene imidazol 50 mM. Las proteínas marcadas se eluyeron con regulador que contenía imidazol 200 mM en Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 200 mM. Las proteínas eluidas se dializaron contra regulador que contenía Tris 20 mM pH 7.6 y NaCl 200 mM para SosCat etiquetada con His, y Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 200 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM para Ras etiquetado con His. Las proteínas eluidas se concentraron con 5.000 kD en columnas de ultra centrifugas Amicon de corte molecular (Millipore). Las proteínas purificadas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta uso posterior.

Para los experimentos de RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, las células BL21 que albergan la construcción His-Ras se cultivaron a 37°C en medio M9 suplementado con <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl como la única fuente de nitrógeno<sup>15</sup>. La producción de proteínas se indujo con IPTG 500  $\mu$ M a O.D. 1.0 durante 16 horas a 16°C. La purificación de proteínas y la concentración se realizaron como en la sección 5. La His6-tag se separó al incubar las Ras etiquetadas con His6 con Virus del grabado del tabaco etiquetado con His6 recombinante (TEV) de la proteasa (Invitrogen) durante la noche a 4°C siguiendo el protocolo del fabricante. La muestra se cargó en una columna de NiNTA agarosa cargada y la proteína tag-menos recogida en el flujo a través de fracción. El Ras uniformemente marcado con <sup>15</sup>N se intercambió con regulador contra el regulador RMN (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 5.5, NaCl 150 mM, MgCl 10 mM) utilizando filtro centrífugo Amicon Ultra (Millipore) y suplementado con D<sub>2</sub>O al 10%. Los datos se recogieron en un sistema de RMN de cuatro canales Bruker 900 MHz equipado con criosonda a 30°C y se analizaron con el software BioSpin (Bruker). Se calculó la diferencia promedio del desplazamiento químico ( $\Delta\delta$ NH) observada para núcleos <sup>1</sup>H y <sup>15</sup>N de varias resonancias correspondientes a los residuos en las regiones de cambio y no cambio. Los resultados de experimentos de RMN se muestran en la Figura 5.

#### Ejemplo 10 – Diseño de Péptido

Se realizó diseño de inhibidores de Ras/Sos a partir de la secuencia  $\alpha$ -H Sos<sub>929-944</sub> de tipo silvestre. Se introdujeron modificaciones adicionales con el fin de mejorar la solubilidad de los péptidos de HBS. Los residuos cargados se introdujeron en posiciones que no participan en la unión a Ras. Se realizó barrido de alanina computacional en dos estructuras separadas de cristal (códigos PDB: 1NVW y 1BKD) del complejo Ras/Sos para determinar otros residuos de unión importantes de la hélice  $\alpha$ -H que se pueden incorporar en los imitadores de péptidos. Adicionalmente, los residuos no esenciales  $\beta$ -ramificados (que incluyen treonina) en la secuencia  $\alpha$ -H de tipo silvestre se reemplazaron por residuos adecuados para proporcionar péptidos con mayor contenido helicoidal (Tabla 1), como se planteó la hipótesis de que dichas modificaciones mejorarían la  $\alpha$ -helicidad.

## Reivindicaciones

1. Un péptido que comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia los aminoácidos 929-944 de la hélice  $\alpha$ H de Sos, y en donde el péptido no comprende la secuencia FEGYRLELLKAEEN.

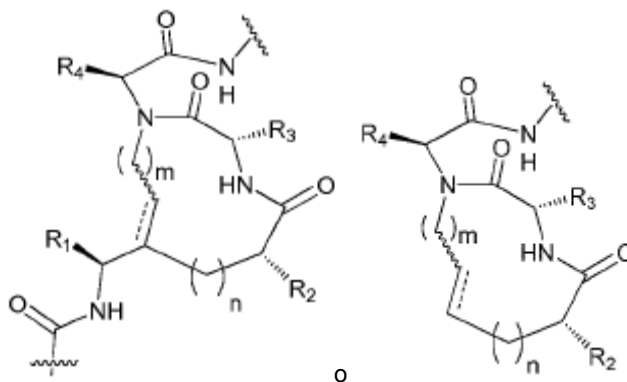
2. Un péptido para uso en un método terapéutico para inhibir la señalización Ras en una célula, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice  $\alpha$ H de Sos.

3. Un péptido para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, dicho péptido comprende: (i) la secuencia FEGYRTDILRTEEGN, (ii) la secuencia FEGYRTELLKAEEN, (iii) la secuencia FEAYRLEKLKAEEN, (iv) la secuencia FEGYRLEKLKAEENRR, o (v) una secuencia de la fórmula FXGZZXZXZXZEXXN donde X es cualquier residuo de aminoácidos y Z es un residuo hidrófobo, el péptido tiene una hélice alfa, internamente limitada, estable, en donde dicha hélice alfa se limita por un entrecruzamiento formado por una reacción que forma enlace carbono a carbono, y adicionalmente en donde el péptido copia por lo menos una porción de la hélice  $\alpha$ H de Sos.

4. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en donde el péptido copia los aminoácidos 929-944 de la hélice  $\alpha$ H de Sos.

5. El péptido de la reivindicación 1 o el péptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el péptido tiene una hélice alfa internamente limitada que abarca los residuos 1 a 4 de la secuencia de aminoácidos.

6. El péptido de la reivindicación 1 o reivindicación 5, o el péptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el péptido comprende la fórmula:



donde

— es un enlace carbono a carbono sencillo o doble;

~~~~ es un enlace sencillo y es cis o trans cuando — es un enlace doble;

n es 1 o 2;

m es cero o cualquier entero positivo;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, un grupo alquilo, o un grupo arilo.

7. El péptido o el péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde m es 1.

8. El péptido o el péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde m es 2.

9. El péptido o el péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde n es 1.

5 10. El péptido o el péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde n es 2.

11. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicaciones 5 a 10, o el péptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

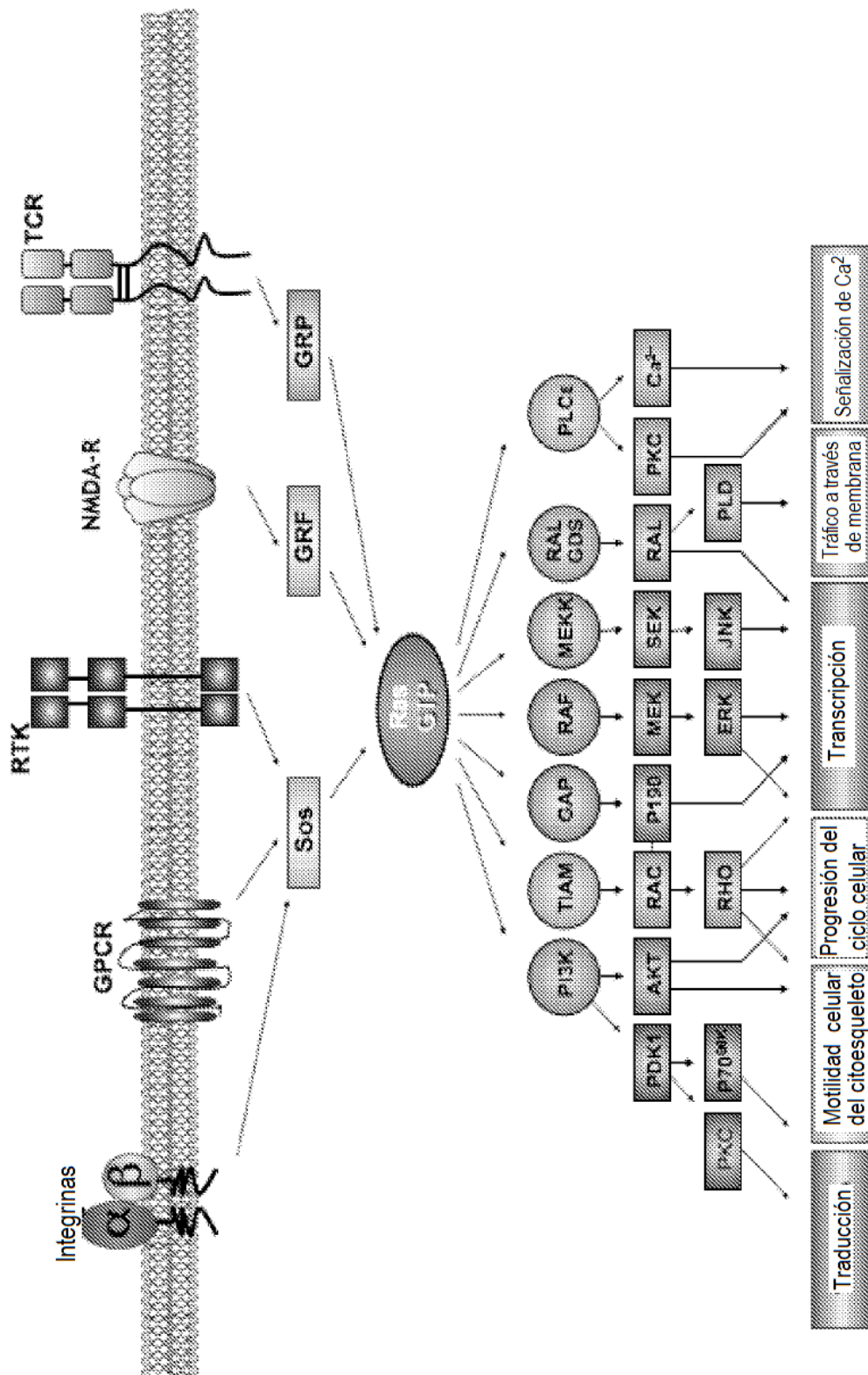


