

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 458**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2009 PCT/US2009/057934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10034034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2009 E 09736335 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2342222**

54 Título: **Macrociclos peptidomiméticos**

30 Prioridad:

22.09.2008 US 99063 P

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

04.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NASH, HUW, M.;
ANNIS, DAVID, ALLEN;
KAPPELLER-LIBERMANN, ROSANA;
SAWYER, TOMI, K. y
KAWAHATA, NORIYUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 458 T3

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

DESCRIPCIÓN

Macrociclos peptidomiméticos

Antecedentes de la invención

5 Los péptidos producidos recombinantemente o sintéticamente tienen importantes aplicaciones como medicamentos. Sin embargo, los péptidos sufren con frecuencia de pobre estabilidad metabólica, pobre penetrabilidad celular y unión promiscua debido a su flexibilidad conformacional. Una estrategia para estabilizar estos péptidos es usar entrecruzadores intramoleculares para mantener el péptido en la configuración deseada, por ejemplo, usando enlaces disulfuro, enlaces amida o enlaces carbono-carbono para conectar cadenas laterales de aminoácidos. Véase, p. ej., Jackson et al. (1991), J. Am. Chem. Soc. 113:9391-9392; Phelan et al. (1997), J. Am. Chem. Soc. 119:455-460; 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; Walensky et al. (2004), Science 305:1466-1470; Bernal et al. (2007), J. Am. Chem. Soc. 129:2456-2457; la patente de Estados Unidos US7192713B1 (Verdine et al) (que describe péptidos helicoidales estabilizados entrecruzados que comprenden aminoácidos naturales y no naturales, en donde el péptido comprende al menos dos restos reactivos capaces de experimentar una reacción de formación de enlace C-C); y la patente de Estados Unidos US5811515 (Grubbs et al) (que describe la síntesis de péptidos y peptidomiméticos estabilizados restringidos conformacionalmente/cíclicos a partir de precursores que contienen dos o más enlaces C-C insaturados); los contenidos de estas patentes y publicaciones se incorporan por referencia en la presente memoria. A veces, se hace referencia a tales polipéptidos que están estabilizados conformacionalmente por medio de entrecruzadores intramoleculares como polipéptidos "grapados".

Una ventaja importante de estos polipéptidos entrecruzados es que tienen una capacidad para penetrar las membranas celulares mejorada con respecto a sus equivalentes no grapados. Se cree que esta captación celular está mediada por un mecanismo de transporte activo que utiliza la endocitosis.

25 Algunas de las características físicas que facilitan la entrada de los péptidos en las células también tienden a aumentar la afinidad de los polipéptidos entrecruzados por las proteínas séricas, tales como la albúmina. Por consiguiente, muchas cabezas de serie muy prometedoras exhiben un marcado "cambio en presencia de suero", tienen una actividad *in vivo* o en ensayos con medios a base de suero considerablemente reducida en comparación con la actividad en ensayos que usan medios libres de suero, lo que hace que los péptidos no sean lo suficientemente óptimos para aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Sin embargo, los polipéptidos entrecruzados que tienen bajos niveles de unión al suero tienden a tener una pobre penetración celular, así como una pobre farmacocinética, p. ej., una rápida eliminación renal o de primer paso. Esta invención aborda este y otros problemas.

Los documentos WO 2005/044839, WO 2008/061192 y WO 2008/104000 se refieren a péptidos entrecruzados. Rusnak, D. W. et al. ((2004), Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (14), 2309-2312) describen ensayos de cribado para determinar la KD de fármacos de molécula pequeña por las proteínas plasmáticas.

35 **Compendio**

La presente invención proporciona métodos como se expone en las reivindicaciones. En la presente memoria se describen métodos para la identificación y optimización de polipéptidos entrecruzados que poseen una afinidad reducida por las proteínas séricas para permitir una buena actividad en presencia de suero, a la vez que retienen suficiente afinidad por las membranas celulares como para ser transportados fácilmente al interior de la célula, retienen suficiente afinidad por las proteínas séricas como para tener farmacocinéticas aceptables y retienen una alta afinidad de unión a uno o más receptores diana del interior de la célula. Los inventores han descubierto que, para alcanzar estos objetivos, hay un intervalo óptimo de unión a las proteínas séricas para los polipéptidos entrecruzados. Se describen compuestos óptimos con una penetración celular y actividades biológicas superiores en presencia de suero y relaciones estructura-actividad para permitir la optimización de los polipéptidos entrecruzados que tienen eficacias terapéuticas o actividades diagnósticas mejoradas.

En la presente memoria se describe un método de identificar polipéptidos entrecruzados con eficacias mejoradas en sangre entera humana, que comprende las etapas de sintetizar análogos del polipéptido entrecruzado progenitor y realizar ensayos celulares en ausencia de proteínas séricas humanas y también en presencia de una o más concentraciones de suero humano, con el fin de determinar la afinidad aparente de cada polipéptido entrecruzado por las proteínas séricas humanas.

En la presente memoria se describe un método de preparar un polipéptido con eficacia celular optimizada en sangre entera humana, método que comprende: a) proporcionar un polipéptido progenitor que comprende un entrecruzador que conecta un primer aminoácido y un segundo aminoácido de dicho polipéptido, y en donde el polipéptido progenitor penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular; b) identificar uno o más motivos dipeptídicos en dicho polipéptido progenitor que consten de una cadena lateral ácida adyacente a una cadena lateral hidrofóbica grande, en donde la cadena lateral ácida no es esencial para unir la diana; c) sustituir la cadena lateral ácida en dicho motivo por una cadena lateral neutra para preparar un polipéptido progenitor modificado; d) medir las eficacias *in vitro* del polipéptido polipéptidos progenitor modificado en

un ensayo de células enteras en donde la actividad está mediada por la unión a la diana intracelular, en presencia y ausencia de suero humano; e) calcular la afinidad aparente (K_d^*) del polipéptido modificado por las proteínas séricas humanas y su CE_{50} ; y f) seleccionar el polipéptido progenitor modificado como un polipéptido optimizado si dicho polipéptido progenitor modificado tiene una K_d^* más alta y una CE_{50} igual o más baja que el polipéptido progenitor.

$$CE'_{50} = CE_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{CE_{50}}} \right)$$

5 En algunos casos, K_d^* se define por la ecuación: en la que n es 1, CE_{50} es una eficacia *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en ausencia de suero humano alguno y CE'_{50} es una eficacia *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en un N % de suero humano en donde P es igual a $(N/100) \times (700)$ micromolar.

10 En algunos casos del método, tanto la cadena lateral ácida como la hidrofóbica grande de dicho motivo dipeptídico no son esenciales para unir la diana y se reemplazan por cadenas laterales neutras y menos hidrofóbicas, respectivamente.

15 Por ejemplo, en la presente memoria se describe un método de cribar un polipéptido que comprende un entrecruzador que conecta un primer aminoácido y un segundo aminoácido de dicho polipéptido, en donde el polipéptido penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular, método que comprende medir la eficacia *in vitro* del polipéptido en un ensayo de células enteras en presencia y ausencia de suero humano; calcular la afinidad aparente (K_d^*) del polipéptido por las proteínas séricas

$$CE'_{50} = CE_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{CE_{50}}} \right)$$

20 humanas, en donde K_d^* se define por la ecuación *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en ausencia de suero humano alguno y CE'_{50} es una eficacia *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en un N % de suero humano en donde P es igual a $(N/100) \times (700)$ micromolar; y seleccionar compuestos que tienen una K_d^* de 1 a 700 micromolar, p. ej., 1-70 micromolar, por ejemplo, 10-70 micromolar. Por ejemplo, el compuesto seleccionado puede poseer una fracción libre estimada en sangre humana del 0,1-50 %, p. ej., 0,5-10 %, en donde la fracción libre estimada se define por la ecuación

$$\text{Fracción libre} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [ASH]_{total}}$$

y $[ASH]_{total}$ es 700 micromolar.

25 En algunos casos del método, la actividad biológica (CE_{50}) se mide como el porcentaje del número de células destruidas en un ensayo *in vitro* en el que las células cultivadas se exponen a una concentración efectiva de dicho polipéptido.

30 En algunos casos, el polipéptido se selecciona de tal forma que la afinidad aparente de unión al suero (K_d^*) del polipéptido entrecruzado es 1, 3, 10, 70 micromolar o mayor. En otros casos, la K_d^* del polipéptido entrecruzado es de 1 a 10, 70 o 700 micromolar. En otros casos, el polipéptido entrecruzado se selecciona de tal forma que posee una fracción libre estimada en sangre humana de entre el 0,1 y 50 %, o entre el 0,15 y 10 %.

35 También se describen polipéptidos seleccionados usando los métodos de la invención o, de lo contrario, que cumplen con los criterios de la invención. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 1 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 3 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 10 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 70 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de entre 1-70 micromolar. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de entre 1-700 micromolar. En algunos casos, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una fracción libre estimada en sangre entera de entre el 0,1-50 %. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una fracción libre estimada en sangre entera de entre el 0,5-10 %.

En algunos casos del método, dicho polipéptido contiene un enlace cruzado. En algunos casos del método, dicho polipéptido contiene dos enlaces cruzados.

45 En algunos casos del método, un enlace cruzado conecta dos átomos de carbono α . En otros casos del método, un átomo de carbono α al que está unido un enlace cruzado está sustituido con un sustituyente de fórmula R-. En otro caso del método, dos átomos de carbono α a los que está unido un enlace cruzado están sustituidos con sustituyentes independientes de fórmula R-.

5 En un caso de los métodos de la invención, R- es alquilo. Por ejemplo, R- es metilo. Como alternativa, R- y una parte de un enlace cruzado tomados juntos pueden formar una estructura cíclica. En otro caso del método, un enlace cruzado está formado por dos enlaces carbono-carbono consecutivos. Por ejemplo, un enlace cruzado puede comprender al menos 8, 9, 10, 11 o 12 enlaces consecutivos. En otros casos, un enlace cruzado puede comprender al menos 7, 8, 9, 10 u 11 átomos de carbono.

En algunos casos del método, el polipéptido entrecruzado penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular.

10 En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado comprende un dominio α -helicoidal de un miembro de la familia BCL-2. Por ejemplo, el polipéptido entrecruzado comprende un dominio BH3. En otros casos, el polipéptido entrecruzado tiene una identidad de secuencia de al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % con cualquiera de las secuencias de las Tablas 1, 2, 3 y 4, p. ej., como se mide en un algoritmo BLAST.

15 También se describen métodos de uso de los polipéptidos entrecruzados mejorados descritos en métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto con riesgo de (o susceptible de) padecer un trastorno o que tiene un trastorno asociado a una expresión o actividad (p. ej., anomalías de la vía apoptótica extrínseca o intrínseca) aberrantes (p. ej., insuficientes o excesivas) de un miembro de la familia BCL-2; y de tratamiento o prevención de enfermedad hiperproliferativa mediante interferencia con la interacción o unión entre p53 y MDM2 en células hiperproliferativas, p. ej., células tumorales.

Los casos adicionales de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, los ejemplos, los dibujos y las reivindicaciones que se presentan a continuación.

20 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se conseguirá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención consultando la descripción detallada siguiente, que expone casos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

25 La FIG. 1 muestra las curvas dosis-respuesta del macrociclo peptidomimético (compuesto 1) en presencia de concentraciones variables de suero humano.

La FIG. 2 muestra un gráfico de CE_{50} celular frente a concentraciones de suero humano para análogos del macrociclo peptidomimético con propiedades mejoradas.

La FIG. 3 muestra un gráfico de CE_{50} celular frente a concentraciones de suero humano para análogos del macrociclo peptidomimético con propiedades mejoradas.

30 La FIG. 4 muestra representaciones de tipo rueda helicoidal de análogos del macrociclo peptidomimético mejorado.

Descripción detallada

Como se emplea 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 enlazados covalentemente.

35 Como se emplea en la presente memoria, el término "polipéptido grapado" o "polipéptido entrecruzado" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de residuos de aminoácido unidos por una pluralidad de enlaces peptídicos y al menos un conector formador de macrociclo que forma un macrociclo entre un primer residuo de aminoácido presente de forma natural o no presente de forma natural (o análogo) y un segundo residuo de aminoácido presente de forma natural o no presente de forma natural (o análogo) dentro de la misma molécula. El polipéptido entrecruzado incluye casos en los que el conector formador de macrociclo conecta el carbono α del primer residuo de aminoácido (o análogo) al carbono α del segundo residuo de aminoácido (o análogo). Los polipéptidos entrecruzados incluyen opcionalmente uno o más enlaces no peptídicos entre uno o más residuos de aminoácido y/o residuos de análogo de aminoácido e incluyen opcionalmente uno o más residuos de aminoácido o residuos de análogo de aminoácido no presente de forma natural además de cualquiera que forma el macrociclo.

45 Como se emplea en la presente memoria, el término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una estructura secundaria definida en solución por parte de un polipéptido entrecruzado de la invención como se mide mediante dicroísmo circular, RMN u otra medición biofísica, o resistencia a la degradación proteolítica *in vitro* o *in vivo*. Ejemplos no limitantes de estructuras secundarias contempladas en esta invención son las hélices α , los giros β y las hojas plegadas β .

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "estabilidad helicoidal" se refiere al mantenimiento de una estructura α -helicoidal por parte de un polipéptido entrecruzado de la invención como se mide mediante dicroísmo circular o RMN. Por ejemplo, en algunos casos, los polipéptidos entrecruzados de la invención exhiben al menos un aumento de 1,25, 1,5, 1,75 o 2 veces de la α -helicidad como se determina mediante dicroísmo circular en comparación con un macrociclo correspondiente al que le falta el sustituyente R-.

5 El término " α -aminoácido" o simplemente "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unidos a un carbono que se denomina el carbono α . Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, los isómeros D- y L- de los aminoácidos presentes de forma natural, así como aminoácidos no presentes de forma natural preparados mediante síntesis orgánica u otras rutas metabólicas. A menos que el contexto indique específicamente lo contrario, el término aminoácido, como se emplea en la presente memoria, tiene por objeto incluir análogos de aminoácido.

El término "aminoácido presente de forma natural" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos que se encuentran habitualmente en los 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" o "aminoácido no natural" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar a un aminoácido y que puede ser sustituida por un aminoácido en la formación de un polipéptido entrecruzado. Los análogos de aminoácido incluyen, sin limitación, compuestos que son estructuralmente idénticos a un aminoácido, como se define en la presente memoria, excepto por la inclusión de uno o más grupos metileno adicionales entre el grupo amino y el carboxilo (p. ej., α -amino β -carboxi ácidos) o por la sustitución del grupo amino o carboxi por un grupo de reactividad similar (p. ej., sustitución de la amina primaria por una amina secundaria o terciaria o sustitución del grupo carboxi por un éster).

20 Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo salvaje de un polipéptido (p. ej., un dominio BH3 o el dominio de unión a MDM2 de p53) sin suprimir o alterar sustancialmente su actividad biológica o bioquímica esencial (p. ej., unión al receptor o activación). Un residuo de aminoácido "esencial" es un residuo que, cuando se altera a partir de la secuencia de tipo salvaje del polipéptido, da lugar a la supresión o supresión sustancial de la actividad biológica o bioquímica esencial del polipéptido.

25 Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., K, R, H), cadenas laterales ácidas (p. ej., D, E), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., G, N, Q, S, T, Y, C), cadenas laterales no polares (p. ej., A, V, L, I, P, F, M, W), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., T, V, I) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., Y, F, W, H). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial previsto en un polipéptido BH3, por ejemplo, se reemplaza preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Otros ejemplos de sustituciones aceptables son sustituciones basadas en consideraciones isostéricas (p. ej., norleucina por metionina) u otras propiedades (p. ej., 2-tienilalanina por fenilalanina).

30 El término "miembro", como se emplea en la presente memoria, junto con macrociclos o conectores formadores de macrociclo se refiere a los átomos que forman o pueden formar el macrociclo y excluye átomos de sustituyente o cadena lateral. Por analogía, ciclodecano, 1,2-difluorodecano y 1,3-dimetilciclodecano se consideran todos ellos macrociclos de diez miembros, ya que los sustituyentes hidrógeno o flúor o las cadenas laterales metilo no participan en la formación del macrociclo.

Los símbolos "", cuando se emplean como parte de una estructura molecular, se refieren a un enlace sencillo o un doble enlace *cis* o *trans*.

40 El término "cadena lateral de aminoácido" se refiere a un resto unido al carbono α de 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. También se incluyen otras cadenas laterales de aminoácidos no presentes de forma natural, por ejemplo, aquellos que están presentes en la naturaleza (p. ej., un metabolito de aminoácido) o los que se fabrican sintéticamente (p. ej., un aminoácido α,α -disustituido).

45 El término "aminoácido α,α -disustituido" se refiere a una molécula o resto que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unidos a un carbono (el carbono α) que está unido a dos cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales.

50 El término "polipéptido" abarca dos o más aminoácidos presentes de forma natural o no presentes de forma natural unidos por un enlace covalente (p. ej., un enlace amida). Los polipéptidos, como se describen en la presente memoria, incluyen proteínas de longitud total (p. ej., proteínas procesadas totalmente), así como secuencias de aminoácidos más cortas (p. ej., fragmentos de proteínas presentes de forma natural o fragmentos de polipéptidos sintéticos).

55 El término "reactivo de macrociclación" o "reactivo formador de macrociclo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier reactivo que se puede usar para preparar un polipéptido entrecruzado de la invención mediando la reacción entre dos grupos reactivos. Los grupos reactivos pueden ser, por ejemplo, una azida y un alquino, en cuyo caso, los reactivos de macrociclación incluyen, sin limitación, reactivos de Cu tales como reactivos que proporcionan una especie de Cu(I) reactiva, tales como CuBr, CuI o CuOTf, así como sales de Cu(II)

tales como $\text{Cu}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$, CuSO_4 y CuCl_2 que se pueden convertir in situ en un reactivo de $\text{Cu}(\text{I})$ activo mediante la adición de un agente reductor tal como ácido ascórbico o ascorbato sódico. Los reactivos de macrociclación pueden incluir además, por ejemplo, reactivos de Ru conocidos en la técnica tales como $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$, $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ u otros reactivos de Ru que puedan proporcionar una especie de $\text{Ru}(\text{II})$ reactiva. En otros casos, los grupos reactivos son olefinas terminales. En tales casos, los reactivos de macrociclación o reactivos formadores de macrociclo son catalizadores de metátesis que incluyen, pero no se limitan a, catalizadores de complejo metal de transición temprano-carbena estabilizados tales como catalizadores de metal de transición del grupo VIII-carbena. Por ejemplo, tales catalizadores son centros metálicos de Ru y Os que tienen un estado de oxidación +2, un recuento de electrones de 16 y son pentacoordinados. Se describen catalizadores adicionales en Grubbs et al., "Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis" Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452 y en la patente de Estados Unidos n.º 5 811 515. En otros casos más, los grupos reactivos son grupos tiol. En tales casos, el reactivo de macrociclación es, por ejemplo, un conector funcionalizado con dos grupos tiol-reactivos tales como grupos halógeno.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, o a 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, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ indica que el grupo tiene de 1 a 10 (incluidos) átomos de carbono en él. En ausencia de designación numérica alguna, "alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (incluidos) átomos de carbono en ella.

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

El término "alqueniilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo, que es una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. El resto alqueniilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (incluidos) átomos de carbono en él. El término "alqueniilo inferior" se refiere a una cadena alqueniilo $\text{C}_2\text{-C}_6$. En ausencia de designación numérica alguna, "alqueniilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (incluidos) 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 contiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. El resto alquinilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (incluidos) átomos de carbono en él. El término "alquinilo inferior" se refiere a una cadena alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_6$. En ausencia de designación numérica alguna, "alquinilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (incluidos) átomos de carbono en ella.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 6 carbonos o bicíclico de 10 carbonos en donde 0, 1, 2, 3 o 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los 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 alcoxi sustituido con arilo.

"Arilalquilo" se refiere un grupo arilo, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, como se definió anteriormente. Los 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 un grupo arilo, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por uno o más grupos $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$. Los ejemplos representativos de un grupo arilamido incluyen 2- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -fenilo, 3- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -fenilo, 4- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -fenilo, 2- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -piridilo, 3- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -piridilo y 4- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -piridilo,

"Alquilheterociclo" se refiere a un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$ se ha reemplazado por un heterociclo. Los ejemplos representativos de un grupo alquilheterociclo incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -morfolina, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -piperidina, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -morfolina y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -imidazol.

"Alquilamido" se refiere a un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$ se ha reemplazado por un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$. Los ejemplos representativos de un grupo alquilamido incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{NH}_2)\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_3\text{-CH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH=CH}_2$.

"Alcanol" se refiere a un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$ se ha reemplazado por un grupo hidroxilo. Los ejemplos representativos de un

grupo alcohol incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ y $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$.

5 "Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$ se ha reemplazado por un grupo $-\text{COOH}$. Los ejemplos representativos de un grupo alquilcarboxi incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

10 El término "cicloalquilo", como se emplea en la presente memoria, incluye grupos hidrocarburo cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen de 3 a 12 carbonos, preferiblemente de 3 a 8 carbonos y más preferiblemente de 3 a 6 carbonos, en donde el grupo cicloalquilo está además opcionalmente sustituido. Algunos grupos cicloalquilo incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

15 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene de 1-3 heteroátomos si es monocíclico, de 1-6 heteroátomos si es bicíclico o de 1-9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados de O, N o S (p. ej., átomos de carbono y de 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de O, N o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en donde 0, 1, 2, 3 o 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupo heteroarilo incluyen piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, benzimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo y similares.

20 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.

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

30 El término "sustituyente" se refiere a un grupo que reemplaza a un segundo átomo o grupo tal como un átomo de hidrógeno o cualquier molécula, compuesto o resto. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, los grupos halo, hidroxilo, mercapto, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, tioalcoxi, ariloxi, amino, alcoxycarbonilo, amido, carboxi, alcanosulfonilo, alquilcarbonilo y ciano.

35 En algunos casos, los compuestos descritos contienen uno o más centros asimétricos y, por tanto, se presentan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros únicos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas tales formas isoméricas de estos compuestos están incluidas en la presente invención a menos que indique expresamente lo contrario. En algunos casos, los compuestos de esta invención también se representan en formas tautoméricas múltiples, en tales casos, la invención incluye todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria (p. ej., si la alquilación de un sistema de anillo da lugar a alquilación en múltiples sitios, la invención incluye todos tales productos de reacción). Todas tales formas isoméricas de tales compuestos están incluidas en la presente invención a menos que indique expresamente lo contrario. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente memoria están incluidas en la presente invención a menos que indique expresamente lo contrario.

45 Como se emplean en la presente memoria, los términos "aumentar" y "reducir" significan, respectivamente, provocar un aumento o reducción estadísticamente significativos (es decir, p. ej., $p < 0,1$) de al menos el 5 %.

50 Como se emplea en la presente memoria, la mención de un intervalo numérico para una variable tiene como objeto transmitir que la invención se puede poner en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Por tanto, para una variable que es inherentemente discreta, la variable es igual a cualquier valor de número entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los extremos del intervalo. De forma similar, para una variable que es inherentemente continua, la variable es igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los extremos del intervalo. Como ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe como que tiene valores entre 0 y 2 toma los valores 0, 1 o 2 si la variable es inherentemente discreta y toma los valores 0,0; 0,1; 0,01; 0,001 o cualquier otro valor real ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es inherentemente continua.

55 Como se emplea en la presente memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se usa en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "uno/u otro".

El término "en promedio" representa el valor medio derivado de realizar al menos tres réplicas independientes para cada punto de datos.

El término "actividad biológica" abarca las propiedades estructurales y funcionales de un macrociclo de la invención. La actividad biológica es, por ejemplo, estabilidad estructural, alfa-helicidad, afinidad por una diana, resistencia a la degradación proteolítica, penetrabilidad celular, estabilidad intracelular, estabilidad *in vivo* o cualquier combinación de las mismas.

Los detalles de uno o más casos concretos de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción que se presenta a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

10 Propiedades biológicas de los polipéptidos entrecruzados descritos

En un caso, la presente invención proporciona un método de identificar polipéptidos entrecruzados con eficacias mejoradas en sangre entera humana, que comprende las etapas de sintetizar análogos del polipéptido entrecruzado progenitor y realizar ensayos celulares en ausencia de proteínas séricas humanas y también en presencia de dos o más concentraciones de suero humano, con el fin de determinar la afinidad aparente de cada polipéptido entrecruzado por las proteínas séricas humanas y calcular una CE50 en sangre entera mediante extrapolación matemática.

En algunos casos, el polipéptido se selecciona de tal forma que la afinidad aparente de unión al suero (K_d^*) del polipéptido entrecruzado es 1, 3, 10, 70 micromolar o mayor, pero no mayor de 700 micromolar. En otros casos, la K_d^* del polipéptido entrecruzado es de 1 a 10, 70 o 700 micromolar. En otros casos, el polipéptido entrecruzado se selecciona de tal forma que posee una fracción libre estimada en sangre humana de entre el 0,1 y 50 %, o entre el 0,15 y 10 %.

