

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 941**

51 Int. Cl.:

C07C 271/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2008** **E 12174832 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2564862**

54 Título: **Aminoácidos sustituidos para preparar péptidos macrocíclicos unidos a triazol**

30 Prioridad:

23.02.2007 US 903073 P

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

16.01.2018

73 Titular/es:

AILERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
281 Albany Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

NASH, HUW

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 941 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).

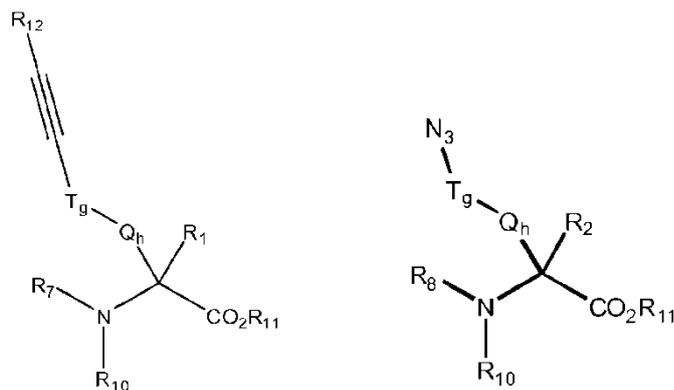
DESCRIPCIÓN

Aminoácidos sustituidos para preparar péptidos macrocíclicos unidos a triazol

Antecedentes de la invención

5 Los péptidos son cada vez más importantes en aplicaciones farmacéuticas. Los péptidos no modificados a menudo adolecen de poca estabilidad metabólica, poca penetración celular, y de unirse indiscriminadamente debido a su flexibilidad conformacional. Para mejorar estas propiedades, los investigadores han generado péptidos cíclicos y peptidomiméticos por distintos métodos, incluyendo formación de enlace disulfuro, formación de enlace amida, y formación de enlace carbono-carbono (Jackson *et al.* (1991), *J. Am. Chem. Soc.* 113:9391-9392; Phelan *et al.* (1997), *J. Am. Chem. Soc.* 119:455-460; WO 2005/044839 Taylor (2002), *Biopolymers* 66: 49-75; Brunel *et al.* (2005), *Chem. Commun.* (20):2552-2554; Hiroshige *et al.* (1995), *J. Am. Chem. Soc.* 117: 11590-11591; Blackwell *et al.* (1998), *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:3281-3284; Schafmeister *et al.* (2000), *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892). Roice *et al.* (2004) *QSAR Comb. Sci.* 23: 662-673, describen aminopolímeros basados en polietilenglicol de alta capacidad para la síntesis de péptidos y orgánica. Las limitaciones de estos métodos incluyen poca estabilidad metabólica (enlaces disulfuro y amida), poca penetrabilidad en las células (enlaces disulfuro y amida) y la utilización de metales potencialmente tóxicos (para la formación de enlaces carbono-carbono). Por lo tanto, existe una necesidad significativa de procedimientos mejorados para producir péptidos o peptidomiméticos que posean una mayor rigidez conformacional, estabilidad metabólica y penetrabilidad celular. La presente invención aborda estas y otras necesidades de la técnica. Brea *et al.*, *J. Org. Chem.*, 71, 7870-7873 (2006) describe aminoácidos sustitutos.

La invención proporciona un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



20

IIa

IIb,

en las que

R_1 y R_2 son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;

Q_h y T_g es cada uno independientemente alquileo,

25

R_7 y R_8 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

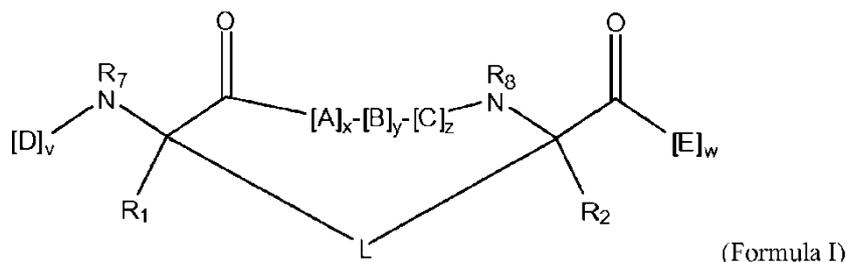
R_{10} y R_{11} son -H;

R_{12} es -H o alquilo; y

g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5.

30

En la presente memoria también se describen macrociclos peptidomiméticos de Fórmula I, en la que:



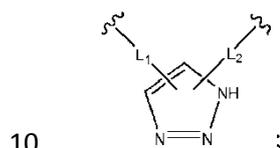
cada A, C, D y E es independientemente un aminoácido natural o no natural;

B es un aminoácido natural o no natural, , [-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-] o [-NH-L₃-];

5 R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituidos o sustituidos con halógeno;

R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R₅;

L es un elemento de unión que forma macrociclos de fórmula



L₁, L₂ y L₃ son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R₄-K-R₄]_n, pudiendo esta cada uno de ellos opcionalmente sustituido con R₅;

15 cada R₄ es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂ o CONR₃;

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

20 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo or heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

25 v es un número entero de 1 a 1000;

w es un número entero de 1 a 1000;

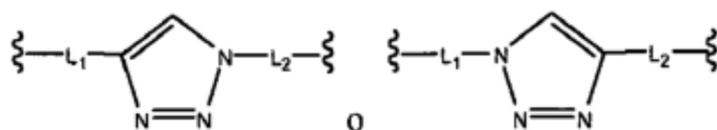
x es un número entero de 0 a 10;

y es un número entero de 0 a 10;

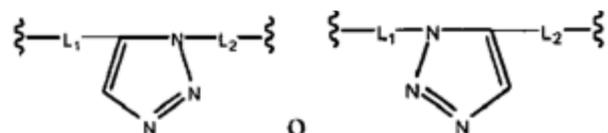
z es un número entero de 0 a 10; y

30 n es un número entero de 1 a 5.

L puede ser



L puede ser

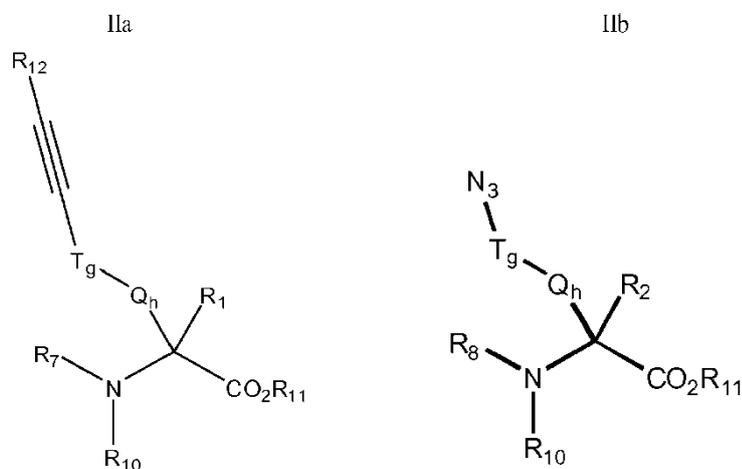


5 Al menos uno de R₁ y R₂ puede ser alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. R₁ y R₂ pueden ser independientemente alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo no sustituido o sustituido con halógeno. Por ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ puede ser alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. Ambos R₁ y R₂ pueden ser independientemente alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. Al menos uno de R₁ y R₂ puede ser metilo. Tanto R₁ como R₂ pueden ser metilo.

10 Al menos uno de D y E puede ser un aminoácido natural o no natural sustituido con un lípido o hidrocarburo de elevado peso molecular. Al menos uno de D y E puede estar unido a un elemento de unión que forma macrociclos adicional. Una estructura secundaria del macrociclo peptidomimético puede ser más estable que la correspondiente estructura secundaria del correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede comprender una hélice α. La hélice α puede comprender, por ejemplo, de 1 vuelta a 5 vueltas. La hélice α puede ser más estable que la hélice α del correspondiente polipéptido no macrocíclico. El elemento de unión que forma macrociclos puede abarcar, por ejemplo, de 1 vuelta a 5 vueltas de la hélice α, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 vueltas de la hélice α. La longitud del elemento de unión que forma macrociclos puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente 5 Å hasta aproximadamente 9 Å por vuelta de la hélice α. El elemento de unión que forma macrociclos puede abarcar aproximadamente 1 vuelta de la hélice α. La longitud del elemento de unión que forma macrociclos puede ser aproximadamente igual a la longitud de aproximadamente 6 enlaces carbono-carbono a aproximadamente 14 enlaces carbono-carbono, o puede ser igual a la longitud de aproximadamente 8 enlaces carbono-carbono hasta aproximadamente 12 enlaces carbono-carbono. El macrociclo puede comprender un anillo de aproximadamente 18 átomos a 26 átomos.

25 El elemento de unión que forma macrociclos puede abarcar aproximadamente 2 vueltas de la hélice α. La longitud del elemento de unión que forma macrociclos puede ser aproximadamente igual a la longitud de aproximadamente 8 enlaces carbono-carbono hasta aproximadamente 16 enlaces carbono-carbono, o puede ser aproximadamente igual a la longitud de aproximadamente 10 enlaces carbono-carbono hasta aproximadamente 13 enlaces carbono-carbono. El macrociclo puede comprender un anillo de aproximadamente 29 átomos a aproximadamente 37 átomos.

30 La invención proporciona, un aminoácido útil en la síntesis de macrociclos peptidomiméticos. En esta memoria se proporciona un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



IIa

IIb₁

en los que

R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;

Q_h y T_g es cada uno independientemente alquilenilo;

5 R₇ y R₈ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

R₁₀ y R₁₁ son -H;

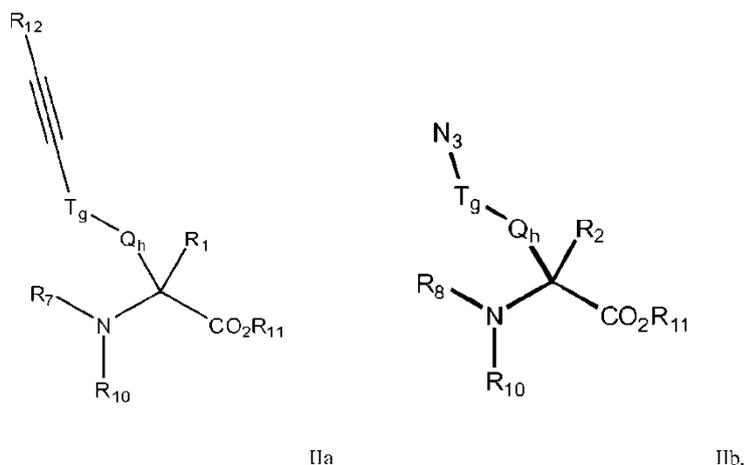
R₁₂ es -H o alquilo; y

g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5.

10 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIa y R₁ es alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. En otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIb y R₂ es alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. En aún otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIa y R₁ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₁ puede ser metilo. En aún otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIb y R₂ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₂ puede ser metilo. En otro aspecto la presente invención
15 proporciona además kits que comprenden compuestos de la invención u otros aminoácidos análogos útiles en la preparación de macrociclos peptidomiméticos de la invención junto con reactivos de formación de macrociclos como se describe en esta memoria.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende:

a) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de Fórmulas IIa y IIb:



20 en las que

R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;

cada Q_h y T_g es cada uno independientemente alquilenilo;

25 R₇ y R₈ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo or heterocicloalquilo;

R₁₀ y R₁₁ son -H;

R₁₂ es -H o alquilo; y

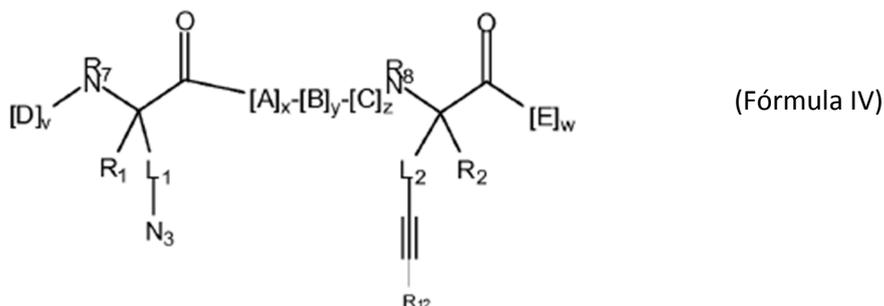
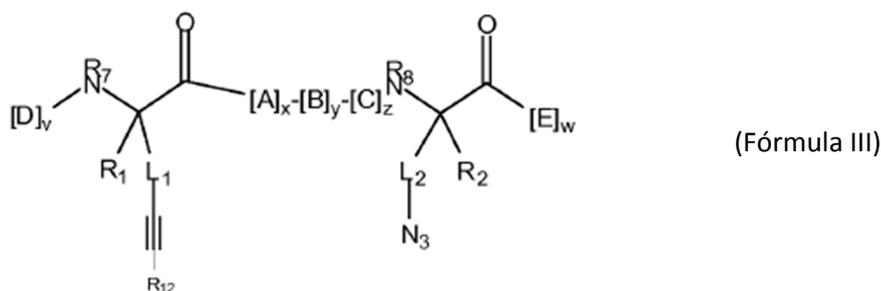
g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5; y

b) un reactivo de formación de macrociclos.

30 En algunas realizaciones, el kit comprende un compuesto de Fórmula IIa y R₁ es alquilo no sustituido o sustituido con halógeno. En realizaciones relacionadas, R₁ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₁ puede ser metilo. En otras realizaciones, el kit comprende un compuesto de Fórmula IIb y R₂ es alquilo no sustituido o sustituido con halógeno. En realizaciones relacionadas, R₂ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₂ puede ser metilo.

En algunas realizaciones, un kit comprende al menos un compuesto de Fórmula IIa y al menos un compuesto de Fórmula IIb. En realizaciones específicas del kit de la invención, el reactivo de formación de macrociclos es un reactivo de Cu. En aún otras realizaciones del kit de la invención, el reactivo de formación de macrociclos es un reactivo de Ru.

- 5 También se describe en esta memoria un método para sintetizar un macrociclo peptidomimético, el método comprende las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de Fórmula III o Fórmula IV:



con un reactivo de formación de macrociclos;

- 10 en las que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ son como se ha definido anteriormente; R₁₂ es -H cuando el reactivo de formación de macrociclos es un reactivo de Cu y R₁₂ es -H o alquilo cuando el reactivo de formación de macrociclos es un reactivo de Ru; y además en las que dicha etapa de contacto tiene como resultado una unión covalente formada entre el alquino y el resto azida en la Fórmula III o la Fórmula IV. Por ejemplo, R₁₂ puede ser metilo cuando el reactivo de formación de macrociclos es un reactivo de Ru.

- 15 Al menos uno de R₁ y R₂ puede ser alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo no sustituido o sustituido con halógeno. R₁ y R₂ pueden ser independientemente alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno.

- 20 Por ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ puede ser alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. En otro ejemplo, ambos R₁ y R₂ son independientemente alquilo no sustituido o sustituido con halógeno. Al menos uno de R₁ y R₂ puede ser metilo. R₁ y R₂ pueden ser metilo. El reactivo de formación de macrociclos puede ser un reactivo de Cu. Alternativamente, el reactivo de formación de macrociclos puede ser un reactivo de Ru.

- 25 El precursor peptidomimético se puede purificar antes de la etapa de contacto. El macrociclo peptidomimético se puede purificar después de la etapa de contacto. El macrociclo peptidomimético se puede volver a plegar después de la etapa de contacto. El método se puede llevar a cabo en disolución, o, alternativamente, el método se puede llevar a cabo en un soporte sólido.

- 30 También está previsto en la presente memoria llevar a cabo el método en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El método se puede realizar en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El método también se puede aplicar para sintetizar una biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

- 35 El macrociclo peptidomimético que resulta del método puede comprender una hélice α en disolución acuosa. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético puede mostrar un aumento de la estructura de hélice α en disolución acuosa en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede mostrar una mayor estabilidad térmica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede mostrar una mayor actividad biológica en comparación con el correspondiente polipéptido no

macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede mostrar una mayor resistencia a la degradación proteolítica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede mostrar una mayor capacidad de penetración en células vivas en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico.

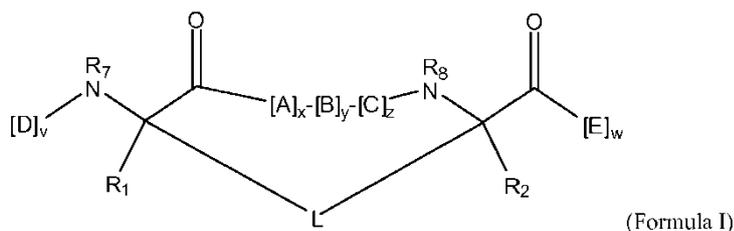
- 5 El resto alquino del precursor peptidomimético de Fórmula III o Fórmula IV puede ser una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico y el resto azida del precursor peptidomimético de Fórmula III o Fórmula IV puede ser una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alfa-metil-L-ornitina y δ -azido-alfa-metil-D-ornitina.

En algunas realizaciones, $x+y+z$ es 3, y A, B y C son independientemente aminoácidos naturales o no naturales. $x+y+z$ puede ser 6, y A, B y C pueden ser independientemente aminoácidos naturales o no naturales.

- 15 El reactivo de formación de macrociclos puede ser un reactivo de Cu y la etapa de contacto se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en disolvente prótico, disolvente acuoso, disolvente orgánico y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el disolvente se puede elegir entre el grupo que consiste en H_2O , THF/ H_2O , tBuOH/ H_2O , DMF, DIPEA, CH_3CN , CH_2Cl_2 , $ClCH_2CH_2Cl$ o una mezcla de los mismos.

- 20 En otras realizaciones, el reactivo de formación de macrociclos puede ser un reactivo de Ru y la etapa de contacto se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico. Por ejemplo, el disolvente puede ser DMF, THF, CH_3CN , CH_2Cl_2 o $ClCH_2CH_2Cl$. El disolvente puede ser un disolvente que favorezca la formación de hélices.

El macrociclo peptidomimético que resulta de llevar a cabo el método puede tener la Fórmula (I):



en la que v , w , x , y , z , A, B, C, D, E, R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , y L son como se ha definido anteriormente.

25 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "macrociclo" se refiere a una molécula que tiene una estructura química que incluye un anillo o ciclo formado por al menos 9 átomos unidos por enlace covalente.

- 30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "macrociclo peptidomimético" se refiere a un compuesto que comprende un gran número de restos de aminoácidos unidos por un gran número de enlaces peptídicos y al menos un elemento de unión formador de macrociclos que forma un macrociclo entre el carbono α de un resto de aminoácido natural o de un resto de aminoácido no natural o de un resto de análogo de aminoácido y el carbono α de otro resto de aminoácido natural o el resto de aminoácido no natural o el resto de análogo de aminoácido. Los macrociclos peptidomiméticos incluyen opcionalmente uno o más enlaces no peptídicos entre uno o más restos de aminoácidos y/o restos de análogo de aminoácido y, opcionalmente, incluyen uno o más restos de aminoácidos no naturales o restos de análogo de aminoácido, además de cualquiera que forme el macrociclo.

- 35 Como se utiliza en la presente memoria, el término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una estructura secundaria definida en disolución por un macrociclo peptidomimético de la invención medido por dicroísmo circular, RMN u otra medida biofísica, o resistencia a la degradación proteolítica *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos no limitativos de estructuras secundarias contempladas en la presente invención son hélices α , espiras β y hojas plisadas β .

- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "estabilidad helicoidal" se refiere al mantenimiento de la estructura de la hélice α por un macrociclo peptidomimético de la invención medido por dicroísmo circular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los macrociclos peptidomiméticos de la invención presentan un aumento de al menos 1,25; 1,5; 1,75 o 2 veces en la helicidad α determinado por dicroísmo circular en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico.