FIG. 1

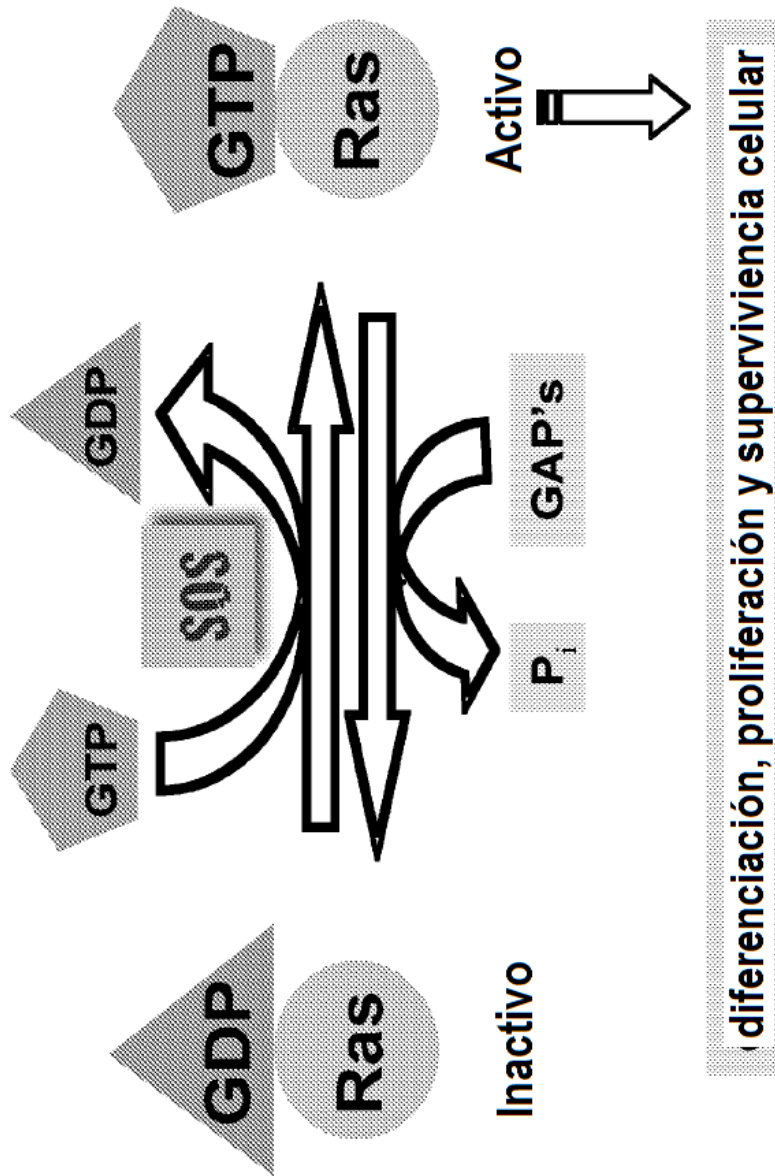


FIG. 2

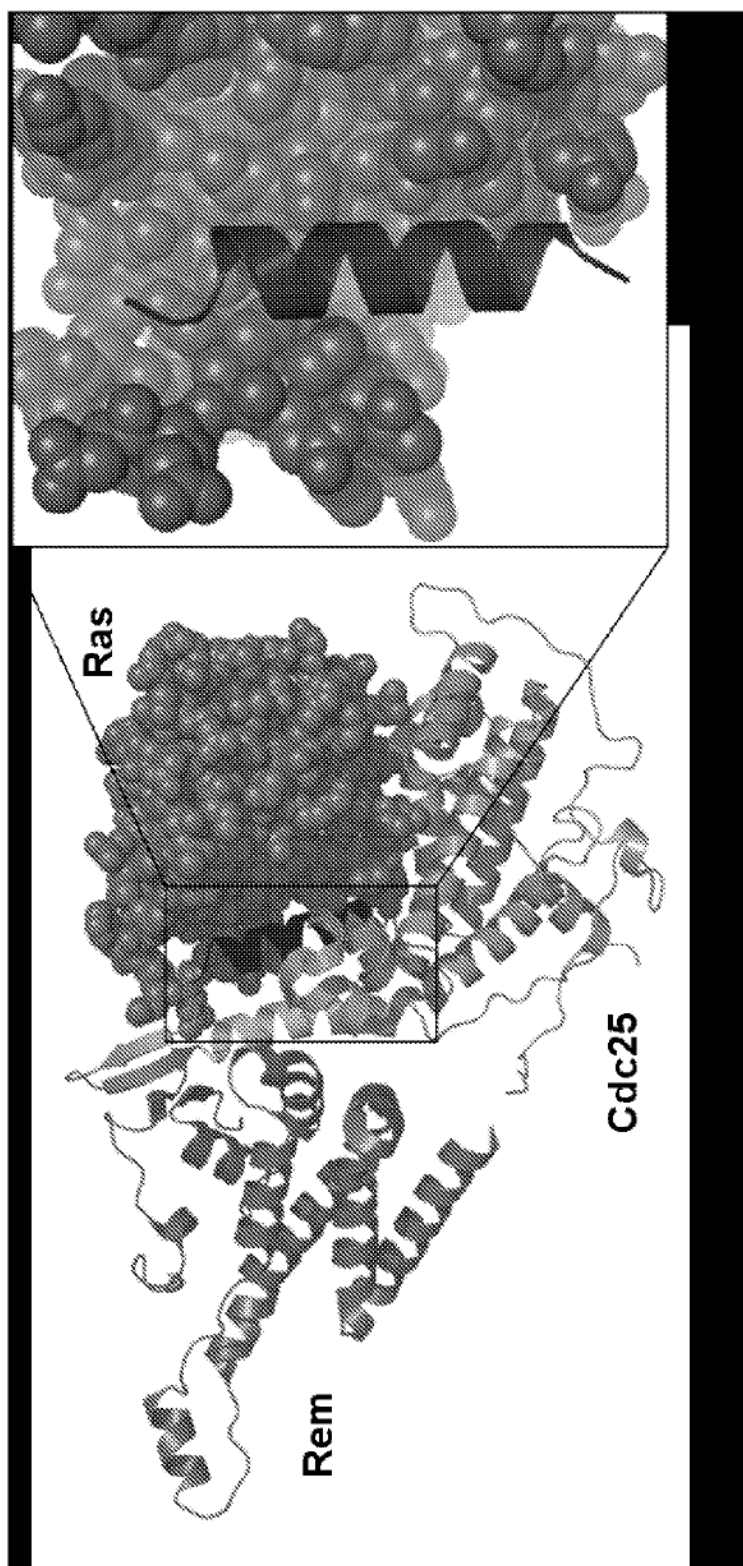


FIG. 3

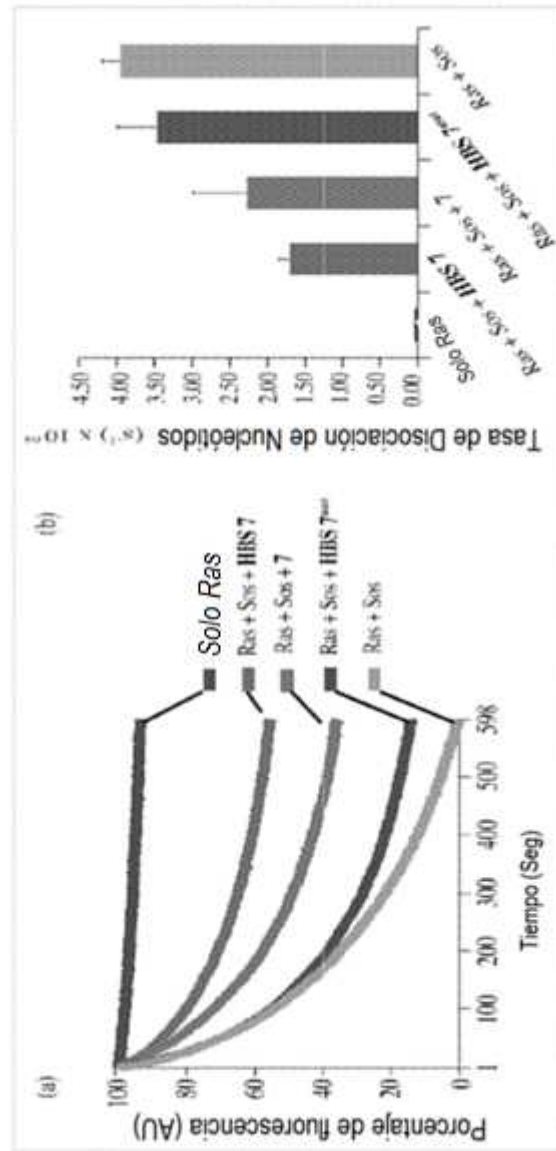


FIG. 4