En algunos casos, los valores de K_d aparentes para proteína sérica mediante análisis del cambio en CE50 se usan para proporcionar un medio sencillo y rápido de cuantificar la propensión de los compuestos experimentales a unir ASH y otras proteínas séricas. Existe una relación lineal entre la CE_{50} aparente en presencia de proteína sérica (CE'_{50}) y la cantidad de proteína sérica añadida a un ensayo *in vitro*. Esta relación se define mediante la afinidad de unión del compuesto por las proteínas séricas, expresada como K_d^* . Este término es una constante de disociación *aparente* determinada experimentalmente que puede ser el resultado de los efectos acumulativos de múltiples eventos de unión experimentalmente indistinguibles. La forma de esta relación se presenta aquí en la Ec. 0.1 y su derivación se puede encontrar en Copeland et al, Biorg. Med Chem Lett. 2004, 14:2309-2312.

$$(0.1) \quad CE'_{50} = CE_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{CE_{50}}} \right)$$

Una proporción significativa de unión de proteína sérica se puede atribuir a interacciones del fármaco con la ASH, debido a la alta concentración de esa proteína en el suero (35-50 g/L o 530-758 μ M). Para calcular el valor de K_d para estos compuestos hemos asumido que el cambio en CE_{50} tras la adición de proteína se puede atribuir por completo a la ASH presente en el suero añadido, donde P es 700 μ M para suero al 100 %, P es 70 μ M para suero al 10 %, etc. Además, hacemos la suposición simplificadora de que todos los compuestos unen ASH con una estequiometría 1:1, de tal forma que el término n de la Ec. (0.1) sea constantemente la unidad. Con estos parámetros definidos, calculamos el valor de K_d^* para cada péptido grapado a partir de los cambios en los valores de CE_{50} con concentraciones crecientes de suero (y proteína sérica) mediante el análisis de regresión no lineal de la Ec. 1.1 usando Mathematica 4.1 (Wolfram Research, Inc., www.wolfram.com). La fracción libre en sangre se estima por la ecuación siguiente, en la que la $[ASH]_{total}$ se ajusta a 700 μ M, como derivó Trainor, Expert Opin. Drug Disc., 2007, 2(1):51-64.

$$(0.2) \quad \text{Fracción libre} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [ASH]_{total}}$$

En un caso, la actividad biológica mejorada se mide como penetrabilidad celular mejorada o una capacidad de inducir la apoptosis mejorada. En otros casos más, la actividad biológica se mide como el porcentaje del número de células destruidas en un ensayo *in vitro* en el que las células cultivadas se exponen a una concentración efectiva de dicho polipéptido.

En algunos casos, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 1 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 3 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado

mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 10 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 70 micromolar o más débil. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de entre 1-70 micromolar. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de entre 1-700 micromolar.

En algunos casos, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una fracción libre estimada en sangre entera de entre el 0,1-50 %. En otro caso, el polipéptido entrecruzado mejorado posee una fracción libre estimada en sangre entera de entre el 0,5-10 %.

Polipéptidos entrecruzados

Cualquier proteína o polipéptido con una secuencia de aminoácidos primaria conocida que contiene una estructura secundaria que se cree que otorga actividad biológica mediante interacción con una o más dianas de proteína intracelular, dominio proteico o ácido nucleico es objeto de la presente descripción. Por ejemplo, se puede analizar la secuencia del polipéptido y se pueden sustituir los análogos de aminoácido que contienen grupos reactivos con reactivos de macrociclación en las posiciones apropiadas. Las posiciones apropiadas se determinan comprobando qué superficie o superficies moleculares de la estructura secundaria son necesarias para la actividad biológica y, por lo tanto, a través de qué otra superficie o superficies los conectores formadores de macrociclo de la invención pueden formar un macrociclo sin bloquear estéricamente la superficie o superficies requeridas para la actividad biológica. Tales determinaciones se hacen usando métodos tales como cristalografía de rayos X de complejos entre la estructura secundaria y un ligando natural para visualizar residuos (y superficies) críticos para la actividad; mediante mutagénesis secuencial de residuos en la estructura secundaria para identificar funcionalmente residuos (y superficies) críticos para la actividad; o mediante otros métodos. Mediante tales determinaciones, los aminoácidos apropiados se sustituyen por los análogos de aminoácido y conectores formadores de macrociclo de la descripción. Por ejemplo, para que una estructura secundaria α -helicoidal tenga actividad biológica, puede ser necesario que una superficie de la hélice (p. ej., una superficie molecular que se extiende longitudinalmente a lo largo del eje de la hélice y radialmente 45-135° en torno al eje de la hélice) entre en contacto con otra biomolécula *in vivo* o *in vitro*. En tal caso, se diseña un conector formador de macrociclo para que conecte dos carbonos α de la hélice a la vez que se extiende longitudinalmente a lo largo de la superficie de la hélice en la parte de esa superficie no directamente requerida para la actividad.

En algunos casos, la secuencia peptídica deriva de la familia de proteínas BCL-2. La familia BCL-2 se define por la presencia de hasta cuatro dominios de homología BCL-2 (BH) conservados denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, todos ellos incluyen segmentos α -helicoidales (Chittenden et al. (1995), EMBO 14:5589; Wang et al. (1996), Genes Dev. 10:2859). Las proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-2 y BCL-X_L, presentan conservación de secuencia en todos los dominios BH. Las proteínas antiapoptóticas se dividen en miembros de la familia "multidominio" (p. ej., BAK, BAX), que poseen homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, y miembros de la familia "solo dominio BH3" (p. ej., BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA), que contienen homología de secuencia exclusivamente en el segmento α -helicoidal anfipático BH3. Los miembros de la familia BCL-2 tienen la capacidad de formar homo- y heterodímeros, lo que sugiere que la unión competitiva y la proporción entre los niveles de proteína pro- y antiapoptótica dictan la susceptibilidad a estímulos de muerte. Las proteínas antiapoptóticas sirven para proteger a las células del exceso proapoptótico, es decir, la muerte celular programada excesiva. Las medidas de seguridad "adicionales" incluyen la regulación de la transcripción de proteínas proapoptóticas y el mantenimiento de estas como conformémeros inactivos, que requieren activación proteolítica, desfosforilación o cambio conformacional inducido por ligando para activar las funciones promuerte. En ciertos tipos de células, las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática desencadenan la apoptosis por medio de una vía mitocondrial. Las mitocondrias pueden servir como guardián de la muerte celular secuestrando el citocromo c, un componente crítico de un complejo citosólico que activa la caspasa 9, lo que lleva a eventos proteolíticos aguas abajo fatales. Las proteínas multidominio tales como BCL-2/BCL-X_L y BAK/BAX juegan papeles enfrentados de guardián y verdugo en la membrana mitocondrial, con sus actividades reguladas además por miembros solo BH3 de la familia BCL-2 aguas arriba. Por ejemplo, la BID es un miembro de la familia solo dominio BH3 de proteínas proapoptóticas y transmite las señales de muerte recibidas en la membrana plasmática a proteínas proapoptóticas efectoras situadas en la membrana mitocondrial. La BID tiene la capacidad de interactuar con proteínas tanto pro- como antiapoptóticas y, tras activación por la caspasa 8, desencadena la liberación del citocromo c y la apoptosis mitocondrial. Los estudios de delección y mutagénesis determinaron que el segmento BH3- α -helicoidal anfipático de los miembros de la familia proapoptótica puede servir como un dominio de muerte y, por tanto, puede representar un motivo estructural crítico para la interacción con proteínas apoptóticas multidominio. Los estudios estructurales han mostrado que la hélice de BH3 puede interactuar con proteínas antiapoptóticas insertando en un surco hidrofóbico, formado por la interfaz de BH1, 2 y 3 dominios. La BID activada puede ser unida y secuestrada por proteínas antiapoptóticas (p. ej., BCL-2 y BCL-X_L) y puede desencadenar la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, lo que lleva a la liberación del citocromo c y a un programa de apoptosis mitocondrial. La BAD también es un miembro de la familia proapoptótica de solo dominio BH3 cuya expresión desencadena la activación de BAX/BAK. Sin embargo, al contrario que la BID, la BAD presenta una unión preferente a los miembros de la familia antiapoptótica BCL-2 y BCL-X_L. Mientras que el dominio BH3 de la BAD exhibe una unión a BCL-2 de alta afinidad, el péptido BH3 de la BAD es incapaz de activar la liberación del citocromo c desde las mitocondrias *in vitro*, lo que sugiere que la BAD no es un activador directo de BAX/BAK. Las mitocondrias que sobreexpresan BCL-2 son resistentes a la liberación del citocromo c inducida por BID, pero el

5 cotratamiento con BAD puede restablecer la sensibilidad a BID. La inducción de la apoptosis mitocondrial mediante BAD parece ser el resultado de: (1) el desplazamiento de activadores de BAX/BAK, tales como proteínas BID o similares a BID, desde el bolsillo de unión de BCL-2/BCL-XL o (2) la ocupación selectiva del bolsillo de unión de BCL-2/BCL-XL por la BAD para evitar el secuestro de proteínas similares a BID por proteínas antiapoptóticas. Por tanto, han surgido dos clases de proteínas de solo dominio BH3, las proteínas similares a BID, que activan directamente la apoptosis mitocondrial, y las proteínas similares a BAD, que tienen la capacidad de sensibilizar las mitocondrias a proapoptóticas similares a BID ocupando los bolsillos de unión de las proteínas antiapoptóticas multidominio. Se han descrito diversos dominios α -helicoidales de proteínas miembros de la familia BCL-2 susceptibles a la metodología descrita en la presente memoria (Walensky et al. (2004), Science 305:1466 y Walensky et al., patente de Estados Unidos de n.º de publicación 2005/02506 80).

10 En otros casos, la secuencia peptídica deriva de la proteína supresora de tumores p53 que se une a la proteína oncogén MDM2. El sitio de unión de la MDM2 está localizado dentro de una región de la supresora de tumores p53 que forma una hélice α . En la patente de Estados Unidos n.º 7 083 983, Lane et al. describen que la región de p53 responsable de la unión a MDM2 está representada aproximadamente por los aminoácidos 13-31 (PLSQETFSDLWKLLPENNV) de la proteína p53 humana madura. Otras secuencias modificadas descritas por Lane también están contempladas en la presente invención. Asimismo, la interacción de p53 y MDM2 ha sido comentada por Shair et al. (1997), Chem. & Biol. 4:791, y se han identificado mutaciones del gen p53 en virtualmente la mitad de todos los casos de cáncer de los que se ha informado. A medida que una célula se somete a tensiones, se cree que la p53 orquesta una respuesta que lleva a la detención del ciclo celular y reparación del ADN, o a la muerte celular programada. Además de las mutaciones del gen p53 que alteran la función de la proteína p53 directamente, la p53 se puede alterar por cambios en la MDM2. Se ha mostrado que la proteína MDM2 se une a la p53 e interrumpe la activación transcripcional asociándose con el dominio de transactivación de la p53. Por ejemplo, un péptido de 11 aminoácidos derivado del dominio de transactivación de la p53 forma una hélice α anfipática de 2,5 giros que se inserta en la hendidura de la MDM2. Por tanto, en algunos casos, se diseñan novedosas estructuras de hélice α generadas mediante el método de la presente invención para generar estructuras que se unen fuertemente al aceptor de la hélice e interrumpen las interacciones proteína-proteína nativas. A continuación, se criban estas estructuras usando técnicas de alto rendimiento para identificar péptidos de molécula pequeña óptimos. Las estructuras novedosas que interrumpen la interacción de MDM2 son útiles para muchas aplicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, el control de sarcomas de tejido blando (que sobreexpresan MDM2 en presencia de p53 de tipo salvaje). A continuación, en algunos casos, estos cánceres se contienen con moléculas pequeñas que interceptan la MDM2, evitando de este modo la supresión de la p53. Además, en algunos casos, se usan disruptores de molécula pequeña de las interacciones MDM2-p53 como terapia adyuvante para ayudar a controlar y modular la magnitud de la respuesta apoptótica dependiente de p53 en la quimioterapia convencional.

35 A continuación, se facilita una lista ejemplar no limitante de secuencias peptídicas adecuadas para su uso como punto de partida para la optimización según la presente descripción:

TABLA 1

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = residuo con enlace cruzado)
Péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQV GD SMDRSIPP	QEDIIRNIARHLA XVGD X MDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRR IGDEF NAYYAR	DNRPEIWIAQELR XIGD X FNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRR MSDEF VDSFKK	NLWAAQRYGRELR XMSD X FDVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREIGAQLR XMAD X LNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL GDEL HQRTM	RSSAAQLTAARLK XLGD X LHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRK IGDK VYCTW	AELPPEFAAQLR XIGD X VYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRR IGDK VNLRQKL	VPADLKDECAQLR XIGD X VNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHRLHT	QHRAEVQIARKLQ XIAD X FHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL GDEL HQRT	SSAAQLTAARLK XLGD X LHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLAC IGDEM DVSLRA	CMEGSDALALRL XIGD X MDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILK NSDW IWDWSS	DIERRKEVESILK XNSD X IWDWSS

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = residuo con enlace cruzado)
Péptidos BH3		
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G DELEMIRP	GRLAEVCAVLL X L GDX LEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKR I GDELDSNMEL	PQDASTKKSECL X L X IGDXLDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI I GDDINRR	PSSTMGQVGRQLA X I GDX INRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG D EFELR	KQALR X AG D X F ELR
BCL2-BH3	LSPPWHLALALRQAG D DFSRR	LSPPWHLALALR X AG D X F DFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG D EFELRY	EVIPMAAVKQALR X AG D X F ELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG D EFETRF	PADPLHQAMR X AG D X F ETRF
MCLI-BH3	ATSRKLETLR R V G DG V QRNHETA	ATSRKLETLR X V GDX VQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL G DELEQIR	LAEVCTVLL X L GDX LEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGLDP	MTVGELSRAL G X E NG X LDP
NIX-BH3	WEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKEVEAL X SAD X VSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLV I Q G DDRMKL	SMARDPQRYLV X Q GDX RMKL

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

TABLA 2

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = residuo con enlace cruzado)
Péptidos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQV G DSMDRSIPP	QEDIIRNI X RHL X QV G DSMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRR I GDEFNAYYAR	DNRPEIW X QEL X R I GDEFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRR S DEFVDSFKK	NLWAAQRY X REL X R S DEFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRM A DDLNAQYER	EEQWAREI X AQL X RM A DDLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL G DELHQRTM	RSSAAQLT X ARL X AL G DELHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRK I GDKVYCTW	AELPPEF X AQL X K I GDKVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRR I GDKVNLQKL	VPADLKDE X AQL X R I GDKVNLQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHLHT	QHRAEVQI X RKL X CIADQFHLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL G DELHQRT	SSAAQLT X ARL X AL G DELHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLAC I GDEMDVSLRA	CMEGSDAL X LRL X C I GDEMDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILK K NSDWIWDWSS	DIERRKEV X SIL X K N SDWIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G DELEMIRP	GRLAEV X AVL X RL G DELEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKR I GDELDSNMEL	PQDASTKK X ECL X R I GDELDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI I GDDINRR	PSSTMGQV X RQL X I I GDDINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG D EFELR	X QAL X EAG D EFELR

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = residuo con enlace cruzado)
Péptidos BH3		
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG DD FSRR	LSPPWHLX LALX QAGDDFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG DE FELRY	EVIPMAAVX QALX EAGDEFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG DE FETRF	PADPLX QAMX AAGDEFETRF
MCLI-BH3	ATSRKLET LR RV GD GVQRNHETA	ATSRKX ETLX RV GD GVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GD ELEQIR	LAEVX TVLX RL GD ELEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHEN GS LDP	MTVGELX RALX HEN GS LDP
NIX-BH3	WEGEKEVEAL KK SADW VS DWS	VVEGEKE XEALX KSADW VS DWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYL VI Q GD DRMKL	SMARDPX RYLX I QGD DRMKL

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

TABLA 3

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = residuo con enlace cruzado)
Péptidos p53		
Péptido hp53 1	LSQET FSD LW KLL PEN	LSQET FSDX W KLL P EX
Péptido hp53 2	LSQET FSD LW KLL PEN	LSQ EX FSD LW KX L PEN
Péptido hp53 3	LSQET FSD LW KLL PEN	LSQ X T FSD LW X L L PEN
Péptido hp53 4	LSQET FSD LW KLL PEN	LSQET F X D LW KLL X EN
Péptido hp53 5	LSQET FSD LW KLL PEN	QSQQ T F X N L W R L L X Q N

5

La **Tabla 3** enumera secuencias humanas que se dirigen al sitio de unión a p53 de MDM2/X y están implicadas en cánceres.

TABLA 4

Nombre	Secuencia (negrita = residuos críticos)	Secuencia entrecruzada (X = enlace cruzado)
Ligandos peptídicos de GPCR		
Angiotensina II	DRV YI HP F	DR X Y X HP F
Bombesina	EQRLGNQ W AV G H L M	EQRLGN X W AV G H L X
Bradiquinina	RPP G F S P F R	RPP X F S P F R X
C5a	ISHK D M Q L G R	ISHK D M X L G R X
C3a	ARASH L G L A R	ARASH L X L A R X
Hormona estimulante α -melanocito	SYSME H F R W G K P V	SYSM X H F R W X K P V

La **Tabla 4** enumera secuencias que se dirigen a receptores acoplados a proteínas G humanos y están implicadas en numerosas enfermedades humanas (Tyndall et al. (2005), Chem. Rev. 105:793-826).

Polipéptidos entrecruzados

5 En algunos casos del método, un polipéptido de la descripción contiene un enlace cruzado. En algunos casos del método, dicho polipéptido contiene dos enlaces cruzados. En algunos casos del método, un enlace cruzado conecta dos átomos de carbono α . En otros casos del método, un átomo de carbono α al que está unido un enlace cruzado está sustituido con un sustituyente de fórmula R-. En otro caso del método, dos átomos de carbono α a los que está unido un enlace cruzado están sustituidos con sustituyentes independientes de fórmula R-. En un caso de los métodos de la invención, R- es alquilo. Por ejemplo, R- es metilo. Como alternativa, R- y una parte de un enlace cruzado tomados juntos pueden formar una estructura cíclica. En otro caso del método, un enlace cruzado está formado por dos enlaces carbono-carbono consecutivos. Por ejemplo, un enlace cruzado puede comprender al menos 8, 9, 10, 11 o 12 enlaces consecutivos. En otros casos, un enlace cruzado puede comprender al menos 7, 8, 9, 10 u 11 átomos de carbono.

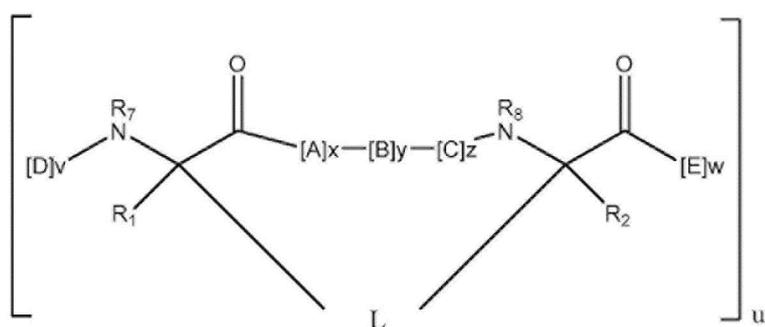
15 En otro caso del método, el polipéptido entrecruzado comprende un dominio α -helicoidal de un miembro de la familia BCL-2. Por ejemplo, el polipéptido entrecruzado comprende un dominio BH3. En otros casos, el polipéptido entrecruzado comprende al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de cualquiera de las secuencias de las Tablas 1, 2, 3 y 4. En algunos casos del método, el polipéptido entrecruzado penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular.

20 En algunos casos, dicho polipéptido helicoidal contiene un enlace cruzado. En otros casos, dicho polipéptido helicoidal contiene dos enlaces cruzados.

25 En algunos casos, un enlace cruzado conecta dos átomos de carbono α . En otros casos, un átomo de carbono α al que está unido un enlace cruzado está sustituido con un sustituyente de fórmula R-. En otro caso, dos átomos de carbono α a los que está unido un enlace cruzado están sustituidos con sustituyentes independientes de fórmula R-. En un caso de la invención, R- es alquilo. Por ejemplo, R- es metilo. Como alternativa, R- y una parte de un enlace cruzado tomados juntos pueden formar una estructura cíclica. En otro caso, un enlace cruzado está formado por enlaces carbono-carbono consecutivos. Por ejemplo, un enlace cruzado puede comprender al menos 8, 9, 10, 11 o 12 enlaces consecutivos. En otros casos, un enlace cruzado puede comprender al menos 7, 8, 9, 10 u 11 átomos de carbono.

30 En otro caso, el polipéptido entrecruzado comprende un dominio α -helicoidal de un miembro de la familia BCL-2. Por ejemplo, el polipéptido entrecruzado comprende un dominio BH3. En otros casos, el polipéptido entrecruzado comprende al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de cualquiera de las secuencias de las Tablas 1, 2, 3 y 4. En algunos casos, el polipéptido entrecruzado penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular.

En algunos casos, los polipéptidos entrecruzados de la invención tienen la Fórmula (I):



Fórmula I

Fórmula (I)

35

en donde:

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

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

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-;

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

5 L es un conector formador de macrociclo de fórmula -L₁-L₂-;

L₁ y L₂ son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R₄-K-R₄-]_n, estando cada uno opcionalmente sustituidos con R₅;

10 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;

15 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 o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

20 u es un número entero de 0-10;

v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000;

x es un número entero de 0-10;

y es un número entero de 0-10;

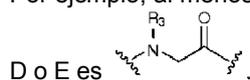
25 z es un número entero de 0-10; y

n es un número entero de 1-5.

En un ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otros casos, R₁ y R₂ son metilo.

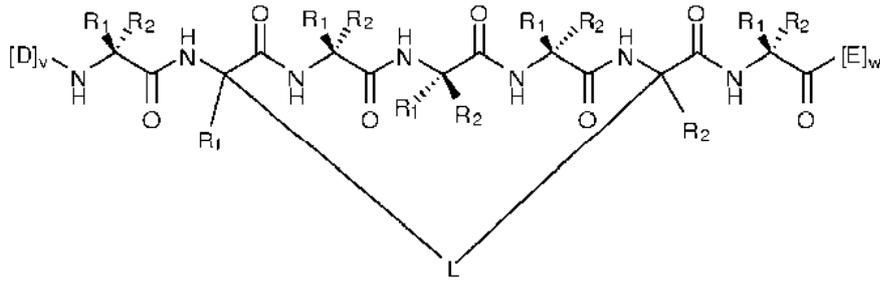
30 En algunos casos de la descripción, x+y+z es al menos 3. En otros casos de la descripción, x+y+z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo de la descripción se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula [A]_x, cuando x es 3, abarca casos en los que los aminoácidos no son idénticos, p. ej., Gln-Asp-Ala, así como casos 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.

35 En algunos casos, el polipéptido entrecruzado de la descripción comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno intrahelicoidales. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un aminoácido α,α-disustituido. En un ejemplo, B es un aminoácido α,α-disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C,



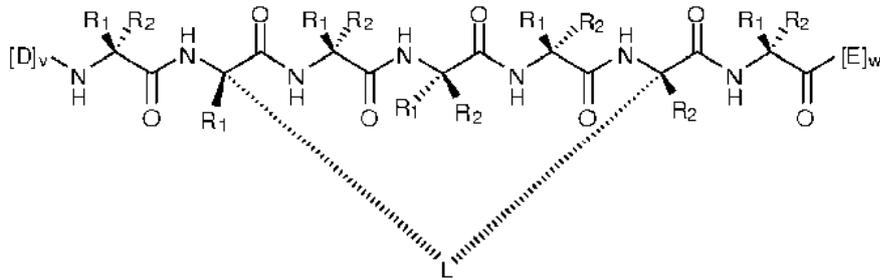
40 En otros casos, la longitud del conector formador de macrociclo L, como se mide desde un primer Cα a un segundo Cα, se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria deseada, tal como una hélice α formada por residuos del polipéptido entrecruzado que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los que se encuentran entre el primer Cα y un segundo Cα.