45

- 5 El término " α -aminoácido" o simplemente "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unido a un carbono que se designa carbono α . Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, tanto los isómeros D como L de los aminoácidos naturales, así como de los aminoácidos no naturales preparados por síntesis orgánica u otras rutas metabólicas. A menos que el contexto indique específicamente lo contrario, el término aminoácido, como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir análogos de aminoácido.
- El término "aminoácido natural" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos que se encuentran comúnmente en péptidos sintetizados en la naturaleza, y conocidos por las abreviaturas de una letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.
- 10 El término "análogo de aminoácido" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar a un aminoácido y que puede sustituir a un aminoácido en la formación de un macrociclo peptidomimético. Los análogos de aminoácido incluyen, sin limitación, compuestos que son estructuralmente idénticos a un aminoácido, tal como se definen en la presente memoria, excepto por la inclusión de uno o más grupos metileno adicionales entre el grupo amino y carboxilo (por ejemplo, α -amino β -carboxiácidos), o por la sustitución del grupo amino o carboxilo por un grupo reactivo similar (por ejemplo, sustitución de la amina primaria por una amina secundaria o terciaria, o la sustitución del grupo carboxi por un éster).
- 15 Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido (por ejemplo, un dominio BH3 o el dominio de unión MDM2 p53) sin suprimir o alterar sustancialmente su actividad biológica o bioquímica esencial (por ejemplo, unión al receptor o activación del mismo). Un resto de aminoácido "esencial" es un resto que, cuando se altera a partir de la secuencia de tipo silvestre del polipéptido, da como resultado la supresión o la supresión sustancial de la actividad biológica o bioquímica esencial del polipéptido.
- 20 Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, K, R, H), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, D, E), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, G, N, Q, S, T, Y, C), cadenas laterales apolares (por ejemplo, A, V, L, I, P, F, M, W), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, T, V, I) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, Y, F, W, H). Por lo tanto, un resto previsto de aminoácido no esencial en un polipéptido BH3, por ejemplo, se reemplaza preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de la cadena lateral.
- 25 El término "miembro", como se utiliza en la presente memoria en relación con macrociclos o elementos de unión formadores de macrociclos se refiere a los átomos que forman o pueden formar el macrociclo, y excluye átomos de la cadena lateral o del sustituyente. Por analogía, ciclodecano, 1,2-difluoro-decano y 1,3-dimetil ciclodecano se consideran todos macrociclos de diez miembros ya que los sustituyentes de hidrógeno o flúor o cadenas laterales de metilo no participan en la formación del macrociclo.
- 30 El símbolo  cuando se utiliza como parte de una estructura molecular se refiere a un enlace sencillo o a un doble enlace trans o cis.
- 35 El término "cadena lateral de aminoácido" se refiere a un resto unido al carbono α en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácido para alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácido para fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácido para cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácido para aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácido para tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etc. Otras cadenas laterales de aminoácidos no naturales también se incluyen, por ejemplo, los que se producen en la naturaleza (por ejemplo, un metabolito aminoácido) o los que se preparan por síntesis (por ejemplo, un aminoácido α,α -disustituido).
- 40 El término "polipéptido" comprende dos o más aminoácidos de origen natural o no natural unidos por un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida). Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen proteínas completas (por ejemplo, proteínas completamente procesadas) así como secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, fragmentos de proteínas naturales o fragmentos de polipéptido sintético).
- 45 El término "reactivo de macrociclación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier reactivo que puede utilizarse para preparar un macrociclo peptidomimético de la invención por medio de la reacción entre una azida y un alquino. Dichos reactivos incluyen, sin limitación, reactivos de Cu tales como reactivos que proporcionan una especie reactiva de Cu (I), tales como CuBr, CuI o CuOTf, así como sales de Cu (II) tales como de Cu(CO₂CH₃)₂, CuSO₄, y CuCl₂ que pueden convertirse in situ en un reactivo activo de Cu (I) mediante la adición de un agente reductor tal como ácido ascórbico o ascorbato de sodio. Los reactivos de macrociclación incluyen además, por ejemplo, reactivos de Ru conocidos en la técnica tales como Cp*RuCl(PPh₃)₂, [Cp*RuCl]₄ u otros reactivos de Ru que puede proporcionar una especie reactiva de Ru (II).
- 50 El término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo o un radical de los mismos.

El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀ indica que el grupo tiene de 1 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. En ausencia de una designación numérica, "alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

5 El término "alquilenilo" se refiere a un alquilo divalente (es decir, -R-).

El término "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono. El resto alquenilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. El término "alquenilo inferior" se refiere a una cadena de alquenilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquenilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

El término "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que es una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. El resto alquinilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en ella. El término "alquinilo inferior" se refiere a una cadena de alquinilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquinilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico de 6 carbonos o aromático bicíclico de 10 carbonos en el que 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y similares. El término "arilalquilo" o el término "aralquilo" se refiere a alquilo sustituido con un arilo. El término "arilalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con arilo.

20 "Arilalquilo" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente. Ejemplos representativos de un grupo arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, 2-metilfenilo, 3-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etilfenilo, 3-etilfenilo, 4-etilfenilo, 2-propilfenilo, 3-propilfenilo, 4-propilfenilo, 2-butilfenilo, 3-butilfenilo, 4-butilfenilo, 2-pentilfenilo, 3-pentilfenilo, 4-pentilfenilo, 2-isopropilfenilo, 3-isopropilfenilo, 4-isopropilfenilo, 2-isobutilfenilo, 3-isobutilfenilo, 4-isobutilfenilo, 2-sec-butilfenilo, 3-sec-butilfenilo, 4-sec-butilfenilo, 2-t-butilfenilo, 3-t-butilfenilo y 4-t-butilfenilo.

"Arilamido" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por uno o más grupos -C(O)NH₂. Ejemplos representativos de un grupo arilamido incluyen 2-C(O)NH₂-fenilo, 3-C(O)NH₂-fenilo, 4-C(O)NH₂-fenilo, 2-C(O)NH₂-piridilo, 3-C(O)NH₂-piridilo y 4-C(O)NH₂-piridilo.

30 "Alquilheterociclo" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado por un heterociclo. Ejemplos representativos de un grupo alquilheterociclo incluyen, pero no se limitan a, -CH₂CH₂-morfolina, -CH₂CH₂-piperidina, -CH₂CH₂CH₂-morfolina y -CH₂CH₂CH₂-imidazol.

35 "Alquilamido" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado por un grupo -C(O)NH₂. Ejemplos representativos de un grupo alquilamido incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₃, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃, -CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂C(O)NH₂.

40 "Alcanol" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha sustituido por un grupo hidroxilo. Ejemplos representativos de un grupo alcanol incluyen, pero no se limitan a, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH(OH)CH₃, -CH₂CH(OH)CH₂CH₃, -CH(OH)CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂OH.

45 "Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha sustituido con un grupo -COOH. Ejemplos representativos de un grupo alquilcarboxi incluyen pero no se limitan a, -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₂CH₃, -CH(COOH)CH₂CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂COOH.

El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye grupos de hidrocarburos cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen 3 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 3 a 8 átomos de carbono, y más preferentemente de 3 a 6 átomos de carbono, en el que el grupo cicloalquilo además está opcionalmente sustituido. Algunos grupos cicloalquilo incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros, o tricíclico de 11 a 14 miembros, que tiene 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico, o 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos se seleccionan de entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de O, N o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico,

respectivamente), en el que 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada anillo están sustituidos con un sustituyente. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo y similares.

5 El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con heteroarilo.

El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con heteroarilo.

10 El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico no aromático de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros, que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos de entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 ó 1-9 heteroátomos de O, N o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en el que 0, 1, 2 ó 3 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo y similares.

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

20 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos y por lo tanto se presentan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereoisómeros individuales y mezclas diastereoisoméricas. Todas estas formas isómeras de estos compuestos están incluidas en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención también están representados en múltiples formas tautoméricas, en tales casos, la invención incluye todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, si la alquilación de un sistema de anillo da como resultado la alquilación en múltiples puntos, la invención incluye todos los productos de reacción de este tipo). Todas estas formas isoméricas de dichos compuestos están incluidas en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente memoria se incluyen en la presente invención a menos que expresamente se estipule de otra manera.

30 Como se utiliza en la presente memoria, los términos "aumento" y "disminución" significan, respectivamente, producir un aumento o disminución estadísticamente significativo (es decir, $p < 0,1$) de por lo menos 5%.

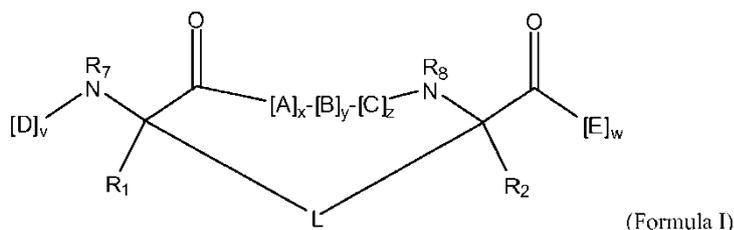
35 Como se utiliza en la presente memoria, la lectura de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la invención puede ponerse en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese rango. Así, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable es igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. De igual manera, para una variable que es intrínsecamente continua, la variable es igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. A título de ejemplo no limitativo, una variable que se describe con valores entre 0 y 2 adopta los valores 0, 1 ó 2 si la variable es intrínsecamente discreta, y adopta los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualesquier otros valores reales ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es intrínsecamente continua.

40 Como se utiliza en la presente memoria, a menos que específicamente se indique lo contrario, la palabra "o" se utiliza en sentido inclusivo de "y/o" y no en sentido exclusivo de "o/o".

Los detalles de una o más realizaciones específicas de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Macrociclos peptidomiméticos

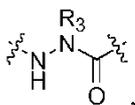
45 La presente descripción describe un macrociclo peptidomimético de Fórmula (I)



en las que:

cada A, C, D y E es independientemente un aminoácido natural o no natural;

B es un aminoácido, análogo de aminoácido natural o no natural,

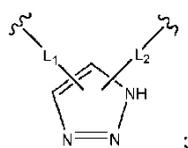


[-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-] o [-NH-L₃-];

5 R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno;

R₃ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

L es un elemento de unión formador de macrociclos de fórmula



10 L₁, L₂ y L₃ son independientemente alquileo, alqueniilo, alquiniilo, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno estando opcionalmente sustituido con R₅;

15 cada R₄ es alquileo, alqueniilo, alquiniilo, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂ o CONR₃;

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

20 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo or heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

25 R₈ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

v es un número entero de 1 a 1000;

w es un número entero de 1 a 1000;

x es un número entero de 0 a 10;

30 y es un número entero de 0 a 10;

z es un número entero de 0 a 10; y

n es un número entero de 1 a 5.

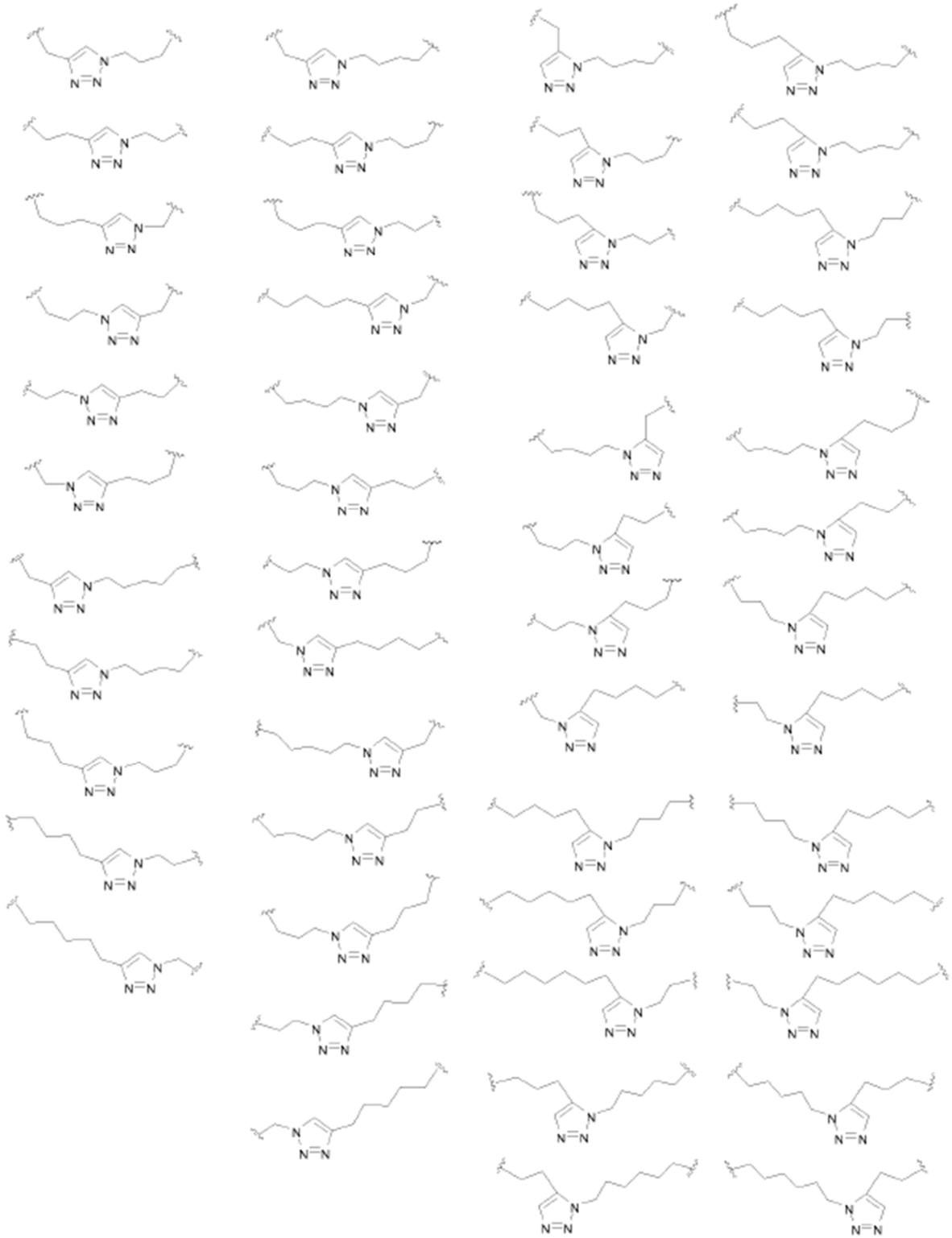
35 x+y+z puede ser al menos 3. x+y+z puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo se puede seleccionar de manera independiente. Por ejemplo, una secuencia representada mediante la fórmula [A]_x, en la que x es 3, abarca situaciones en las que los aminoácidos no son idénticos, p.ej. Gln-Asp-Ala así como ejemplos en los que los aminoácidos son idénticos, p.ej. Gln-Gln-Gln. Esto se aplica para cualquier valor de x, y o z en los intervalos indicados.

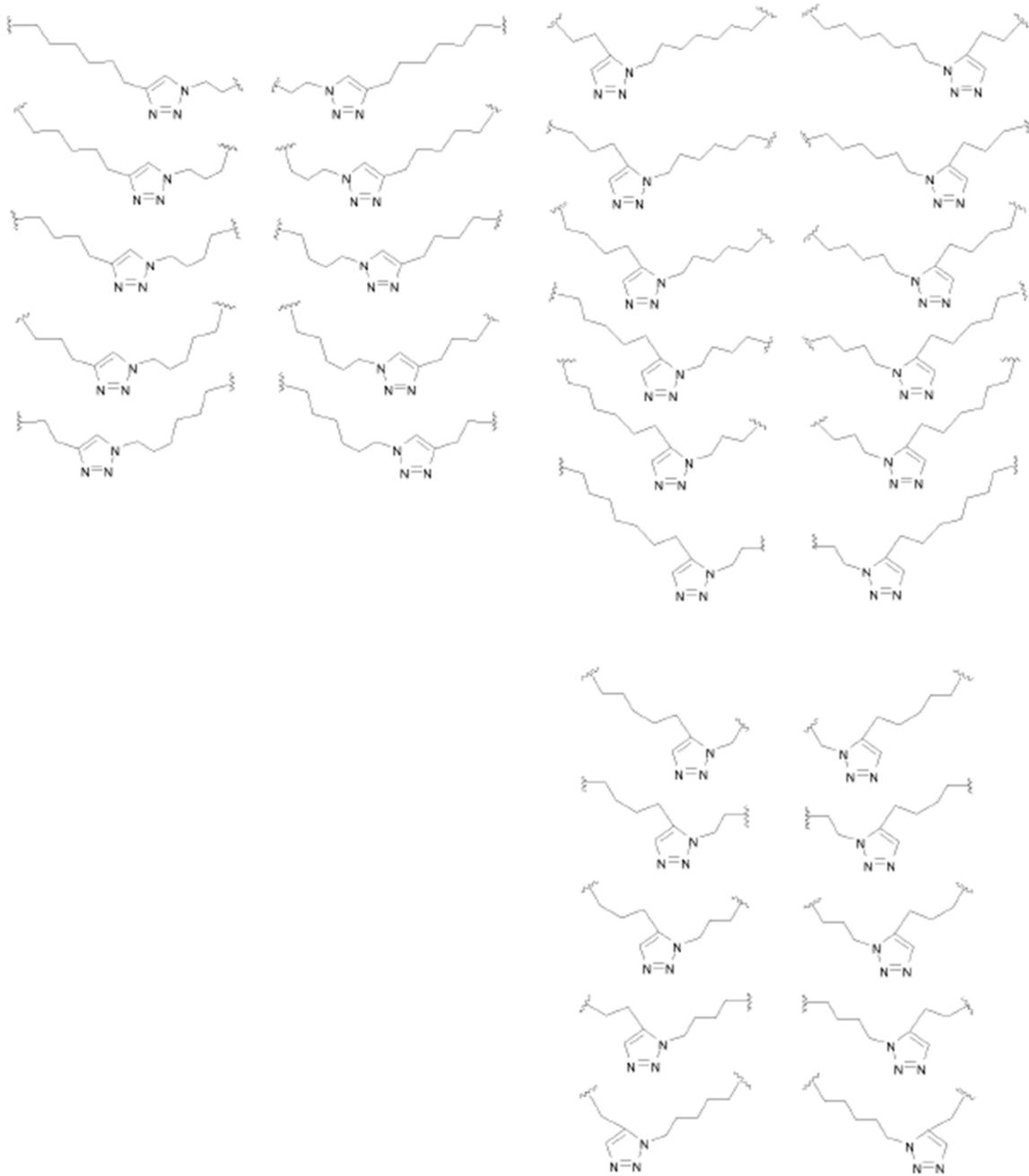
40 El macrociclo peptidomimético puede comprender una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno intrahelicoidales.

La longitud del elemento de unión que forma macrociclos L medida desde un primer C α hasta un segundo C α se selecciona para estabilizar una estructura de péptido secundaria deseada, tal como una hélice α formada por residuos del macrociclo peptidomimético incluyendo, pero no necesariamente limitado a, aquellos entre el primer C α y el segundo C α .