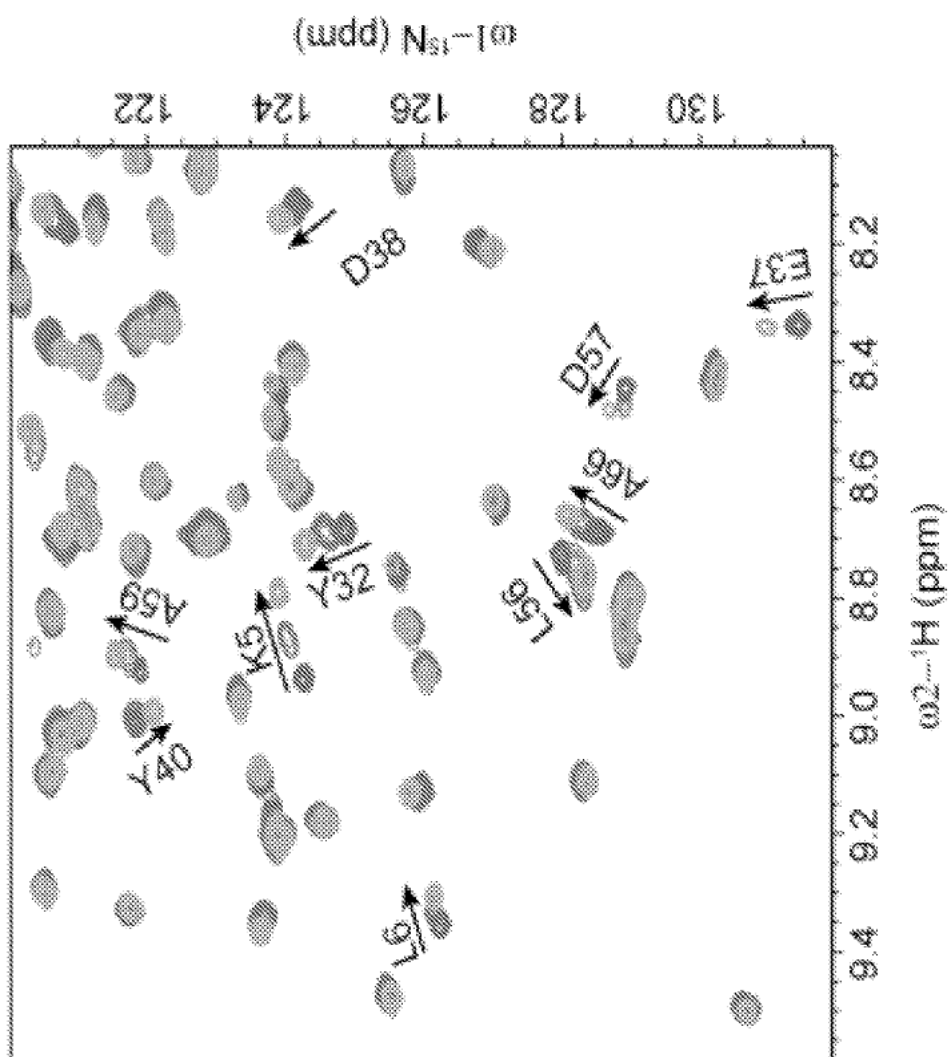


FIG. 5A

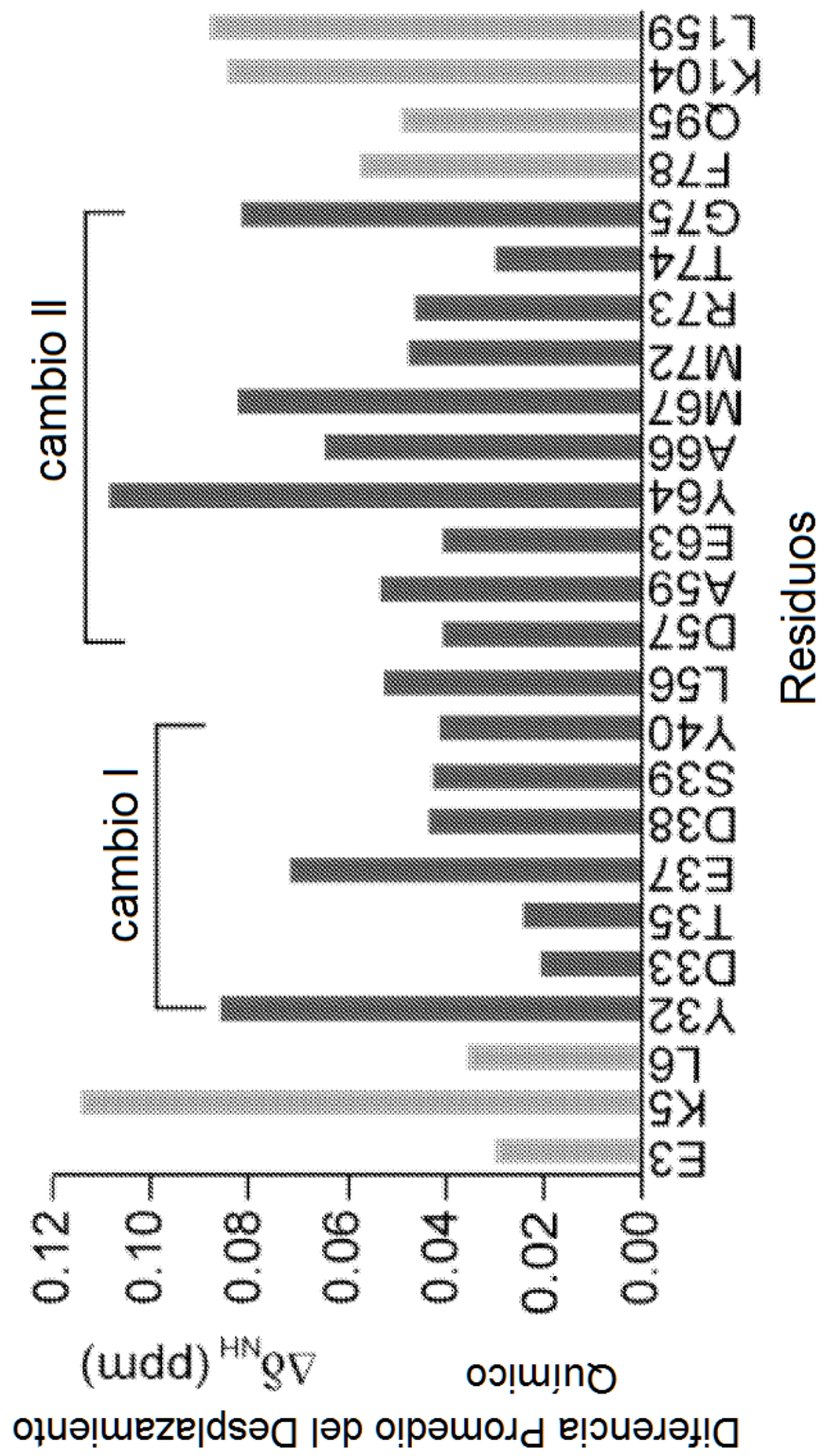


FIG. 5B

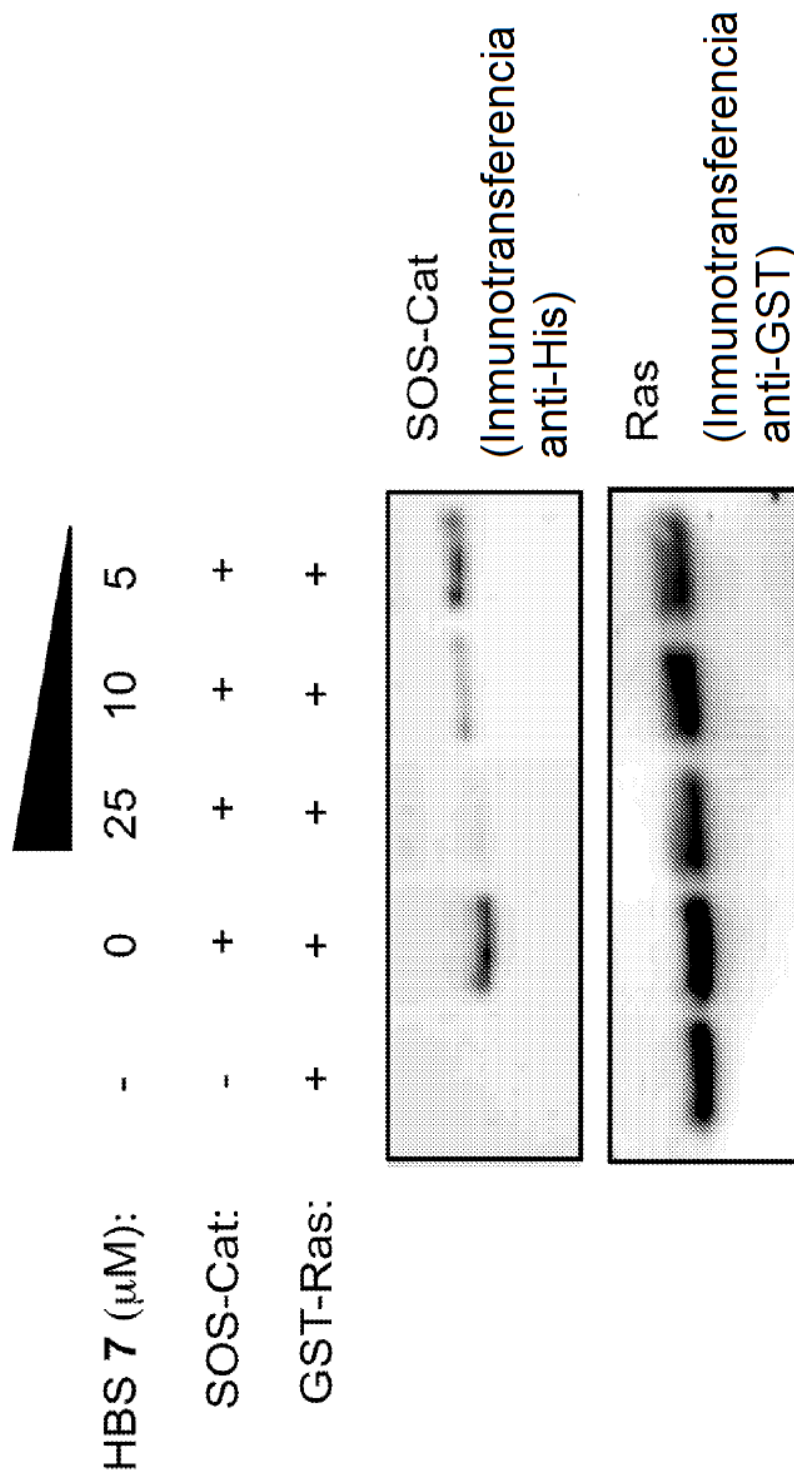


FIG. 6

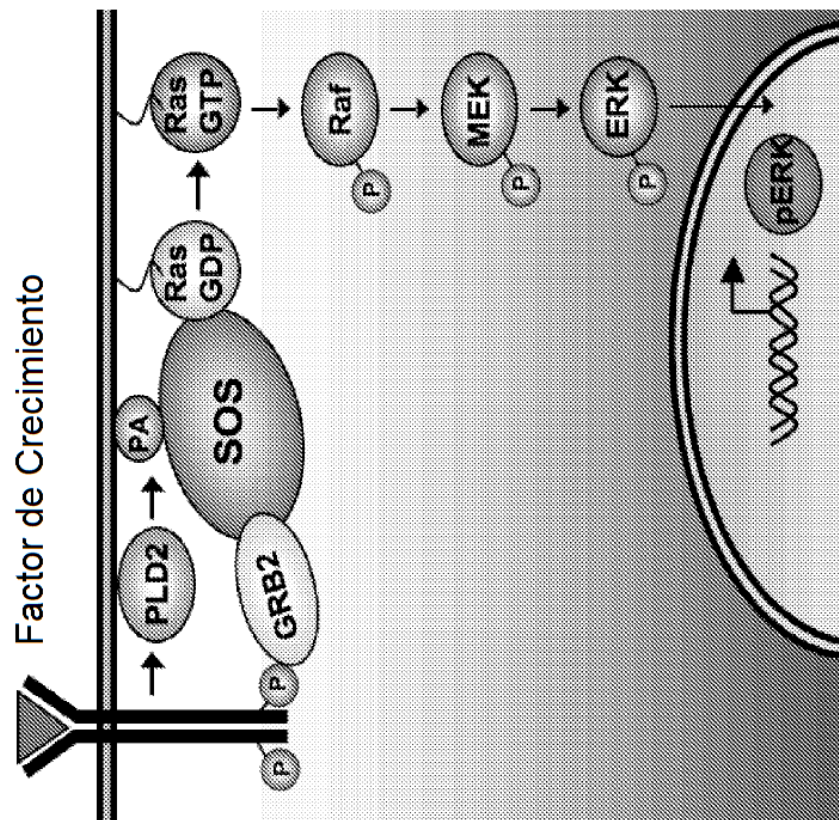