En un caso, el polipéptido entrecruzado de Fórmula (I) es:



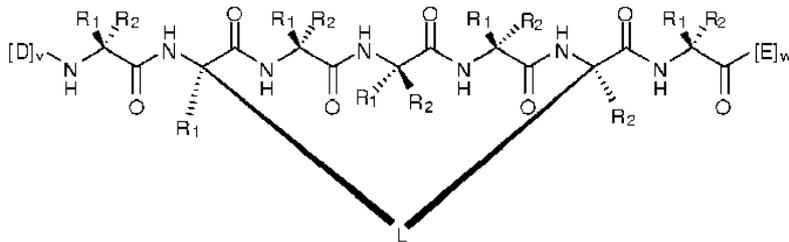
en donde cada R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-;

En casos relacionados, el polipéptido entrecruzado de Fórmula (I) es:

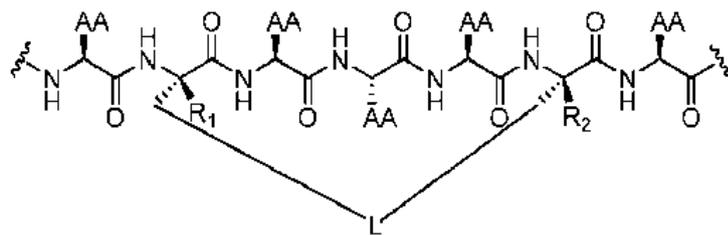


5

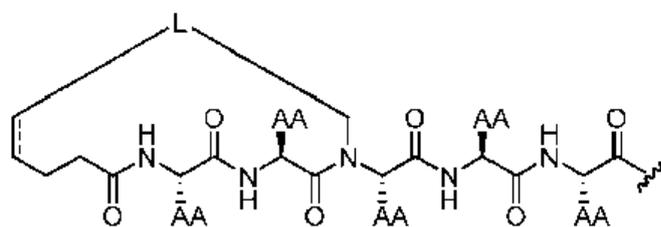
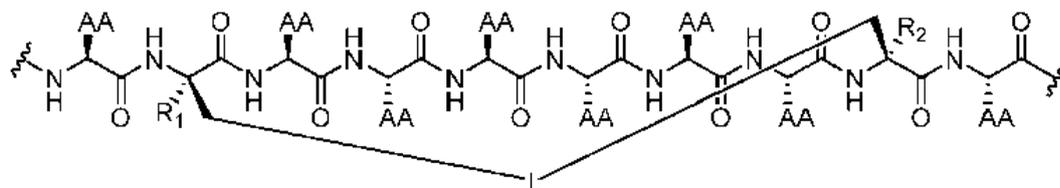
o

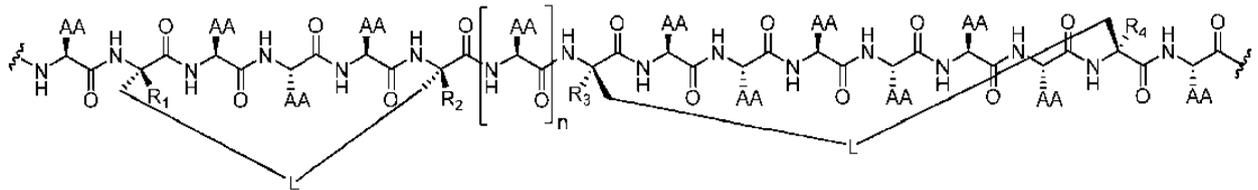
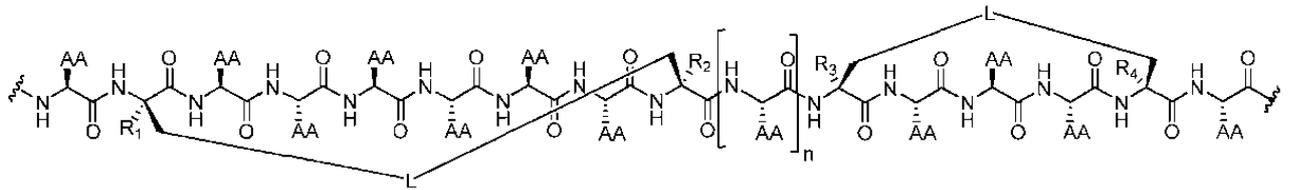
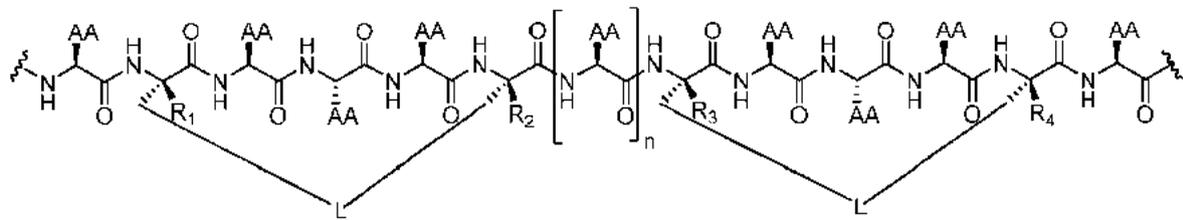
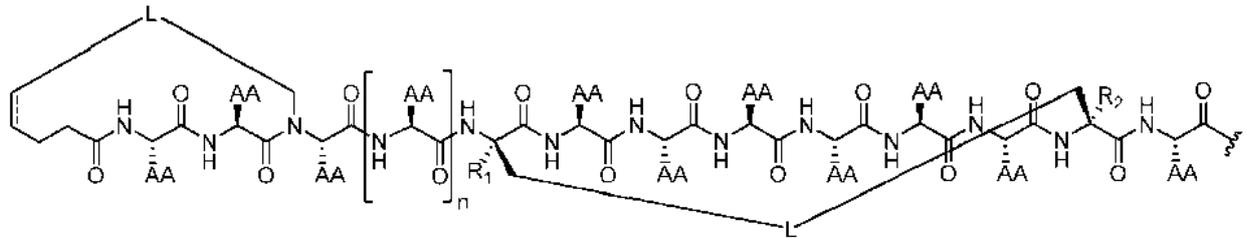
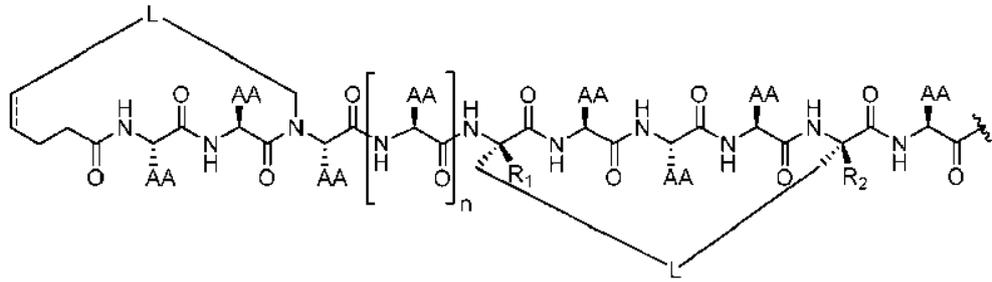


En otros casos, el macrociclo peptidomimético de Fórmula (I) es un compuesto de cualquiera de las fórmulas mostradas a continuación:

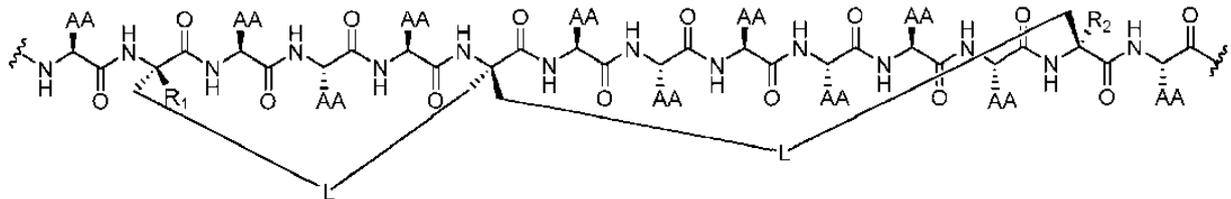
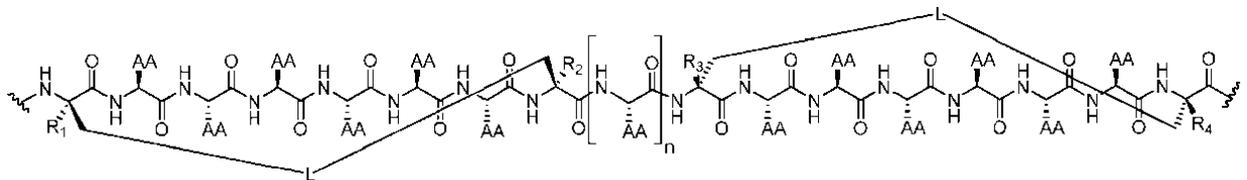


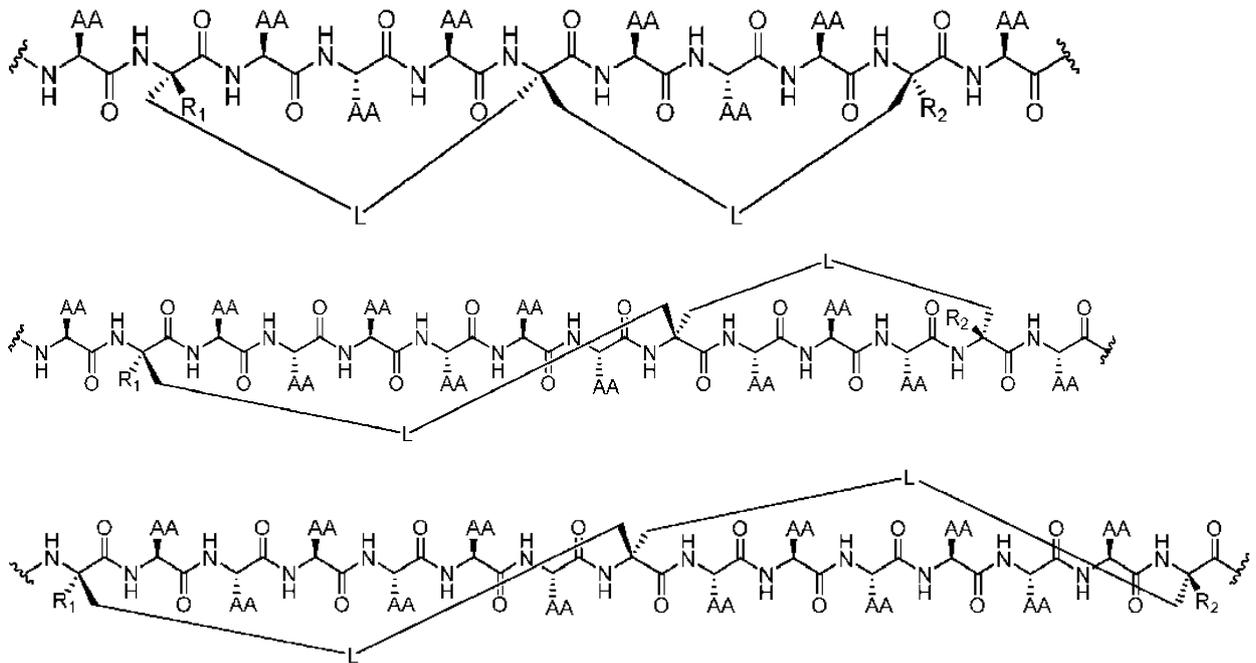
10





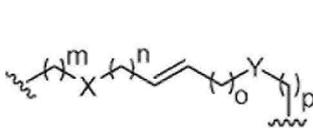
5



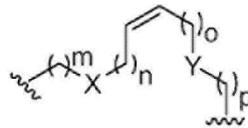


5 en donde "AA" representa cualquier cadena lateral de aminoácido natural o no natural y " " es [D]_v, [E]_w es como se definió anteriormente y n es un número entero entre 0 y 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500. En algunos casos, n es 0. En otros casos, n es inferior a 50.

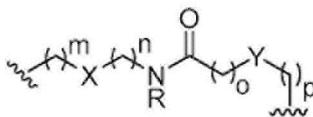
A continuación, se muestran casos ejemplares del conector formador de macrociclo L.



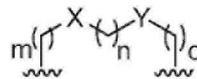
donde X, Y = -CH₂, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10



donde X, Y = -CH₂, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10

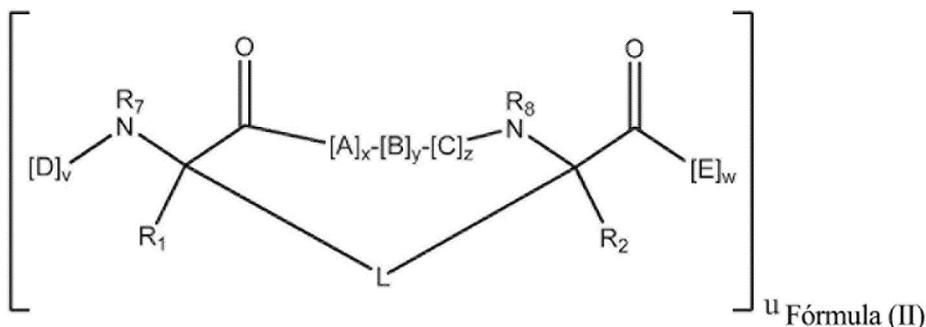


donde X, Y = -CH₂, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, alquilo, otro sustituyente



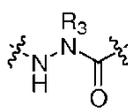
donde X, Y = -CH₂, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10

En algunos casos, los polipéptidos entrecruzados de la descripción tienen la Fórmula (I):



en donde:

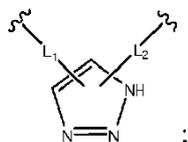
cada A, C, D y E son independientemente un aminoácido natural o no natural;

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

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-;

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

10 L es un conector formador de macrociclo de fórmula



L₁, L₂ y L₃ son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R₄-K-R₄-]_n, estando cada uno opcionalmente sustituidos 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;

25 R₈ 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 E;

u es un número entero de 0-10;

v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000;

x es un número entero de 0-10;

30 y es un número entero de 0-10;

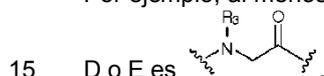
z es un número entero de 0-10; y

n es un número entero de 1-5.

5 En un ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otros casos, R₁ y R₂ son metilo.

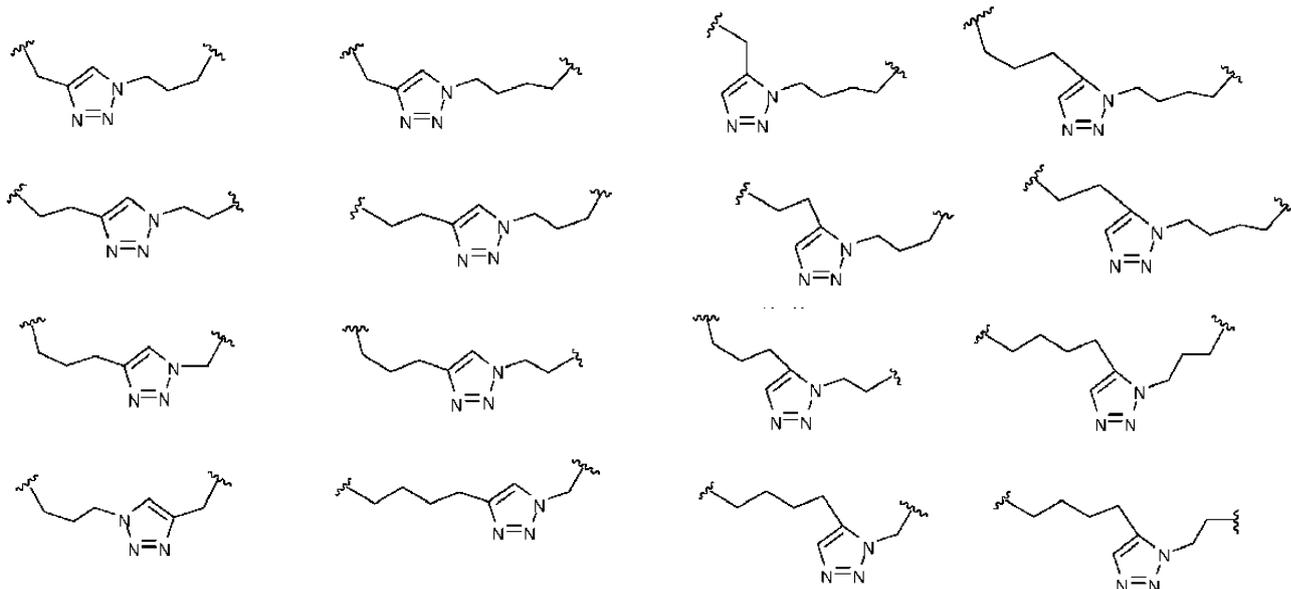
10 En algunos casos, x+y+z es al menos 3. En otros casos, x+y+z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo de la invención se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula [A]_x, cuando x es 3, abarca casos en los que los aminoácidos no son idénticos, p. ej., Gln-Asp-Ala, así como casos 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.

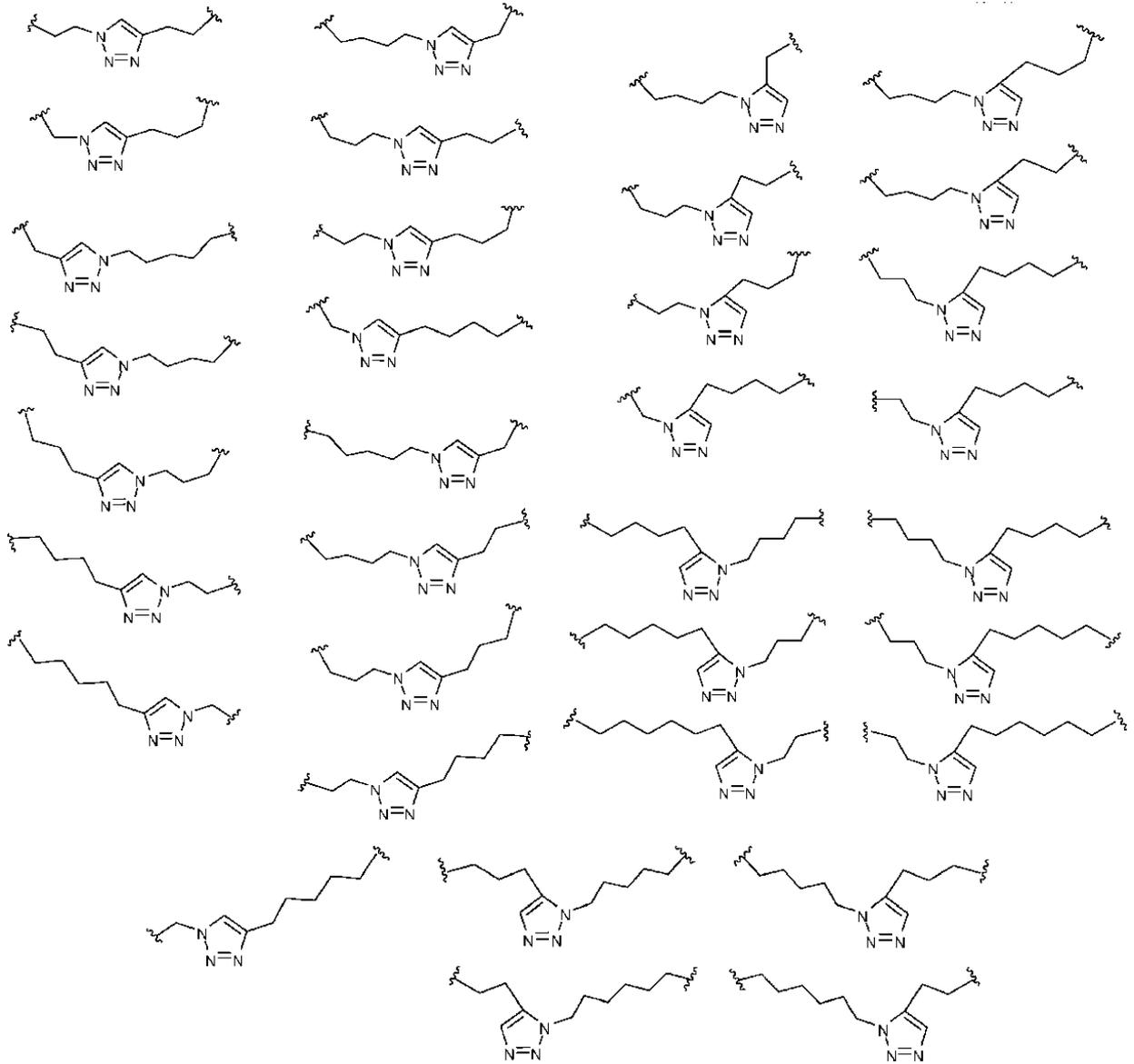
En algunos casos, el polipéptido entrecruzado de la invención comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno intrahelicoidales. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un aminoácido α,α-disustituido. En un ejemplo, B es un aminoácido α,α-disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C,

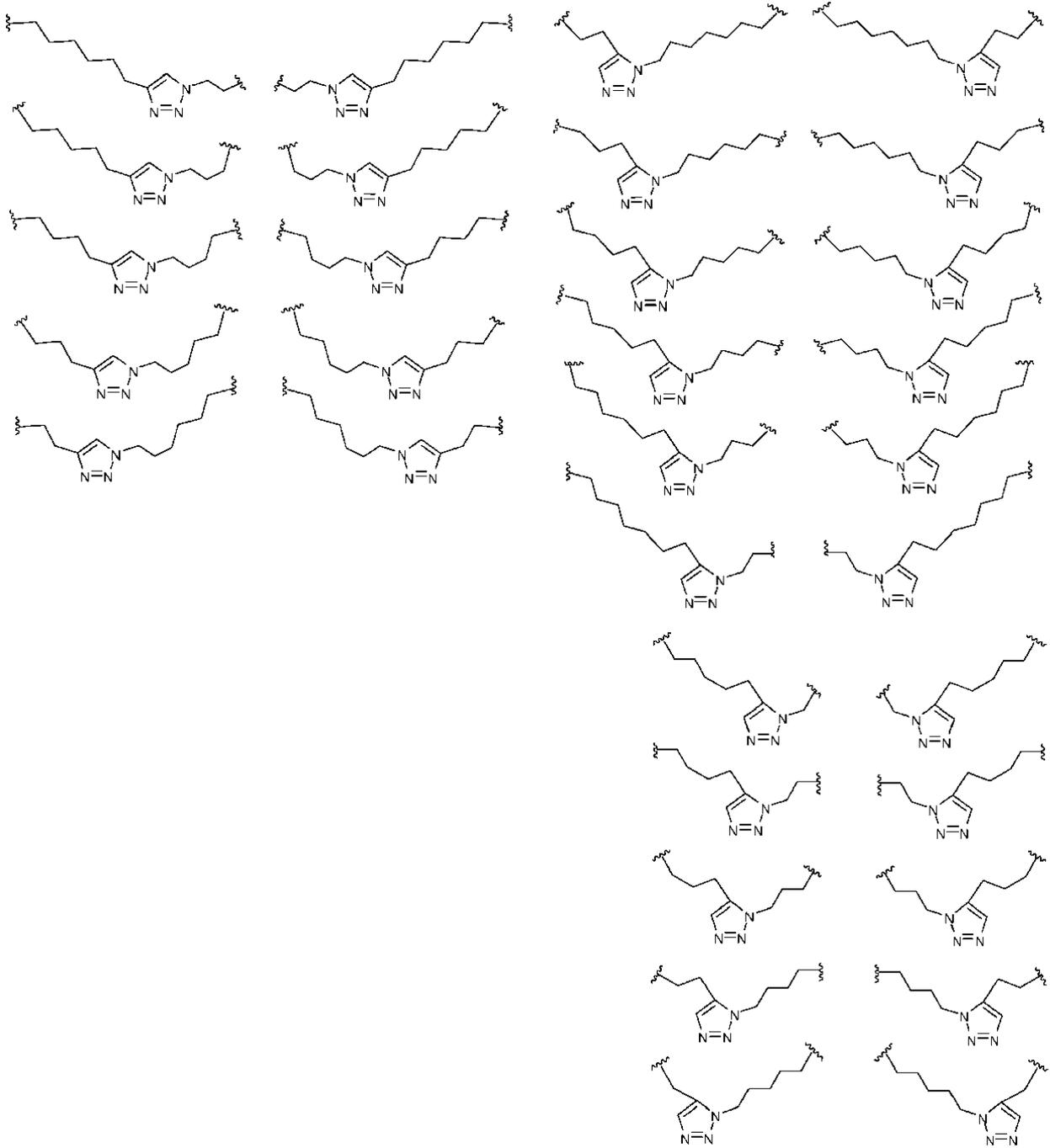


En otros casos, la longitud del conector formador de macrociclo L, como se mide desde un primer Cα a un segundo Cα, se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria deseada, tal como una hélice α formada por residuos del polipéptido entrecruzado que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los que se encuentran entre el primer Cα y un segundo Cα.

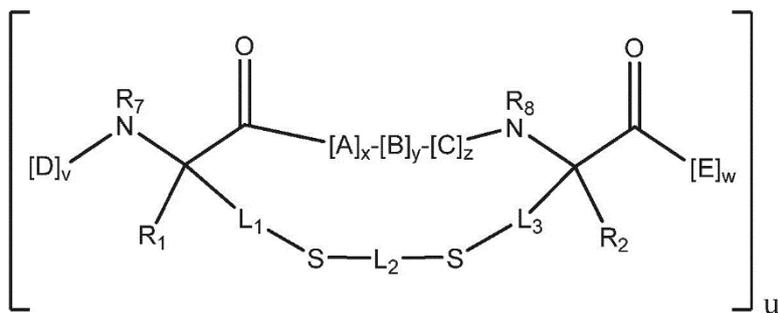
20 A continuación, se muestran casos ejemplares del conector formador de macrociclo L.







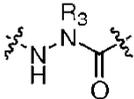
En otros casos, la invención proporciona polipéptidos entrecruzados de Fórmula (III):



Fórmula (III)

en donde:

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

5 B es un aminoácido natural o no natural, análogo de aminoácido, , [-NH-L4-CO-], [-NH-L4-SO2-] o [-NH-L4-];

R1 y R2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-;

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

10 L1, L2, L3 y L4 son independientemente alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R4-K-R4-]n, estando cada uno sin sustituir o sustituidos con R5;

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

15 cada R4 es alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, arileno o heteroarileno;

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

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

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

u es un número entero de 0-10;

25 v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000;

x es un número entero de 0-10;

y es un número entero de 0-10;

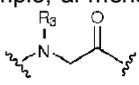
z es un número entero de 0-10; y

30 n es un número entero de 1-5.

En un ejemplo, al menos uno de R_1 y R_2 es alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R_1 como R_2 son independientemente alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R_1 y R_2 es metilo. En otros casos, R_1 y R_2 son metilo.

5 En algunos casos de la descripción, $x+y+z$ es al menos 3. En otros casos de la invención, $x+y+z$ es 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 de la invención se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula $[A]_x$, cuando x es 3, abarca casos en los que los aminoácidos no son idénticos, p. ej., Gln-Asp-Ala, así como casos 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.

10 En algunos casos, el polipéptido entrecruzado comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R_8 es -H, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno intrahelicoidales. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un aminoácido α,α -disustituido. En un ejemplo, B es un aminoácido α,α -disustituido. Por ejemplo, al menos

uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C, D o E es 

15 En otros casos, la longitud del conector formador de macrociclo $[-L_1-S-L_2-S-L_3-]$, como se mide desde un primer $C\alpha$ a un segundo $C\alpha$, se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria deseada, tal como una hélice α formada por residuos del polipéptido entrecruzado que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los que se encuentran entre el primer $C\alpha$ y un segundo $C\alpha$.