- 5 El macrociclo peptidomimético comprende al menos un motivo de hélice α . Por ejemplo, A, B y/o C en el compuesto de Fórmula I incluyen una o más hélices α . En general, las hélices α incluyen entre 3 y 4 residuos aminoácidos por vuelta. La hélice α del macrociclo peptidomimético incluye de 1 a 5 vueltas y, por tanto, 3 a 20 residuos aminoácidos. La hélice α puede incluir 1 vuelta, 2 vueltas, 3 vueltas, 4 vueltas o 5 vueltas. El elemento de unión que forma macrociclos estabiliza un motivo de hélice α incluido en el macrociclo peptidomimético. Así, la longitud del elemento de unión que forma macrociclos L desde un primer C α hasta un segundo C α se puede seleccionar para aumentar la estabilidad de una hélice α . El elemento de unión que forma macrociclos puede abarcar de 1 vuelta a 5 vueltas de la hélice α . El elemento de unión que forma macrociclos puede abarcar aproximadamente 1 vuelta, 2 vueltas, 3 vueltas, 4 vueltas o 5 vueltas de la hélice α . La longitud del elemento de unión que forma macrociclos puede ser aproximadamente de 5 Å a 9 Å por vuelta de la hélice α , o aproximadamente de 6 Å a 8 Å por vuelta de la hélice α .
- 10 Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 1 vuelta de la hélice α , la longitud es igual a aproximadamente de 5 enlaces carbono-carbono a 13 enlaces carbono-carbono, aproximadamente de 7 enlaces carbono-carbono a 11 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 9 enlaces carbono-carbono. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 2 vueltas de la hélice α , la longitud es igual a aproximadamente de 8 enlaces carbono-carbono a 16 enlaces carbono-carbono, aproximadamente de 10 enlaces carbono-carbono a 14 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 12 enlaces carbono-carbono. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 3 vueltas de la hélice α , la longitud es igual a aproximadamente de 14 enlaces carbono-carbono a 22 enlaces carbono-carbono, aproximadamente de 16 enlaces carbono-carbono a 20 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 18 enlaces carbono-carbono. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 4 vueltas de la hélice α , la longitud es igual a aproximadamente de 20 enlaces carbono-carbono a 28 enlaces carbono-carbono, aproximadamente de 22 enlaces carbono-carbono a 26 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 24 enlaces carbono-carbono. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 5 vueltas de la hélice α , la longitud es igual a aproximadamente de 26 enlaces carbono-carbono a 34 enlaces carbono-carbono, aproximadamente de 28 enlaces carbono-carbono a 32 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 30 enlaces carbono-carbono. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 1 vuelta de la hélice α , la unión contiene aproximadamente de 4 átomos a 12 átomos, aproximadamente de 6 átomos a 10 átomos, o aproximadamente 8 átomos. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 2 vueltas de la hélice α , la unión contiene aproximadamente de 7 átomos a 15 átomos, aproximadamente de 9 átomos a 13 átomos, o aproximadamente 11 átomos. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 3 vueltas de la hélice α , la unión contiene aproximadamente de 13 átomos a 21 átomos, aproximadamente de 15 átomos a 19 átomos, o aproximadamente 17 átomos. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 4 vueltas de la hélice α , la unión contiene aproximadamente de 19 átomos a 27 átomos, aproximadamente de 21 átomos a 25 átomos, o aproximadamente 23 átomos. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 5 vueltas de la hélice α , la unión contiene aproximadamente de 25 átomos a 33 átomos, aproximadamente de 27 átomos a 31 átomos, o aproximadamente 29 átomos. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 1 vuelta de la hélice, el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 17 miembros a 25 miembros, aproximadamente de 19 miembros a 23 miembros, o aproximadamente 21 miembros. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 2 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 29 miembros a 37 miembros, aproximadamente de 31 miembros a 35 miembros, o aproximadamente 33 miembros. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 3 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 44 miembros a 52 miembros, aproximadamente de 46 miembros a 50 miembros, o aproximadamente 48 miembros. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 4 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 59 miembros a 67 miembros, aproximadamente de 61 miembros a 65 miembros, o aproximadamente 63 miembros. Cuando el elemento de unión que forma macrociclos abarca aproximadamente 5 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 74 miembros a 82 miembros, aproximadamente de 76 miembros a 80 miembros, o aproximadamente 78 miembros.

A continuación se muestran ejemplos del elemento de unión que forma macrociclos L:





D y/o E se pueden modificar adicionalmente a fin de facilitar la absorción celular. La lipidiación o PEGilación de un macrociclo peptidomimético facilita la absorción celular, aumenta la biodisponibilidad, aumenta la circulación sanguínea, altera la farmacocinética, disminuye la inmunogenicidad y/o disminuye la frecuencia necesaria de administración.

5

Un macrociclo peptidomimético puede presentar propiedades biológicas mejoradas tales como mayor estabilidad estructural, mayor afinidad por una diana, mayor resistencia a la degradación proteolítica y/o mayor penetrabilidad celular cuando se compara con el polipéptido no macrocíclico correspondiente. Un macrociclo peptidomimético puede comprender una o más hélices α en disoluciones acuosas y/o presentar un mayor grado de helicidad α en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Un elemento de unión que forma macrociclos puede aumentar la permeabilidad celular del macrociclo peptidomimético. Aunque no se ha comprobado teóricamente, se supone que el elemento de unión que forma macrociclos puede aumentar la hidrofobia global del macrociclo peptidomimético con respecto a un polipéptido no macrocíclico correspondiente.

10

5 Cualquier proteína o polipéptido con una conocida secuencia primaria de aminoácidos que contiene una estructura secundaria que se cree que comunica actividad biológica puede ser el objeto de la presente descripción. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido puede analizarse y los análogos de aminoácido que contienen azida y que contienen alquino pueden estar sustituidos en las posiciones apropiadas. Las posiciones apropiadas se determinan averiguando qué superficie(s) molecular(es) de la estructura secundaria se necesita(n) para la actividad biológica y, por lo tanto, a través de qué otra(s) superficie(s) los elementos de unión que forman macrociclos pueden formar un macrociclo sin bloquear estéricamente la(s) superficie(s) requerida(s) para la actividad biológica. Dichas determinaciones se realizan utilizando procedimientos tales como la cristalografía de rayos X de complejos entre la estructura secundaria y una pareja de unión natural para visualizar la actividad en los restos (y superficies) críticos; por mutagenia sucesiva de restos en la estructura secundaria para identificar funcionalmente la actividad en restos (y superficies) críticos, o por otros procedimientos. Mediante dichas determinaciones, los aminoácidos apropiados se sustituyen por los análogos de aminoácido y los elementos de unión que forman macrociclos descritos en esta memoria. Por ejemplo, para una estructura secundaria de hélice α , una superficie de la hélice (por ejemplo, una superficie molecular que se extiende longitudinalmente a lo largo del eje de la hélice y de radialmente 45-135° alrededor del eje de la hélice) puede que sea necesario que haga contacto con otra biomolécula *in vivo* o *in vitro* para la actividad biológica. En tal caso, se diseña un elemento de unión que forma macrociclos para unir dos carbonos α de la hélice, mientras que se extiende longitudinalmente a lo largo de la superficie de la hélice en la parte de esta superficie no necesaria directamente para la actividad.

20 La secuencia peptídica puede proceder de la familia BCL-2 de proteínas. La familia BCL-2 se define por la presencia de hasta cuatro dominios de homología (BH) BCL-2 conservados denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, todos los cuales incluyen segmentos de hélice α (Chittenden *et al.* (1995). EMBO14:5589; Wang *et al.* (1996), Genes Dev. 10:2859). Las proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-2 y BCL-X_L, presentan la conservación de la secuencia en todos los dominios BH. Las proteínas proapoptóticas se dividen en miembros de la familia "multidominio" (por ejemplo, BAK, BAX), que poseen una homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, y miembros de la familia "dominio BH3 sólo" (por ejemplo, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA), que contiene una homología de secuencia exclusivamente en los miembros de la familia BCL-2 del segmento BH3 α -helicoidal anfipático tienen capacidad para formar homodímeros y heterodímeros, lo que sugiere que la unión competitiva y la relación entre los niveles de proteína pro-y antiapoptótica prescribe sensibilidad a los estímulos de muerte. Las proteínas antiapoptóticas funcionan para proteger las células del exceso proapoptótico, es decir, muerte celular programada excesiva. Las medidas de "seguridad" adicionales incluyen la regulación de la transcripción de proteínas proapoptóticas y su mantenimiento como conformadores inactivos, lo que requiere la activación proteolítica, desfosforilación, o cambio de conformación inducido por ligandos para activar las funciones pro muerte. En determinados tipos de células, las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática desencadenan la apoptosis a través de una ruta mitocondrial. Las mitocondrias pueden servir como un guardián de la muerte celular al secuestrar el citocromo c, un componente crítico de un complejo citosólico que activa la caspasa 9, lo que conduce a episodios proteolíticos mortales corriente abajo. Las proteínas multidominio como BCL-2/BCL-X_L y BAK/BAX desempeñan funciones de duelo de guardián y verdugo en la membrana mitocondrial, con sus actividades más reguladas por los miembros BH3 sólo corriente arriba de la familia BCL-2. Por ejemplo, BID es un miembro de la familia de dominio BH3 sólo de proteínas proapoptóticas, y transmite señales de muerte recibidas en la membrana plasmática para las proteínas proapoptóticas efectoras en la membrana mitocondrial. BID tiene capacidad para interactuar con las proteínas pro- y antiapoptóticas, y tras la activación por la caspasa 8, desencadena la liberación de citocromo c y la apoptosis mitocondrial. Estudios de eliminación y mutagenia determinaron que el segmento BH3 α -helicoidal anfipático de los miembros de la familia proapoptótica puede funcionar como un dominio de muerte y por lo tanto pueden representar un motivo estructural crítico para la interacción con las proteínas apoptóticas multidominio. Estudios estructurales han demostrado que la hélice BH3 puede interactuar con proteínas antiapoptóticas mediante la inserción en una ranura hidrófoba formada por la interfaz de los dominios BH1, 2 y 3. El BID activado puede estar unido y secuestrado por proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, BCL-2 y BCL-X_L) y puede desencadenar la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, que conducen a la liberación del citocromo c y un programa de apoptosis mitocondrial. BAD es también un dominio BH3 sólo miembro de la familia proapoptótica cuya expresión desencadena la activación de BAX/BAK. Al contrario que BID, sin embargo, BAD muestra unión preferencial a los miembros de la familia antiapoptótica, BCL-2 y BCL-X_L. Mientras que el dominio BH3 de BAD presenta una alta afinidad de unión a BCL-2, el péptido BAD BH3 es incapaz de activar la liberación del citocromo c de la mitocondria *in vitro*, lo que sugiere que BAD no es un activador directo de BAX/BAK. Las mitocondrias que sobre-expresan BCL-2 son resistentes a la liberación del citocromo c inducida por BID, pero el tratamiento conjunto con BAD puede restaurar la sensibilidad al BID. La inducción de la apoptosis mitocondrial por BAD parece resultar de: (1) desplazamiento de activadores BAX/BAK, tales como BID y proteínas similares a BID, de la bolsa de la unión BCL-2/BCL-XL, o (2) ocupación selectiva de la bolsa de unión BCL-2/BCL-XL por BAD para evitar el secuestro de proteínas similares a BID por proteínas antiapoptóticas. Por lo tanto, dos clases de proteínas solamente con dominio BH3 han surgido, proteínas similares a BID que activan directamente la apoptosis mitocondrial, y las proteínas similares a BAD, que tienen capacidad de sensibilizar mitocondrias para proapoptóticas ocupando las bolsas de proteínas antiapoptóticas de multidominios. Se han descrito varios dominios α -helicoidales de proteínas miembros de la familia BCL-2 dispuestas para la metodología descrita en este documento (Walensky *et al.* (2004), Science 305:1466; y Walensky *et al.*, Publicación de patente US n° 2005/0250680).

La secuencia peptídica puede proceder de la proteína p53 supresora tumoral que se une a la proteína MDM2 del oncogén. El sitio de unión de MDM2 se localiza dentro de una región del supresor tumoral p53 que forma una hélice α . En patente de EE.UU. n° 7.083.983, Lane *et al.* dan a conocer que la región de P53 responsable de la unión a MDM2 está representada aproximadamente por los aminoácidos 13 a 31 (PLSQETFSDLWKLLPENNV) de la proteína p53 humana madura. También se contemplan otras secuencias modificadas dadas a conocer por Lane. Además, la interacción de p53 y MDM2 ha sido expuesta por Shair *et al.* (1997), Chem. & Biol. 4:791, y las mutaciones en el gen p53 se han identificado en casi la mitad de todos los casos de cáncer publicados. A medida que se imponen tensiones en una célula, se cree que p53 dispone una respuesta que conduce a la interrupción del ciclo celular y la reparación del ADN, o a la muerte celular programada. Así como las mutaciones en el gen p53 que alteran la función de la proteína p53 directamente, p53 puede alterarse por cambios en MDM2. Se ha demostrado que la proteína MDM2 se une a p53 e interrumpe la activación de la transcripción mediante la asociación con el dominio de transactivación de p53. Por ejemplo, un péptido de 11 aminoácidos procedente del dominio de transactivación de p53 forma una hélice α anfipática de 2,5 vueltas que se inserta en la hendidura de MDM2. Así, en algunas realizaciones, las nuevas estructuras de la hélice α generadas por el procedimiento de la presente invención se modifican genéticamente para generar estructuras que se unen fuertemente al receptor de hélice e interrumpen las interacciones naturales proteína-proteína. Estas estructuras se detectan después utilizando técnicas de alto rendimiento para identificar péptidos óptimos de moléculas pequeñas. Las nuevas estructuras que interrumpen la interacción con MDM2 son útiles para muchas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse al, control de sarcomas de tejidos blandos (que sobreexpresa MDM2 en la presencia de p53 de tipo silvestre). Estos cánceres entonces se mantienen en observación con moléculas pequeñas que interceptan MDM2, evitando de este modo la supresión de p53. Además, las moléculas pequeñas perturbadoras de las interacciones p53-MDM2 se utilizan como terapia adyuvante para ayudar a controlar y modular la amplitud de la respuesta a la apoptosis dependiente de p53 en quimioterapia convencional.

A continuación se proporciona una lista de ejemplos no limitantes de secuencias peptídicas adecuadas para usar en la presente descripción:

TABLA 1

Denominación	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia reticulada (X = residuo reticulado)
péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLA QV GDSMDRSIPP	QEDIIRNIARHLA XV GD X MDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRR IG DEFNAYYAR	DNRPEIWIAQELR XI GD X FNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRR MS DEFVDSFKK	NLWAAQRYGRELR XM SD X FVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRR MAD LNAQYER	EEQWAREIGAQLR XM AD X LNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL G DELHQRTM	RSSAAQLTAARLK XL GD X LHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRK IG DKVYCTW	AELPPEFAAQLR XI GD X VYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRR IG DKVNLRQKL	VPADLKDECAQLR XI GD X VNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCI AD QFHRLHT	QHRAEVQIARKLQ XI AD X QFHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL G DELHQRT	SSAAQLTAARLK XL GD X LHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLAC IG DEMDVSLRA	CMEGSDALALRLA XI GD X MDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILK NS DIWDWSS	DIERRKEVESILK XN SD X IWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G DELEMIRP	GRLAEVCAVLL XL GD X LEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLK IG DELDSNMEL	PQDASTKKSECL XI GD X LDSNMEL

Denominación	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia reticulada (X = residuo reticulado)
péptidos BH3		
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI G DDINRR	PSSTMGQVGRQLA XIGDX INRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG D EFELR	KQALR XAGDX FELR
BCL2-BH3	LSPPVHLALALRQAG D DFSRR	LSPPVHLALALR XAGDX FSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG D EFELRY	EVIPMAAVKQALR XAGDX FELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG D EFETRF	PADPLHQAMR XAGDX FETRF
MCL1-BH3	ATSRKLET L RRV G DGVQRNHETA	ATSRKLET L R XVGD XVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTV L LRL G DELEQIR	LAEVCTV L L XLD XLEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHEN G SLDP	MTVGELSRAL G XEN G XLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEAL K KSADWVSDWS	VVEGEKEVEAL X SAD X VSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLV I Q G DDRMKL	SMARDPQRYLV X Q G D X RMKL

La Tabla 1 presenta secuencias humanas que se dirigen al sitio de unión de BH3 y están implicadas en cánceres, trastornos autoinmunitarios, enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.

TABLA 2

Denominación	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia reticulada (X = residuo reticulado)
péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQV G D S MDRSIPP	QEDIIRNI X RHL X QV G D S MDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRR I G D EFNAYYAR	DNRPEIW X QEL X R I G D EFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRE L RRMS D EFVDSFKK	NLWAAQRY X REL X RMS D EFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRM A DDLNAQYER	EEQWAREI X AQL X RM A DDLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARL K AL G DELHQRTM	RSSAAQL X ARL X AL G DELHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRK I G D KVYCTW	AELPPEF X AQL X K I G D KVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRR I G D KVNLRQKL	VPADLKDE X AQL X R I G D KVNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQF H RLHT	QHRAEVQ I ARKL X CIADQF H RLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARL K AL G DELHQRT	SSAAQL X ARL X AL G DELHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLAC I G D EMDVSLRA	CMEGSDAL X LRL X C I G D EMDVSLRA

Denominación	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia reticulada (X = residuo reticulado)
péptidos BH3		
Bnip3	DIERRKEVESILKKN SD WIWDWSS	DIERRKEV X SIL X KN S DWIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G DELEMIRP	GRLAEV X AVL X RL G DELEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRI G DELDSNMEL	PQDASTKK X ECL X RI G DELDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI I GDINRR	PSSTMGQV X RQL X I I GDINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAGDEFELR	X QAL X EAGDEFELR
BCL2-BH3	LSPPWHLALALRQAG D DFSRR	LSPPWHL X LAL X QAG D DFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAV X QAL X EAGDEFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPL X QAM X AAGDEFETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLRRV G DGVQRNHETA	ATSRK X ETL X RV G DGVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL G DELEQIR	LAEV X TVL X RL G DELEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGLDP	MTVGEL X RAL X HENGLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VEGEKE X EAL X KSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQ G DDRMKL	SMARDP X RYL X IQ G DDRMKL

La Tabla 2 presenta secuencias humanas que se dirigen al sitio de unión de BH3 y están implicadas en cánceres, trastornos autoinmunitarios, enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.

TABLA 3

Denominación	Secuencia	Secuencia reticulada
péptidos P53		
péptido hp53_muy corto	LSQET F SDLW K LLPEN	X SQ E X F SDLW K LLPEN
péptido hp53_corto	PPLSQET F SDLW K LLPEN N	PP X SQ E X F SDLW K LLPEN N
péptido hp53-P27S_corto	PPLSQET F SDLW K LLSE N N	PP X SQ E X F SDLW K LLSE N N
péptido hp53_largo	DPSVEPPLSQET F SDLW K LLPEN N VL S PLP	DPSVEPP X SQ E X F SDLW K LLPEN N VL S PLP
péptido hp53-P27S_largo	DPSVEPPLSQET F SDLW K LLSE N NVL S PLP	DPSVEPP X SQ E X F SDLW K LLSE N NVL S PLP
péptido hp53_muy corto	LSQET F SDLW K LLPEN	LSQET F SDLW X LLP X N
péptido hp53_corto	PPLSQET F SDLW K LLPEN N	PPLSQET F SDLW X LLP X NN

Denominación	Secuencia	Secuencia reticulada
péptidos P53		
péptido hp53-P27S-corto	PPLSQETFSDL W KLLSENN	PPLSQETFSDL W <u>X</u> LLS <u>X</u> NN
péptido hp53_largo	DPSVEPPLSQETFSDL W KLLPENNVLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDL W <u>X</u> LLP <u>X</u> NNVLSPLP
péptido hp53-P27S_largo	DPSVEPPLSQETFSDL W KLLSENNVLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDL W <u>X</u> LLS <u>X</u> NNVLSPLP

La Tabla 3 presenta secuencias humanas que tienen como objetivo el sitio de unión de p53 de MDM2/X y están implicados en cánceres.

TABLA 4

Denominación	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia reticulada (<u>X</u> = residuo reticulado)
ligandos del péptido GPCR		
Angiotensina II	DRVYI H PF	DR <u>X</u> Y <u>X</u> H P F
Bombesina	EQRLGNQWAVG H LM	EQRLGN <u>X</u> WAVG H L <u>X</u>
Bradiquinina	RPPGF S PFR	RPP <u>X</u> F S PFR <u>X</u>
C5a	ISHKDM Q LGR	ISHKDM <u>X</u> LGR <u>X</u>
C3a	ARASHL G LAR	ARASHL <u>X</u> LAR <u>X</u>
hormona estimulante de melanocitos α	SYSME H FRWGKPV	SYSM <u>X</u> HFRW <u>X</u> KPV

5

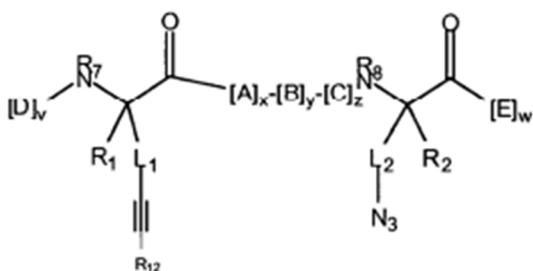
La Tabla 4 presenta secuencias que tienen como objetivo receptores acoplados a la proteína G humana y están implicadas en numerosas enfermedades humanas (Tyndall *et al.* (2005), *Chem. Rev.* 105:793-826).