FIG. 7

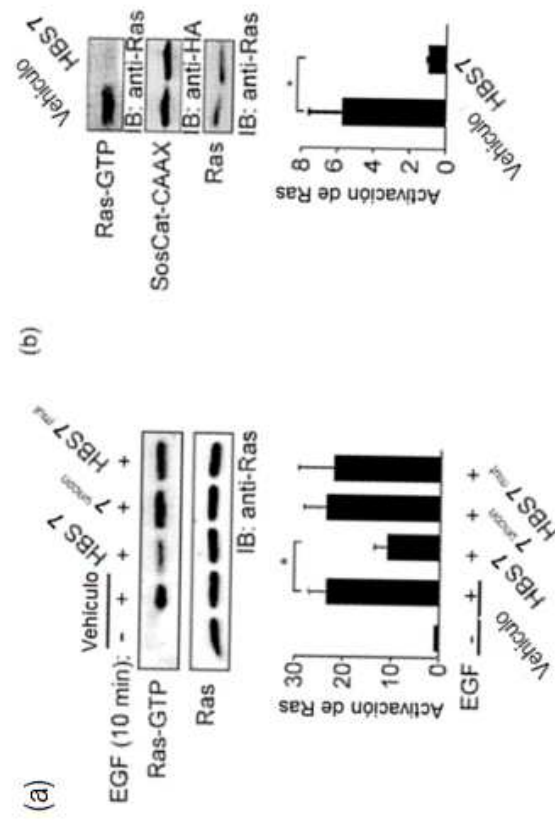


FIG. 8

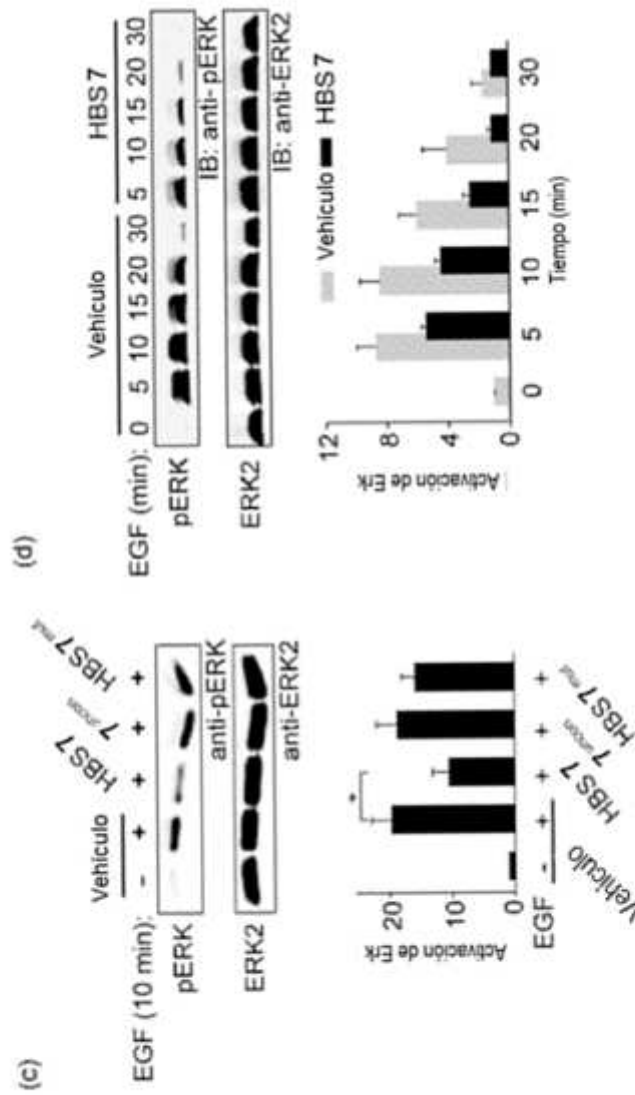
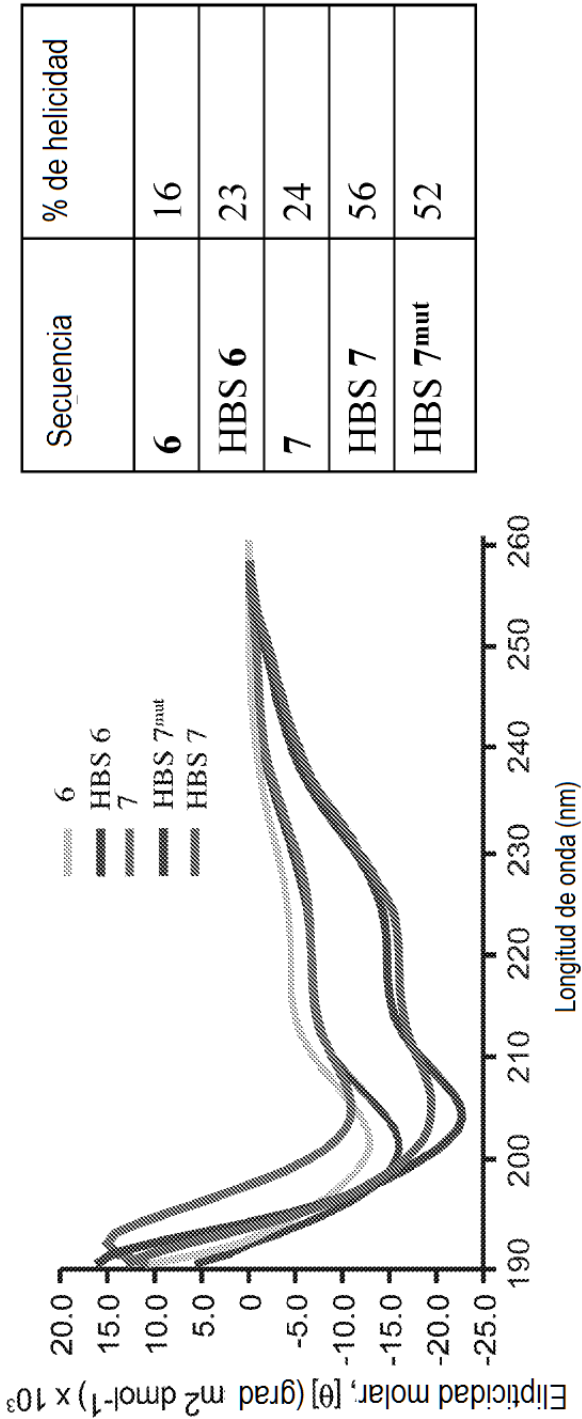


FIG. 8 (cont.)