20 Los macrociclos o precursores de macrociclo se sintetizan, por ejemplo, mediante métodos en fase solución o fase sólida y pueden contener aminoácidos tanto presentes de forma natural como no presentes de forma natural. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids" en Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, editado por G.C. Barrett, Chapman and Hall, 1985. En algunos casos, los restos tiol son las cadenas laterales de los residuos de aminoácido L-cisteína, D-cisteína, α -metil-L-cisteína, α -metil-D-cisteína, L-homocisteína, D-homocisteína, α -metil-L-homocisteína o α -metil-D-homocisteína. Un reactivo bisalquilante es de la fórmula general $X-L_2-Y$ en donde L_2 es un resto conector y X e Y son grupos salientes que son desplazados por restos -SH para formar enlaces con L_2 . En algunos casos, X e Y son halógenos tales como I, Br o Cl.

25 En otros casos, D y/o E en el compuesto de Fórmula I, II o III están modificados adicionalmente con el fin de facilitar la captación celular. En algunos casos, la lipidación o PEGilación de un polipéptido entrecruzado facilita la captación celular, aumenta la biodisponibilidad, aumenta la circulación sanguínea, altera la farmacocinética, reduce la inmunogenicidad y/o reduce la frecuencia de administración necesaria.

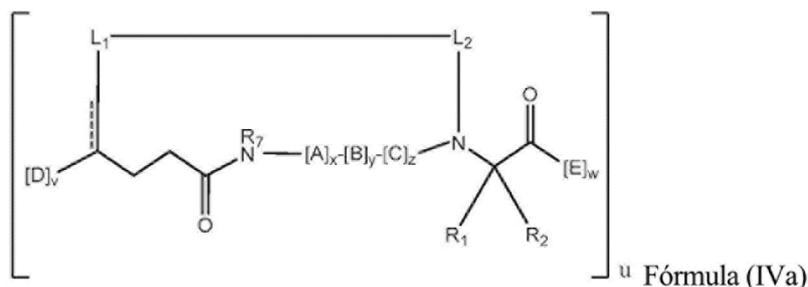
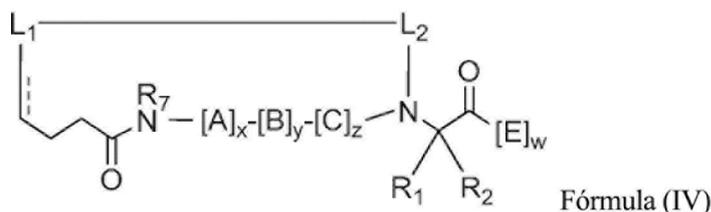
30 En otros casos, al menos uno de [D] y [E] en el compuesto de Fórmula I, II o III representan un resto que comprende un conector formador de macrociclo adicional de tal forma que el polipéptido entrecruzado comprende al menos dos conectores formadores de macrociclo. En un caso específico, un polipéptido entrecruzado comprende dos conectores formadores de macrociclo.

35 En los polipéptidos entrecruzados de la descripción, cualquiera de los conectores formadores de macrociclo descritos en la presente memoria se puede usar en cualquier combinación con cualquiera de las secuencias mostradas en las Tablas 1-4 y también con cualquiera de los sustituyentes R- indicados en la presente memoria.

40 En algunos casos, el polipéptido entrecruzado comprende al menos un motivo de hélice α . Por ejemplo, A, B y/o C en el compuesto de Fórmula I, II o III incluyen una o más hélices α . Como norma general, las hélices α incluyen entre 3 y 4 residuos de aminoácido por giro. En algunos casos, la hélice α del polipéptido entrecruzado incluye de 1 a 5 giros y, por lo tanto, de 3 a 20 residuos de aminoácido. En casos específicos, la hélice α incluye 1 giro, 2 giros, 3 giros, 4 giros o 5 giros. En algunos casos, el conector formador de macrociclo estabiliza un motivo de hélice α incluido en el polipéptido entrecruzado. Por tanto, en algunos casos, la longitud del conector formador de macrociclo L, desde un primer $C\alpha$ hasta un segundo $C\alpha$, se selecciona para aumentar la estabilidad de una hélice α . En algunos casos, el conector formador de macrociclo abarca de 1 giro a 5 giros de la hélice α . En algunos casos, el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 giro, 2 giros, 3 giros, 4 giros o 5 giros de la hélice α . En algunos casos, la longitud del conector formador de macrociclo es aproximadamente de 5 Å a 9 Å por giro de la hélice α o aproximadamente de 6 Å a 8 Å por giro de la hélice α . Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 giro de una 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 giros de una 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 giros de una 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 giros de una 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 giros de una 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 giro de una hélice α , la conexión contiene aproximadamente de 4 átomos a 12 átomos, aproximadamente de 6 átomos a 10 átomos, o aproximadamente 8 átomos. Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 giros de la hélice α , la conexión contiene aproximadamente de 7 átomos a 15 átomos, de aproximadamente 9 átomos a 13 átomos, o aproximadamente 11 átomos. Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 giros de la hélice α , la conexión contiene aproximadamente de 13 átomos a 21 átomos, de aproximadamente 15 átomos a 19 átomos, o aproximadamente 17 átomos. Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 giros de la hélice α , la conexión contiene aproximadamente de 19 átomos a 27 átomos, de aproximadamente 21 átomos a 25 átomos, o aproximadamente 23 átomos. Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 giros de la hélice α , la conexión contiene aproximadamente de 25 átomos a 33 átomos, de aproximadamente 27 átomos a 31 átomos, o aproximadamente 29 átomos. Cuando el conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 giro de la hélice α , 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 giros 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 giros 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 giros 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 conector formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 giros 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.

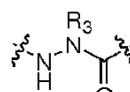
En otros casos, son polipéptidos entrecruzados de Fórmula (IV) o (IVa):



30 en donde:

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

B es un aminoácido natural o no natural, análogo de aminoácido, $[-NH-L_3-CO-]$, $[-NH-L_3-SO_2-]$ o $[-NH-$



$]$, $[-NH-L_3-CO-]$, $[-NH-L_3-SO_2-]$ o $[-NH-$

35 R_1 y R_2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

R_3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R_5 ;

L es un conector formador de macrociclo de fórmula $-L_1-L_2-$;

L_1 y L_2 son independientemente alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, cicloarileno, heterocicloarileno o $[-R_4-K-R_4-]_n$, estando cada uno opcionalmente sustituidos con R_5 ;

- 5 cada R_4 es alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 o $CONR_3$;

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

- 10 cada R_6 es independientemente $-H$, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R_7 es $-H$, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R_5 ;

u es un número entero de 0-10;

- 15 v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000;

x es un número entero de 0-10;

y es un número entero de 0-10;

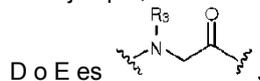
z es un número entero de 0-10; y

- 20 n es un número entero de 1-5.

En un ejemplo, al menos uno de R_1 y R_2 es alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R_1 como R_2 son independientemente alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R_1 y R_2 es metilo. En otros casos, R_1 y R_2 son metilo.

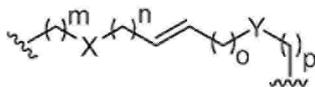
- 25 En algunos casos de la descripción, $x+y+z$ es al menos 1. En algunos casos de la invención, $x+y+z$ es al menos 2. En otros casos de la descripción, $x+y+z$ es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo de la invención se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula $[A]_x$, cuando x es 3, abarca casos en los que los aminoácidos no son idénticos, p. ej., Gln-Asp-Ala, así como casos 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.

- 30 En algunos casos, el polipéptido entrecruzado de la descripción comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R_8 es $-H$, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno intrahelicoidales. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un aminoácido α,α -disustituido. En un ejemplo, B es un aminoácido α,α -disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C,

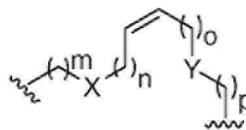


- 35 En otros casos, la longitud del conector formador de macrociclo L, como se mide desde un primer $C\alpha$ a un segundo $C\alpha$, se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria deseada, tal como una hélice α formada por residuos del polipéptido entrecruzado que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los que se encuentran entre el primer $C\alpha$ y un segundo $C\alpha$.

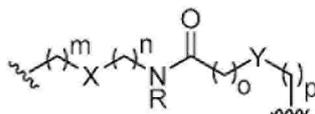
A continuación, se muestran casos ejemplares del conector formador de macrociclo L.



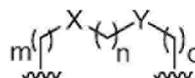
donde X, Y = $-\text{CH}_2$, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10



donde X, Y = $-\text{CH}_2$, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10



donde X, Y = $-\text{CH}_2$, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, alquilo, otro sustituyente



donde X, Y = $-\text{CH}_2$, O, S o NH
m, n, o, p = 0-10

Preparación de polipéptidos entrecruzados

5 Los polipéptidos entrecruzados se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cualquiera de los residuos indicados mediante "X" en las Tablas 1, 2, 3 o 4 se puede sustituir por un residuo capaz de formar un entrecruzador con un segundo residuo de la misma molécula o un precursor de tal residuo.

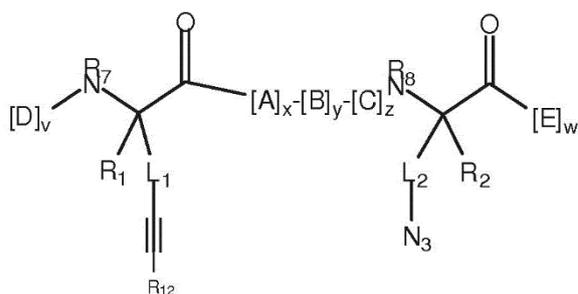
10 En la técnica se conocen diversos métodos de llevar a cabo la formación de polipéptidos entrecruzados. Por ejemplo, la preparación de polipéptidos entrecruzados de Fórmula I se describe en Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister & Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky et al., Science 305:1466-1470 (2004); la patente de Estados Unidos n.º 7 192 713 y la solicitud PCT WO2008/121767. Los aminoácidos y precursores de aminoácido α,α -disustituídos descritos en las referencias citadas se pueden emplear en la síntesis de polipéptidos precursores del polipéptido entrecruzado. Tras la incorporación de tales aminoácidos en los polipéptidos precursores, se hacen reaccionar las olefinas terminales con un catalizador de metátesis, lo que lleva a la formación del polipéptido entrecruzado.

15 En otros casos, los macrociclos peptidomiméticos de la invención son de Fórmula IV o IVa. Los métodos para la preparación de tales macrociclos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7 202 332.

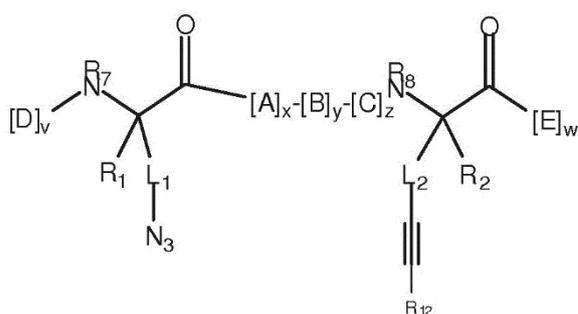
20 En algunos casos, la síntesis de estos polipéptidos entrecruzados implica un proceso multietapa que se caracteriza por la síntesis de un precursor peptidomimético que contiene un resto azida y un resto alquino seguida de la puesta en contacto del precursor peptidomimético con un reactivo de macrociclación para generar un polipéptido entrecruzado conectado a triazol. Los macrociclos o precursores de macrociclo se sintetizan, por ejemplo, mediante métodos en fase solución o fase sólida y pueden contener aminoácidos tanto presentes de forma natural como no presentes de forma natural. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids" en Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, editado por G.C. Barrett, Chapman and Hall, 1985.

25 En algunos casos, una azida está conectada al carbono α de un residuo y un alquino está unido al carbono α de otro residuo. En algunos casos, los restos azida son análogos azido de los 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. En otro caso, el resto alquino es L-propargilglicina. En otros casos más, 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.

30 En la presente memoria se describe un método para sintetizar un polipéptido entrecruzado, método que comprende las etapas de poner en contacto un precursor peptidomimético de Fórmula V o Fórmula VI:



(Fórmula V)



(Fórmula VI)

con un reactivo de macrociclación;

en donde v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ son como se definieron para la Fórmula (II); R₁₂ es -H cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Cu y R₁₂ es -H o alquilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru; y en donde además dicha etapa de puesta en contacto da lugar a la formación de una conexión covalente entre los restos alquino y azida de la Fórmula III o la Fórmula IV. Por ejemplo, R₁₂ puede ser metilo cuando el reactivo de macrociclación es un reactivo de Ru.

En los polipéptidos entrecruzados de la invención, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-. En algunos casos, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-; En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un aminoácido α,α-disustituido. En un ejemplo, B es un aminoácido α,α-disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico.

Por ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, sin sustituir o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otros casos, R₁ y R₂ son metilo. El reactivo de macrociclación puede ser un reactivo de Cu o un reactivo de Ru.

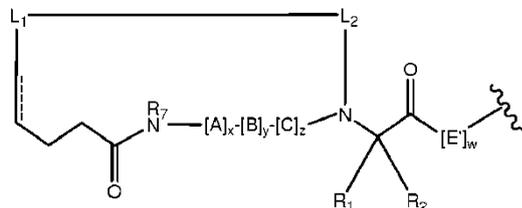
En algunos casos, el precursor peptidomimético se purifica antes de la etapa de puesta en contacto. En otros casos, el polipéptido entrecruzado se purifica después de la etapa de puesta en contacto. En otros casos más, el polipéptido entrecruzado se repliega después de la etapa de puesta en contacto. El método se puede realizar en solución o, como alternativa, el método se puede realizar sobre un soporte sólido.

También se contempla en la presente memoria la realización del método de la invención en presencia de una macromolécula diana que se une al precursor peptidomimético o al polipéptido entrecruzado en condiciones que favorecen dicha unión. En algunos casos, el método se realiza en presencia de una macromolécula diana que se une preferentemente al precursor peptidomimético o al polipéptido entrecruzado en condiciones que favorecen dicha unión. El método también se puede aplicar para sintetizar una biblioteca de polipéptidos entrecruzados.

En algunos casos, el resto alquino del precursor peptidomimético de Fórmula V o Fórmula VI es 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 y ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninoico. En otros casos, el resto azida del precursor peptidomimético de Fórmula V o Fórmula VI es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en e-azido-L-lisina, e-azido-D-lisina, e-azido-α-metil-L-lisina, e-azido-α-metil-D-lisina, d-azido-α-metil-L-ornitina y d-azido-α-metil-D-ornitina.

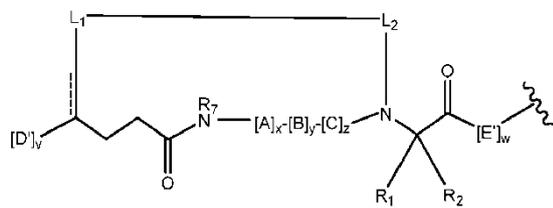
En algunos casos, $x+y+z$ es 3 y A, B y C son independientemente aminoácidos naturales o no naturales. En otros casos, $x+y+z$ es 6 y A, B y C son independientemente aminoácidos naturales o no naturales.

En algunos casos de macrociclos peptidomiméticos, $[D]_v$ y/o $[E]_w$ comprenden macrociclos peptidomiméticos o estructuras macrocíclicas adicionales. Por ejemplo, $[D]_v$ puede tener la fórmula:



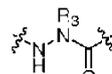
5

o



en donde cada A, C, D' y E' son independientemente un aminoácido natural o no natural;

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



, $[-NH-L_3-CO-]$, $[-NH-L_3-SO_2-]$ o $[-NH-L_3-$

10

R_1 y R_2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo o heterocicloalquilo, sin sustituir o sustituidos con halo-, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

R_3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R_5 ;

15

L_1 y L_2 son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno o $[-R_4-K-R_4-]_n$, estando cada uno opcionalmente sustituidos con R_5 ;

cada R_4 es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno o heteroarileno;

20

cada K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 o $CONR_3$;

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

cada R_6 es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, un resto fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

25

R_7 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituidos con R_5 ;

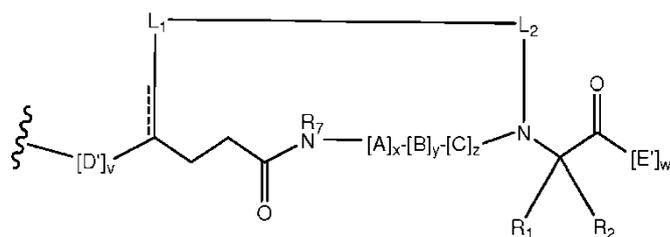
v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 1-1000; y

x es un número entero de 0-10.

30

En otro caso, $[E]_w$ tiene la fórmula:



en el párrafo anterior.

En algunos casos, la etapa de puesta en contacto se realiza 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 del grupo que consiste en 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 hélice.

Los grupos protectores, grupos salientes o reactivos alternativos pero equivalentes están sustituidos y algunas de las etapas sintéticas se realizan en secuencias u órdenes alternativos para producir los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupo protector (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, aquellas tales como las descritas en Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); Fieser and 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 en ediciones posteriores de los mismos.

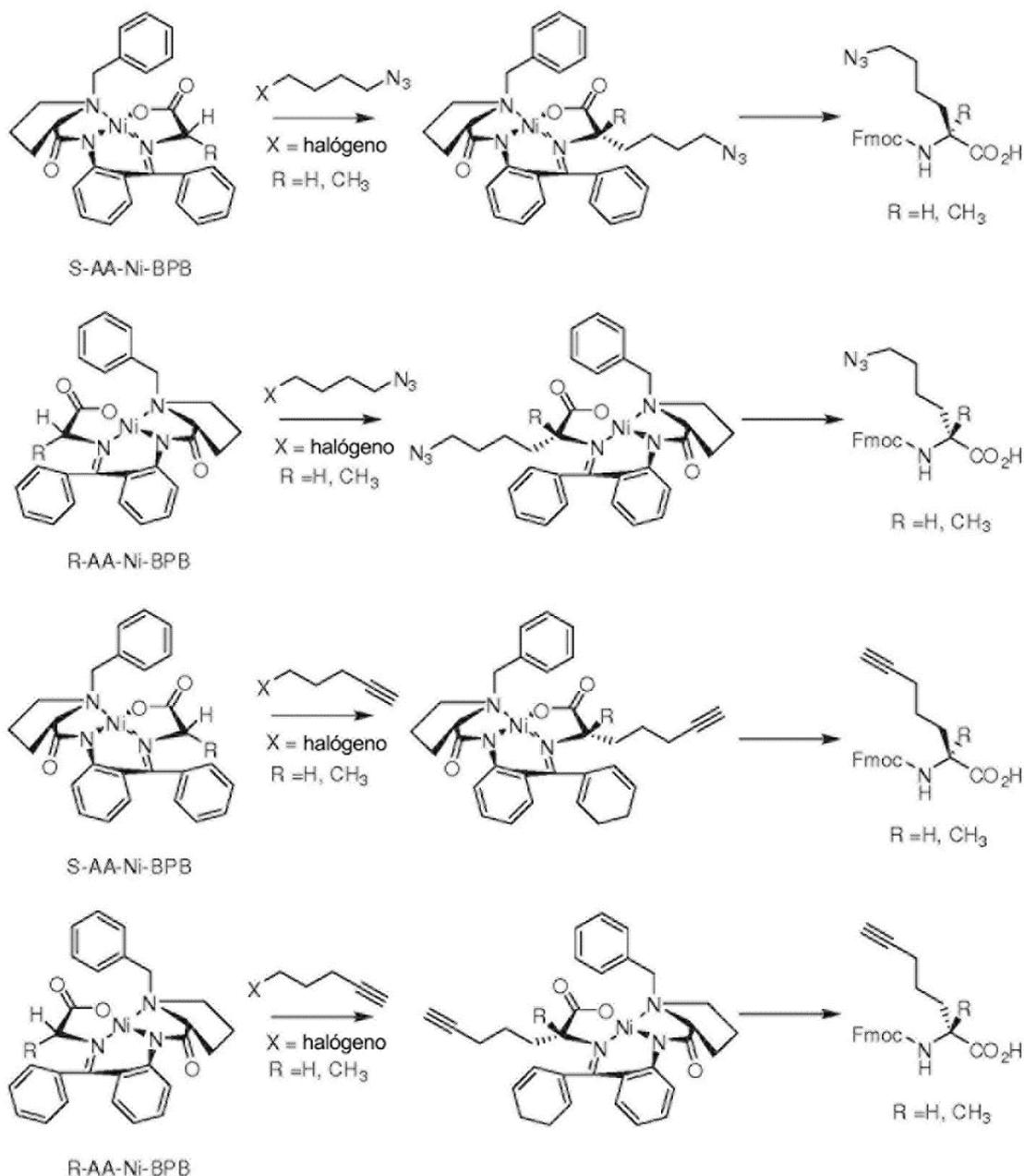
Los polipéptidos entrecruzados se fabrican, por ejemplo, mediante métodos de síntesis química, tales como los descritos en Fields et al., Capítulo 3 en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., Nueva York, N. Y., 1992, p. 77. Por consiguiente, por ejemplo, los péptidos se sintetizan usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con la amina protegida mediante química tBoc o Fmoc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, un sintetizador de péptidos automatizado (p. ej., Applied Biosystems (Foster City, CA), Modelo 430A, 431 o 433).

Una forma de producir los precursores peptidomiméticos y los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria usa síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS). El aminoácido C-terminal está unido a una resina de poliestireno entrecruzada por medio de un enlace ácido lábil con una molécula conectora. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para síntesis, lo que hace que sea relativamente sencillo y rápido lavar los reactivos y subproductos en exceso. El N-terminal está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácidos, pero extraíble por bases. Los grupos funcionales de la cadena lateral están protegidos, según proceda, con grupos estables en bases y lábiles en ácidos.

Los precursores peptidomiméticos más largos se producen, por ejemplo, uniendo péptidos sintéticos individuales usando ligadura química nativa. Como alternativa, los péptidos sintéticos más largos se biosintetizan mediante técnicas de ADN recombinante y expresión de proteínas bien conocidas. Tales técnicas se proporcionan en manuales estándar con protocolos detallados bien conocidos. Para construir un gen que codifica un precursor peptidomimético de esta invención, la secuencia de aminoácidos se traduce de forma inversa para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, preferiblemente con codones que son óptimos para el organismo en el que se va a expresar el gen. Después, se fabrica un gen sintético, habitualmente sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si procede. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta a una célula huésped. A continuación, se expresa el gen en condiciones adecuadas que sean apropiadas para el sistema de expresión y el huésped seleccionados. El péptido se purifica y caracteriza mediante métodos estándar.

Los precursores peptidomiméticos se fabrican, por ejemplo, de una forma combinatorial y de alto rendimiento usando, por ejemplo, un sintetizador combinatorial policanal de alto rendimiento (p. ej., el sintetizador de péptidos multicanal Thuramed TETRAS de CreoSalus, Louisville, KY o el sintetizador de péptidos multicanal Modelo Apex 396 de AAPPTec, Inc., Louisville, KY).

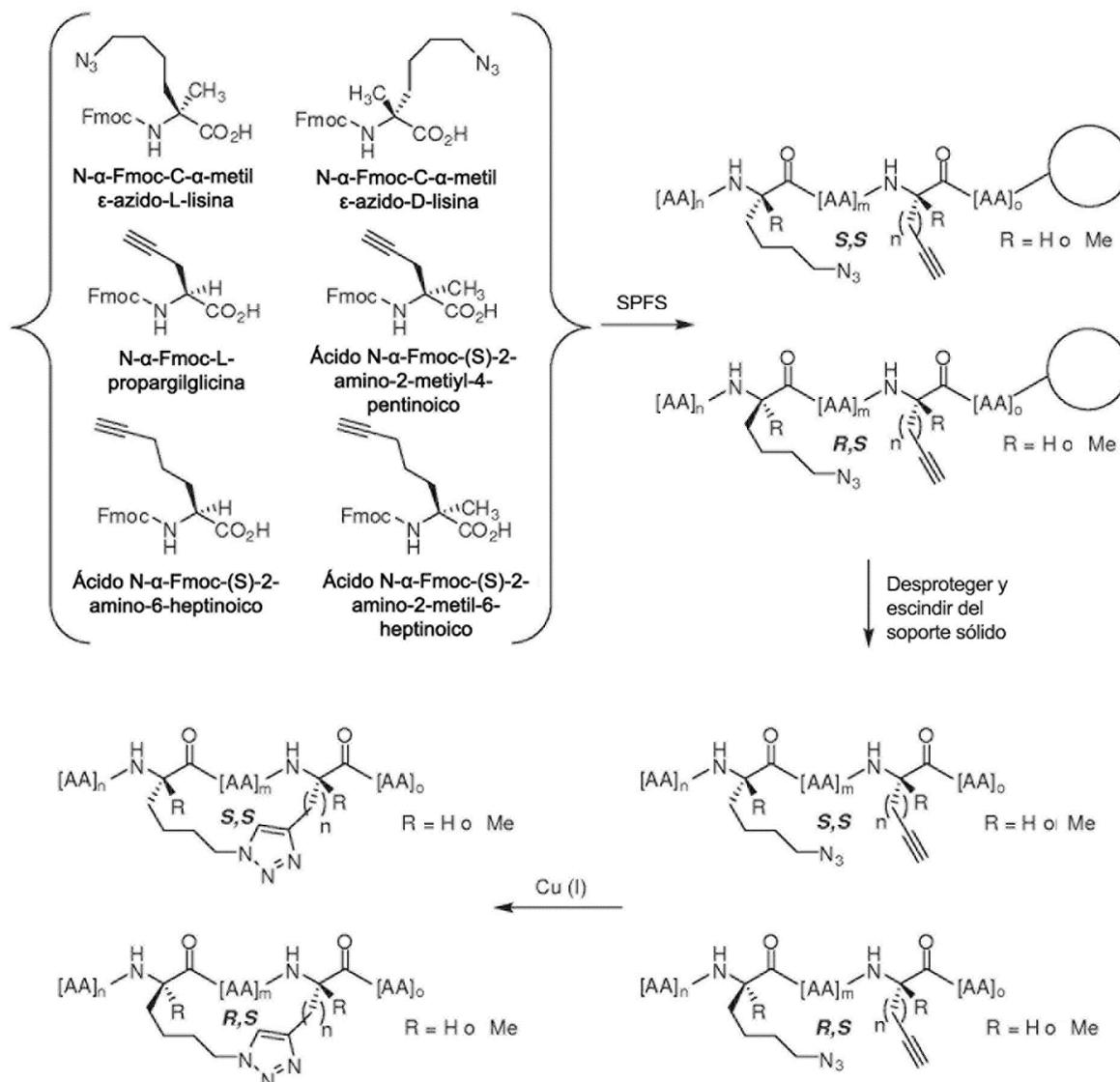
Los esquemas sintéticos siguientes se proporcionan de forma meramente ilustrativa y no tienen como objeto limitar el alcance de la invención, como se describe en la presente memoria. Para simplificar los dibujos, los esquemas ilustrativos representan los análogos azidoaminoácido e-azido- α -metil-L-lisina y e-azido- α -metil-D-lisina, y los análogos alquinoaminoácido L-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico y ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico. Por tanto, en los esquemas sintéticos siguientes, cada R₁, R₂, R₇ y R₈ son -H; cada L₁ es -(CH₂)₄- y cada L₂ es -(CH₂)₄-. Sin embargo, como se ha señalado a lo largo de la descripción detallada, se pueden emplear muchos otros análogos de aminoácido en los que R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ y L₂ se pueden seleccionar independientemente de las diversas estructuras descritas en la presente memoria.