Métodos para preparar los macrociclos peptidomiméticos

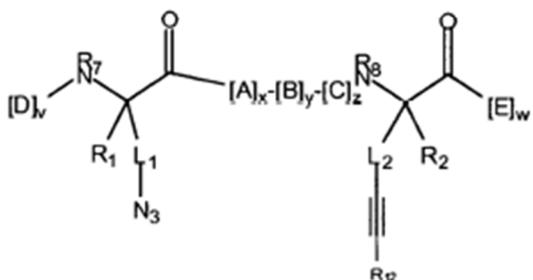
10 En la presente memoria se describen métodos de síntesis de macrociclos peptidomiméticos. La síntesis de estos macrociclos peptidomiméticos implica un proceso en múltiples etapas que presenta la síntesis de un precursor peptidomimético que contiene un resto azida y un resto alquino; a continuación se pone en contacto el precursor peptidomimético con un reactivo de macrociclación para generar un macrociclo peptidomimético unido a triazol. Los macrociclos o los precursores de macrociclos se sintetizan, por ejemplo, por procedimientos en fase de disolución o en fase sólida, y pueden contener tanto aminoácidos naturales como no naturales. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids" in Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids editado por G.C. Barrett, Chapman and Hall, 1985.

20 Una azida puede estar unida al carbono α de un residuo y un alquino puede estar unido al carbono α de otro residuo. Los restos azida pueden ser análogos de azida de aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina, alfa-metil-D-lisina, L-ornitina, D-ornitina, alfa-metil-L-ornitina o alfa-metil-D-ornitina. El resto alquino puede ser L-propargilglicina. Aún en otras realizaciones, el resto alquino es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico y ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico.

25 La descripción proporciona un método para sintetizar un macrociclo peptidomimético, el procedimiento comprende las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV:



(Fórmula III)



(Fórmula IV)

con un reactivo de macrociclación;

en las que v , w , x , y , z , A , B , C , D , E , R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , L_1 y L_2 son como se ha definido anteriormente; R_{12} es -H cuando el reactivo macrociclación es un reactivo de Cu y R_{12} es -H o alquilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru, y además en el que dicha etapa de puesta en contacto da como resultado un enlace covalente formado entre el alquino y el resto azida en la fórmula III o fórmula IV. Por ejemplo, R_{12} puede ser metilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru.

En el método por lo menos uno de entre R_1 y R_2 puede ser alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. R_1 y R_2 pueden ser independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno.

Por ejemplo, por lo menos uno de entre R_1 y R_2 puede ser alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. En otro ejemplo, tanto R_1 como R_2 son independientemente alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. Al menos uno de entre R_1 y R_2 puede ser metilo. En otras realizaciones, R_1 y R_2 pueden ser metilo. El reactivo de macrociclación puede ser un reactivo de Cu o un reactivo de Ru.

El precursor peptidomimético se puede purificar antes de la etapa de contacto. El macrociclo peptidomimético se puede purificar después de la etapa de contacto. El macrociclo peptidomimético se puede replegar después de la etapa de contacto. El procedimiento puede realizarse en disolución, o, alternativamente, el procedimiento puede realizarse en un soporte sólido.

En la presente memoria también se concibe realizar el procedimiento en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El procedimiento se puede realizar en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al macrociclo peptidomimético en condiciones que favorecen dicha unión. El procedimiento también se puede aplicar para sintetizar una biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

El macrociclo peptidomimético resultante del procedimiento puede comprender una hélice α en disolución acuosa. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de estructura ahelicoidal en disolución acuosa en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de la estabilidad térmica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de la actividad biológica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de la resistencia a la degradación proteolítica en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. El macrociclo peptidomimético puede presentar un aumento de capacidad para penetrar en las células vivas en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico.

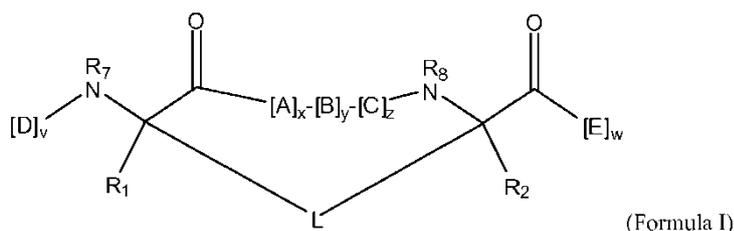
El resto alquino del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV puede ser una cadena lateral de un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico y ácido (R)-

2-amino-2-metil-8-noninoico. El resto azida del precursor peptidomimético de fórmula III o fórmula IV puede ser una cadena lateral de un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido- α -metil-L-lisina, ϵ -azido- α -metil-D-lisina, δ -azido- α -metil-L-ornitina y δ -azido- α -metil-D-ornitina.

5 $x+y+z$ puede ser 3 y A, B y C pueden ser, independientemente, aminoácidos naturales o no naturales. $x+y+z$ puede ser 6, y A, B, y C pueden ser aminoácidos independientemente naturales o no naturales.

10 La etapa de contacto se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consta de disolvente prótico, disolvente acuoso, disolvente orgánico y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el disolvente puede seleccionarse de entre el grupo que consta de H₂O, THF, THF/H₂O, tBuOH/H₂O, DMF, DIPEA, CH₃CN o CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl o una mezcla de los mismos. El disolvente puede ser un disolvente que favorece la formación de la hélice.

El macrociclo peptidomimético que resulta de realizar el procedimiento puede tener la fórmula (I):



en la que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈ y L son como se ha definido anteriormente.

15 Grupos alternativos pero protectores equivalentes, grupos salientes o reactivos están sustituidos y algunas de las etapas de síntesis se realizan en secuencias u órdenes alternativos para producir los compuestos deseados. Las transformaciones químicas de síntesis y metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, las descritas en Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª Ed., John Wiley and Sons (1991); Fieser y Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

20 Los macrociclos peptidomiméticos se fabrican, por ejemplo, por procedimientos de síntesis química, tal como se describe en Fields *et al.*, Capítulo 3 en Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, pág. 77. Por lo tanto, por ejemplo, los péptidos se sintetizan utilizando técnicas automáticas de Merrifield de síntesis en fase sólida con la amina protegida ya sea por la química de tBoc o de Fmoc utilizando aminoácidos protegidos en la cadena lateral, por ejemplo, en un sintetizador automático de péptidos (por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), modelo 430A, 431 o 433).

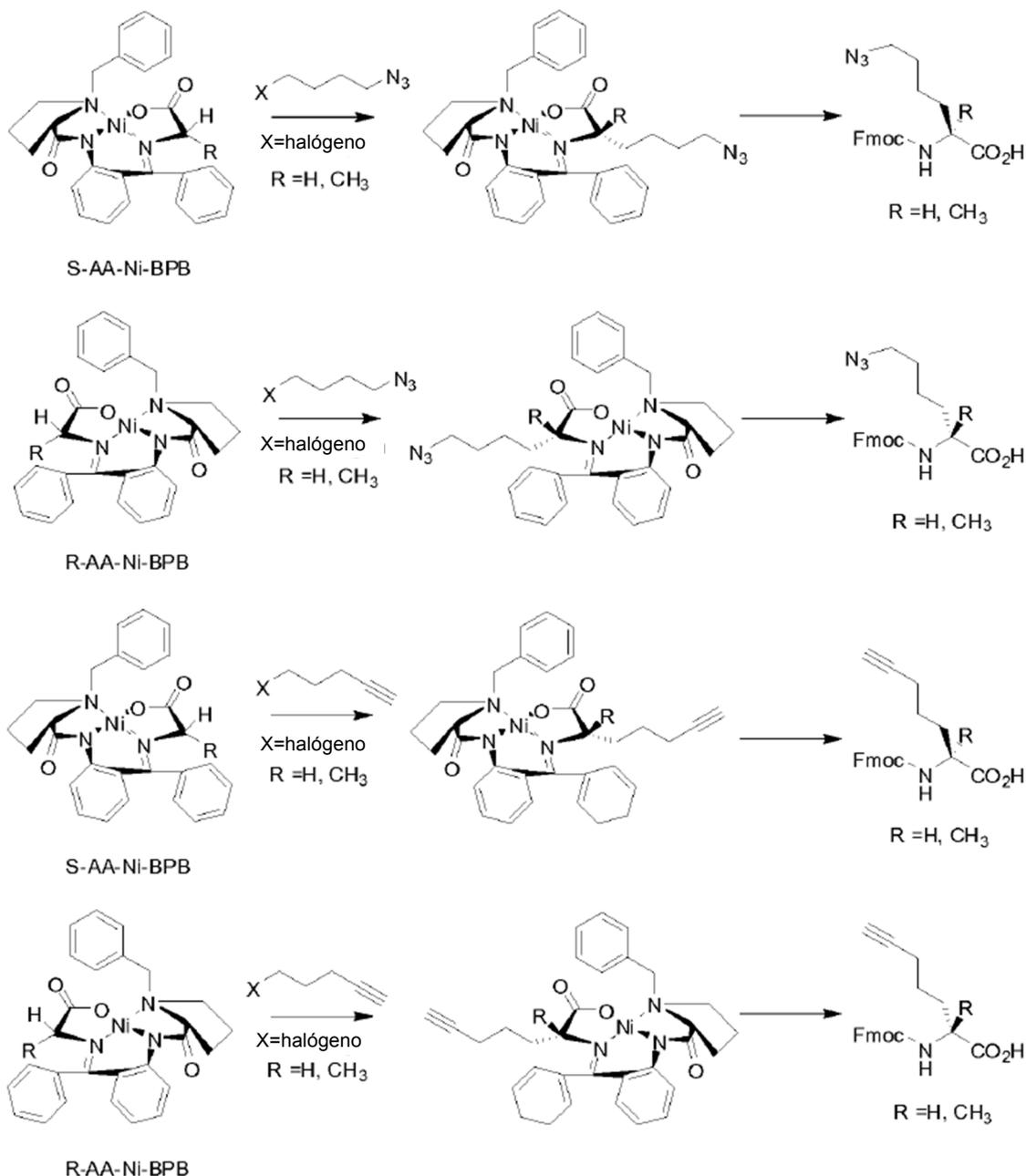
25 Una manera de producir los precursores peptidomiméticos y macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria utiliza la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido del terminal C está unido a una resina de poliestireno reticulado por un enlace lábil en medio ácido con una molécula de enlace. Esta resina es insoluble en los disolventes utilizados para la síntesis, por lo que es relativamente sencillo y rápido lavar el exceso de reactivos y subproductos. El terminal N está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácido, pero desmontable por bases. Los grupos funcionales de las cadenas laterales están protegidos según sea necesario con grupos básicos estables o ácidos lábiles.

30 Los precursores peptidomiméticos más largos se producen, por ejemplo, combinando péptidos sintéticos individuales utilizando enlace químico natural. Alternativamente, se biosintetizan péptidos sintéticos más largos por técnicas bien conocidas de ADN recombinante y de expresión de proteínas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales estándares muy conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un precursor peptidomimético, la secuencia de aminoácidos se traduce a la inversa para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que el gen se va a expresar. A continuación, se construye un gen sintético, por lo general sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y algunos elementos reguladores, en caso necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula anfitriona. El péptido se expresa entonces en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y el anfitrión. El péptido se purifica y caracteriza por procedimientos normalizados.

45 Los precursores de peptidomiméticos se preparan, por ejemplo, de modo combinatorio con alto rendimiento utilizando, por ejemplo, un sintetizador combinatorio policanal de alto rendimiento (por ejemplo, sintetizador de péptidos multicanal modelo Apex 396 de AAPPTEC, Inc., Louisville, KY).

5 Los esquemas de síntesis siguientes se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. Para simplificar los dibujos, los esquemas ilustrativos describen análogos azido de aminoácidos ϵ -azido- α -metil-L-lisina y ϵ -azido- α -metil-D-lisina, y análogos alquino de aminoácidos L-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico y ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico. Esto, en los siguientes esquemas sintéticos, cada R_1 , R_2 , R_7 y R_8 es -H; cada L_1 es $-(CH_2)_4-$, y cada L_2 es $-(CH_2)-$. Sin embargo, como se observó a lo largo de la descripción detallada anterior, muchos otros análogos de aminoácido se pueden emplear en los que R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , L_1 y L_2 puede seleccionarse independientemente de las diferentes estructuras dadas a conocer en la presente memoria.

Esquema de síntesis 1:

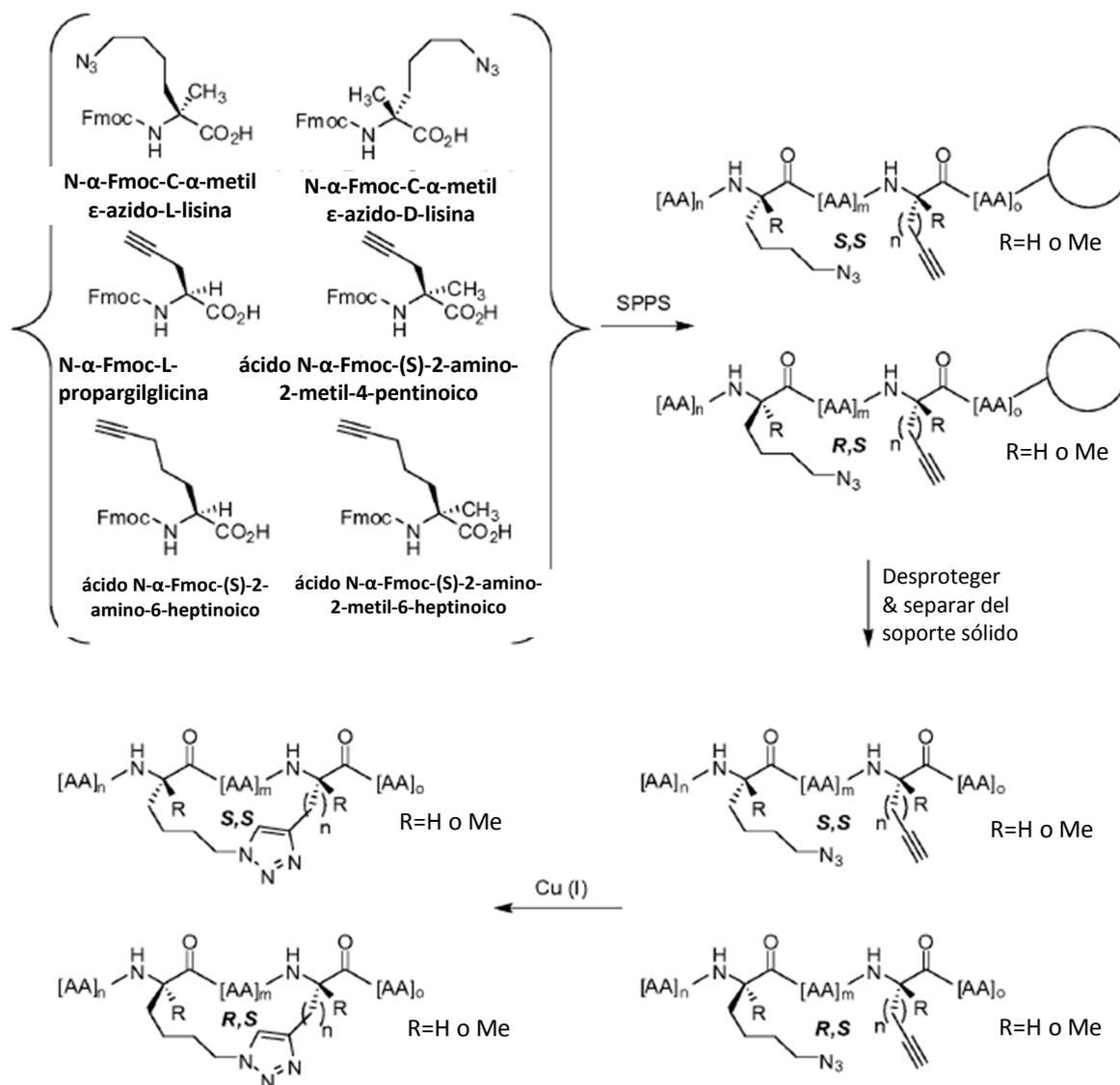


10

15

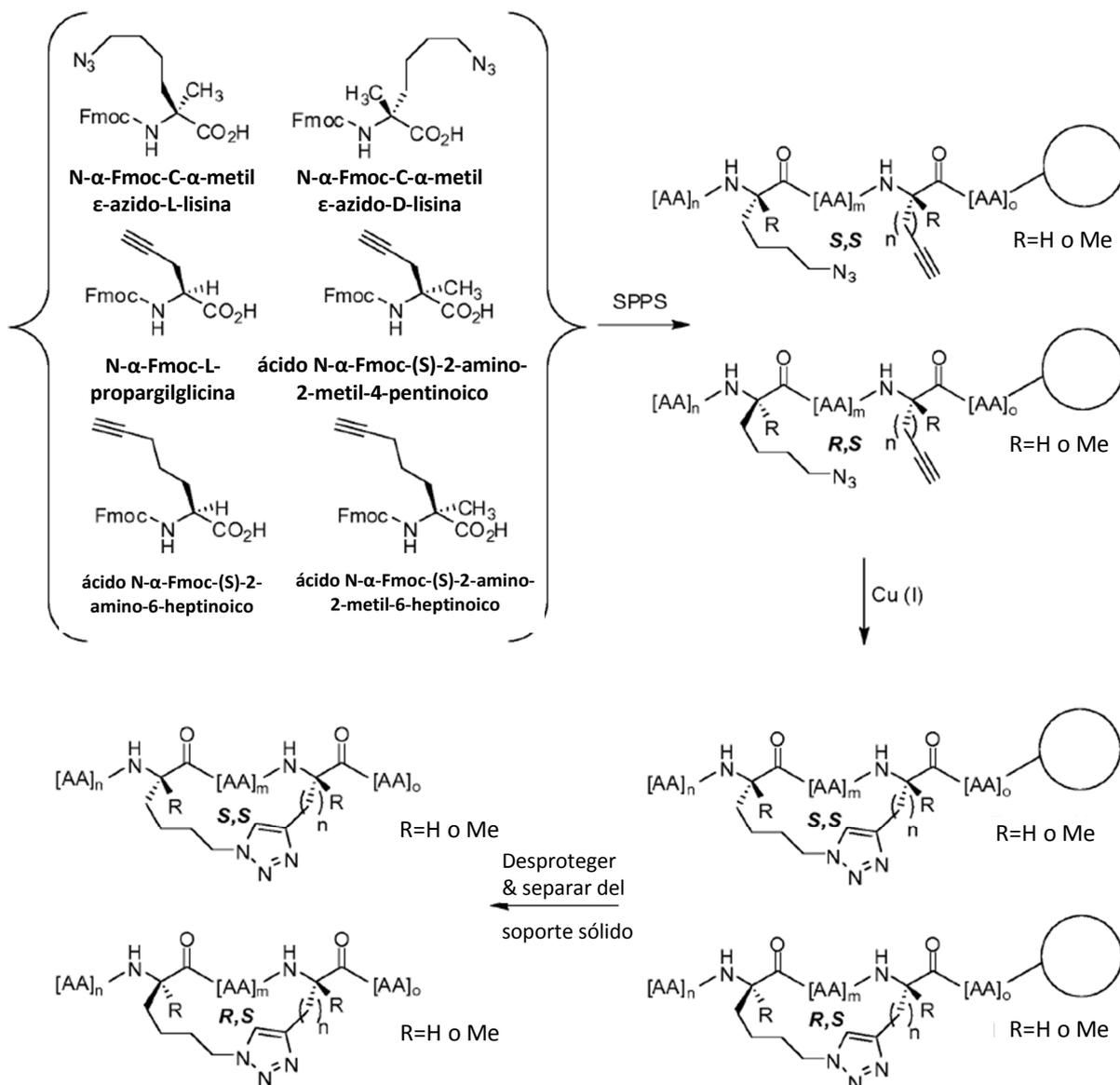
El Esquema de síntesis 1 describe la preparación de varios compuestos. Los complejos de Ni(II) de bases de Schiff derivadas de (S)-2-[N-(N'-bencilproil)amino]benzofenona (BPB) quiral auxiliar y aminoácidos tales como glicina o alanina se preparan como se describe en Belokon *et al.* (1998), Tetrahedron Asymm. 9:4249-4252. Los complejos resultantes se hacen reaccionar posteriormente con reactivos alquilantes que comprenden un resto azido o alquínico para obtener compuestos enantioméricamente enriquecidos. Si se desea, los compuestos resultantes pueden protegerse para su utilización en la síntesis de péptidos.