10% de TFE en regulador de solución salina con fosfato, pH 7.4

FIG. 9

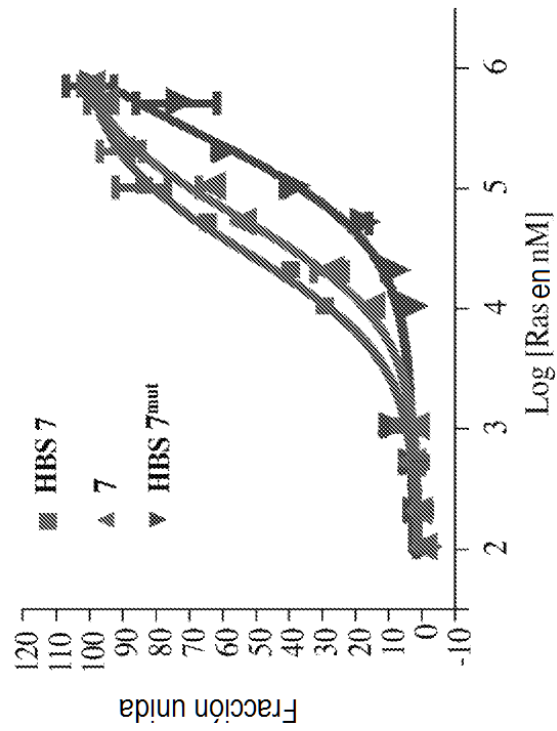


FIG. 10

| Secuencia | K _d (μM) |
|----------------------|---------------------|