Esquema sintético 1:

El esquema sintético 1 describe la preparación de varios compuestos de la invención. Los complejos de Ni(II) de bases de Schiff derivados del auxiliar quiral (S)-2-[N-(N'-bencilproil)amino]benzofenona (BPB) y aminoácidos tales como glicina o alanina se preparan como se describe en Belokon et al. (1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252.

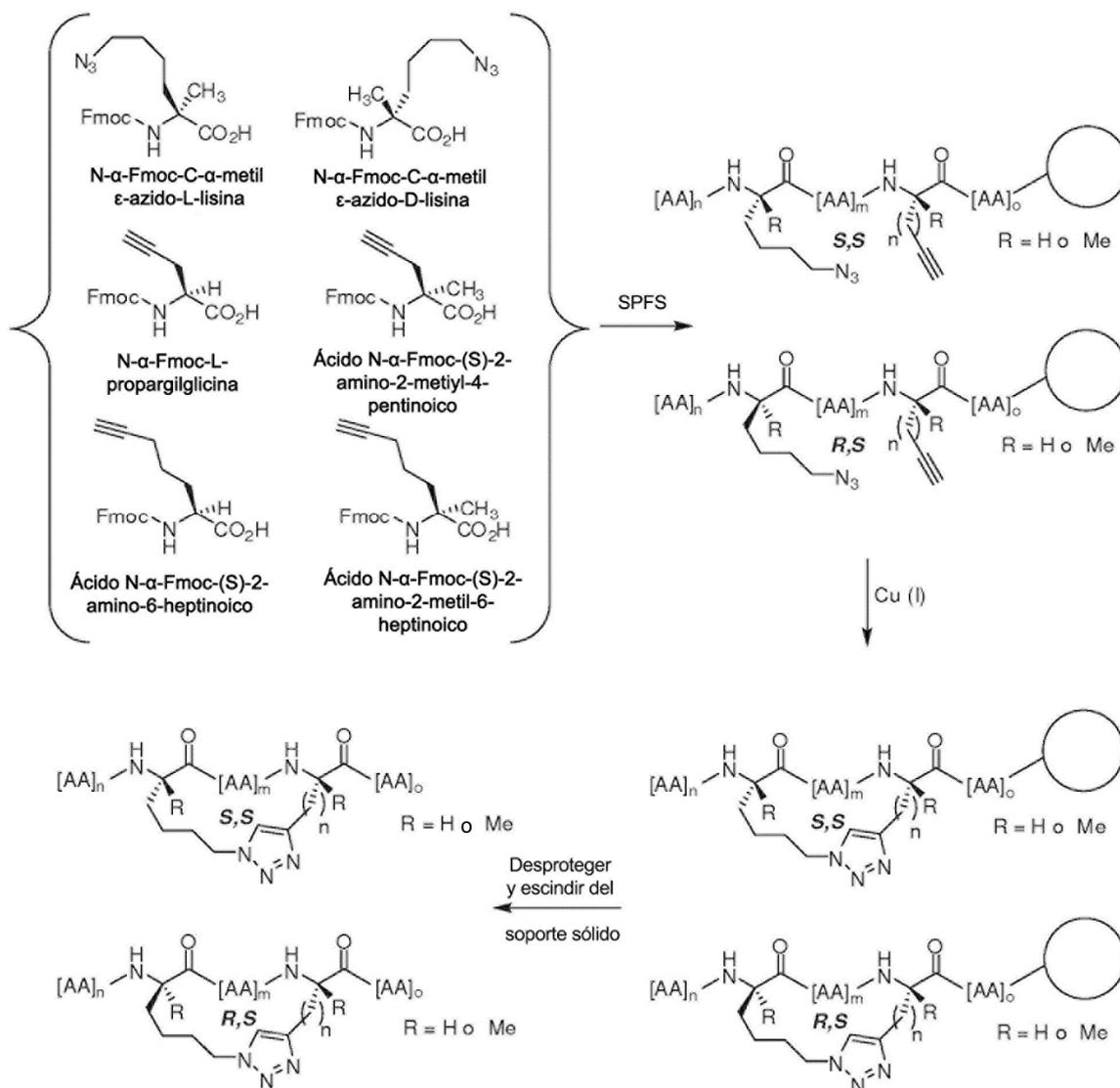
5 Los complejos resultantes se hacen reaccionar posteriormente con reactivos alquilantes que comprenden un resto azido o alquino para producir compuestos de la invención enriquecidos enantioméricamente. Si se desea, los compuestos resultantes se pueden proteger para su uso en la síntesis de péptidos.

Esquema sintético 2:



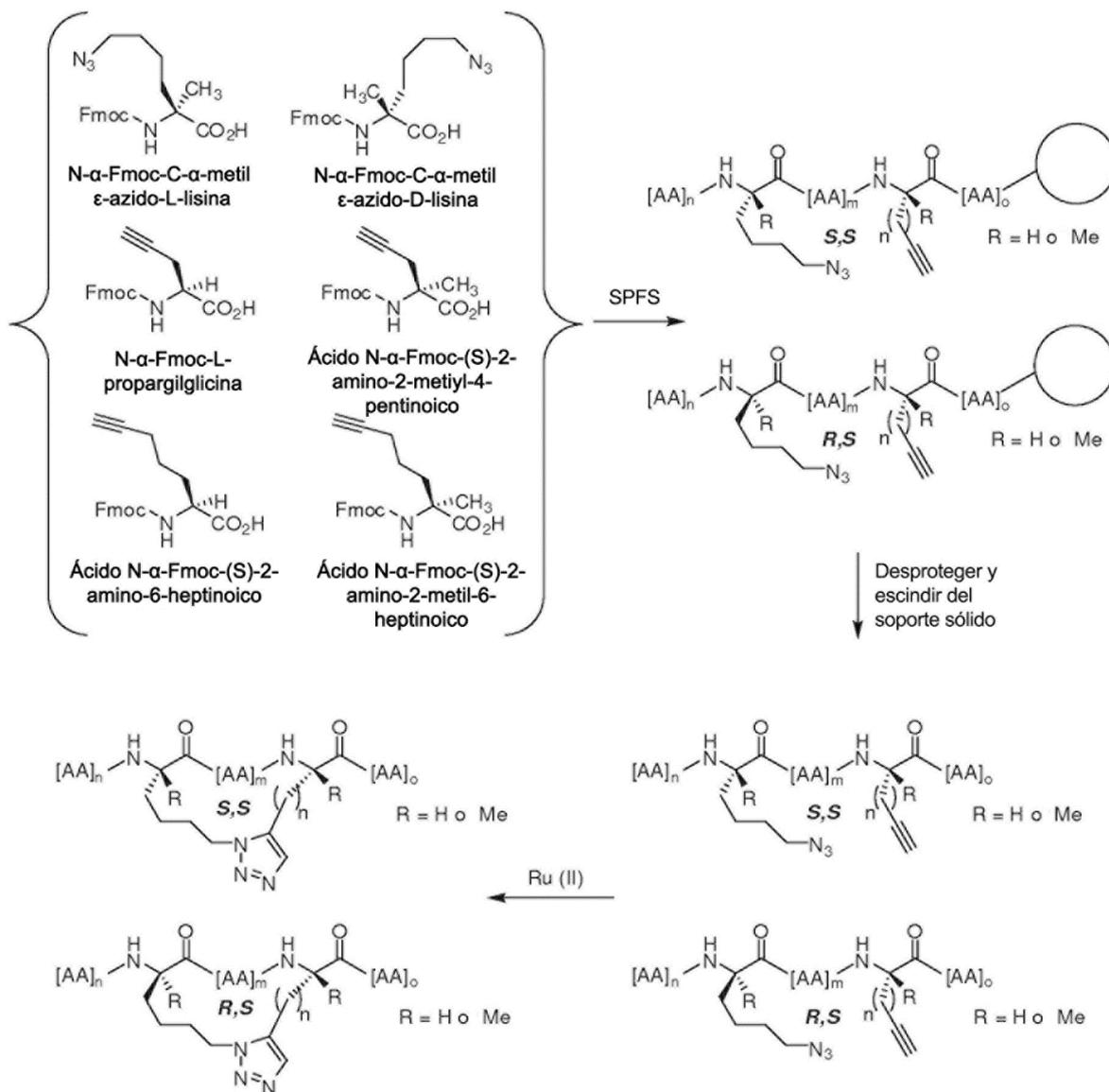
En el método general de síntesis de polipéptidos entrecruzados mostrado en el Esquema sintético 2, el precursor peptidomimético contiene un resto azido y un resto alquino y se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase solución o en fase sólida (SPFS) usando el aminoácido disponible en el mercado N- α -Fmoc-L-propargilglicina 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, N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. A continuación, el precursor peptidomimético se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95 %). El precursor peptidomimético se hace reaccionar como una mezcla cruda o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como un Cu(I) en soluciones 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; Punna et al. (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). En un caso, la reacción de formación de triazol se realiza en condiciones que favorecen la formación de hélice α . En un caso, la etapa de macrociclación se realiza en un disolvente elegido del grupo que consiste en H₂O, THF, CH₃CN, DMF, DIPEA, tBuOH o una mezcla de los mismos. En otro caso, la etapa de macrociclación se realiza en DMF. En algunos casos, la etapa de macrociclación se realiza en un disolvente acuoso o parcialmente acuoso tamponado.

Esquema sintético 3:



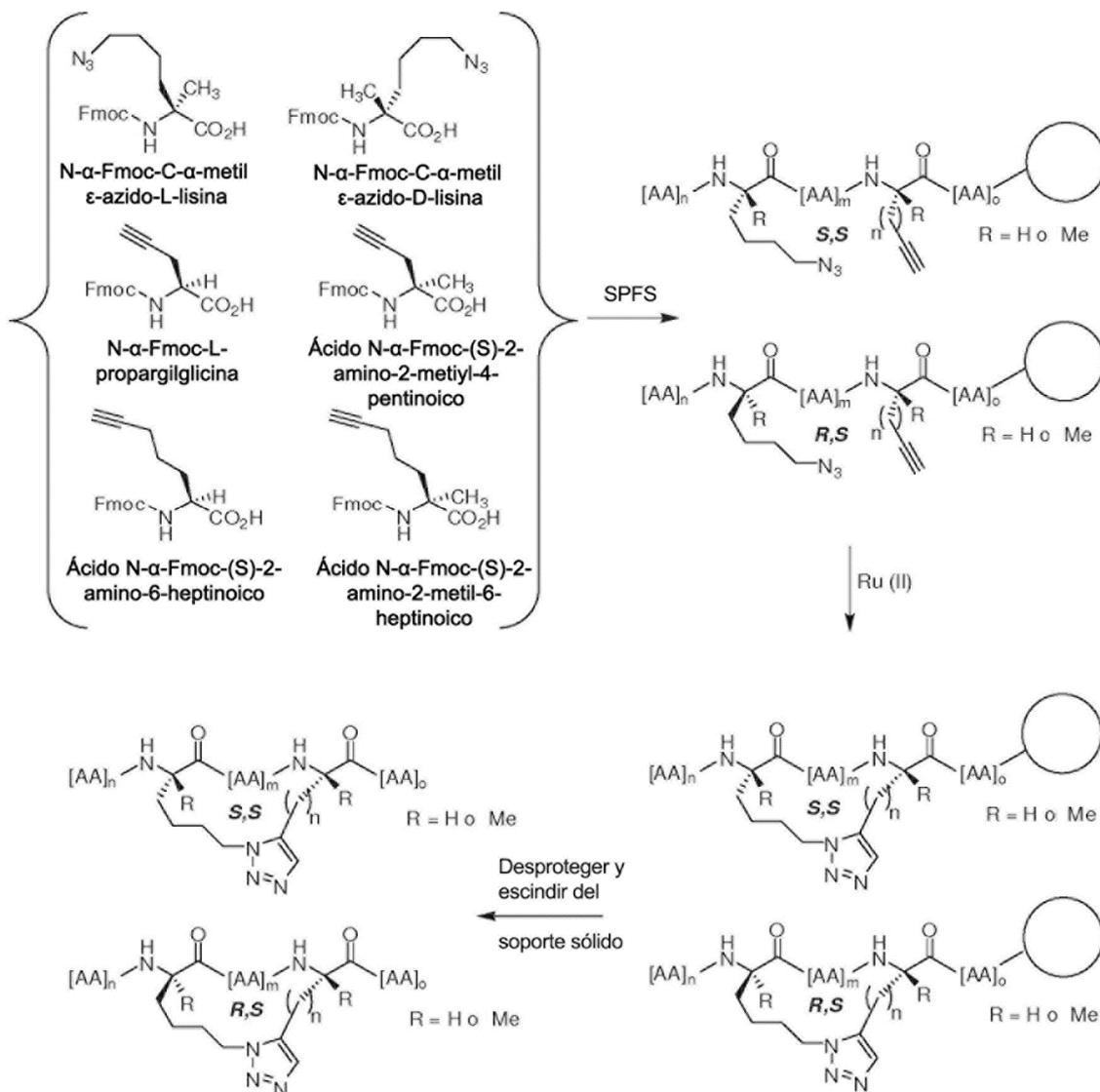
En el método general de síntesis de polipéptidos entrecruzados mostrado en el Esquema sintético 3, el precursor peptidomimético contiene un resto azido y un resto alquino y se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) usando el aminoácido disponible en el mercado N- α -Fmoc-L-propargilglicina 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, N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. El precursor peptidomimético se hace reaccionar con un reactivo de macroclicación tal como un reactivo de Cu(I) en la resina como una mezcla cruda (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; Punna et al. (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). A continuación, el polipéptido entrecruzado que contiene triazol resultante se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95%). En algunos casos, la etapa de macroclicación se realiza en un disolvente elegido del grupo que consiste en CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl, DMF, THF, NMP, DIPEA, 2,6-lutidina, piridina, DMSO, H₂O o una mezcla de los mismos. En algunos casos, la etapa de macroclicación se realiza en un disolvente acuoso o parcialmente acuoso tamponado.

Esquema sintético 4:



En el método general de síntesis de polipéptidos entrecruzados mostrado en el Esquema sintético 4, el precursor peptidomimético contiene un resto azido y un resto alquino y se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase solución o en fase sólida (SPFS) usando el aminoácido disponible en el mercado N- α -Fmoc-L-propargilglicina 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, N-metil- ϵ -azido-L-lisina y N-metil- ϵ -azido-D-lisina. A continuación, el precursor peptidomimético se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95 %). El precursor peptidomimético se hace reaccionar como una mezcla cruda o se purifica antes de la reacción con un reactivo de macrociclación tal como un reactivo de Ru(II), por ejemplo, Cp* $\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ o [Cp* $\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen et al. (2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang et al. (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999). En algunos casos, la etapa de macrociclación se realiza en un disolvente elegido del grupo que consiste en DMF, CH₃CN y THF.

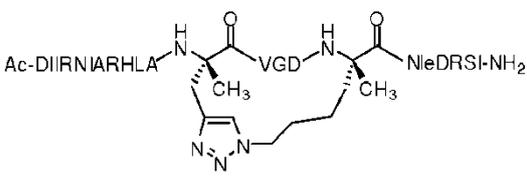
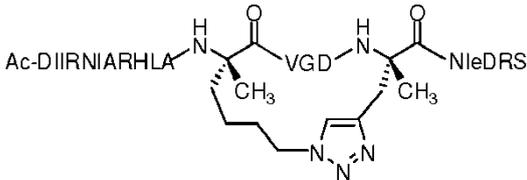
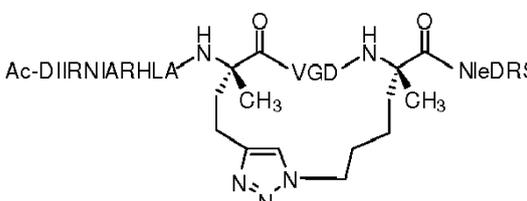
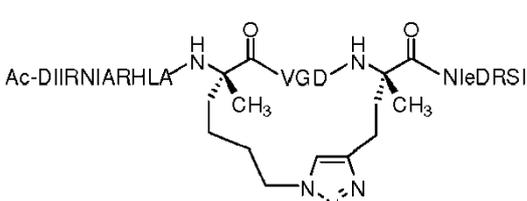
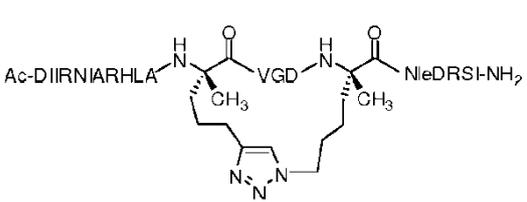
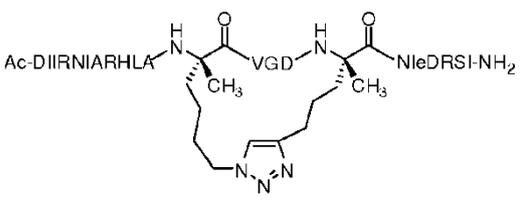
Esquema sintético 5:

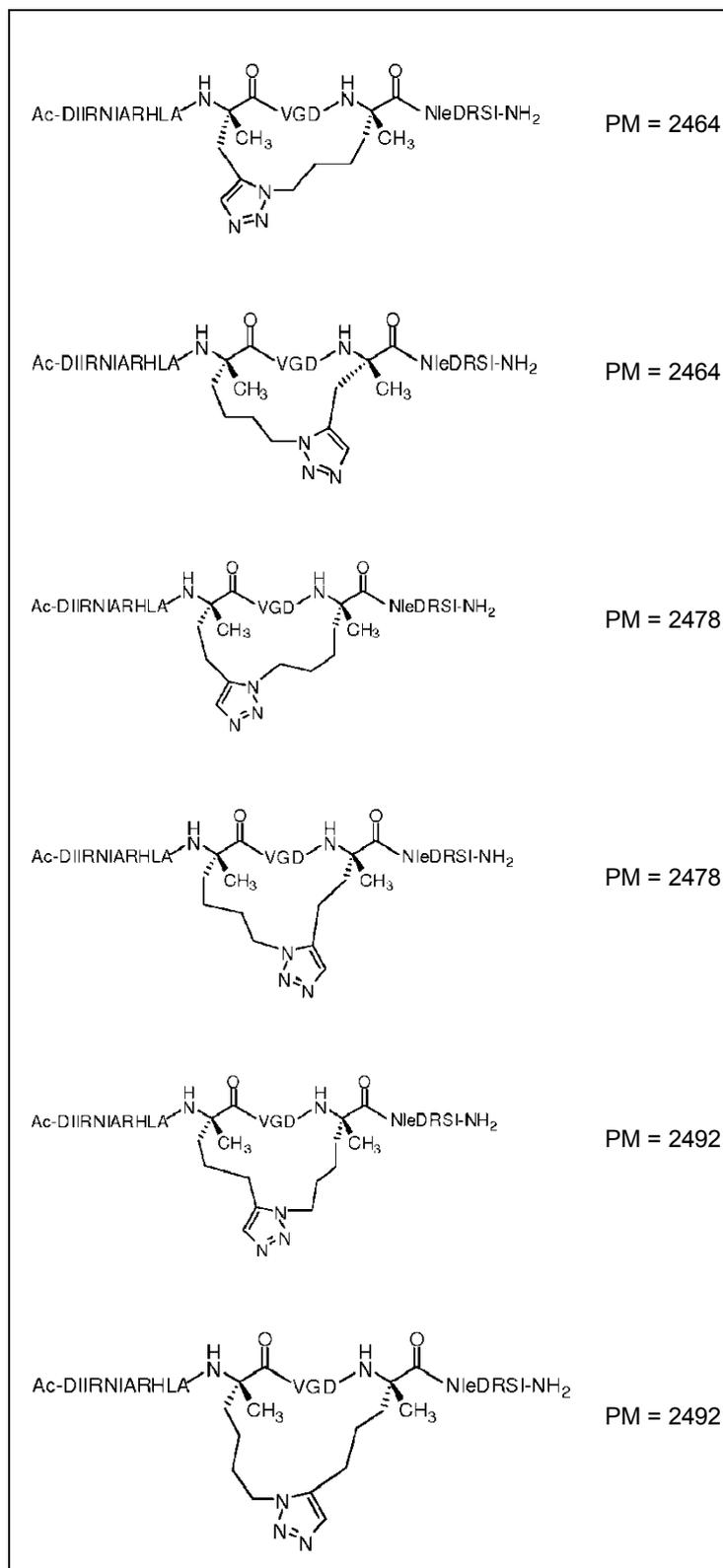


En el método general de síntesis de polipéptidos entrecruzados mostrado en el Esquema sintético 5, el precursor peptidomimético contiene un resto azido y un resto alquino y se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) usando el aminoácido disponible en el mercado N- α -Fmoc-L-propargilglicina y las formas protegidas por N- α -Fmoc de los aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinoico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinoico, N-metil-e-azido-L-lisina y N-metil-e-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 cruda. Por ejemplo, el reactivo puede ser Cp* $\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ o [Cp* $\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen et al. (2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang et al. (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999). En algunos casos, la etapa de macrociclación se realiza en un disolvente elegido del grupo que consiste en CH_2Cl_2 , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, CH_3CN , DMF y THF.

En la Tabla 5 se muestran varios polipéptidos entrecruzados ejemplares. "Nie" representa norleucina y reemplaza a un residuo de metionina. Se contempla el uso de conectores similares para sintetizar polipéptidos entrecruzados basados en las secuencias de polipéptidos descritas de la Tabla 1 a la Tabla 4.