Esquema de síntesis 2



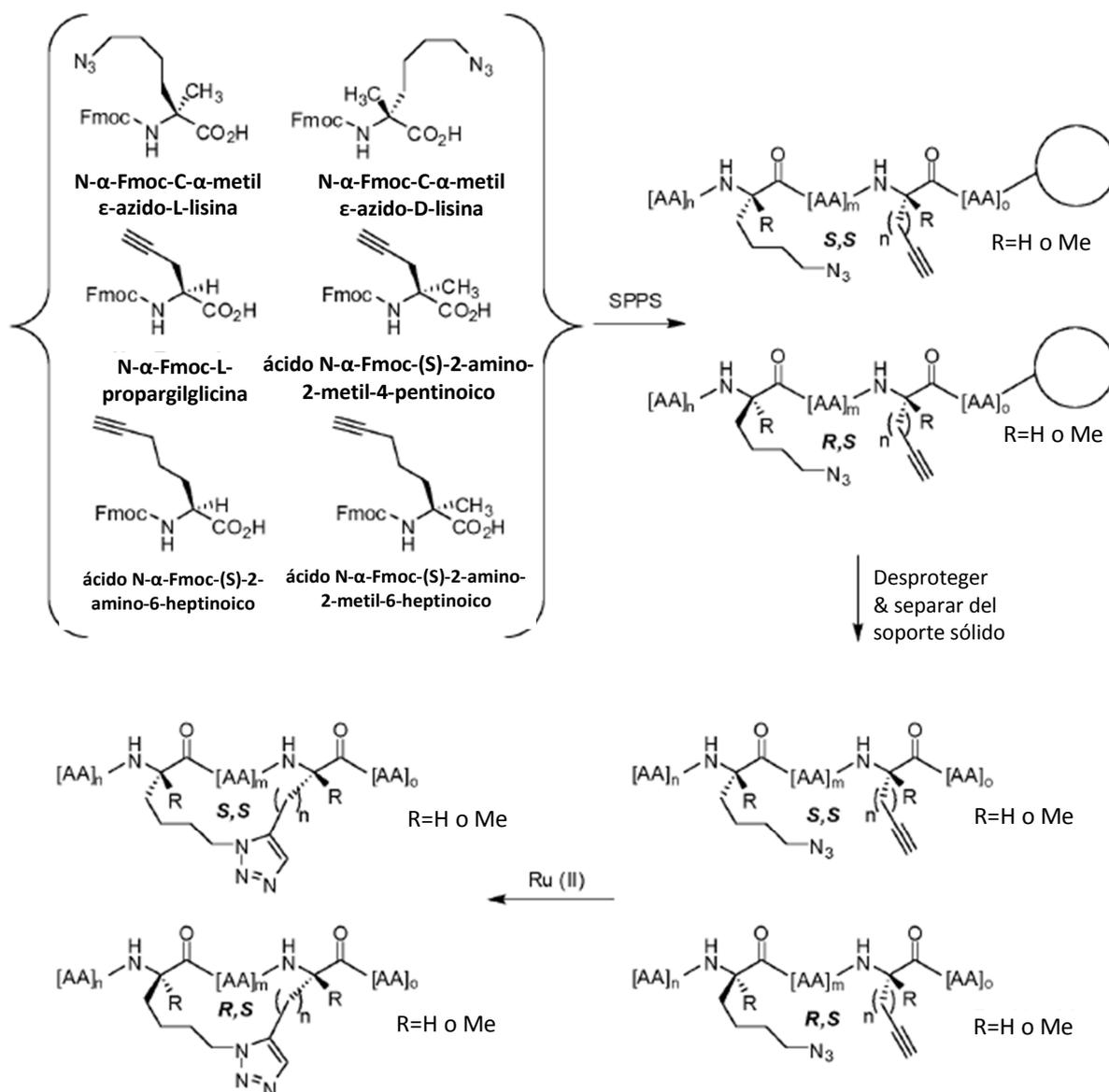
En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos que se muestran en el Esquema de síntesis 2, el precursor peptidomimético contiene un resto azida y un resto alquino y se sintetiza por síntesis en fase de disolución o en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N- α -Fmoc-L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas por N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en condiciones estándar (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). El precursor peptidomimético se hace reaccionar como una mezcla en bruto o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Cu (I) en disoluciones orgánicas o acuosas (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tornøe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Purma *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). La reacción para la formación de triazol se puede llevar a cabo en condiciones que favorecen la formación de la hélice α . La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo constituido por H₂O, THF, CH₃CN, DMF, DIPEA, tBuOH, o una mezcla de los mismos. La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en DMF. La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un tampón acuoso o un disolvente parcialmente acuoso.

Esquema de síntesis 3:



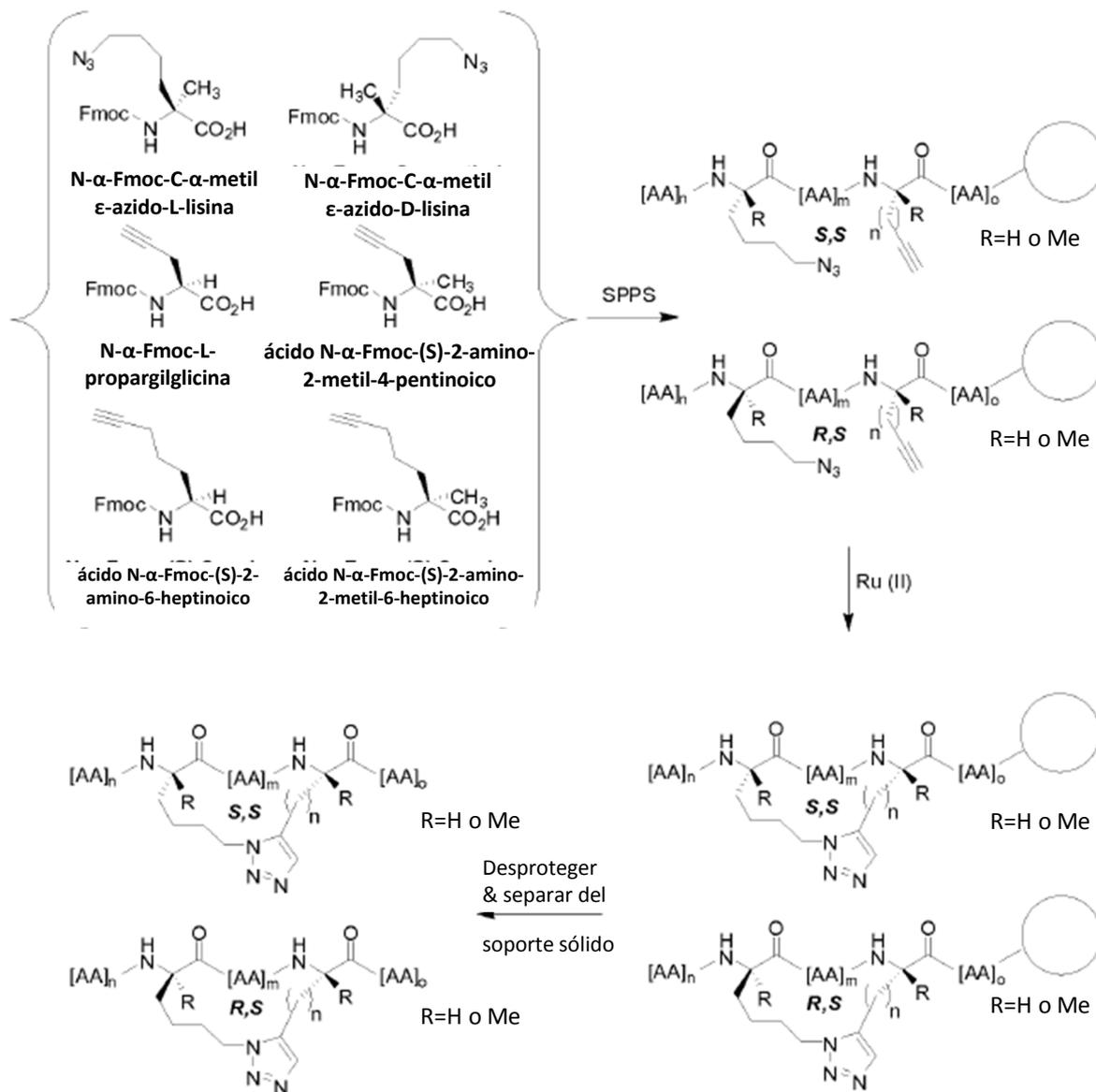
En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos que se muestran en el Esquema de síntesis 3, el precursor peptidomimético contiene un resto azida y un resto alquino y se sintetiza por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N- α -Fmoc-L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas con N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se hace reaccionar con un reactivo tal como un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Cu (I) en la resina como una mezcla en bruto (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tomoe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Purma *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). El macrociclo peptidomimético que contiene triazol resultante se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en condiciones estándar (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl, DMF, THF, NMP, DIPEA, 2,6-lutidina, piridina, DMSO, H₂O o una mezcla de los mismos. La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un tampón acuoso o un disolvente parcialmente acuoso.

Esquema de síntesis 4:



En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos mostrado en el Esquema de síntesis 4, el precursor peptidomimético contiene un resto azida y un resto alquino y se sintetiza por síntesis de péptidos en fase de disolución o en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido disponible en el mercado N- α -Fmoc-L-propargilglicina y las formas protegidas con N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, N-metil- ϵ -azido-L-lisina, y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se desprotege a continuación y se separa de la resina en fase sólida en condiciones estándares (por ejemplo, ácido fuerte tal como TFA al 95%). El precursor peptidomimético se hace reaccionar como una mezcla en bruto o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como reactivos de Ru (II), por ejemplo Cp^{*}RuCl (PPh₃)₂ o [Cp^{*}RuCl]₄ (Rasmussen *et al.* (2007), *Org. Lett.* 9:5337-5339; Zhang *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en DMF, CH₃CN y THF.

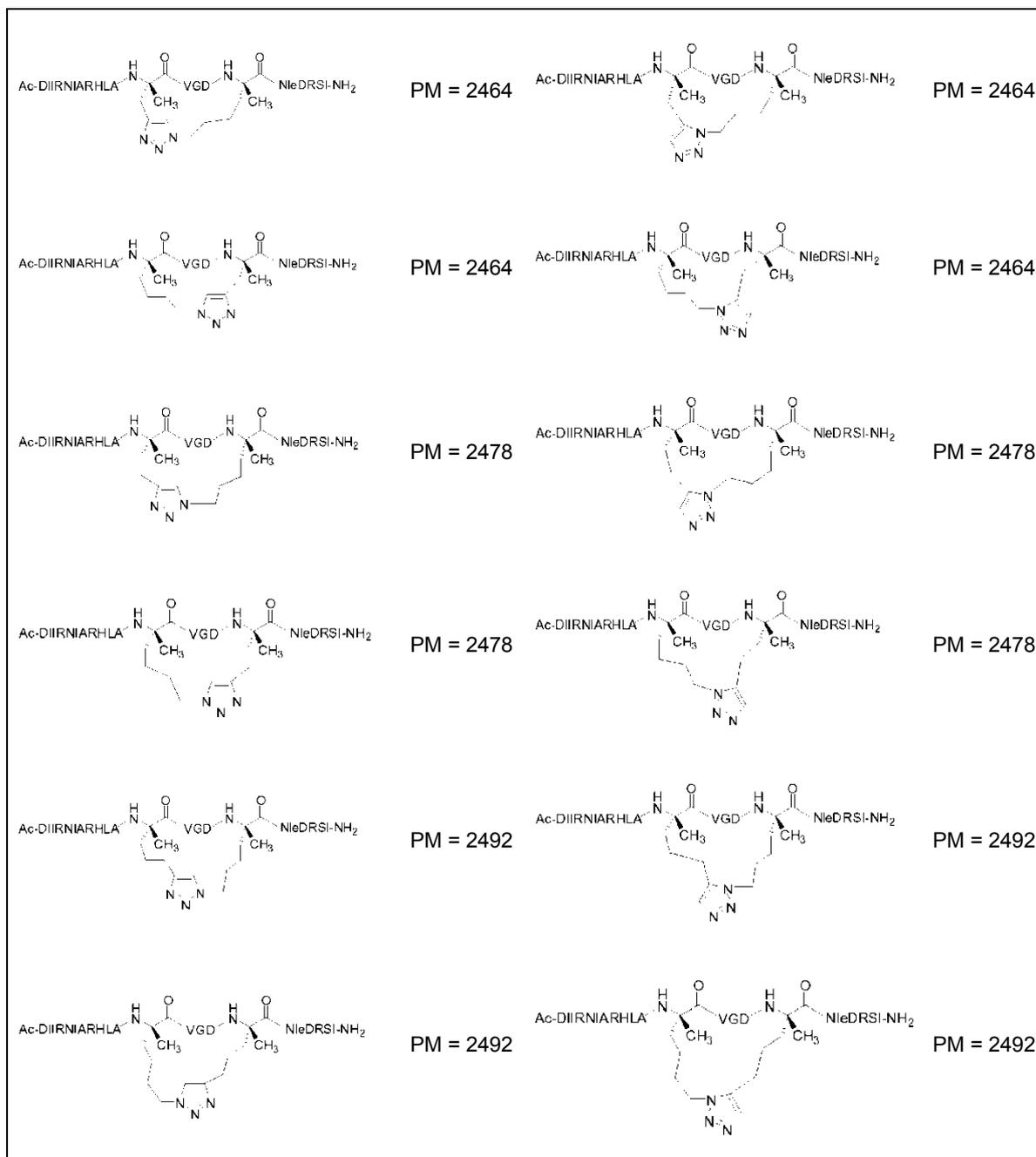
Esquema de síntesis 5:



En el procedimiento general para la síntesis de macrociclos peptidomiméticos mostrado en el Esquema de síntesis 5, el precursor peptidomimético contiene un resto azida y un resto alquino y se sintetiza por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando el aminoácido N- α -Fmoc-L-propargilglicina disponible en el mercado y las formas protegidas con N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se hace reaccionar con un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Ru (II) en la resina como una mezcla en bruto. Por ejemplo, el reactivo puede ser Cp* $RuCl(PPh_3)_2$ o [Cp* $RuCl$] $_4$ (Rasmussen *et al.* (2007), *Org. Lett.* 9:5337-5339; Zhang *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). La etapa de macrociclación se puede llevar a cabo en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en CH_2Cl_2 , $CICH_2CH_2Cl$, CH_3CN , DMF y THF.

En la Tabla 5 se muestran a título de ejemplo varios macrociclos peptidomiméticos. Para estos macrociclos, un polipéptido no macrocíclico correspondiente es el fragmento DIIRNIARHLAQVGDMSDRSI de secuencia del polipéptido BID BH3. "Nie" representa norleucina y sustituye a un resto de metionina. Se prevé que los enlazadores similares se utilizan para sintetizar macrociclos peptidomiméticos basados en las secuencias de polipéptidos descritos en la Tabla 1 a la Tabla 4.

TABLA 5



La Tabla 5 muestra ejemplos de macrociclos peptidomiméticos de la invención. "Nle" representa norleucina.

Análogos de aminoácido

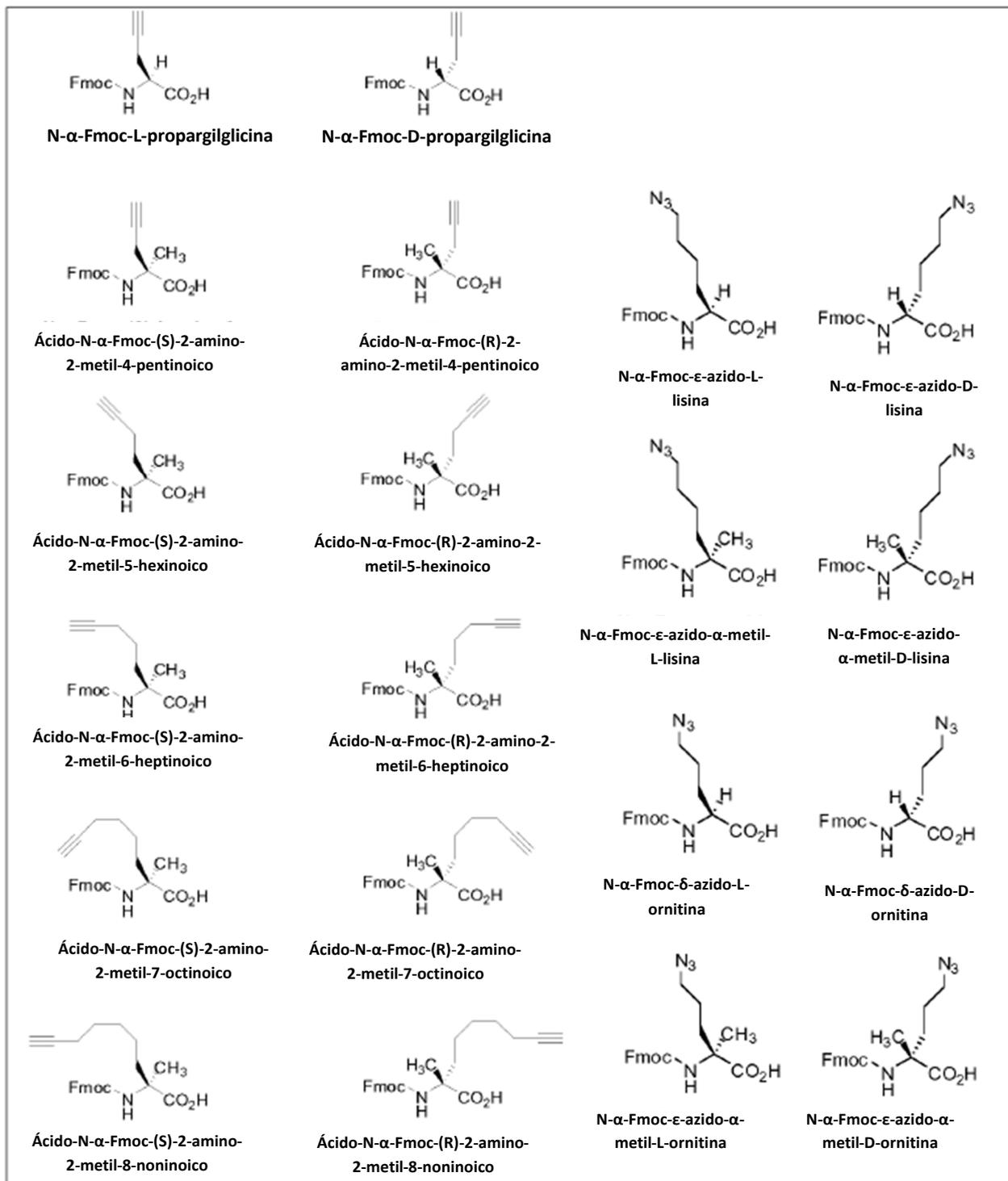
5 En la presente memoria se describe la utilización de aminoácidos y análogos de aminoácido no naturales en la síntesis de los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria. Cualquier aminoácido o análogo de aminoácido susceptible de los procedimientos sintéticos empleados para la síntesis de triazol estable que contiene macrociclos peptidomiméticos se puede utilizar en dichos usos. Por ejemplo, L-propargilglicina se contempla como un aminoácido útil en la presente invención. Sin embargo, también son útiles otros aminoácidos que contienen alquino que contienen una cadena lateral diferente de aminoácidos. Por ejemplo, L-propargilglicina contiene una

10 unidad de metileno entre el carbono α del aminoácido y el alquino de la cadena lateral del aminoácido. También se describe la utilización de aminoácidos con múltiples unidades de metileno entre el carbono α y el alquino. Además, los análogos azido de los aminoácidos L-lisina, D-lisina, α -metil-L-lisina, y α -metil-D-lisina, se contemplan como aminoácidos útiles. Sin embargo, otros aminoácidos con azida terminal que contienen una diferente cadena lateral de aminoácidos son también útiles. Por ejemplo, el análogo azido de L-lisina contiene cuatro unidades de metileno

15 entre el carbono α del aminoácido y la azida terminal de la cadena lateral de aminoácidos. También se contempla la

utilización de aminoácidos con menos de o más de cuatro unidades de metileno entre el carbono α y la azida terminal. La tabla 6 muestra algunos aminoácidos útiles en la preparación de macrociclos peptidomiméticos.