| 7 | 57 ± 5.0 |
| HBS 7 | 28 ± 4.8 |
| HBS 7 ^{mut} | 273 ± 8.5 |

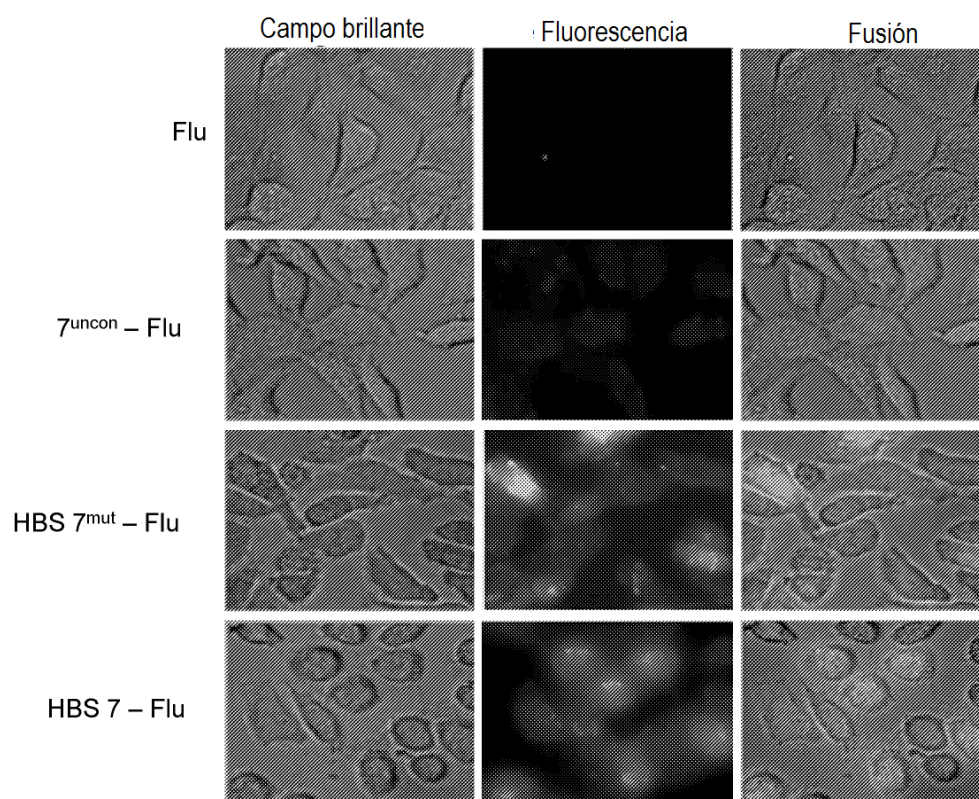
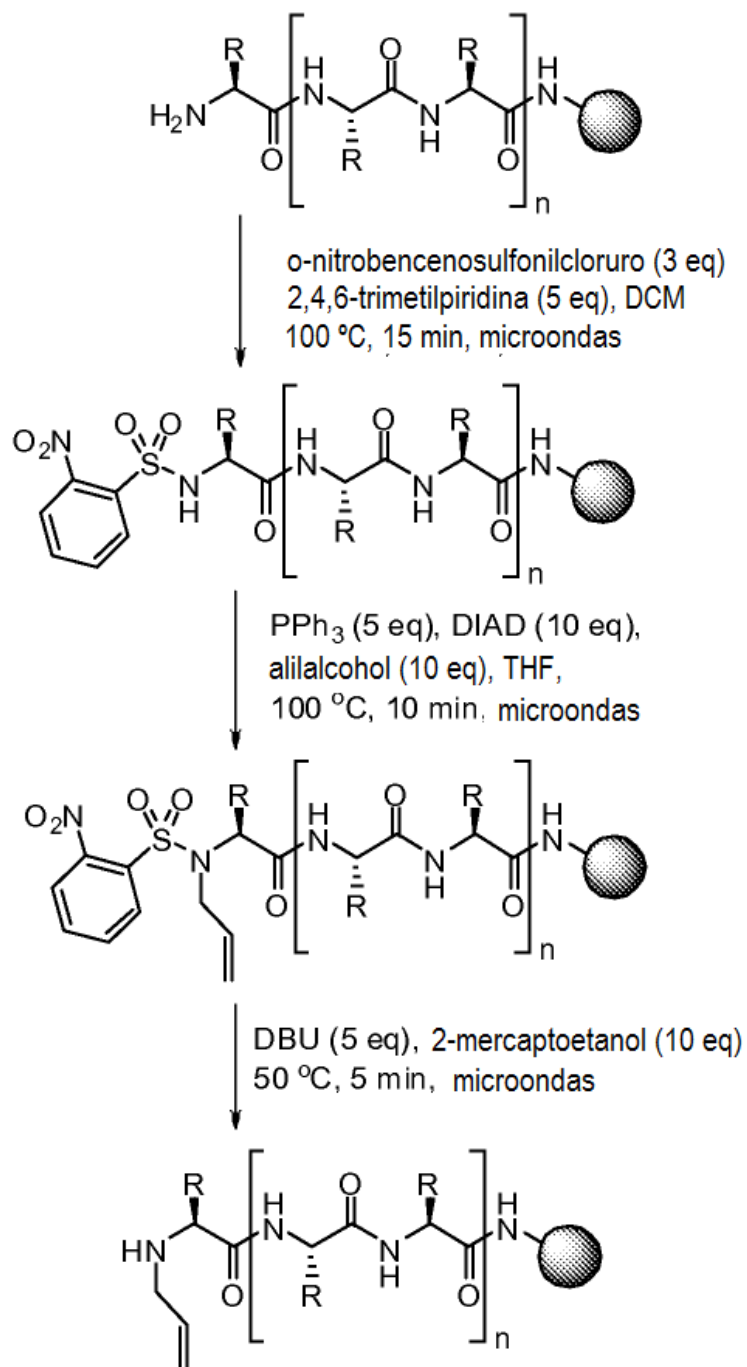