TABLE 5

	PM = 2464
	PM = 2464
	PM = 2478
	PM = 2478
	PM = 2492
	PM = 2492

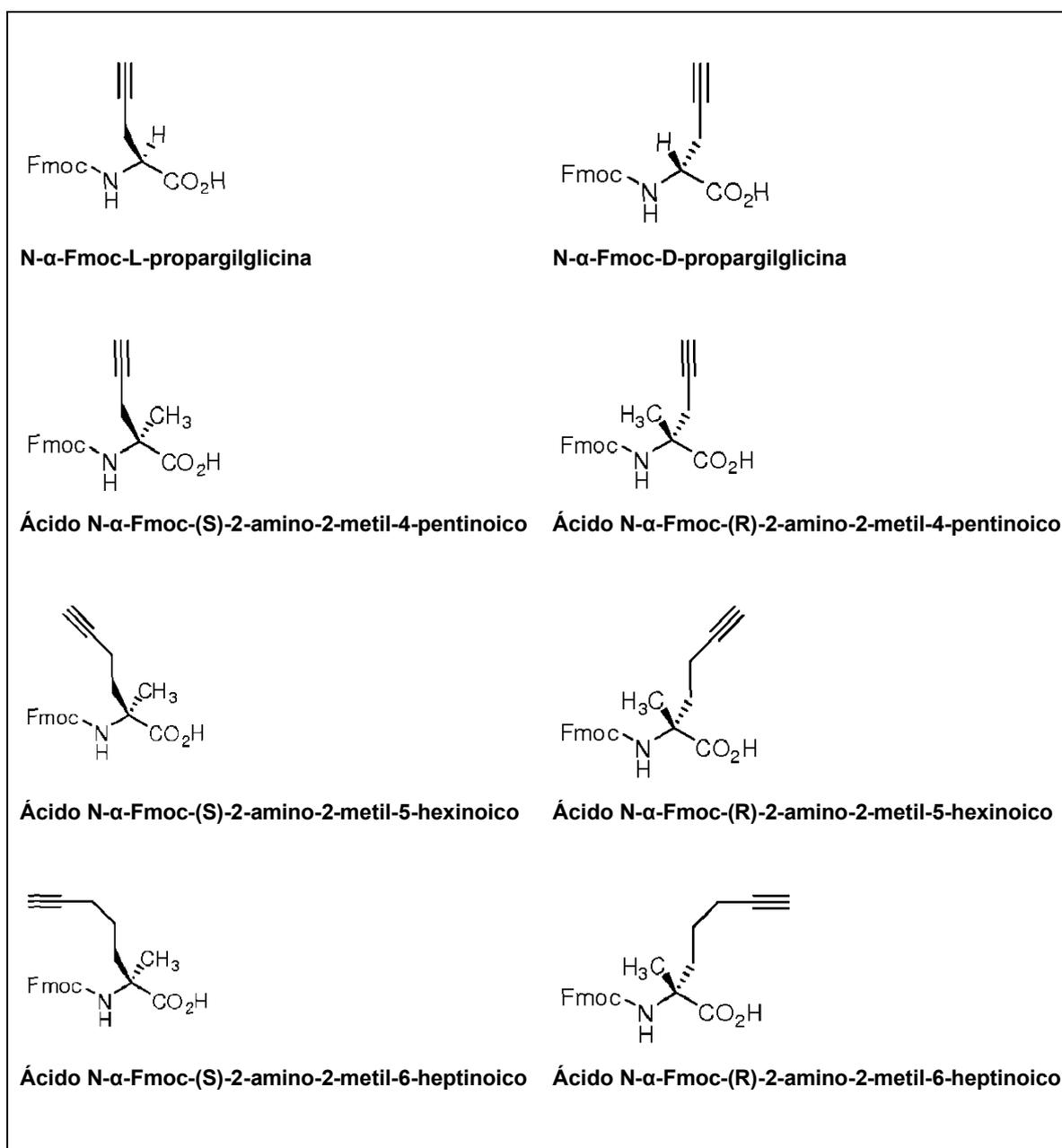


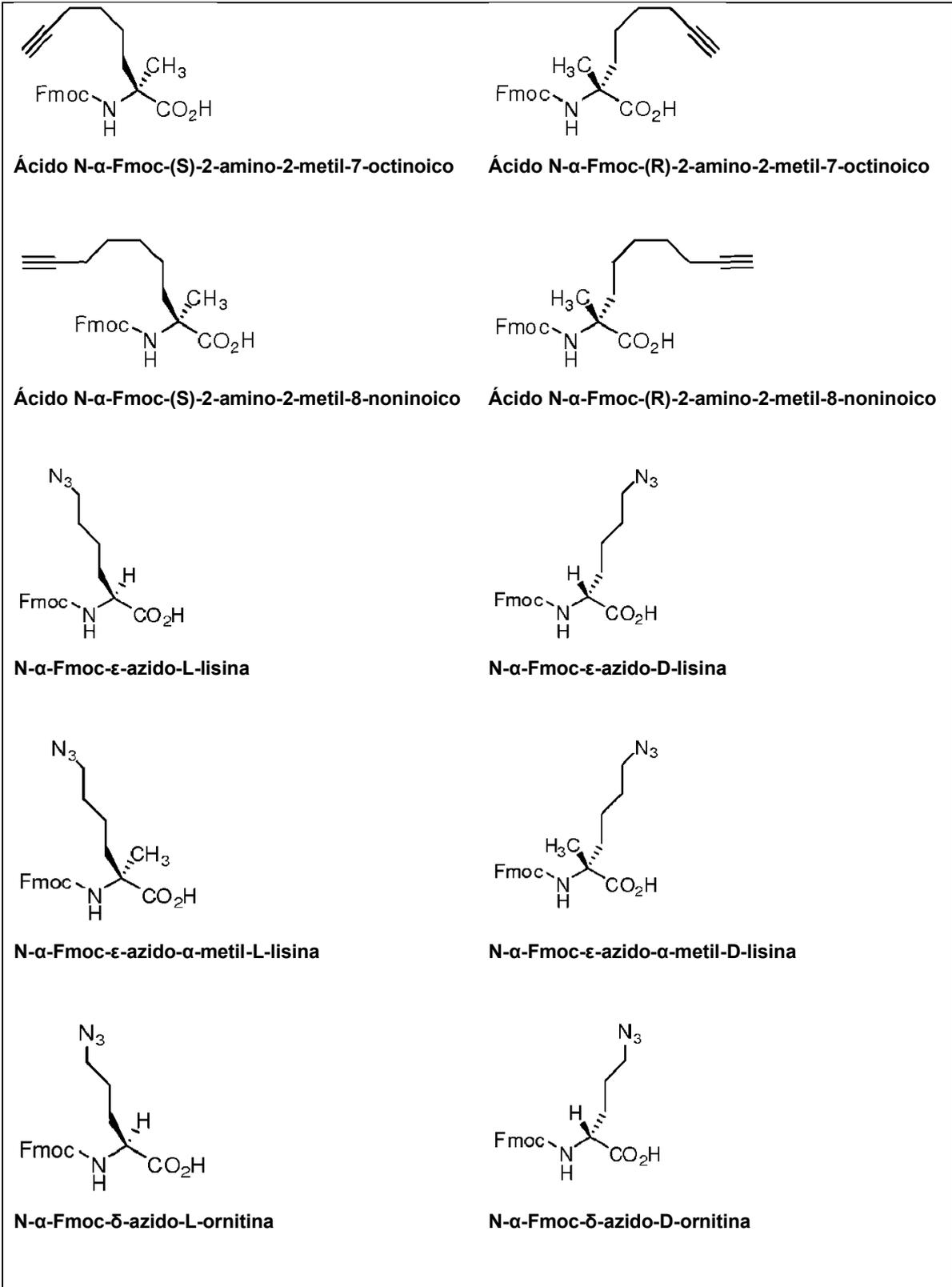
La Tabla 5 muestra macrociclos peptidomiméticos ejemplares de la invención. "Nle" representa norleucina.

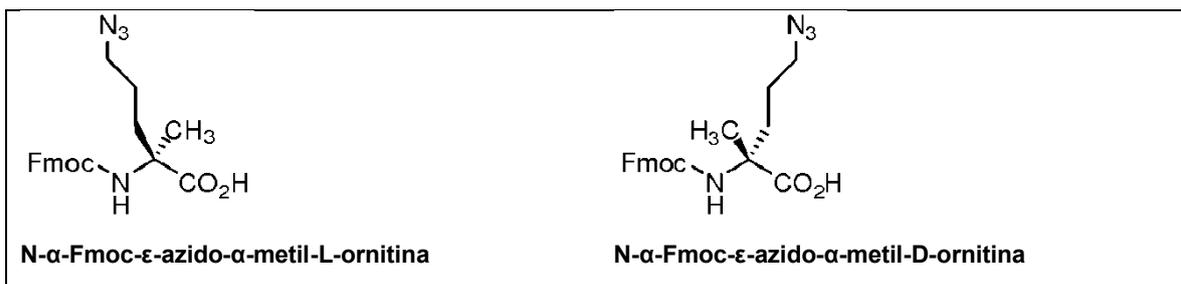
La presente descripción contempla el uso de aminoácidos no presentes de forma natural y análogos de aminoácido en la síntesis de los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria. En la presente descripción se puede usar cualquier aminoácido o análogo de aminoácido susceptible a los métodos sintéticos empleados para la síntesis de polipéptidos entrecruzados que contienen triazol estables. Por ejemplo, la L-propargilglicina se contempla

5 como un aminoácido útil en la presente invención. Sin embargo, otros aminoácidos que contienen alquino, que
 contienen una cadena lateral de aminoácido diferente, también son útiles en la descripción. Por ejemplo, la L-
 propargilglicina contiene una unidad de metileno entre el carbono α del aminoácido y el alquino de la cadena lateral
 del aminoácido. La descripción también contempla el uso de aminoácidos con múltiples unidades de metileno entre
 el carbono α y el alquino. Los análogos azido de los aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina y alfa-metil-D-
 lisina también están contemplados como aminoácidos útiles en la presente invención. Sin embargo, otros
 aminoácidos con azida terminal que contienen una cadena lateral de aminoácido diferente también son útiles en la
 descripción. Por ejemplo, el análogo azido de L-lisina contiene cuatro unidades de metileno entre el carbono α del
 aminoácido y la azida terminal de la cadena lateral del aminoácido. La descripción también contempla el uso de
 10 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 polipéptidos entrecruzados.

TABLA 6



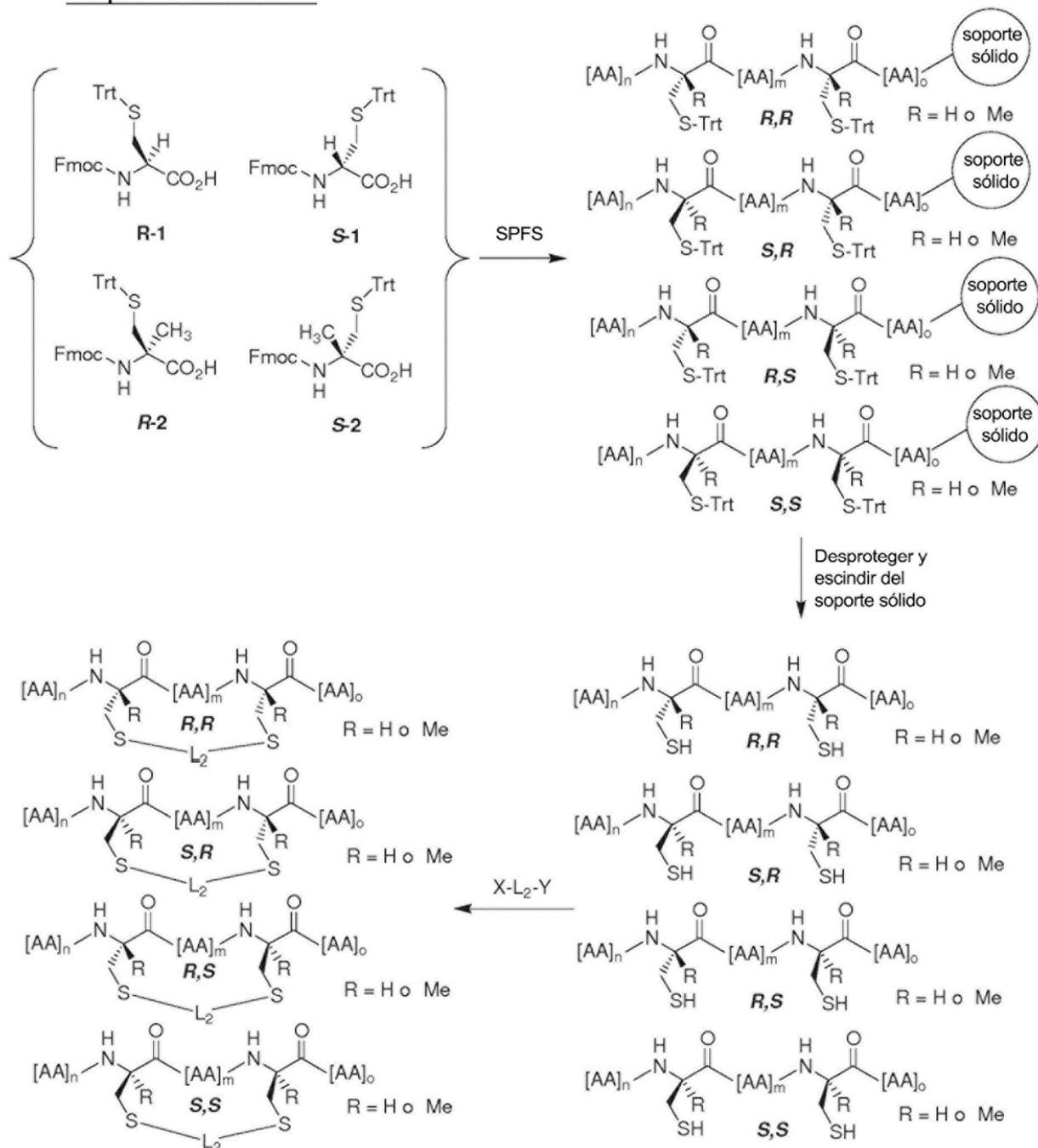




La **Tabla 6** muestra aminoácidos ejemplares útiles en la preparación de polipéptidos entrecruzados.

- 5 En algunos casos, los aminoácidos y análogos de aminoácido son de la configuración D. En otros casos, son de la configuración L. En algunos casos, algunos de los aminoácidos y análogos de aminoácido contenidos en el peptidomimético son de la configuración D mientras que algunos de los aminoácidos y análogos de aminoácido son de la configuración L. En algunos casos, los análogos de aminoácido son α,α-disustituidos, tal como α-metil-L-propargilglicina, α-metil-D-propargilglicina, e-azido-alfa-metil-L-lisina y e-azido-alfa-metil-D-lisina. En algunos casos, los análogos de aminoácido son N-alquilados, p. ej., N-metil-L-propargilglicina, N-metil-D-propargilglicina, N-metil-e-azido-L-lisina y N-metil-e-azido-D-lisina.
- 10 En algunos casos, el resto -NH del aminoácido está protegido usando un grupo protector, que incluye, sin limitación, -Fmoc y -Boc. En otros casos, el aminoácido no está protegido antes de la síntesis del polipéptido entrecruzado.
- 15 En otros casos, se sintetizan polipéptidos entrecruzados de Fórmula III. Los esquemas sintéticos siguientes describen la preparación de tales compuestos. Para simplificar los dibujos, los esquemas ilustrativos representan análogos de aminoácido derivados de L-o D-cisteína, en los que L₁ y L₃ son ambos -(CH₂)-. Sin embargo, como se ha señalado a lo largo de la descripción detallada anteriormente, se pueden emplear muchos otros análogos de aminoácido en los que L₁ y L₃ se pueden seleccionar independientemente de las diversas estructuras descritas en la presente memoria. Los símbolos "[AA]_m", "[AA]_n", "[AA]_o" representan una secuencia de restos conectados por enlaces amida tales como aminoácidos naturales y no naturales. Como se describió anteriormente, cada aparición de "AA" es independiente de cualquier otra aparición de "AA", y una fórmula tal como "[AA]_m" abarca, por ejemplo,
- 20 secuencias de aminoácidos no idénticos, así como secuencias de aminoácidos idénticos.

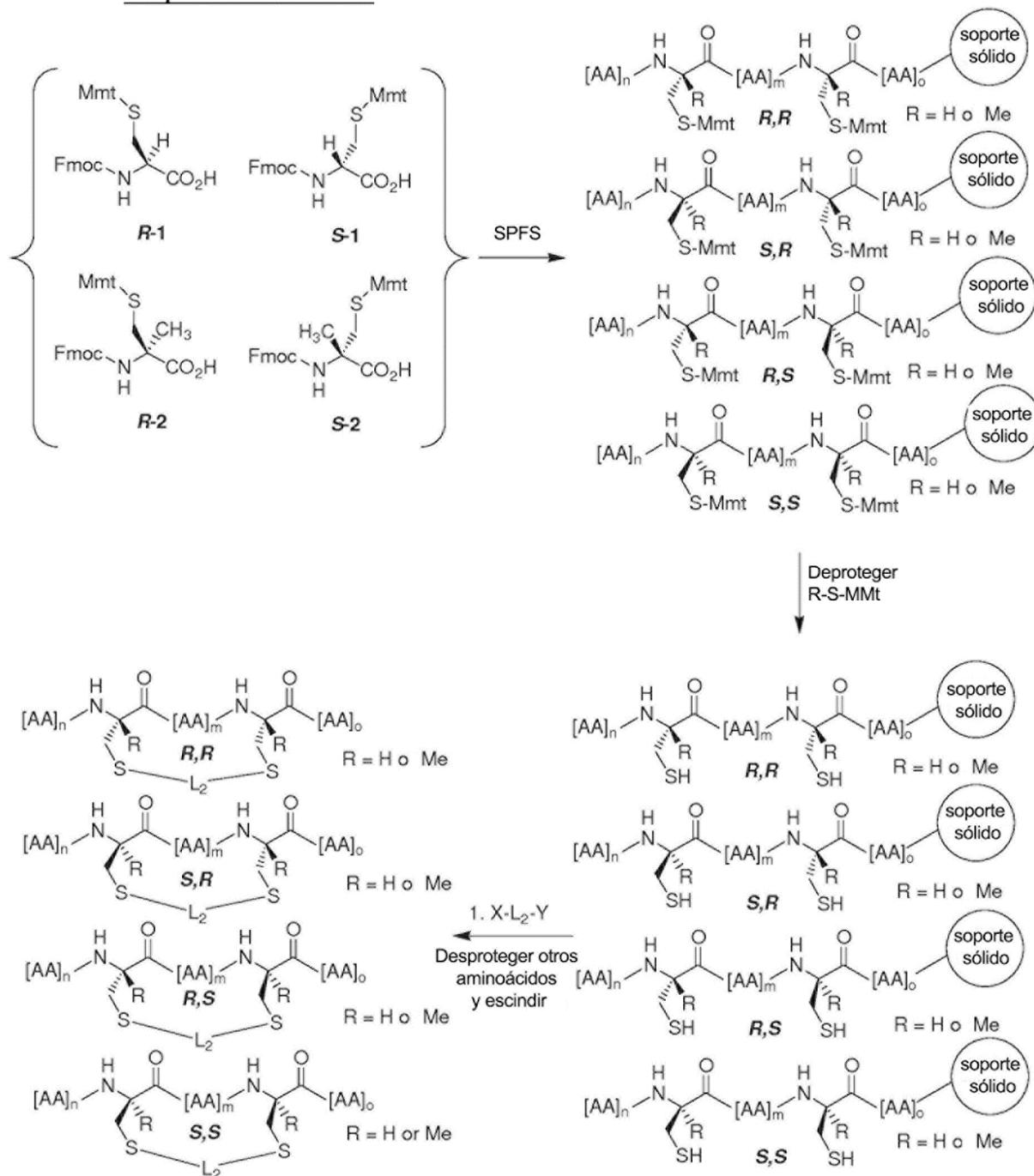
Esquema sintético 6:



En el Esquema 6, el precursor peptidomimético contiene dos restos -SH y se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) usando aminoácidos N-α-Fmoc disponibles en el mercado tales como N-α-Fmoc-S-tritilo-L-cisteína o N-α-Fmoc-S-tritilo-D-cisteína. Las versiones alfa-metiladas de D-cisteína o L-cisteína se generan mediante métodos conocidos (Seebach et al. (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 y referencias del mismo) y, a continuación, se convierten en los monómeros N-α-Fmoc-S-tritilo apropiadamente protegidos mediante métodos conocidos ("Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins", Oxford University Press, Nueva York: 1998. A continuación, el peptidomimético precursor se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95 %). El peptidomimético precursor se hace reaccionar como una mezcla cruda o se purifica antes de la reacción con X-L₂-Y en soluciones orgánicas o acuosas. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en condiciones diluidas (es decir, 0,15 mmol/L) para favorecer la macrociclación y evitar la polimerización. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en soluciones orgánicas tales como NH₃ líquido (Mosberg et al. (1985), J. Am. Chem. Soc. 107:2986-2987; Szweczuk et al. (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40: 233-242), NH₃/MeOH o NH₃/DMF (Or et al. (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149). En otros casos, la alquilación se realiza en una solución acuosa tal como clorhidrato de guanidinio 6 M, pH 8 (Brunel et al. (2005),

Chem. Commun. (20):2552-2554). En otros casos, el disolvente usado para la reacción de alquilación es DMF o dicloroetano.

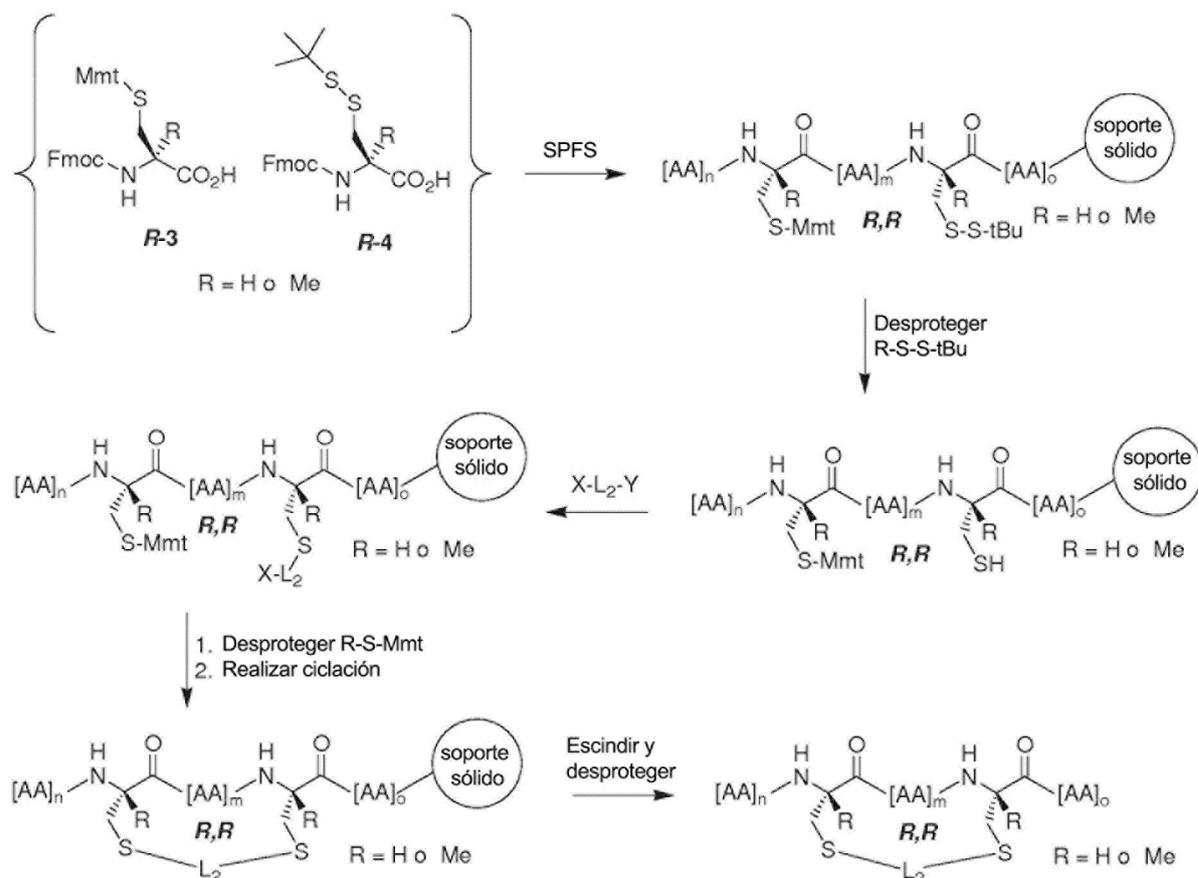
Esquema sintético 7:



En el Esquema 7, el peptidomimético precursor contiene dos o más restos -SH, de los que dos están protegidos especialmente para permitir su desprotección selectiva y posterior alquilación para la formación del macrociclo. El peptidomimético precursor se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) usando aminoácidos N- α -Fmoc disponibles en el mercado tales como N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritil-L-cisteína o N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritil-D-cisteína. Las versiones alfa-metiladas de D-cisteína o L-cisteína se generan mediante métodos conocidos (Seebach et al. (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 y referencias del mismo) y, a continuación, se convierten en los monómeros N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritil apropiadamente protegidos mediante métodos conocidos (Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins, Oxford University Press, Nueva York: 1998). A continuación, los grupos protectores Mmt del precursor peptidomimético se escinden selectivamente mediante condiciones estándar (p. ej.,

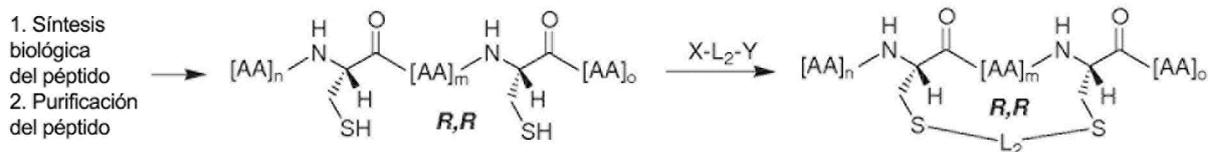
ácido suave tal como TFA al 1 % en DCM). A continuación, el peptidomimético precursor se hace reaccionar en la resina con X-L₂-Y en una solución orgánica. Por ejemplo, la reacción tiene lugar en presencia de una base impedida tal como diisopropiletilamina. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en soluciones orgánicas tales como NH₃ líquido (Mosberg et al. (1985), J. Am.Chem. Soc. 107:2986-2987; Szewczuk et al. (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242), NH₃/MeOH o NH₃/DMF (Or et al. (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149). En otros casos, la reacción de alquilación se realiza en DMF o dicloroetano. A continuación, el polipéptido entrecruzado se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95 %).