TABLA 6



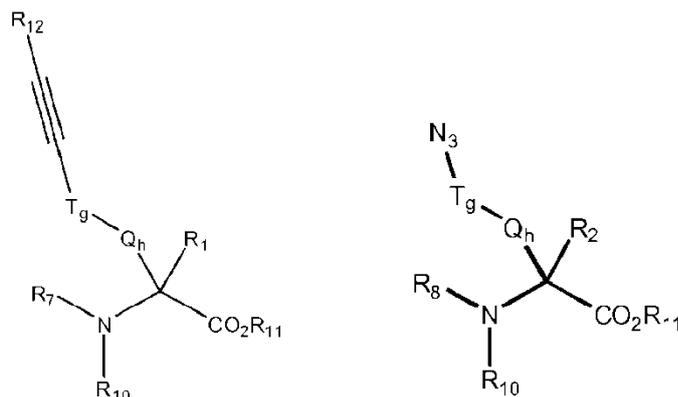
5 La Tabla 6 muestra ejemplos de aminoácidos útiles en la preparación de macrociclos peptidomiméticos de la invención.

En algunos casos, los aminoácidos y análogos de aminoácido presentan la configuración D. En otros casos presentan la configuración L. En algunos casos, algunos de los aminoácidos y análogos de aminoácido contenidos en el peptidomimético presentan la configuración D, mientras que algunos de los aminoácidos y análogos de

aminoácido presentan la configuración L. En algunos casos, los análogos de aminoácido están disustituídos en α,α , tales como α -metil-L-propargilglicina, α -metil-D-propargilglicina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina y ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina. En algunos casos, los análogos de aminoácido están alquilados en el N, por ejemplo, N-metil-L-propargilglicina, N-metil-D-propargilglicina, N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina.

- 5 En algunos casos, el resto NH del aminoácido está protegido con un grupo protector, incluyendo, sin limitación -Fmoc y Boc-. En otros casos, el aminoácido no está protegido antes de la síntesis del macrociclo peptidomimético.

La invención proporciona un aminoácido útil en la síntesis de macrociclos peptidomiméticos de la descripción. Así, la invención proporciona un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



- 10 en las que

R_1 y R_2 son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;

cada Q_h y T_g es independientemente alquilenilo;

- 15

R_7 y R_8 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

R_{10} y R_{11} son -H

R_{12} es -H o alquilo; y

g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. En otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula IIb y R_2 es alquilo, no sustituido o sustituido con halógeno. Aún en otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula IIa y R_1 es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R_1 puede ser metilo. Aún en otras realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula IIb y R_2 es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R_2 puede ser metilo.

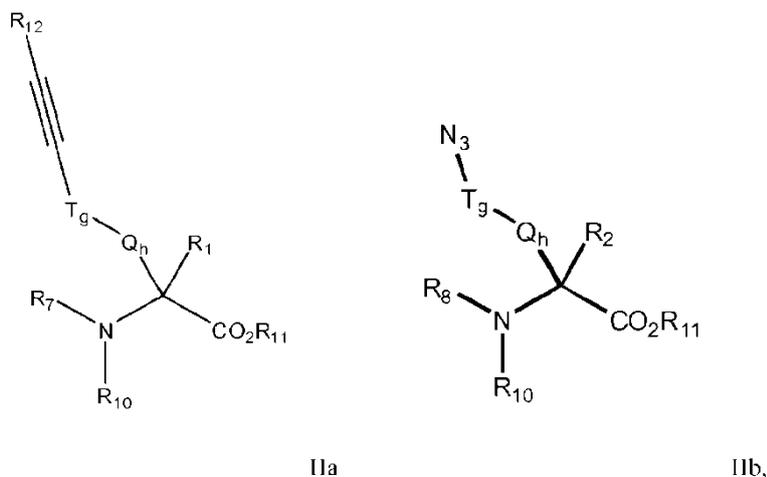
25 **Kits**

En otro aspecto, la presente invención proporciona además kits que comprenden compuestos de fórmulas IIa o IIb de la invención junto con reactivos de macrociclación como se describe en esta memoria.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende:

- a) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de Fórmulas IIa y IIb:

- 30



en las que

R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;

5 Q_h y T_g es cada uno independientemente alquileno;

R₇ y R₈ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;

R₁₀ y R₁₁ son -H

R₁₂ es -H o alquilo; y

10 g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5; y

b) un reactivo de macrociclación.

En algunas realizaciones, el kit comprende un compuesto de fórmula IIa y R₁ es alquilo no sustituido, o sustituido con halógeno. En las realizaciones relacionadas, R₁ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₁ puede ser metilo. En otras realizaciones, el kit comprende un compuesto de fórmula IIb y R₂ es alquilo no sustituido, o sustituido por halógeno. En realizaciones relacionadas, R₂ es alquilo no sustituido. Por ejemplo, R₂ puede ser metilo.

En algunas realizaciones, un kit comprende por lo menos un compuesto de fórmula IIa y por lo menos un compuesto de Fórmula IIb. En realizaciones específicas del kit de la invención, el reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu o un reactivo de Ru. En algunas realizaciones, el kit contiene un gran número de compuestos de fórmula IIa y/o fórmula IIb. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más análogos de aminoácido tal como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más reactivos de macrociclación como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, el kit comprende uno o más recipientes que contienen uno o más análogos de aminoácido tal como se describe en la presente memoria, así como uno o más recipientes que contienen uno o más reactivos de macrociclación como se describe en la presente memoria.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que contiene al menos dos análogos de aminoácido, como se describió anteriormente, teniendo al menos uno un alquino de cadena lateral y teniendo al menos uno un resto azida en el terminal de la cadena lateral, el análogo de aminoácido opcionalmente protegido y adecuado para las síntesis descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el análogo de aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico ácido, ε-azido-α-metil-L-lisina y ε-azido-α-metil-D-lisina, δ-azido-α-metil-L-ornitina, y δ-azido-α-metil-D-ornitina y todas las formas adecuadamente protegidas para la síntesis de péptidos en fase líquida o sólida.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que contiene al menos un aminoácido no natural, o análogo de aminoácido, unido a un soporte sólido compatible con las síntesis descritas en la presente memoria para macrociclos peptidomiméticos. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que contiene un análogo de aminoácido de la invención que incluye un resto alquino terminal en combinación con un recipiente que contiene un análogo de aminoácido de la invención que incluye un resto azida terminal en combinación con un reactivo de macrociclación de la invención.

Ensayos

Las propiedades de los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria se ensayan, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos a continuación. El macrociclo puede tener propiedades mejoradas en relación con un correspondiente polipéptido no macrocíclico. Un polipéptido no macrocíclico correspondiente es, por ejemplo, un precursor de un macrociclo peptidomimético, tal como un compuesto de fórmula III o IV, que se convierte en dicho macrociclo. Alternativamente, un polipéptido no macrocíclico correspondiente es una secuencia de polipéptido, tal como una secuencia de polipéptido natural que tiene una superposición sustancial de secuencia con el macrociclo descrito en esta memoria. Numerosos ejemplos de polipéptidos naturales que corresponden con el polipéptido macrocíclico se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

En general, un polipéptido no macrocíclico correspondiente puede ser también un polipéptido natural o precursor peptidomimético marcado. Dicho marcaje, por ejemplo, mediante marcaje fluorescente o radioactivo, se utiliza si es necesario en algunos de los ensayos descritos a continuación. En dichos ensayos, tanto el macrociclo como el correspondiente polipéptido no macrocíclico por lo general se marcan por procedimientos similares o funcionalmente equivalentes.

15 Ensayo para determinar helicidad α

En disolución, la estructura secundaria de polipéptidos con dominios α -helicoidales alcanzará un equilibrio dinámico entre las estructuras en espiral aleatoria y las estructuras α -helicoidales, expresado a menudo como "helicidad por ciento". Así, por ejemplo, los dominios BH3 proapoptóticos no modificados son espirales principalmente aleatorias en disolución, con contenido α -helicoidal generalmente inferior al 25%. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados, por otro lado, poseen, por ejemplo, una helicidad alfa que es por lo menos dos veces mayor que la de un polipéptido no macrocíclico correspondiente. Los macrociclos pueden poseer una alfa-helicidad mayor del 50%. Para someter a ensayo la helicidad de los macrociclos peptidomiméticos, tales como los macrociclos basados en el dominio BH3, los compuestos se disuelven en una disolución acuosa (por ejemplo, disolución 50 mM de fosfato de potasio a pH 7, o H₂O destilada, a concentraciones de 25-50 mM). Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) utilizando parámetros estándar de medición (por ejemplo, temperatura 20°C; longitud de onda, 190-260 nm; resolución de etapa, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 seg; anchura de banda, 1 nm; longitud de trayectoria, 0,1 cm). El contenido de hélice α de cada péptido se calcula dividiendo la elipticidad media residual (por ejemplo, $[\Phi]_{222}$ obs) por el valor señalado para un decapeptido de modelo helicoidal (Yang *et al.* (1986), *Methods Enzymol.* 130:208).

30 Ensayo para determinar la temperatura de fusión (T_m)

Un macrociclo peptidomimético que comprende una estructura secundaria tal como una hélice α , presenta, por ejemplo, una temperatura de fusión superior que un polipéptido no macrocíclico correspondiente. Por lo general los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria presentan una T_m > 60°C lo que representa una estructura muy estable en disoluciones acuosas. Para ensayar el efecto de la formación de macrociclos sobre la temperatura de fusión, macrociclos peptidomiméticos o péptidos no modificados se disuelven en H₂O destilada (por ejemplo, a una concentración final de 50 mM) y la T_m se determina midiendo el cambio en la elipticidad en un intervalo de temperatura (por ejemplo, 4 a 95°C) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) utilizando parámetros estándar (por ejemplo, longitud de onda de 222 nm; resolución de la etapa, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; anchura de banda, 1 nm, ritmo de aumento de la temperatura: 1°C/min; longitud del trayectoria, 0,1 cm).

Ensayo de resistencia a la proteasa

El enlace amídico de la cadena principal del péptido es sensible a la hidrólisis por las proteasas, haciendo de este modo vulnerables los compuestos peptídicos a una rápida degradación *in vivo*. La formación de la hélice peptídica, sin embargo, por lo general oculta la cadena principal de la amida y por lo tanto puede protegerla de la escisión proteolítica. Los macrociclos peptidomiméticos pueden someterse a proteólisis con tripsina *in vitro* para evaluar cualquier cambio en la velocidad de degradación en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético y un polipéptido no macrocíclico correspondiente se incuban con tripsina agarosa y las reacciones se inactivan en varios momentos por centrifugación y posterior inyección de HPLC para cuantificar el sustrato residual por absorción ultravioleta a 280 nm. En resumen, el macrociclo peptidomimético y precursor peptidomimético (5 mcg) se incuban con tripsina agarosa (Pierce) (S/E ~ 125) durante 0, 10, 20, 90 y 180 minutos. Las reacciones se inactivan por centrifugación de sobremesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se cuantifica por detección del pico a 280 nm por HPLC. La reacción proteolítica muestra una cinética de primer orden y la constante de velocidad, k, se determina a partir de un gráfico de ln[s] frente al tiempo (k = -1Xpendiente).

55 Ensayo de estabilidad *ex vivo*

Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen por ejemplo, una vida media *ex vivo* que es por lo menos dos veces mayor que la de un péptido de polipéptido no macrocíclico correspondiente y poseen una

vida media *ex vivo* de 12 horas o más. Para estudios de estabilidad en suero *ex vivo*, pueden utilizarse varios ensayos. Por ejemplo, un macrociclo peptidomimético y un polipéptido no macrocíclico correspondiente (en un ejemplo específico, el polipéptido natural correspondiente) (2 mcg) se incuban con suero reciente de ratón, de rata y/o humano (2 ml) a 37°C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Para determinar el nivel de compuesto intacto, puede utilizarse el procedimiento siguiente: Las muestras se extraen transfiriendo 100 µl de sueros a tubos de 2 ml de centrifuga seguido de la adición de 10 µl de ácido fórmico al 50% y 500 µl de acetonitrilo y centrifugación a 14.000 RPM durante 10 min a 4 ± 2°C. Los sobrenadantes se transfieren a continuación a tubos de 2 ml recientes y se evaporan en TurboVap bajo N₂ < 10 psi, 37°C. Las muestras se redisuelven en 100 µl de acetonitrilo:agua 50:50 y se someten a análisis de LC-MS/MS.

10 Ensayos de unión *in vitro*

Para evaluar la unión y afinidad de los macrociclos peptidomiméticos y precursores peptidomiméticos a proteínas receptoras, se utiliza, por ejemplo, un ensayo de polarización fluorescente (FPA). La técnica de FPA mide la orientación molecular y movilidad utilizando luz polarizada y marcador fluorescente. Cuando se excita con luz polarizada, trazadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares aparentes altos (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades más lentas de rotación en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en disolución).

Por ejemplo, macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados (25 nM) se incubaron con la proteína receptora (25-1000 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de unión se mide, por ejemplo, por polarización fluorescente en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar por análisis de regresión no lineal utilizando, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Un macrociclo peptidomimético descrito en esta memoria muestra, en algunos casos, una K_d similar o menor que el polipéptido no macrocíclico correspondiente.

Las proteínas receptoras de péptidos BH3 tales como BCL-2, BCL-X_L, BAX o MCL1 pueden utilizarse, por ejemplo, en este ensayo. Las proteínas receptoras para los péptidos p53, tales como MDM2 o MDMX también se pueden utilizar en este ensayo.

Ensayos de desplazamiento *in vitro* para caracterizar los antagonistas de las interacciones péptido-proteína

Para evaluar la unión y afinidad de los compuestos que antagonizan la interacción entre un péptido (por ejemplo, un péptido BH3 o un péptido p53) y una proteína receptora, se utiliza, por ejemplo, un ensayo de polarización fluorescente (FPA) que utiliza un macrociclo peptidomimético fluoresceinado procedente de una secuencia precursora peptidomimética. La técnica de FPA mide la orientación molecular y movilidad utilizando luz polarizada y marcador fluorescente. Cuando se excita con luz polarizada, trazadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con altos pesos moleculares aparentes (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades más lentas de rotación en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en disolución). Un compuesto que antagoniza la interacción entre el macrociclo peptidomimético fluoresceinado y una proteína receptora se detectará en un experimento de FPA de unión competitiva.

Por ejemplo, los presuntos compuestos antagonistas (1 nM a 1 mM) y un macrociclo peptidomimético fluoresceinado (25 nM) se incubaron con la proteína receptora (50 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad antagonista de unión se mide, por ejemplo, por la polarización fluorescente en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar por análisis de regresión no lineal utilizando, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Cualquier clase de molécula, tales como pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, oligonucleótidos o proteínas pueden examinarse como supuestos antagonistas en este ensayo. Las proteínas receptoras de péptidos BH3 tales como BCL2, BCL-X_L, BAX o MCL1 se pueden utilizar en este ensayo. Las proteínas receptoras para los péptidos p53, tales como MDM2 o MDMX se puede utilizar en este ensayo.

50 Ensayos de unión en células intactas

Es posible medir la unión de péptidos o peptidomiméticos macrociclos a sus receptores naturales en células intactas por experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, se incuban células intactas con compuestos fluoresceinados (marcados con FITC) de 4 horas en ausencia de suero, seguido de sustitución de suero y posterior incubación que oscila entre 4 y 18 horas. Después las células se sedimentan y se incuban en tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, CHAPS al 1% y mezcla inhibidora de proteasa) durante 10 minutos a 4°C. Los extractos se centrifugan a 14.000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se recogen y se incuban con 10 µl de anticuerpo anti-FITC de cabra durante 2 horas en rotación a 4°C seguido de 2 horas más de incubación a 4°C con proteína A/G

Sepharose (50 µl de suspensión de perlas al 50%). Después de centrifugación rápida, los gránulos se lavan en tampón de lisis que contiene concentraciones crecientes de sal (por ejemplo, 150, 300, 500 mM). Las perlas se reequilibrán a continuación en NaCl 150 mM antes de la adición de tampón de muestra que contenía SDS y ebullición. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se someten opcionalmente a electroforesis utilizando geles Bis-Tris en gradiente 4% -12% seguido de la transferencia a membranas Immobilon-P. Después del bloqueo, las inmunotransferencias se incuban opcionalmente con un anticuerpo que detecta FITC y también con uno o más anticuerpos que detectan las proteínas que se unen al macrociclo peptidomimético, incluyendo BCL2, MCL1, BCL-XL, A1, BAX, BAK, MDM2 o MDMX.

Ensayos de permeabilidad celular

Un macrociclo peptidomimético es, por ejemplo, más permeable a las células en comparación con el correspondiente polipéptido no macrocíclico. Los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria pueden ser más permeables a las células que los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, permeabilidad celular que es al menos dos veces mayor que el correspondiente polipéptido no macrocíclico, y a menudo 20% o más del péptido aplicado se observará que han penetrado en la célula después de 4 horas. Para medir la permeabilidad celular de los macrociclos peptidomiméticos y de los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes, las células intactas se incuban con macrociclos peptidomiméticos fluorescentes o los polipéptidos no macrocíclicos correspondientes (10 µM) durante 4 horas en medio exento de suero a 37°C, se lavan dos veces con medio y se incuban con tripsina (0,25%) durante 10 min a 37°C. Las células se lavan de nuevo y se vuelven a poner en suspensión en PBS. La fluorescencia celular se analiza, por ejemplo, utilizando ya sea un citómetro de flujo FACSCalibur o el lector KineticScan HCS® de Cellomics.

Ensayos de eficacia celular

La eficacia de determinados macrociclos peptidomiméticos se determina, por ejemplo, en ensayos de destrucción celular utilizando varias estirpes de células tumorígenas y no tumorígenas y células primarias procedentes de poblaciones de células humanas o de ratón. La viabilidad celular se controla, por ejemplo, más de 24 a 96 horas de incubación con macrociclos peptidomiméticos (0,5 a 50 µM) para identificar los que matan a EC50 <10 µM. Varios ensayos estándar que miden la viabilidad celular medida están disponibles en el mercado y se utilizan opcionalmente para evaluar la eficacia de los macrociclos peptidomiméticos. Además, ensayos que miden la activación de anexina V y la caspasa se utilizan opcionalmente para evaluar si los macrociclos peptidomiméticos destruirán las células al activar el sistema apoptótico.

Ensayo de estabilidad *in vivo*

Para investigar la estabilidad *in vivo* de los macrociclos peptidomiméticos, los compuestos se administran, por ejemplo, a ratones y/o ratas por vía IV, IP, PO o inhalación en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 50 mg/kg y muestras de sangre extraídas a 0', 5', 15', 30', 1 h, 4 h, 8 h y 24 horas después de la inyección. Las concentraciones de compuesto intacto en 25 µl de suero reciente se miden entonces por LC-MS/MS como anteriormente.