FIG. 11

**FIG. 12**

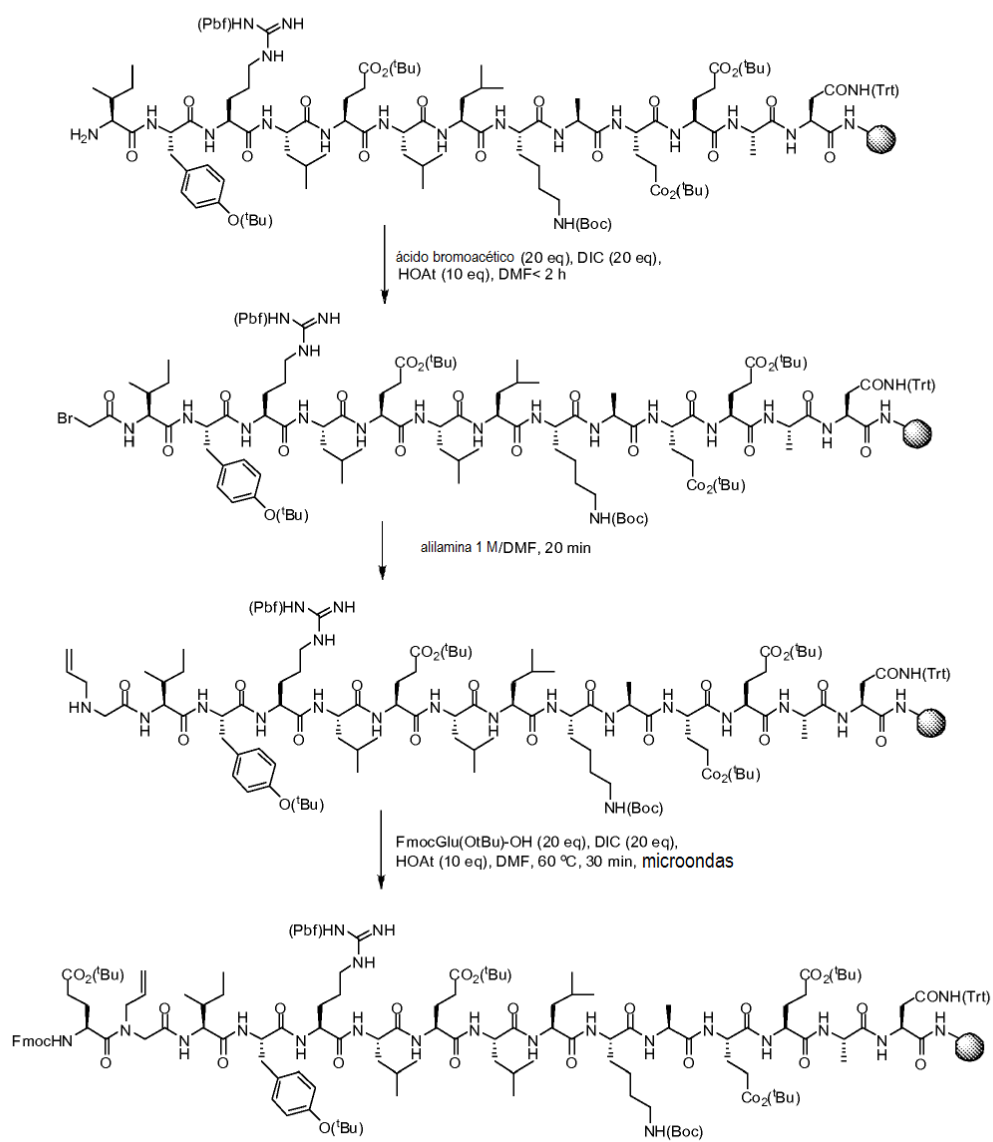


FIG. 13

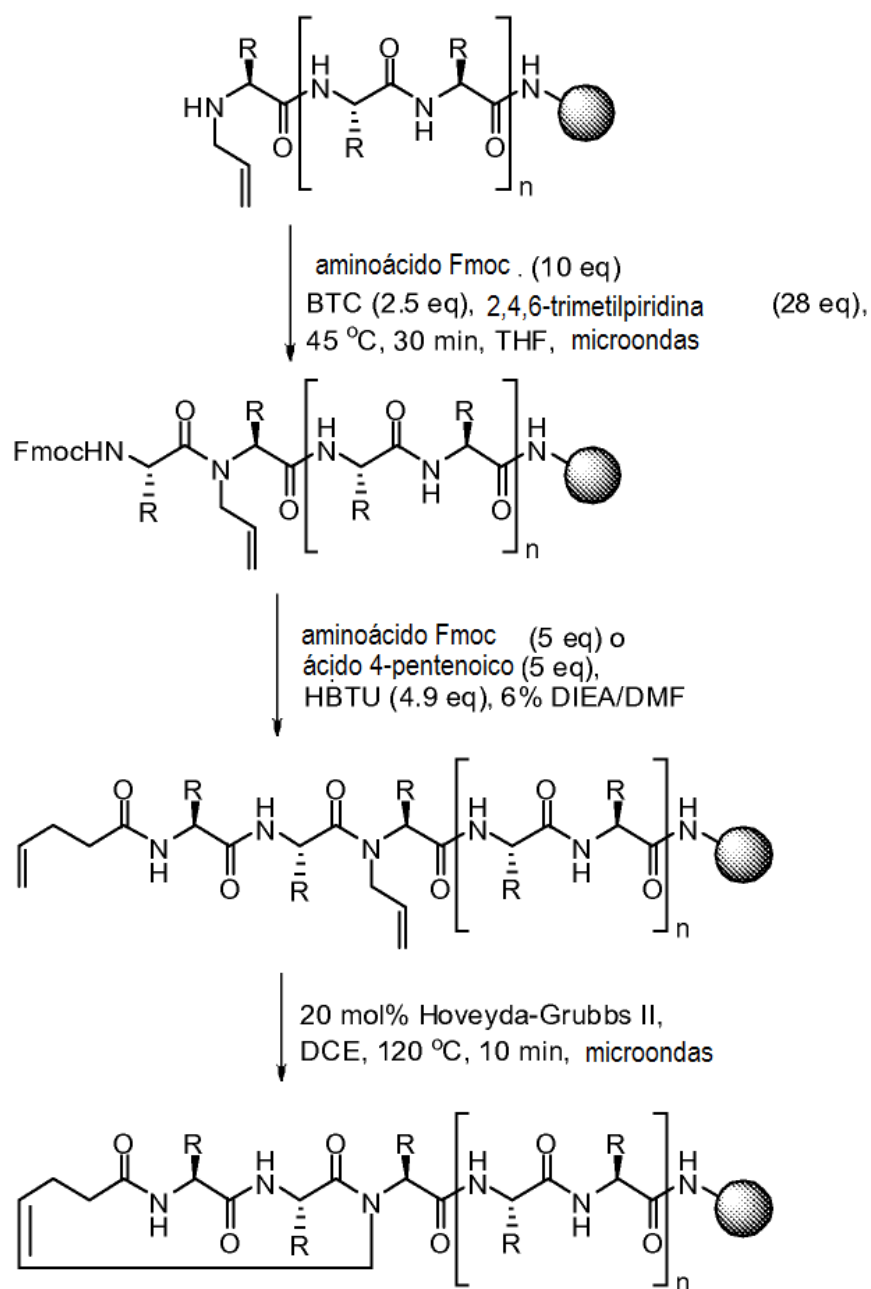


FIG. 14

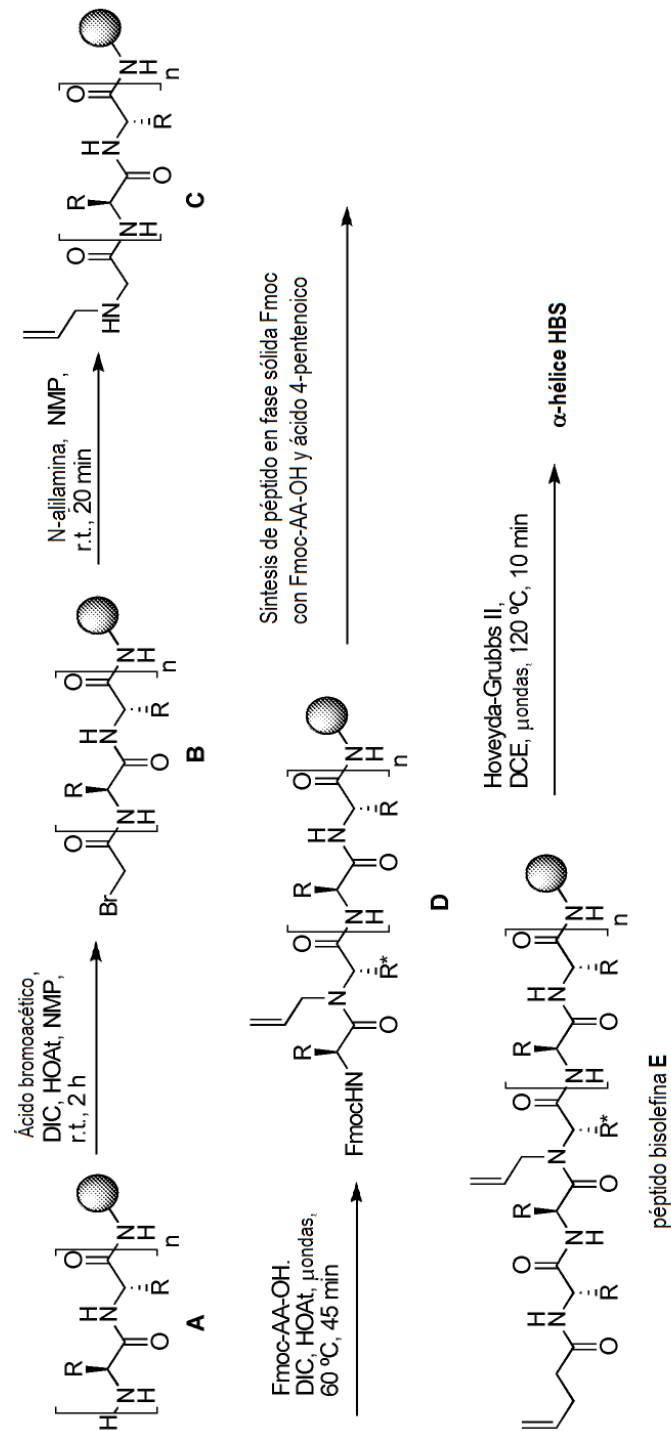


FIG. 15