Esquema sintético 8:



En el Esquema 8, el precursor peptidomimético contiene dos o más restos $-SH$, de los que dos están protegidos especialmente para permitir su desprotección selectiva y posterior alquilación para la formación del macrociclo. El precursor peptidomimético se sintetiza mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) usando aminoácidos N- α -Fmoc disponibles en el mercado tales como N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritil-L-cisteína, N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritil-D-cisteína, N- α -Fmoc-S-S-t-butil-L-cisteína y N- α -Fmoc-S-S-t-butil-D-cisteína. Las versiones alfa-metiladas de D-cisteína o L-cisteína se generan mediante métodos conocidos (Seebach et al. (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 y referencias del mismo) y, a continuación, se convierten en los monómeros N- α -Fmoc-S-*p*-metoxitritilo o N- α -Fmoc-S-S-t-butilo apropiadamente protegidos mediante métodos conocidos (Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins, Oxford University Press, Nueva York: 1998). El grupo protector S-S-tButilo del precursor peptidomimético se escinde selectivamente mediante condiciones conocidas (p. ej., 2-mercaptoetanol al 20 % en DMF, referencia: Galande et al. (2005), J. Comb. Chem. 7:174-177). A continuación, el peptidomimético precursor se hace reaccionar en la resina con un exceso molar de X-L₂-Y en una solución orgánica. Por ejemplo, la reacción tiene lugar en presencia de una base impedida tal como diisopropiletilamina. A continuación, el grupo protector Mmt del precursor peptidomimético se escinde selectivamente mediante condiciones estándar (p. ej., ácido suave tal como TFA al 1 % en DCM). A continuación, el precursor peptidomimético se cicla en la resina mediante tratamiento con una base impedida en soluciones orgánicas. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en soluciones orgánicas tales como NH₃/MeOH o NH₃/DMF (Or et al. (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149). A continuación, el polipéptido entrecruzado se desprotege y escinde de la resina en fase sólida mediante condiciones estándar (p. ej., ácido fuerte tal como TFA al 95 %).

Esquema sintético 9:



En el Esquema 9, el precursor peptidomimético contiene dos restos L-cisteína. El precursor peptidomimético se sintetiza mediante sistemas de expresión biológicos en células vivas conocidos o mediante métodos de expresión *in vitro* libres de células conocidos. El peptidomimético precursor se hace reaccionar como una mezcla cruda o se purifica antes de la reacción con X-L₂-Y en soluciones orgánicas o acuosas. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en condiciones diluidas (es decir, 0,15 mmol/L) para favorecer la macrociclación y evitar la polimerización. En algunos casos, la reacción de alquilación se realiza en soluciones orgánicas tales como NH₃ líquido (Mosberg et al. (1985), J. Am.Chem. Soc. 107:2986-2987; Szewczuk et al. (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242), NH₃/MeOH, o NH₃/DMF (Or et al. (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149). En otros casos, la alquilación se realiza en una solución acuosa tal como clorhidrato de guanidinio 6 M, pH 8 (Brunel et al. (2005), Chem. Commun. (20):2552-2554). En otros casos, la alquilación se realiza en DMF o dicloroetano. En otro caso, la alquilación se realiza en soluciones acuosas no desnaturizantes y en otro caso más, la alquilación se realiza en condiciones que favorecen la formación de la estructura α -helicoidal. En otro caso más, la alquilación se realiza en condiciones que favorecen la unión del peptidomimético precursor a otra proteína con el fin de inducir la formación de la conformación α -helicoidal ligada durante la alquilación.

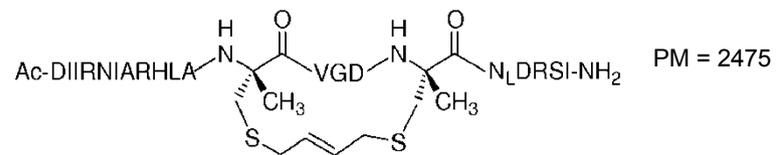
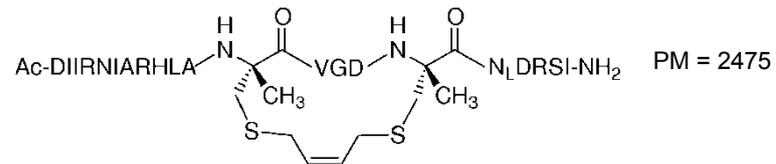
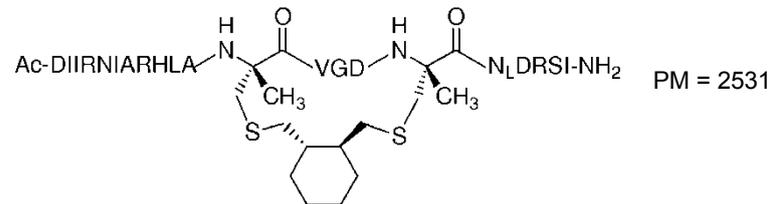
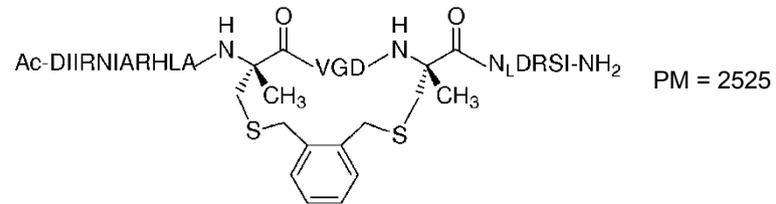
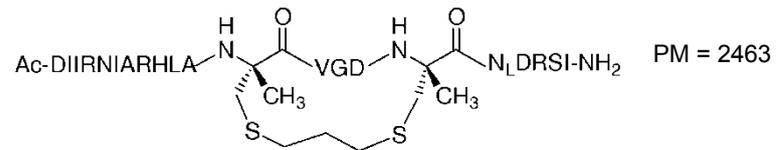
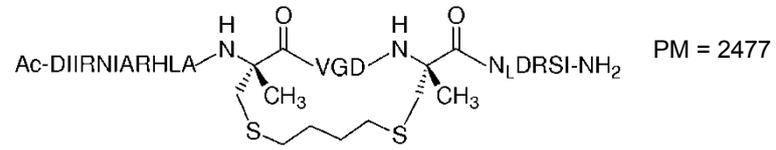
Se contemplan diversos casos para X e Y que son adecuados para reaccionar con grupos tiol. En general, cada X o Y se seleccionan independientemente de la categoría general mostrada en la Tabla 5. Por ejemplo, X e Y son haluros tales como -Cl, -Br o -I. Cualquiera de los conectores formadores de macrociclo descritos en la presente memoria se puede usar en cualquier combinación con cualquiera de las secuencias mostradas en las Tablas 1-4 y también con cualquiera de los sustituyentes R- indicados en la presente memoria.

TABLA 7: Ejemplos de grupos reactivos capaces de reaccionar con grupos tiol y conexiones resultantes

X o Y	Conexión covalente resultante
acrilamida	Tioéter
haluro (p. ej., haluro de alquilo o arilo)	Tioéter
sulfonato	Tioéter
aziridina	Tioéter
epóxido	Tioéter
haloacetamida	Tioéter
maleimida	Tioéter
éster sulfonato	Tioéter

La Tabla 6 muestra macrociclos ejemplares de la invención. "N_L" representa norleucina y reemplaza a un residuo de metionina. Se contempla el uso de conectores similares para sintetizar polipéptidos entrecruzados basados en las secuencias de polipéptidos descritas de la Tabla 1 a la Tabla 4.

TABLA 8: Ejemplos de polipéptidos entrecruzados de la invención



Para los ejemplos mostrados en esta tabla, "N_L" representa norleucina.

5 La presente descripción contempla el uso de aminoácidos tanto presentes de forma natural como no presentes de forma natural y análogos de aminoácido en la síntesis de polipéptidos entrecruzados de Fórmula (III). En la presente descripción se puede usar cualquier aminoácido o análogo de aminoácido susceptible a los métodos sintéticos empleados para la síntesis de polipéptidos entrecruzados que contienen bis-sulfhidrilo estables. Por ejemplo, la cisteína se contempla como un aminoácido útil en la presente descripción. Sin embargo, otros aminoácidos que contienen azufre, aparte de la cisteína, que contienen una cadena lateral de aminoácido diferente también son útiles.

5 Por ejemplo, la cisteína contiene una unidad de metileno entre el carbono α del aminoácido y el -SH terminal de la cadena lateral del aminoácido. La descripción también contempla el uso de aminoácidos con múltiples unidades de metileno entre el carbono α y el -SH terminal. Los ejemplos no limitantes incluyen α -metil-L-homocisteína y α -metil-D-homocisteína. En algunos casos, los aminoácidos y análogos de aminoácido son de la configuración D. En otros casos, son de la configuración L. En algunos casos, algunos de los aminoácidos y análogos de aminoácido contenidos en el peptidomimético son de la configuración D mientras que algunos de los aminoácidos y análogos de aminoácido son de la configuración L. En algunos casos, los análogos de aminoácido son α,α -disustituidos, tal como α -metil-L-cisteína y α -metil-D-cisteína.

10 La descripción incluye macrociclos en los que se usan conectores formadores de macrociclo para conectar dos o más restos -SH en los precursores peptidomiméticos para formar los polipéptidos entrecruzados de la invención. Como se describió anteriormente, los conectores formadores de macrociclo otorgan rigidez conformacional, mayor estabilidad metabólica y/o mayor penetrabilidad celular. Asimismo, en algunos casos, las conexiones formadoras de macrociclo estabilizan la estructura secundaria α -helicoidal de los macrociclos peptidomiméticos. Los conectores formadores de macrociclo son de fórmula X-L₂-Y, en donde tanto X como Y son restos iguales o diferentes, como se definió anteriormente. Tanto X como Y tienen las características químicas que permiten a un conector formador de macrociclo -L₂- bis-alquilar el precursor peptidomimético que contiene bis-sulfhidrilo. Como se definió anteriormente, el conector -L₂- incluye alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, o heterocicloarileno, o -R₄-K-R₄-, todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos con un grupo R₅, como se definió anteriormente. Asimismo, de uno a tres átomos de carbono de los conectores formadores de macrociclo -L₂-, aparte de los carbonos unidos al -SH del aminoácido que contiene sulfhidrilo, están opcionalmente sustituidos con un heteroátomo tal como N, S u O.

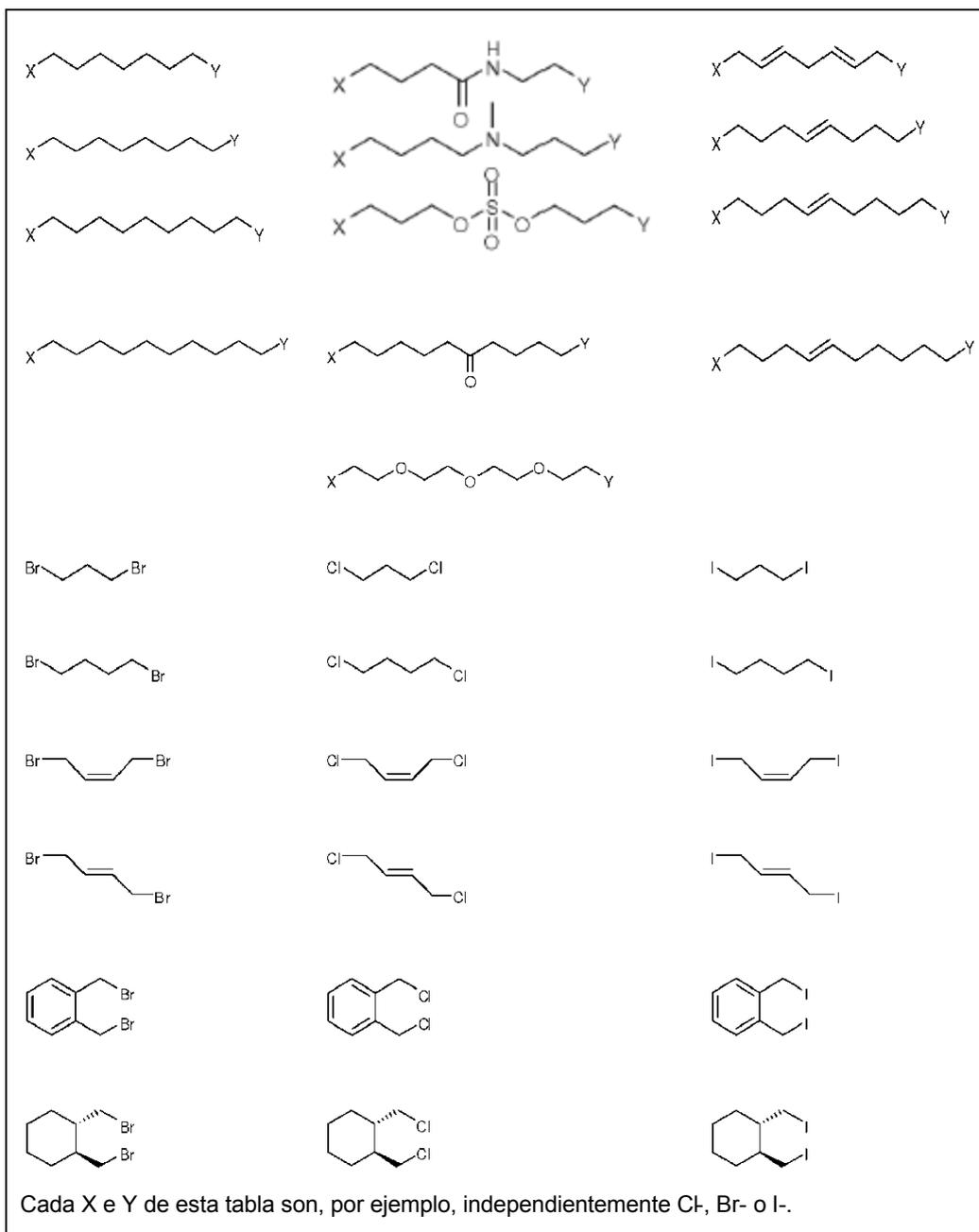
15 Se puede modificar la longitud del componente L₂ del conector formador de macrociclo X-L₂-Y en función de, entre otras cosas, la distancia entre las posiciones de los dos análogos de aminoácido usados para formar el polipéptido entrecruzado. Asimismo, a medida que se modifican las longitudes de los componentes L₁ y/o L₃ del conector formador de macrociclo, también se puede modificar la longitud de L₂ para crear un conector de una longitud total apropiada para formar un polipéptido entrecruzado estable. Por ejemplo, si los análogos de aminoácido usados se modifican añadiendo una unidad de metileno adicional a cada uno de L₁ y L₃, la longitud de L₂ se reduce en una longitud equivalente de aproximadamente dos unidades de metileno para compensar el aumento de las longitudes de L₁ y L₃.

20 En algunos casos, L₂ es un grupo alquileno de fórmula -(CH₂)_n-, en el que n es un número entero de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15. Por ejemplo, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otros casos, L₂ es un grupo alquenileno. En otros casos más, L₂ es un grupo arilo.

La Tabla 9 muestra casos adicionales de grupos X-L₂-Y.

35

TABLA 9. Grupos X-L₂-Y ejemplares



Los métodos adicionales de formación de polipéptidos entrecruzados de la invención incluyen los descritos por Mustapa, M. Firouz Mohd et al., J. Org. Chem (2003), 68, pp. 8193-8198; Yang, Bin et al. Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, pág. 1403-1406; la patente de Estados Unidos n.º 5 364 851; la patente de estados Unidos n.º 5 446 128; la patente de Estados Unidos n.º 5 824 483; la patente de Estados Unidos n.º 6 713 280 y la patente de Estados Unidos n.º 7 202 332. En tales casos, los precursores de aminoácido se usan conteniendo un sustituyente R-adicional en la posición alfa. Tales aminoácidos se incorporan en el precursor de macrociclo en las posiciones deseadas, que puede ser en las posiciones en las que el conector está sustituido o, como alternativa, en otros lugares de la secuencia del precursor de macrociclo. A continuación, se lleva a cabo la ciclación del precursor según el método indicado.

Ensayos

Las propiedades de los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria se ensayan, por ejemplo, usando los métodos descritos a continuación.

Ensayo para determinar la α -helicidad.

En solución, la estructura secundaria de los polipéptidos con dominios α -helicoidales alcanzará un equilibrio dinámico entre estructuras de espiral aleatoria y estructuras α -helicoidales, con frecuencia expresado como un "porcentaje de helicidad". Por tanto, por ejemplo, los dominios BH3 proapoptóticos no modificados son predominantemente espirales aleatorias en solución, con un contenido α -helicoidal normalmente inferior al 25 %. Por otra parte, los macrociclos peptidomiméticos con conectores optimizados poseen, por ejemplo, una alfa-helicidad que es al menos dos veces mayor que la de un polipéptido no entrecruzado correspondiente. En algunos casos, los macrociclos de la invención poseerán una alfa-helicidad mayor del 50 %. Para ensayar la helicidad de los macrociclos peptidomiméticos de la invención, tales como los macrociclos a base de dominios BH3, se disuelven los compuestos en una solución acuosa (p. ej., solución de fosfato potásico 50 mM a pH 7, o H₂O destilada, hasta concentraciones de 25-50 μ M). Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtienen en un espectropolarímetro (p. ej., Jasco J-710) usando parámetros de medición estándar (p. ej., temperatura, 20 °C; longitud de onda, 190-260 nm; resolución, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/s; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; ancho de banda, 1 nm; paso óptico, 0,1 cm). El contenido α -helicoidal de cada péptido se calcula dividiendo la elipticidad residual media (p. ej., $[\Phi]_{222\text{obs}}$) por el valor presentado para un decapeptido helicoidal modelo (Yang et al. (1986), *Methods Enzymol.* 130:208)).

Ensayo para determinar la temperatura de fusión (T_f)

Un macrociclo peptidomimético de la invención que comprende una estructura secundaria tal como una hélice α exhibe, por ejemplo, una temperatura de fusión más alta que un polipéptido no entrecruzado correspondiente. Habitualmente, los macrociclos peptidomiméticos de la invención exhiben una T_f > 60 °C, lo que representa una estructura sumamente estable en soluciones acuosas. Para ensayar el efecto de la formación del macrociclo sobre la temperatura de fusión, se disuelven los macrociclos peptidomiméticos o los péptidos no modificados en H₂O destilada (p. ej., a una concentración final de 50 μ M) y se determina la T_f midiendo el cambio de elipticidad en un intervalo de temperatura (p. ej., de 4 a 95 °C) en un espectropolarímetro (p. ej., Jasco J-710) usando parámetros estándar (p. ej., longitud de onda 222 nm; resolución, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/s; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; ancho de banda, 1 nm; velocidad de aumento de la temperatura: 1 °C/min; paso óptico, 0,1 cm).

Ensayo de resistencia a proteasas.

El enlace amida de la cadena principal peptídica es susceptible a hidrólisis por proteasas, proporcionando de este modo compuestos peptídicos vulnerables a una rápida degradación *in vivo*. Sin embargo, la formación de la hélice en los péptidos habitualmente esconde la cadena principal amida y, por lo tanto, puede protegerla de la escisión proteolítica. Los macrociclos peptidomiméticos de la presente invención se pueden someter a proteólisis con tripsina *in vitro* para evaluar cualquier cambio en la velocidad de degradación en comparación con un polipéptido no entrecruzado correspondiente. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético y un polipéptido no entrecruzado correspondiente se incuban con tripsina-agarosa y las reacciones se someten a enfriamiento rápido en diversos momentos temporales mediante centrifugación y posterior inyección HPLC para cuantificar el sustrato residual mediante absorción ultravioleta a 280 nm. En resumen, el macrociclo peptidomimético y el precursor peptidomimético (5 mcg) se incuban con tripsina-agarosa (Pierce) (S/E ~ 125) durante 0, 10, 20, 90 y 180 minutos. Las reacciones se someten a enfriamiento rápido mediante centrifugación con centrifuga de mesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se cuantifica mediante detección de pico por HPLC a 280 nm. La reacción proteolítica presenta 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).

Ensayo de estabilidad ex vivo.

Los macrociclos peptidomiméticos con conectores optimizados poseen, por ejemplo, una semivida *ex vivo* que es al menos dos veces mayor que la de un polipéptido no entrecruzado correspondiente y poseen una semivida *ex vivo* de 12 horas o más. Para los estudios de estabilidad en suero *ex vivo* se pueden usar una variedad de ensayos. Por ejemplo, un macrociclo peptidomimético y/o un polipéptido no entrecruzado correspondiente (2 mcg) se incuban, cada uno, con suero de ratón, rata y/o humano fresco (p. ej., 1-2 mL) a 37 °C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Las muestras de diferente concentración de macrociclo se pueden preparar mediante dilución en serie con suero. Para determinar el nivel de compuesto intacto, se puede usar el procedimiento siguiente: Las muestras se extraen mediante transferencia de 100 μ l de los sueros a tubos de centrifuga de 2 ml seguida de adición de 10 μ L de ácido fórmico al 50 % y 500 μ L de acetonitrilo y centrifugación a 14 000 RPM durante 10 min a 4 \pm 2 °C. A continuación, se transfieren los sobrenadantes a tubos de 2 ml frescos y se evaporan en un evaporador Turbovap en N₂ < 10 psi, 37 °C. Las muestras se reconstituyen en 100 μ L de acetonitrilo:agua 50:50 y se someten a análisis por LC-MS/MS. Se conocen procedimientos equivalentes o similares para pruebas de estabilidad *ex vivo* y se pueden usar para determinar la estabilidad de los macrociclos en suero.

Ensayos de unión in vitro.

Para evaluar la unión y afinidad de los macrociclos peptidomiméticos y los precursores peptidomiméticos por proteínasceptoras, se usa, por ejemplo, un ensayo de polarización de la fluorescencia (FPA). La técnica FPA mide la orientación y movilidad moleculares usando luz polarizada y un trazador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los trazadores fluorescentes (p. ej., FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares aparentes altos (p.

ej., péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades de rotación más lentas en comparación con los trazadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (p. ej., péptidos marcados con FITC que están libres en solución).

5 Por ejemplo, los macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados (25 nM) se incuban con la proteína aceptora (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, mediante polarización de la fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia (p. ej., Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar mediante análisis de regresión no lineal usando, por ejemplo, el software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Un macrociclo peptidomimético de la invención muestra, en algunos casos, una K_d similar o más baja que la de un polipéptido no entrecruzado correspondiente.

En este ensayo se pueden usar, por ejemplo, proteínasceptoras para péptidos BH3 tales como BCL-2, BCL-X_L, BAX o MCL1. Las proteínasceptoras para péptidos p53 tales como MDM2 o MDMX también se pueden usar en este ensayo.

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

15 Para evaluar la unión y afinidad de los compuestos que antagonizan la interacción entre un péptido (p. ej., un péptido BH3 o un péptido p53) y una proteína aceptora se usa, por ejemplo, un ensayo de polarización de la fluorescencia (FPA) utilizando un macrociclo peptidomimético fluoresceinado derivado de una secuencia de precursor peptidomimético. La técnica FPA mide la orientación y movilidad moleculares usando luz polarizada y un trazador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los trazadores fluorescentes (p. ej., FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares aparentes altos (p. ej., péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades de rotación más lentas en comparación con los trazadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (p. ej., péptidos marcados con FITC que están libres en solución). Un compuesto que antagoniza la interacción entre el macrociclo peptidomimético fluoresceinado y una proteína aceptora se detectará en un experimento FPA de unión competitiva.

20 Por ejemplo, los presuntos compuestos antagonistas (de 1 nM a 1 mM) y un macrociclo peptidomimético fluoresceinado (25 nM) se incuban con la proteína aceptora (50 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 del antagonista se mide, por ejemplo, mediante polarización de la fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia (p. ej., Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar mediante análisis de regresión no lineal usando, por ejemplo, el software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Se puede examinar cualquier clase de molécula, tal como moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos o proteínas, como presuntos antagonistas en este ensayo. En este ensayo se pueden usar proteínasceptoras para péptidos BH3 tales como BCL-2, BCL-X_L, BAX o MCL1. Las proteínasceptoras para péptidos p53 tales como MDM2 o MDMX se pueden usar en este ensayo.

35 Ensayos de unión en células intactas.

Es posible medir la unión de los péptidos o polipéptidos entrecruzados a sus aceptores naturales en células intactas mediante experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, se incuban células intactas con compuestos fluoresceinados (marcados con FITC) durante 4-24 h en ausencia o presencia de suero. A continuación, se disponen las células en forma de pellet y se incuban en tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, CHAPS al 1 % y cóctel inhibidor de proteasas) durante 10 minutos a 4 °C. Los extractos se centrifugan a 14 000 rpm durante 15 minutos y se recogen e incuban los sobrenadantes con 10 µl de anticuerpo de cabra anti-FITC durante 2 h, rotando a 4 °C seguido de incubación adicional de 2 h a 4 °C con proteína A/G Sepharose (50 µl de suspensión de perlas al 50 %). Tras su centrifugación rápida, los pellets se lavan en tampón de lisis que contiene una concentración de sal creciente (p. ej., 150, 300, 500 mM). A continuación, se reequilibran las perlas en NaCl 150 mM antes de la adición de tampón de muestra que contiene SDS y la ebullición. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se someten opcionalmente a electroforesis usando geles Bis-Tris con gradiente 4 %-12 % seguida de transferencia a membranas Immobilon-P. Tras el bloqueo, las membranas se incuban opcionalmente con un anticuerpo que detecta el FITC y también con uno o más anticuerpos que detectan proteínas que se unen al polipéptido entrecruzado, BCL2, MCL1, BCL-X_L, AI, BAX, BAK, MDM2 o MDMX incluidas.

50 Ensayos de penetrabilidad celular.

Para medir la penetrabilidad celular de los péptidos o los polipéptidos entrecruzados, se incuban células intactas con polipéptidos entrecruzados fluoresceinados (10 µM) durante 4 h en medio libre de suero o en medio suplementado con suero humano 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 vuelven a lavar y se resuspenden en PBS. La fluorescencia celular se analiza, por ejemplo, usando bien un citómetro de flujo FACSCalibur o un lector HCS KineticScan ® de Cellomics.

Ensayos de eficacia celular.