Eficacia *in vivo* en modelos animales

Para determinar la actividad antioncogénica de macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria *in vivo*, los compuestos se administran, por ejemplo, solos (por las vías IP, IV, PO, por inhalación o nasal) o en combinación con dosis subóptimas de quimioterapia aplicable (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido). En un ejemplo, 5 x 10⁶ RS4; 11 células (creadas en la médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) que expresa de forma estable la luciferasa se inyectan por vena caudal en ratones NOD-SCID 3 horas después de haber sido sometidos a irradiación corporal total. Si no se trata, esta forma de leucemia es mortal en 3 semanas en este modelo. La leucemia se controla fácilmente, por ejemplo, inyectando a los ratones D-luciferina (60 mg/kg) y diagnosticando por la imagen los animales anestesiados (por ejemplo, Sistema de diagnóstico por la imagen Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La bioluminiscencia corporal total se cuantifica por integración del flujo fotónico (fotones/s) por Living Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los macrociclos peptidomiméticos solos o combinados con dosis subóptimas de agentes quimioterapéuticos aplicables se administran, por ejemplo, a ratones leucémicos (10 días después de la inyección/día 1 de experimento, en el intervalo de bioluminiscencia 14-16) por la vena caudal o por vía IP a dosis que oscilan de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg durante 7 a 21 días. Opcionalmente, se diagnostica por la imagen a los ratones durante el experimento cada dos días y la supervivencia controla diariamente durante el experimento. Los ratones fallecidos se someten opcionalmente a necropsia al final del experimento. Otro modelo animal es la implantación en ratones NOD-SCID de DoHH2, una estirpe celular procedente de un linfoma folicular humano, que expresa de forma estable la luciferasa. Estos ensayos *in vivo*, generan opcionalmente datos preliminares farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos.

Ensayos clínicos

Para determinar la idoneidad de los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria para el tratamiento de seres humanos, se realizan ensayos clínicos. Por ejemplo, los pacientes diagnosticados de cáncer y necesitados de tratamiento se seleccionan y se separan en el tratamiento y uno o más grupos de referencia, en el que se administra al grupo de tratamiento un macrociclo peptidomimético descrito en esta memoria, mientras que los grupos de referencia reciben un placebo o un fármaco contra el cáncer conocido. La seguridad y eficacia del tratamiento de los macrociclos peptidomiméticos de la invención pueden así evaluarse realizando comparaciones de los grupos de pacientes con respecto a factores tales como la supervivencia y la calidad de vida. En este ejemplo, el grupo de pacientes tratados con un macrociclo peptidomimético muestran mejor supervivencia a largo plazo en comparación con un grupo de referencia de pacientes tratados con un placebo.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria también incluyen derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Un "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de un éster, profármaco u otro derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente memoria. Los derivados farmacéuticamente aceptables especialmente favorecidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la invención cuando se administran a un mamífero (por ejemplo, al aumentar la absorción en la sangre de un compuesto administrado por vía oral) o que aumenta el suministro del compuesto activo a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con relación a la especie progenitora. Algunos derivados farmacéuticamente aceptables incluyen un grupo químico que aumenta la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la mucosa gastrointestinal.

Los macrociclos peptidomiméticos descritos en esta memoria pueden ser modificados mediante enlace covalente o no covalente uniendo grupos funcionales apropiados para mejorar propiedades biológicas selectivas. Dichas modificaciones incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyección, alteran el metabolismo y alteran la velocidad de excreción.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales de ácidos adecuados incluyen acetato, adipato, benzoato, bencensulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, lactato, maleato, malonato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales procedentes de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquilo)₄⁺.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos en esta memoria, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen portadores sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias, que también actúa como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregadores de comprimidos, o un material encapsulador. Los detalles sobre técnicas para la formulación y administración están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co., Easton PA.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido, que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido en comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

Los excipientes sólidos adecuados son cargas de carbohidratos o proteínas e incluyen, pero no se limitan a azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas incluyendo arábica y de tragacanto; así como proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se añaden agentes disgregadores o disolventes, tales como la polividona reticulada, agar-agar, ácido alginico, o una sal de los mismos, tal como alginato sódico.

Las preparaciones en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, disoluciones acuosas o de agua/propilenglicol. Para inyectables parenterales, pueden formularse preparaciones líquidas en disolución acuosa de polietilenglicol.

La preparación farmacéutica está preferentemente en forma de dosis unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. También, la forma de dosificación unitaria puede

ser una cápsula, comprimido, sello o la propia pastilla, o puede ser un número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada.

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

Usos médicos

10 La descripción proporciona macrociclos peptidomiméticos que son útiles en ensayos de unión competitiva para identificar agentes que se unen a ligando(s) natural(es) de las proteínas o péptidos en los que se modelan los macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, en el sistema p53 MDM2, se utilizan macrociclos peptidomiméticos estabilizados marcados basados en el p53 en un ensayo de unión de MDM2 junto con pequeñas moléculas que se unen competitivamente a MDM2. Los estudios de unión competitiva permitir una rápida evaluación *in vitro* y la
15 determinación de los fármacos experimentales específicos para el sistema p53/MDM2. Asimismo en el sistema antiapoptótico BH3/BCL-X_L los macrociclos peptidomiméticos marcados basado en BH3 se pueden utilizar en un ensayo de unión de BCL-X_L junto con pequeñas moléculas que se unen competitivamente a BCL-X_L. Los estudios de unión competitiva permiten una rápida evaluación *in vitro* y la determinación de fármacos candidatos específicos para el sistema BH3/BCL-X_L. La descripción proporciona además la generación de anticuerpos contra los
20 macrociclos peptidomiméticos. Estos anticuerpos se pueden unir específicamente tanto al macrociclo peptidomimético como a los precursores peptidomiméticos p53 o BH3 de los que proceden los macrociclos peptidomiméticos. Dichos anticuerpos, por ejemplo, alteran los sistemas p53/MDM2 o BH3/BCL-X_L, respectivamente.

25 La presente descripción proporciona usos médicos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un paciente en situación de riesgo de (o sensible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante (por ejemplo, insuficiente o excesiva) de miembro de la familia BCL-2 (por ejemplo, anomalías de la ruta apoptótica extrínseca o intrínseca). Se cree que algunos trastornos de tipo BCL-2 son producidos, al menos en parte, por un nivel anormal de uno o más miembros de la familia BCL-2 (por ejemplo, sobre o bajo expresión) o por
30 la presencia de uno o más miembros de la familia BCL-2 que presentan una actividad anormal. Como tal, se utiliza la reducción en el nivel y/o actividad del miembro de familia BCL-2 o el aumento del nivel y/o de actividad del miembro de la familia BCL-2, por ejemplo, para mejorar o reducir los síntomas adversos del trastorno.

La presente descripción proporciona usos médicos para tratar o prevenir enfermedades hiperproliferantes al interferir con la interacción o unión entre p53 y MDM2 en las células tumorales. Estos usos comprenden administrar una
35 cantidad eficaz de un compuesto a un animal de sangre caliente, incluyendo un ser humano, o a las células tumorales que contienen p53 natural. La administración de los compuestos puede provocar la interrupción del crecimiento celular o apoptosis. Los compuestos descritos en esta memoria se pueden utilizar para tratar una enfermedad y/o células tumorales que comprenden concentraciones elevadas de MDM2. Las concentraciones elevadas de MDM2 como las utilizadas en la presente memoria se refiere a concentraciones de MDM2 mayores que los encontrados en las células que contienen más del número normal de copias (2) de mdm2 o por encima de
40 aproximadamente 10.000 moléculas de MDM2 por célula, medidas por ELISA y ensayos similares (Picksley *et al.* (1994), Oncogene 9, 2523 2529).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente, que padece una enfermedad, un síntoma de la enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

Los macrociclos peptidomiméticos se pueden utilizar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Como se utiliza en la presente memoria, los términos "cáncer", "hiperproliferante" y "neoplásica" se refieren a células que tienen capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal
50 caracterizado por el rápido crecimiento celular proliferante. Las enfermedades hiperproliferantes y neoplásicas pueden clasificarse como patológicas, es decir, caracterizando o constituyendo una enfermedad, o pueden clasificarse como no patológicas, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada a una enfermedad. El término se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo
55 histopatológico o etapa de invasión. Un tumor metastático puede surgir de un gran número de tipos de tumores primarios, incluyendo pero sin limitarse a los de mama, pulmón, hígado, colon y ovario. Las células "hiperproliferantes patológicas" se producen en enfermedades caracterizadas por el crecimiento del tumor maligno. Ejemplos de células hiperproliferantes no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas a la reparación de heridas. Ejemplos de trastornos celulares proliferantes y/o diferenciadores incluyen el cáncer, por ejemplo,
60 carcinoma, sarcoma o trastornos metastásicos. En algunas realizaciones, los macrociclos peptidomiméticos son

nuevos agentes terapéuticos para el control del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de dichos cánceres y similares.

5 Los 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, liomiosarcoma, 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 cerebral, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sebáceas, papilar carcinoma, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, 10 seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer testicular, carcinoma microcítico pulmonar, carcinoma no microcítico pulmonar, 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.

15 Ejemplos de trastornos proliferantes incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, derivados de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Preferentemente, las enfermedades se derivan de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Otros 20 trastornos mieloides a título de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC) (examinada en Vaickus (1991), Crit. Rev. Oncol./Hemotol. 11:267-97); los cánceres linfoides incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), tricolecemia (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Otras formas de linfomas malignos incluyen, pero 25 no se limitan a linfoma no hodgkiniano y variantes del mismo, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATL), linfoma de linfocitos T cutáneos (LCTC), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Stemberg.

30 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores de mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de mama proliferante, incluyendo, por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante y papilomas ductales pequeños; tumores, por ejemplo, tumores de estroma tal como fibroadenomas, tumor filoides y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma ductal grande; carcinoma de mama incluyendo carcinoma (no invasor) in situ, que incluye carcinoma canalicular in situ (incluyendo la enfermedad de Paget) y el carcinoma lobular in situ, y carcinoma invasor (infiltrante) que incluye, pero no se limita a, carcinoma canalicular invasor, carcinoma lobular 35 invasor, carcinoma medular, carcinoma coloide (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasor, y diversos tumores malignos. Los trastornos en la mama masculina incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

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

Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores del colon incluyen, pero no se limitan a, pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes familiares, carcinogénesis colorrectal, carcinoma, colorrectal y tumores 45 carcinoides.

50 Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores del hígado incluyen, pero no se limitan a, las hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, incluyendo el carcinoma primario, del hígado y tumores metastásicos.

Ejemplos de trastornos proliferantes celulares y/o diferenciadores 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, cistoadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales 55 superficiales, tumores de células germinativas, tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor del seno endodérmico, coriocarcinoma, tumores del estroma del cordón sexual tales como, tumores de células tecales granulosa, los comafibromas, androblastomas, tumores de células enfermas y gonadoblastoma; y tumores metastásicos, tales como tumores de Krukenberg.

60 Los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades caracterizadas por la muerte celular hiperactiva o la muerte celular debido a un ataque fisiológico, etc. Algunos ejemplos de estados caracterizados por la muerte celular prematura o no deseada son o incluyen la proliferación celular alternativamente no deseada o excesiva, pero no se limitan a enfermedades hipocelulares/hipoplásicas, acelulares/aplásicas o hiper celulares/hiperplásicas. Algunos ejemplos incluyen trastornos

hematológicos que incluyen, pero no se limitan a anemia de Fanconi, anemia aplásica, talasemia, neutropenia congénita o mielodisplasia.

Los macrociclos peptidomiméticos que actúan para disminuir la apoptosis se pueden utilizar para tratar trastornos asociados a un nivel indeseable de muerte celular. Así, los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos se pueden utilizar en el tratamiento de trastornos tales como las que conducen a la muerte celular asociada con la infección vital, por ejemplo, infección asociada a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Una amplia variedad de enfermedades neurológicas se caracterizan por la pérdida gradual de conjuntos específicos de neuronas, y los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos de la invención se utilizan, 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 medular, y varias formas de degeneración cerebelar. La pérdida de células en estas enfermedades no provoca una respuesta inflamatoria, y la apoptosis parece ser el mecanismo de la muerte celular. Además, un número de enfermedades hematológicas están asociadas a una disminución de la producción de células sanguíneas. Estos trastornos incluyen la anemia asociada a enfermedad crónica, anemia aplásica, neutropenia crónica y síndromes mielodisplásicos. Los trastornos de la producción de células sanguíneas, tales como síndrome mielodisplásico y algunas formas de anemia aplásica, se asocian al aumento de la muerte celular por apoptosis en la médula ósea. Estos trastornos podrían proceder de la activación de genes que estimulan la apoptosis, deficiencias adquiridas en células de estroma o factores hematopoyéticos de supervivencia, o los efectos directos de toxinas y mediadores de respuestas inmunitarias. Dos trastornos comunes asociados a la muerte celular son los infartos de miocardio y la embolia cerebral. En ambos trastornos, las células dentro de la zona central de la isquemia, que se produce en caso de pérdida aguda de circulación sanguínea, parecen morir rápidamente como resultado de la necrosis. Sin embargo, fuera de la zona isquémica central, las células mueren en un período de tiempo más prolongado y morfológicamente parecen morir por apoptosis. En otras o más realizaciones, los macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos de la invención se utilizan para tratar todos estos trastornos asociados con la muerte celular indeseable.

Algunos ejemplos de trastornos inmunológicos que se tratan con los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a rechazo de trasplante de órganos, artritis, lupus, IBD, enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple, diabetes, etc.

Algunos ejemplos de trastornos neurológicos que se tratan con los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria incluyen pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, amiloidosis con hemorragia cerebral hereditaria de tipo holandés. La amiloidosis reactiva, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático; mieloma asociado a macroglobulinemia, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar, amiloidosis cardíaca aislada, amiloidosis senil generalizada, diabetes del adulto, insulinooma, amiloidosis auricular aislada, carcinoma medular de la tiroides, amiloidosis familiar, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, polineuropatía amiloidótica familiar, encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Gerstmann-Strausler-Scheinker, encefalopatía espongiiforme bovina, una enfermedad mediada por priones y la enfermedad de Huntington.

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

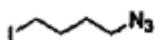
Los ejemplos de trastornos cardiovasculares (por ejemplo, trastornos inflamatorios) que se tratan o previenen con los macrociclos peptidomiméticos incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, infarto de miocardio, apoplejía, trombosis, aneurisma, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, angina de pecho, muerte súbita cardíaca, cardiopatía hipertensora; enfermedad de vasos no coronarios, tales como arteriosclerosis, enfermedad de vasos pequeños, nefropatía, la hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatosis, asma, hipertensión, enfisema y neumopatía crónica, o una enfermedad cardiovascular asociada a procedimientos quirúrgicos ("traumatismo vascular por intervención quirúrgica"), tal como restenosis tras la angioplastia, colocación de una derivación, endoprótesis vascular, injertos por escisión sintéticos o naturales, catéter permanente, válvula u otros dispositivos implantables. Los trastornos cardiovasculares preferidos incluyen la aterosclerosis, infarto de miocardio, aneurisma, y embolia cerebral.

EJEMPLOS

El apartado siguiente proporciona ejemplos ilustrativos de la presente descripción.

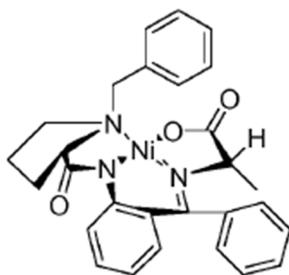
Ejemplo 1. Preparación de aminoácidos alfa, alfa-disustituidos

Compuesto 1



El compuesto 1 se preparó por una secuencia en dos pasos según Yao *et al.* (2004) J. Org. Chem. 69:1720-1722. A 1-yodo-4-cloro-butano (1 ml, 8,2 mmoles) en dimetilformamida (10 ml) se añadió azida sódica (0,53 g, 8,2 mmoles) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó a continuación con acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua (3 veces), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar 1-azido-4-cloro-butano con un rendimiento del 80%. La azida se diluyó con acetona (38 ml) y se añadió yoduro de sodio (1,98 g, 13,00 mmoles) y la reacción se calentó a reflujo durante una noche. Después, la reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo con éter (tres veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron a vacío. El producto 1 se purificó pasándolo a través de un tapón de alúmina neutra. El rendimiento fue del 89%.

Compuesto 2



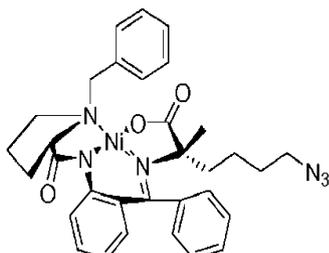
S-Ala-Ni-BPB

El compuesto 2 se preparó mediante una secuencia de tres pasos según Belokon *et al.* (1998), Tetrahedron Asymm. 9:4249-4252. Una disolución de S-prolina (100 g, 0,869 mol) y KOH (172 g, 2,61 mol) en isopropanol (600 ml) se preparó con agitación a 40°C. Tan pronto como la disolución se volvió transparente, se añadió cloruro de bencilo (156 ml, 1,34 mol) a la misma temperatura. Después de completar la adición (3,5 h), la reacción se agitó durante la noche a 40°C. La reacción se neutralizó con HCl conc. (110 ml) hasta pH 5, después se añadió cloroformo (400 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se dejó en agitación durante la noche. La mezcla se filtró y el precipitado se lavó con CHCl₃. Las disoluciones en CHCl₃ se combinaron y se evaporaron, el residuo se trató con acetona y el precipitado del producto en bruto se filtró y se lavó además con acetona. El producto de bencil prolina se aisló con 75% de rendimiento.

A una disolución de bencil prolina (41 g, 0,2 mol) en cloruro de metileno (200 ml) se le añadió cloruro de tionilo (18,34 ml, 0,25 mol) con agitación entre -20°C y -30°C durante un período de 10 min. Se continuó la agitación a -10°C hasta que la mezcla de reacción resultó casi transparente. A continuación, una disolución de 2-aminobenzofenona (25 g, 0,125 mol) en cloruro de metileno (100 ml) se añadió a la mezcla de reacción a -30°C con agitación. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 10 h más y una disolución de carbonato de sodio (40 g) en agua (150 ml) se añadió a la mezcla de reacción con agitación a 0°C. La capa orgánica se separó, se extrajo la capa acuosa varias veces con cloruro de metileno y las disoluciones orgánicas se combinaron y se evaporaron. El producto (aducto bencil prolina-aminobenzofenona) se cristalizó en etanol y se aisló con 85% de rendimiento.

Una disolución de KOH (23,1 g, 0,35 mol) en metanol (75 ml) se vertió en una mezcla agitada de aducto bencil prolina-aminobenzofenona (19,5 g, 0,05 mol) y nitrato de níquel hexahidratado (29,1 g, 0,1 mol), L-Ala (8,9 g, 0,1 mol) en metanol (175) bajo nitrógeno a 40°C-50°C. La mezcla de reacción se agitó a 55°C-65°C durante 2 h y después se neutralizó con ácido acético (20 ml). El volumen de reacción se diluyó con agua (500 ml). Después de 6 h, el sólido cristalino separado se filtró y se lavó con agua (2x) para dar el compuesto puro 2 (sólido de color rojo, 22 g). M + H obs. 512,4, M + H calc. 512,1.

Compuesto 3



Al compuesto 2 (5,122 g, 10,0 mmol) se le añadió dimetilformamida (45 ml), que se desgasificó mediante un ciclo de congelación-descongelación. La disolución se enfrió a 4°C con un baño de hielo y se añadió KOH en polvo (6,361 g, 100 mmol) en un lote. El baño frío se retiró y el compuesto 1 (3,375 g, 15 mmol) disuelto en dimetilformamida (4,0 ml) se añadió con una jeringa. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La reacción se enfrió añadiéndola lentamente a una disolución fría de ácido acético acuoso al 5% (200 ml). El producto en bruto se recogió por filtración y se lavó tres veces con agua fría. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida utilizando una columna de sílice Biotage y hexano acetato de etilo como eluyente. El compuesto 3 se obtuvo como un sólido de color rojo, (51% de rendimiento), M + H calc. 609,2, M + H obs. 609,37. La pureza se determinó como 98% por UV 254 nm.

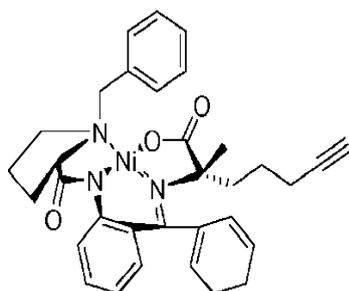
10 Compuesto 4



A una disolución de 5-cloro pentino (5 g, 47,8 mmol) en acetona (80 ml) se le añadió yoduro de sodio (14,321 g, 95,54 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante la noche. Después, la reacción se diluyó con agua y el producto se extrajo con éter (tres veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío. El producto 4 se purificó pasándolo a través de un tapón de alúmina neutra. El rendimiento fue de 92%.

15

Compuesto 5

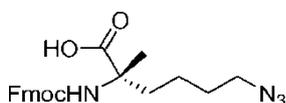


Al compuesto 2 (2,561g, 5,0 mmol) se añadió dimetilformamida (23 ml), que se desgasificó mediante un ciclo de congelación-descongelación. La disolución se enfrió a 4°C con un baño de hielo y se le añadió KOH en polvo (3,181g, 50 mmol) en un lote. Se retiró el baño frío y el compuesto 4 (1,94 g, 10 mmol) disuelto en dimetilformamida (2,0 ml) se añadió con una jeringa. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. La reacción se inactivó añadiéndola lentamente a una disolución fría o ácido acético acuoso al 5% (100 ml). El producto en bruto se recogió por filtración y se lavó tres veces con agua fría. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida utilizando una columna Biotage de sílice y hexano acetato de etilo como eluyente. El compuesto 5 es un sólido rojo, 1,4 g rendimiento del 48%. M + H calc. 578,19, M + H obs. 578,69. La pureza se determinó como 97% por UV 254 nm.

20

25

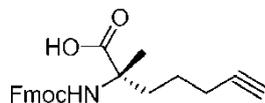
Compuesto 6



A una disolución (12 ml) de HCl/MeOH 1/1 3 N a 70°C se le añadió una disolución del compuesto 3 (1 g, 1,65 mmol) en MeOH (3 ml) gota a gota. El material de partida desapareció en 5 a 10 min. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el disolvente residual se eliminó en una bomba de alto vacío. El residuo en bruto se diluyó con Na₂CO₃ acuoso al 10% (16 ml) enfriado a 0°C con un baño de hielo. Se añadió Fmoc-OSu (0,84 g, 2,5 mmol) disuelto en dioxano (16 ml) y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente con agitación durante la noche. Después, la reacción se diluyó con acetato de etilo y HCl 1 N. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (3 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío. El producto puro se aisló después de una purificación por cromatografía ultrarrápida con una columna de sílice Biotage y acetato de etilo/hexano y cloruro de metileno/metanol como eluyentes para dar un aceite viscoso en 36% de rendimiento global para ambas etapas. M+Na obs. 431,89, M+H calc. (409,18). La pureza se determinó como 98% UV 254 nm.

40

Compuesto 7



5 A una disolución 1/1 (18 ml) de HCl 3 N /MeOH a 70°C se añadió una disolución del compuesto 5 (1,4 g, 2,4 mmol) en MeOH (4 ml) gota a gota. El material de partida desapareció en 5 a 10 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el disolvente residual se eliminó en una bomba de alto vacío. El residuo en bruto se diluyó con Na₂CO₃ acuoso al 10% (24 ml) enfriado a 0°C con un baño de hielo. Se añadió Fmoc-OSu (0,98 g, 2,9 mmol) disuelto en dioxano (24 ml) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación durante la noche. Después, la reacción se diluyó con acetato de etilo y HCl 1 N. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (3 veces). La capa orgánica se secó a continuación sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto puro se aisló (30% de rendimiento para ambas etapas) después de purificación por cromatografía ultrarrápida con una columna de sílice Biotage y acetato de etilo/hexano y cloruro de metileno/metanol como eluyentes. El producto se obtuvo como un aceite viscoso, que solidifica en reposo M+H calc. 378,16, M+Na obs. 400,85.

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AILERON THERAPEUTICS, INC.

5 <120> SISTEMAS MACROCÍCLICOS DE TRIAZOL

<130> P100463EP52

<150> 60/903,073

10 <151> 23-02-2007

<160> 99

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu
1 5 10 15

Asn Asn Val

<210> 2

25

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro
20 25

30

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly
1 5 10 15

Asp Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg
20 25

40

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 4

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

50

<210> 5

<211> 25

ES 2 649 941 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala
1 5 10 15

5 Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg
20 25

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 6
Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly
1 5 10 15

Asp Glu Leu His Gln Arg Thr Met
20

15 <210> 7
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 7
Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ile Gly Asp
1 5 10 15

Lys Val Tyr Cys Thr Trp
20

25 <210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Cys Ala Gln Leu Arg Arg Ile Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu
20 25

30 <210> 9
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 9
Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala
1 5 10 15

Asp Gln Phe His Arg Leu His Thr
20

40 <210> 10
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 649 941 T3

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

Glu Leu His Gln Arg Thr
 20

5 <210> 11
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly
 1 5 10 15

10 Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala
 20 25

<210> 12
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Glu Ser Ile Leu Lys Lys Asn Ser
 1 5 10 15

Asp Trp Ile Trp Asp Trp Ser Ser
 20

20 <210> 13
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 13
 Gly Arg Leu Ala Glu Val Cys Ala Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Met Ile Arg Pro
 20

<210> 14
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
 20 25

35 <210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 15

ES 2 649 941 T3

Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Asp Ile Asn Arg Arg
 20

<210> 16
 <211> 14
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
 1 5 10

10 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 17
 Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Ser Arg Arg
 20

20 <210> 18
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly
 1 5 10 15

25 Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr
 20

30 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Pro Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala Gly Asp Glu Phe
 1 5 10 15

35 Glu Thr Arg Phe
 20

<210> 20
 <211> 23
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 649 941 T3

Ala Thr Ser Arg Lys Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val
 1 5 10 15

Gln Arg Asn His Glu Thr Ala
 20

5 <210> 21
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Leu Ala Glu Val Cys Thr Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu
 1 5 10 15

10 Gln Ile Arg
 <210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 22
 Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly His Glu Asn Gly Ser
 1 5 10 15

20 Leu Asp Pro
 <210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ala Asp
 1 5 10 15

25 Trp Val Ser Asp Trp Ser
 20

30 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ser Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Asp
 1 5 10 15

Arg Met Lys Leu
 20

35 <210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

ES 2 649 941 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 5
 <400> 25
 Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Xaa Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro
 20 25
 <210> 26
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 20
 <400> 26
 Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Xaa Ile Gly
 25 1 5 10 15
 Asp Xaa Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg
 20 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 40
 <400> 27
 Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Xaa Met Ser
 1 5 10 15
 Asp Xaa Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
 45 20 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <220>

ES 2 649 941 T3

<221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

10 <400> 28
 Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Xaa Met Ala
 1 5 10 15

Asp Xaa Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg
 20 25

15 <210> 29
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 29
 Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Xaa Leu Gly
 1 5 10 15

30 Asp Xaa Leu His Gln Arg Thr Met
 20

35 <210> 30
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 30
 Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Ala Ala Gln Leu Arg Xaa Ile Gly Asp
 1 5 10 15

Xaa Val Tyr Cys Thr Trp
 20

50 <210> 31
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 649 941 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 5 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 10 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 31
 Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Cys Ala Gln Leu Arg Xaa Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Xaa Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu
 20 25

15 <210> 32
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

30 <400> 32
 Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Xaa Ile Ala
 1 5 10 15

Asp Xaa Phe His Arg Leu His Thr
 20

35 <210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 33
 Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Xaa Leu Gly Asp
 1 5 10 15

Xaa Leu His Gln Arg Thr
 20

50 <210> 34
 <211> 25

ES 2 649 941 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 34
 Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Xaa Ile Gly
 1 5 10 15

15 Asp Xaa Met Asp Val Ser Leu Arg Ala
 20 25

<210> 35
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 25 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 30 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 35
 Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Glu Ser Ile Leu Lys Xaa Asn Ser
 1 5 10 15

35 Asp Xaa Ile Trp Asp Trp Ser Ser
 20

<210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

50 <400> 36
 Gly Arg Leu Ala Glu Val Cys Ala Val Leu Leu Xaa Leu Gly Asp Xaa
 1 5 10 15

Leu Glu Met Ile Arg Pro
 20

ES 2 649 941 T3

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 15
 <400> 37
 Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Ser Glu Cys Leu Lys Xaa Ile Gly
 1 5 10 15

 Asp Xaa Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
 20 25

 <210> 38
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 30
 <400> 38
 Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Xaa Ile Gly
 1 5 10 15

 Asp Xaa Ile Asn Arg Arg
 20
 35
 <210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 50
 <400> 39
 Lys Gln Ala Leu Arg Xaa Ala Gly Asp Xaa Phe Glu Leu Arg
 1 5 10

<210> 40
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 15
 <400> 40
 Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Ala Leu Arg Xaa Ala Gly
 1 5 10 15

 Asp Xaa Phe Ser Arg Arg
 20

 <210> 41
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 30
 <400> 41
 Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Xaa Ala Gly
 1 5 10 15

 Asp Xaa Phe Glu Leu Arg Tyr
 20
 35
 <210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 50
 <400> 42

ES 2 649 941 T3

Pro Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Xaa Ala Gly Asp Xaa Phe
 1 5 10 15

Glu Thr Arg Phe
 20

<210> 43

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (11)..(11)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (15)..(15)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 43

Ala Thr Ser Arg Lys Leu Glu Thr Leu Arg Xaa Val Gly Asp Xaa Val
 1 5 10 15

Gln Arg Asn His Glu Thr Ala
 20

20 <210> 44

<211> 19

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (10)..(10)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

35 <222> (14)..(14)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 44

Leu Ala Glu Val Cys Thr Val Leu Leu Xaa Leu Gly Asp Xaa Leu Glu
 1 5 10 15

Gln Ile Arg

40 <210> 45

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

45 <221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

50 <221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

ES 2 649 941 T3

<400> 45
 Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly Xaa Glu Asn Gly Xaa
 1 5 10 15

Leu Asp Pro

5 <210> 46
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

20 <400> 46
 Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Lys Xaa Ser Ala Asp
 1 5 10 15

Xaa Val Ser Asp Trp Ser
 20

25 <210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 47
 Ser Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Xaa Gln Gly Asp Xaa
 1 5 10 15

Arg Met Lys Leu
 20

40 <210> 48
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

50 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 649 941 T3

<222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 48
 Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly
 1 5 10 15

5 Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro
 20 25

<210> 49
 <211> 25
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 15 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 20 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 49
 Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Xaa Gln Glu Leu Xaa Arg Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg
 20 25

25 <210> 50
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

40 <400> 50
 Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Xaa Arg Glu Leu Xaa Arg Met Ser
 1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
 20 25

<210> 51
 <211> 25
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 50 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 5
 <400> 51
 Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Xaa Ala Gln Leu Xaa Arg Met Ala
 1 5 10 15
 Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg
 20 25
 <210> 52
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 <400> 52
 Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Xaa Ala Arg Leu Xaa Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 25 Asp Glu Leu His Gln Arg Thr Met
 20
 <210> 53
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 <400> 53
 Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Xaa Ala Gln Leu Xaa Lys Ile Gly Asp
 1 5 10 15
 45 Lys Val Tyr Cys Thr Trp
 20
 <210> 54
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <220>

ES 2 649 941 T3

<221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

10

<400> 54
 Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Xaa Ala Gln Leu Xaa Arg Ile Gly
 1 5 10 15

 Asp Lys Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu
 20 25

15

<210> 55
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

30

<400> 55
 Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Xaa Arg Lys Leu Xaa Cys Ile Ala
 1 5 10 15

 Asp Gln Phe His Arg Leu His Thr
 20

35

<210> 56
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

50

<400> 56
 Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Xaa Ala Arg Leu Xaa Ala Leu Gly Asp
 1 5 10 15

 Glu Leu His Gln Arg Thr
 20

<210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 5 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 10 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 57
 Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Xaa Leu Arg Leu Xaa Cys Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala
 20 25

15 <210> 58
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

30 <400> 58
 Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Xaa Ser Ile Leu Xaa Lys Asn Ser
 1 5 10 15

Asp Trp Ile Trp Asp Trp Ser Ser
 20

35 <210> 59
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 59
 Gly Arg Leu Ala Glu Val Xaa Ala Val Leu Xaa Arg Leu Gly Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Met Ile Arg Pro
 20

50 <210> 60
 <211> 25

ES 2 649 941 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 60
 Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Xaa Glu Cys Leu Xaa Arg Ile Gly
 1 5 10 15

15 Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
 20 25

<210> 61
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 25 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 30 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 61
 Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Xaa Arg Gln Leu Xaa Ile Ile Gly
 1 5 10 15

35 Asp Asp Ile Asn Arg Arg
 20

<210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

50 <400> 62
 Xaa Gln Ala Leu Xaa Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
 1 5 10

<210> 63
 <211> 22
 55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 63
 Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Xaa Leu Ala Leu Xaa Gln Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Ser Arg Arg
 20

15 <210> 64
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

30 <400> 64
 Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Xaa Gln Ala Leu Xaa Glu Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr
 20

35 <210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 65
 Pro Ala Asp Pro Leu Xaa Gln Ala Met Xaa Ala Ala Gly Asp Glu Phe
 1 5 10 15

50 Glu Thr Arg Phe
 20

<210> 66

ES 2 649 941 T3

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

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

15 <400> 66
 Ala Thr Ser Arg Lys Xaa Glu Thr Leu Xaa Arg Val Gly Asp Gly Val
 1 5 10 15

Gln Arg Asn His Glu Thr Ala
 20

<210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

30 <400> 67
 Leu Ala Glu Val Xaa Thr Val Leu Xaa Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Gln Ile Arg

35 <210> 68
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

50 <400> 68
 Met Thr Val Gly Glu Leu Xaa Arg Ala Leu Xaa His Glu Asn Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Asp Pro

ES 2 649 941 T3

<210> 69
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 15
 <400> 69
 Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Xaa Glu Ala Leu Xaa Lys Ser Ala Asp
 1 5 10 15

 Trp Val Ser Asp Trp Ser
 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 <400> 70
 Ser Met Ala Arg Asp Pro Xaa Arg Tyr Leu Xaa Ile Gln Gly Asp Asp
 1 5 10 15

 Arg Met Lys Leu
 20
 35
 <210> 71
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 71
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn
 1 5 10 15
 45
 <210> 72
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 72
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro
 1 5 10 15

 Glu Asn Asn

ES 2 649 941 T3

<210> 73
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 73
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

 Glu Asn Asn
 <210> 74
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 74
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15

 Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 15 20 25 30

 <210> 75
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 75
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15

 Trp Lys Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 20 25 30
 25 <210> 76
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 40 <400> 76
 Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn
 1 5 10 15

 <210> 77
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 50

ES 2 649 941 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 5
 <400> 77
 Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro
 1 5 10 15

 Glu Asn Asn
 <210> 78
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 20
 <400> 78
 Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

 Glu Asn Asn
 <210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 35
 <400> 79
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15

 Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 20 25 30
 40
 <210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 50

ES 2 649 941 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 5
 <400> 80
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 Trp Lys Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 20 25 30
 <210> 81
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 <400> 81
 Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Pro Xaa Asn
 25 1 5 10 15
 <210> 82
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 40
 <400> 82
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Xaa Asn Asn
 45
 <210> 83
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 55
 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 649 941 T3

<222> (17)..(17)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 83
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Ser
 1 5 10 15

5 Xaa Asn Asn

<210> 84
 <211> 30
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 15 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 20 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 84
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15

Trp Xaa Leu Leu Pro Xaa Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 20 25 30

25 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Residuo de aminoácido reticulado

40 <400> 85
 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
 1 5 10 15

Trp Xaa Leu Leu Ser Xaa Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
 20 25 30

45 <210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

50 <400> 86
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5

<210> 87
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

 10 <400> 87
 Glu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met

 1 5 10

 15 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 88
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5
 25
 <210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

 <400> 89
 Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 35 1 5 10

 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

 45 <400> 90
 Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg
 1 5 10

 <210> 91
 <211> 13
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 55
 <400> 91
 Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
 1 5 10

 <210> 92
 60 <211> 8
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

15 <400> 92

Asp Arg Xaa Tyr Xaa His Pro Phe

1 5

<210> 93

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

30 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

35 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 93

Glu Gln Arg Leu Gly Asn Xaa Trp Ala Val Gly His Leu Xaa

1 5 10

40 <210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

50 <222> (4)..(4)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

55 <222> (10)..(10)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 94

Arg Pro Pro Xaa Phe Ser Pro Phe Arg Xaa

1 5 10

60 <210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

15 <400> 95

Ile Ser His Lys Asp Met Xaa Leu Gly Arg Xaa

1 5 10

<210> 96

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

30 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

35 <223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 96

Ala Arg Ala Ser His Leu Xaa Leu Ala Arg Xaa

1 5 10

40 <210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

50 <222> (5)..(5)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

55 <222> (10)..(10)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 97

Ser Tyr Ser Met Xaa His Phe Arg Trp Xaa Lys Pro Val

1 5 10

60 <210> 98

<211> 21

<212> PRT

ES 2 649 941 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5

<400> 98

Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser
1 5 10 15

Met Asp Arg Ser Ile
20

<210> 99

10

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

20

<223> aminoácido desconocido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

25

<223> aminoácido desconocido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

30

<223> Nle

<400> 99

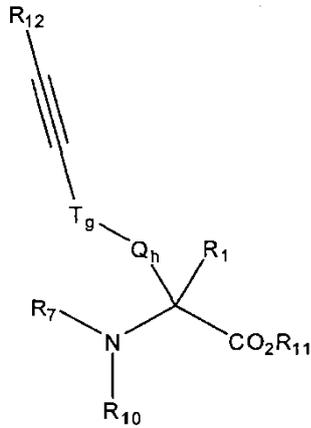
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp Xaa
1 5 10 15

Xaa Asp Arg Ser Ile
20

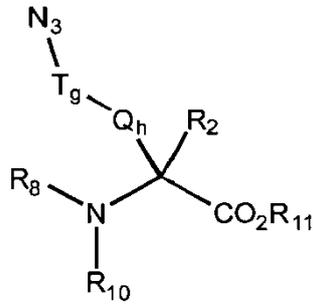
35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula IIa o IIb:



IIa

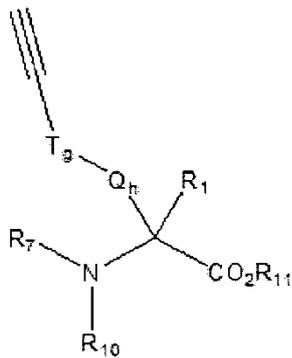


IIb₁

en las que

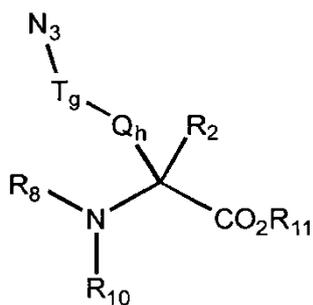
- 5 R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, cada uno de los cuales está no sustituido o sustituido con halógeno;
- Q_h y T_g es cada uno independientemente alquileno,
- R₇ y R₈ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilalquilo o heterocicloalquilo;
- 10 R₁₀ y R₁₁ son -H;
- R₁₂ es -H o alquilo; y
- g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (IIa):



15

3. Un compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (IIb):



4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que R₁ y R₂ son hidrógeno o alquilo no sustituido o sustituido con halógeno.
5. Un compuesto según la reivindicación 4 en el que R₁ y R₂ son alquilo no sustituido.
6. Un compuesto según la reivindicación 5 en el que R₁ y R₂ son metilo.
7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 en el que R₇ y R₈ son hidrógeno.
8. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que T_g es CH₂.
9. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que Q_h es CH₂.
10. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ε-azido-alfa-metil-L-lisina, ε-azido-alfa-metil-D-lisina, δ-azido-alfa-metil-L-ornitina y δ-azido-alfa-metil-D-ornitina.
15. 11. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en ácido N-alfa-Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-5-hexinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-7-octinoico, ácido N-alfa-Fmoc-(S)-2-amino-2-metil-8-noninoico, ácido N-alfa-Fmoc-(R)-2-amino-2-metil-8-noninoico, N-alfa-Fmoc-epsilon-azido-alfa-metil-L-lisina, N-alfa-Fmoc-epsilon-azido-alfa-metil-D-lisina, N-alfa-Fmoc-epsilon-azido-alfa-metil-L-ornitina y N-alfa-Fmoc-epsilon-azido-alfa-metil-D-ornitina.
20. 12. Un kit que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un reactivo de ciclación.
13. Un kit según la reivindicación 12, en el que el catalizador es un catalizador de cobre o de rutenio.