La eficacia de ciertos polipéptidos entrecruzados se determina, por ejemplo, en ensayos de destrucción celular usando varias líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas y células primarias derivadas de poblaciones de células humanas o de ratón. La viabilidad celular se supervisa, por ejemplo, a lo largo de 24-96 h de incubación con polipéptidos entrecruzados (0,5 a 50 μM) para identificar aquellos que destruyen a una $\text{CE}_{50} < 10 \mu\text{M}$. Hay diversos ensayos estándar que miden la viabilidad celular disponibles en el mercado y se usan opcionalmente para evaluar la eficacia de los polipéptidos entrecruzados. Además, los ensayos que miden la activación de la anexina V y la caspasa se usan opcionalmente para evaluar si los polipéptidos entrecruzados destruyen células por activación de la maquinaria apoptótica. Por ejemplo, se usa el ensayo CellTiter-Glo, que determina la viabilidad celular en función de la concentración de ATP intracelular.

5

10 Ensayo de estabilidad *in vivo*.

Para investigar la estabilidad *in vivo* de los polipéptidos entrecruzados, se administran los compuestos, por ejemplo, a ratones y/o ratas por vía IV, IP, PO o por inhalación a concentraciones que varían de 0,1 a 50 mg/kg y se extraen especímenes sanguíneos 0', 5', 15', 30', 1 h, 4 h, 8 h y 24 horas después de la inyección. A continuación, se miden los niveles de compuesto intacto en 25 μL de suero fresco mediante LC-MS/MS como se indicó anteriormente.

15 Eficacia *in vivo* en modelos animales.

Para determinar la actividad antitumorigénica *in vivo* de los polipéptidos entrecruzados de la invención, se administran los compuestos, por ejemplo, por sí solos (vías IP, IV, PO, por inhalación o vía nasal) o en combinación con dosis inferiores a la óptima de la quimioterapia pertinente (p. ej., ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido). En un ejemplo, se inyectan 5×10^6 células RS4;11 (obtenidas de la médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) que expresan de forma estable luciferasa por la vena caudal en ratones NOD-SCID 3 h después de que se hayan sometido a radiación a todo el cuerpo. Si no se trata, esta forma de leucemia es fatal en 3 semanas en este modelo. La leucemia se supervisa fácilmente, por ejemplo, inyectando a los ratones D-luciferina (60 mg/kg) y realizando el diagnóstico por imágenes de los animales anestesiados (p. ej., sistema de diagnóstico por imágenes *in vivo* de Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La bioluminiscencia de todo el cuerpo se cuantifica por integración de flujo fotónico (fotones/s) mediante el software Living Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los macrociclos peptidomiméticos por sí solos o en combinación con dosis inferiores a las óptimas de agentes quimioterapéuticos pertinentes se administran, por ejemplo, a ratones leucémicos (10 días después de la inyección/día 1 del experimento, en un intervalo de bioluminiscencia de 14-16) por la vena caudal o por vías IP en dosis que varían de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg durante de 7 a 21 días. Opcionalmente, los ratones se someten a diagnóstico por imágenes a lo largo del experimento en días alternos y se supervisa la supervivencia diariamente durante toda la duración del experimento. Los ratones que han expirado se someten opcionalmente a necropsia al final del experimento. Otro modelo animal es la implantación en ratones NOD-SCID de DoHH2, una línea celular derivada del linfoma folicular humano, que expresa de forma estable luciferasa. Estas pruebas *in vivo* generan opcionalmente datos farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos preliminares.

20

25

30

35 Ensayos clínicos.

Para determinar la idoneidad de los polipéptidos entrecruzados de la invención para el tratamiento de humanos, se realizan ensayos clínicos. Por ejemplo, se seleccionan pacientes diagnosticados de cáncer y que necesitan tratamiento y se separan en un grupo de tratamiento y uno o más grupos de control, en donde al grupo de tratamiento se le administra un polipéptido entrecruzado de la invención, mientras que los grupos de control reciben placebo o un fármaco anticáncer conocido. La seguridad y eficacia de los polipéptidos entrecruzados de la invención se puede evaluar, por tanto, 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 tratado con un polipéptido entrecruzado muestra una supervivencia a largo plazo mejorada en comparación con un grupo de control de pacientes tratados con un placebo.

40

45 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Los polipéptidos entrecruzados de la presente memoria también incluyen derivados farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos. Un "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de un éster, profármaco u otro derivado de un compuesto de esta descripción farmacéuticamente aceptables que, tras su administración a un receptor, son capaces de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto de esta invención. Los derivados farmacéuticamente aceptables particularmente preferidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la invención cuando se administran a un mamífero (p. ej., aumentando la absorción en sangre de un compuesto administrado oralmente) o que aumentan la entrega del compuesto activo a un compartimento biológico (p. ej., el cerebro o el sistema linfático) con respecto a las especies progenitoras. Algunos derivados farmacéuticamente aceptables incluyen un grupo químico que aumenta la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la mucosa gastrointestinal.

50

55

En algunos casos, los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria están modificados mediante unión covalente o no covalente de grupos funcionales apropiados para mejorar propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un determinado compartimento

biológico (p. ej., 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 descritos en la presente memoria incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, pamoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato undecanoato. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (p. ej., sodio), metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio), amonio y N-(alquilo)₄⁺.

5 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos en la presente memoria, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos 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 actúan como diluyentes, agentes saborizantes, aglutinantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimidos o un material encapsulante. Los detalles sobre las técnicas de formulación y administración están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., 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 los comprimidos, el componente activo está mezclado con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y compactado en la forma y el tamaño deseados.

20 Los excipientes sólidos adecuados son materiales de relleno de carbohidratos o proteínas e incluyen, pero no se limitan a, lactosa, sucrosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas, que incluyen la arábica y el tragacanto; así como proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se añaden agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona entrecruzada, el agar, al ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato sódico.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, soluciones de agua o agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas se pueden formular en solución en solución acuosa de polietilenglicol. El término "parenteral", como se emplea en la presente memoria, habitualmente se refiere a modos de administración que incluyen la intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, 30 intraesternal y subcutánea.

La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tal como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, un comprimido, un sello o una pastilla por sí misma o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma envasada.

40 Cuando las composiciones descritas en la presente memoria comprenden una combinación de un polipéptido entrecruzado y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos, tanto el compuesto como el agente adicional deberían estar presentes a niveles de dosificación de entre el 1 y 100 %, y más preferiblemente entre el 5 y 95 % de la dosificación normalmente administrada en un régimen de monoterapia. En algunos casos, los agentes adicionales se administran por separado, como parte de un régimen de dosis múltiples, de los compuestos de esta invención. Como alternativa, esos agentes son parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos de esta invención en una composición única.

45 Los métodos de administración que se pueden usar en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, el intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo, intranasal, epidural, oral, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmico, rectal, por inhalación, o tópico mediante aplicación a los oídos, la nariz, los ojos o la piel.

Métodos de uso

50 En la presente memoria se describen polipéptidos entrecruzados novedosos que son útiles en los ensayos de unión competitiva para identificar agentes que se unen a al ligando o ligandos naturales de las proteínas o los péptidos sobre los que se modelan los polipéptidos entrecruzados. Por ejemplo, en el sistema p53/MDM2, se usan polipéptidos entrecruzados a base de la p53 estabilizados y marcados en un ensayo de unión a MDM2 junto con moléculas pequeñas que se unen competitivamente a la MDM2. Los ensayos de unión competitiva permiten una rápida evaluación y determinación *in vitro* de fármacos candidatos específicos para el sistema p53/MDM2. Asimismo, en el sistema antiapoptótico BH3/BCL-X_L se pueden usar polipéptidos entrecruzados a base de BH3 marcados en un ensayo de unión a BCL-X_L junto con moléculas pequeñas que se unen competitivamente a la BCL-X_L. Los ensayos de unión competitiva permiten una rápida evaluación y determinación *in vitro* de fármacos candidatos específicos para el sistema BH3/BCL-X_L. También se describe la generación de anticuerpos contra los polipéptidos entrecruzados. En algunos casos, estos anticuerpos unen específicamente tanto los polipéptidos entrecruzados

como los precursores de los polipéptidos entrecruzados de p53 o BH3 de los que derivan los polipéptidos entrecruzados. Tales anticuerpos, por ejemplo, interrumpen los sistemas p53/MDM2 o BH3/BCL-XL, respectivamente.

5 También se describen métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto con riesgo de (o susceptible a) padecer un trastorno o que tiene un trastorno asociado a una expresión o actividad (p. ej., anomalías de la vía apoptótica extrínseca o intrínseca) aberrantes (p. ej., insuficiente o excesiva) de un miembro de la familia BCL-2. Se cree que algunos trastornos de tipo BCL-2 están provocados, al menos en parte, por un nivel anómalo de uno o más miembros de la familia BCL-2 (p. ej., sobre- o infraexpresión) o por la presencia de uno o más miembros de la familia BCL-2 que exhiben una actividad anómala. Como tal, la reducción del nivel y/o la actividad del miembro de la familia BCL-2 o la mejora del nivel y/o la actividad del miembro de la familia BCL-2 se usan, por ejemplo, para paliar o reducir los síntomas adversos del trastorno.

15 También se describen métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades hiperproliferativas mediante interferencia con la interacción o unión entre p53 y MDM2 en células tumorales. Estos métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la invención a un animal de sangre caliente, un humano incluido, o a células tumorales que contienen p53 de tipo salvaje. En algunos casos, la administración de los compuestos de la presente descripción induce la detención del crecimiento celular o la apoptosis. En otros casos o casos adicionales, la presente invención se usa para tratar enfermedades y/o células tumorales que comprenden niveles de MDM2 elevados. Niveles de MDM2 elevados, como se emplea en la presente memoria, se refiere a niveles de MDM2 mayores que los encontrados en células que contienen más del número de copias normal (2) de mdm2 o por encima de aproximadamente 10 000 moléculas de MDM2 por célula como se mide mediante ELISA y ensayos similares (Picksley et al. (1994), Oncogene 9, 2523 2529).

20 Como se emplea en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislados de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, paliar, mejorar o influir en la enfermedad, los síntomas de enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

25 En algunos casos, los polipéptidos entrecruzados de la descripción se usan para tratar, evitar y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Como se emplean en la presente memoria, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado anómalo o una afección caracterizados por crecimiento celular de proliferación rápida. Los estados de enfermedad hiperproliferativos y neoplásicos se pueden categorizar como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad patológico, o se pueden categorizar como no patológicos, es decir, una desviación de la normalidad no asociada a un estado de enfermedad patológico. El término tiene como objeto incluir todos los tipos de crecimientos cancerígenos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados con malignidad, independientemente del tipo histopatológico o el grado de invasividad. Un tumor metastásico puede surgir a partir de una multitud de tipos de tumores primarios, que incluyen, pero no se limitan a, los de origen mamario, pulmonar, de colon y ovárico. Las células "hiperproliferativas patológicas" se presentan en estados de enfermedad caracterizados por crecimiento tumoral maligno. Los ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociada a la reparación de heridas. Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos incluyen cáncer, p. ej., carcinoma, sarcoma o trastornos metastásicos. En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos son agentes terapéuticos novedosos para el control del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, la metástasis de tales cánceres y similares.

30 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, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer testicular, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma o sarcoma de Kaposi.

45 Los ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se emplea en a la presente memoria, el término "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, p. ej., que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides o células precursoras de los mismos. Preferiblemente, las enfermedades que surgen de leucemias agudas pobremente diferenciadas, p. ej., leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC) (analizadas en Vaickus (1991), Crit Rev.

Oncol./Hemotol. 11:267-97); las malignidades 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), leucemia de células peludas (LCP) y macroglobulinemia de Waldenström (MW). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricos, leucemia/linfoma de células T del adulto (LLCTA), linfoma de células T cutáneo (LCTC), leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Stemberg.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos de la mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad mamaria proliferativa, que incluye, p. ej., hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante y papilomas de conductos pequeños; tumores, p. ej., tumores estromales tales como fibroadenoma, tumor filodes y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma de conductos grandes; carcinoma de mama, incluyendo carcinoma in situ (no invasivo) que incluye carcinoma ductal in situ (enfermedad de Paget incluida) y carcinoma lobular in situ, y carcinoma invasivo (infiltrante) que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma coloide (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasivo, y neoplasias malignas varias. Los trastornos de las mamas masculinas incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos del pulmón incluyen, pero no se limitan a, carcinoma broncogénico, que incluye síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoide bronquial, tumores varios y tumores metastásicos; patologías de la pleura, que incluyen efusiones pleurales inflamatorias, efusiones pleurales no inflamatorias, neumotórax y tumores pleurales, que incluyen tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y mesotelioma maligno.

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

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

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos del ovario incluyen, pero no se limitan a, tumores ováricos tales como tumores del epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales de superficie; tumores de células germinales tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor del seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores del estroma de los cordones sexuales tales como tumores de células de la teca-granulosa, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células de Hill y gonadoblastoma; y tumores metastásicos tales como los tumores de Krukenberg.

En otros casos o en casos adicionales, los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente memoria se usan para tratar, evitar o diagnosticar afecciones caracterizadas por muerte celular sobrerreactiva o muerte celular debida a insulto fisiológico, etc. Algunos ejemplos de afecciones caracterizadas por muerte celular prematura o no deseada o, como alternativa, proliferación celular no deseada o excesiva incluyen, pero no se limitan a afecciones 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 y mielodisplasia.

En otros casos o en casos adicionales, los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria que actúan para reducir la apoptosis se usan para tratar trastornos asociados a un nivel de muerte celular no deseado. Por tanto, en algunos casos, los polipéptidos antiapoptóticos de la invención se usan para tratar trastornos tales como los que llevan a muerte celular asociada a infección viral, p. ej., infección asociada a infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Una amplia variedad de enfermedades neurológicas se caracterizan por la pérdida gradual de conjuntos específicos de neuronas y los polipéptidos entrecruzados antiapoptóticos de la invención se usan, en algunos casos, en el tratamiento de estos trastornos. Tales trastornos incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y diversas formas de degeneración cerebelosa. La pérdida celular en estas enfermedades no induce una respuesta inflamatoria y la apoptosis parece ser el mecanismo de la muerte celular. Además, varias enfermedades hematológicas están asociadas a una reducción en la producción de células sanguíneas. Estos trastornos incluyen anemia asociada a enfermedad crónica, anemia aplásica, neutropenia crónica y los síndromes mielodisplásicos. Los trastornos de producción de células sanguíneas, tales como el síndrome mielodisplásico y algunas formas de anemia aplásica, están asociados a un aumento de la muerte celular apoptótica en la médula ósea. Estos trastornos podrían ser el resultado de la activación de genes que fomentan la apoptosis, deficiencias adquiridas en células estromales o factores de supervivencia hematopoyéticos o los efectos directos de toxinas y mediadores de las respuestas inmunes. Dos trastornos comunes asociados a muerte celular son los infartos de miocardio y el accidente cerebrovascular. En ambos trastornos, las células del área central de la isquemia, que se produce en caso de pérdida aguda de flujo sanguíneo, parecen morir rápidamente como resultado de la necrosis. Sin embargo, fuera de la zona isquémica central, las células mueren a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado y,

morfológicamente, parecen morir por apoptosis. En otros casos o en casos adicionales, los polipéptidos entrecruzados antiapoptóticos de la descripción se usan para tratar la totalidad de tales trastornos asociados a una muerte celular no deseada.

5 Algunos ejemplos de trastornos inmunológicos que se tratan con los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, rechazo de trasplantes de órganos, artritis, lupus, EII, enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple, diabetes, etc.

10 Algunos ejemplos de trastornos neurológicos que se tratan con los polipéptidos entrecruzados descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, 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 sistémica, diabetes del adulto, insulinoma, amiloidosis atrial aislada, carcinoma medular de tiroides, amiloidosis familiar, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, polineuropatía amiloidótica familiar, prurito lumbar de ovinos y caprinos, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina, una enfermedad
15 mediada por priones y enfermedad de Huntington.

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

20 Los ejemplos de trastornos vasculares (p. ej., trastornos inflamatorios) que se tratan o evitan con los polipéptidos entrecruzados de la invención incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trombosis, aneurisma, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, angina de pecho, muerte súbita cardíaca, cardiopatía hipertensiva; enfermedad de vasos no coronarios, tal como arteriosclerosis, enfermedad de vasos pequeños, nefropatía, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatosis, asma, hipertensión, enfisema y enfermedad pulmonar crónica; o una afección cardiovascular asociada a procedimientos intervencionistas ("trauma vascular tras operación"), tales como restenosis tras angioplastia, colocación de una derivación, un estent, injertos sintéticos o naturales, un catéter permanente, una válvula u otros dispositivos implantables. Los trastornos cardiovasculares preferidos incluyen aterosclerosis, infarto de miocardio, aneurisma y accidente cerebrovascular.

EJEMPLOS

30 La siguiente sección proporciona ejemplos ilustrativos de la presente invención y compuestos que se pueden emplear en la misma.

Ejemplo 1. Síntesis de polipéptidos entrecruzados de Fórmula (I).

35 Se sintetizan, purifican y analizan polipéptidos entrecruzados α -helicoidales como se describió previamente (Schafmeister et al. (2000), J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892; Walensky et al (2004) Science 305:1466-70; Walensky et al (2006) Mol Cell 24:199-210) y como se indica a continuación. En este estudio se usan los siguientes macrociclos derivados del BH3 de BID humana, el BH3 de BIM humana y secuencias peptídicas de MAML humana:

Tabla 10

Número de compuesto	Péptido progenitor	Secuencia	m/z (M+H) calculado	m/z (M+3H) calculado	m/z (M+3H) encontrado
1	BID	Ac-DIIRNIARHLA\$VGD\$NleDRSI-NH ₂	2438,40	813,47	813,7
2	BID	Ac-DAARNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH ₂	2338,35	780,12	780,17
3	BID	Ac-DIARNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH ₂	2380,39	794,14	794,15
4	BID	Ac-DAIRNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH ₂	2380,39	794,14	794,09

Número de compuesto	Péptido progenitor	Secuencia	m/z (M+H) calculado	m/z (M+3H) calculado	m/z (M+3H) encontrado
5	BID	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$NleDRSI-NH ₂	2139,25	713,76	713,79
6	BID	Pr-RNIARHLAib\$VAibD\$NleDRSI-NH ₂	2153,27	718,43	718,5
7	BID	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$FARSI-NH ₂	2129,25	710,42	710,3
8	BID	Pr-RNIARHLA\$VGD\$NleAibRSI-NH ₂	2081,25	694,42	694,42
9	BID	Pr-RNIAibRHLAib\$VAibD\$AARSI-NH ₂	2081,25	694,42	694,49
10	BIM	Ac-IWIAQELR\$IGD\$FNAYYARR-NH ₂	2646,43	882,82	883,15
11	BIM	Ac-IWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH ₂	2645,45	882,49	882,62
12	BIM	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH ₂	2588,43	863,48	863,85
13	BIM	Ac-RWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH ₂	2688,46	896,83	896,84
14	BIM	Ac-RWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH ₂	2615,45	872,49	872,64
15	BIM	Ac-RWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH ₂	2630,45	877,48	877,36
16	BIM	Ac-IWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH ₂	2587,43	863,14	863,00
17	hMAML	Ac-ERLRRRI\$LCR\$HHST-NH ₂	2124,21	709,08	708,72
18	hMAML	Ac-ERLRRRI\$LAR\$HHST-NH ₂	2092,24	698,42	698,09
19	hMAML	Ac-ALRRRI\$LCA\$HHST-NH ₂	1825,04	609,35	609,06

En las secuencias anteriores, los compuestos 1, 10 y 17 son compuestos de referencia que tienen alta eficacia en medios libres de suero, la cual se ve sustancialmente reducida en presencia de suero. A continuación, se fabrican y ensayan usando los métodos de la invención variantes de este compuesto (2-9, 11-16, 18-19). Nle representa norleucina, Aib representa ácido 2-aminoisobutírico, Chg representa ciclohexilglicina, Ac representa acetilo N-terminal, Pr representa propionilo N-terminal y NH₂ representa amida C-terminal. Los aminoácidos representados como \$ conectan un entrecruzador de todo carbono, que comprende ocho átomos de carbono entre los carbonos alfa de cada aminoácido, con un doble enlace entre los átomos de carbono cuarto y quinto y en donde cada átomo de carbono α al que está unido el entrecruzador está sustituido adicionalmente con un grupo metilo. Se proporcionan los espectros m/z previstos y medidos.

Los aminoácidos alfa,alfa-disustituidos no naturales que contienen cadenas laterales olefinicas se sintetizan según Williams et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:9276 y Schafmeister et al. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122:5891. Los polipéptidos entrecruzados se diseñan reemplazando dos aminoácidos presentes de forma natural (véase la Tabla 10 y la Fig. 5) por los aminoácidos sintéticos correspondientes. Las sustituciones se hacen en las posiciones i e i+4 o en las posiciones i e i+7. Los polipéptidos entrecruzados se generan mediante síntesis de péptidos en fase sólida seguida de entrecruzamiento a base de metátesis de olefina de los aminoácidos sintéticos por medio de sus cadenas laterales que contienen olefina.

Los aminoácidos no naturales (enantiómeros R y S del aminoácido olefínico de 5 carbonos y el enantiómero S del aminoácido olefínico de 8 carbonos) se caracterizan mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Varian Mercury 400) y espectrometría de masas (Micromass LCT). La síntesis de péptidos se realiza manualmente o en un sintetizador de péptidos automatizado (Applied Biosystems, modelo 433A), usando

condiciones para fase sólida, resina de amida de Rink AM (Novabiochem) y química Fmoc para el grupo protector de la cadena principal. Para el acoplamiento de aminoácidos naturales protegidos con Fmoc (Novabiochem), se emplean 10 equivalentes de aminoácido y una proporción molar de 1:1:2 de los agentes de acoplamiento HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA. Los aminoácidos no naturales (4 equiv.) se acoplan con una proporción molar 1:1:2 de HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA. La metátesis de olefina se realiza en la fase sólida usando catalizador de Grubbs 10 mM (Blackwell et al. 1994 supra) (Materia) disuelto en diclorometano desgasificado y que se hace reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. El aislamiento de los compuestos metatetizados se consigue mediante desprotección y escisión mediada por ácido trifluoroacético, precipitación en éter para producir el producto crudo y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Varian ProStar) en una columna C18 de fase reversa (Varian) para producir los compuestos puros. La composición química del producto puro se confirma mediante espectrometría de masas LC/MS (Micromass LCT acoplada a un sistema de HPLC Agilent 1100) y análisis de aminoácidos (Applied Biosystems, modelo 420A).

Ejemplo 2. Ensayos de viabilidad celular de líneas de células tumorales tratadas con polipéptidos entrecruzados de la invención.

Se hace crecer la línea celular Jurkat (Clone E6-1, ATCC, n.º de catálogo TIB-152) en medio suplementado con suero específico (RPMI-1640, Invitrogen, n.º de catálogo 22400) como recomienda ATCC. Un día antes del inicio del estudio, las células se dividen a una densidad celular óptima (2×10^5 - 5×10^5 células/ml) para garantizar células que se dividan activamente. Al día siguiente, se lavan las células dos veces en medio Opti-MEM libre de suero (Invitrogen, n.º de catálogo 51985) y, a continuación, se siembran las células en placas a una densidad celular óptima (10 000 células/pocillo) en 50 µl de medio Opti-MEM u Opti-MEM suplementado con un 2 % o 10 % de suero humano (Bioreclamation, n.º de catálogo HMSRM) en placas de cultivo tisular blancas de 96 pocillos (Nunc, n.º de catálogo 136102).

Para el experimento libre de suero, se diluyen los polipéptidos entrecruzados a partir de soluciones madre 2 mM (DMSO al 100 %) en agua estéril para preparar soluciones de trabajo 400 µM. Los polipéptidos entrecruzados y los controles se diluyen primero 10 veces y, a continuación, se diluyen en serie dos veces en Opti-MEM en placas de dosificación para proporcionar concentraciones de entre 1,2 y 40 µM. A continuación, se añaden 50 µL de cada dilución a los pocillos apropiados de la placa de ensayo para alcanzar concentraciones finales de los polipéptidos iguales a entre 0,6 y 20 µM. Para los estudios usando Opti-MEM suplementado con suero humano (Bioreclamation, n.º de catálogo HMSRM), se diluyen los polipéptidos entrecruzados a partir de soluciones madre 10 mM (DMSO al 100 %) en agua estéril para preparar soluciones de trabajo 2 µM. Los polipéptidos entrecruzados y los controles se diluyen primero 10 veces y, a continuación, se diluyen en serie dos veces en Opti-MEM en presencia de un 2 % o 10 % de suero humano para proporcionar concentraciones de los polipéptidos iguales a entre 6,25 y 200 µM en las placas de dosificación. A continuación, se añaden 50 µL de cada dilución a los pocillos apropiados de la placa de ensayo para alcanzar concentraciones finales de los polipéptidos iguales a entre 3,125 y 100 µM. Los controles incluían pocillos sin polipéptidos que contenían la misma concentración de DMSO que los pocillos que contenían los macrociclos, pocillos que contenían un 0,1 % de Triton X-100 y pocillos que no contenían células. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada.

Al final del periodo de incubación, se realiza un ensayo CellTiter-Glo según las instrucciones del fabricante (Promega, n.º de catálogo G7573) y se mide la luminiscencia usando un lector de placas Synergy HT (BioTek). La luminiscencia se correlaciona con la viabilidad. Una reducción de la viabilidad refleja la capacidad de los compuestos de ensayo de inducir la muerte celular programada por medio de BAX y BAK. En la Figura 1 se muestra una curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de suero humano representativa.

Ejemplo 3. Determinación de la afinidad aparente por proteínas séricas humanas (K_d^*).

La medición de los valores de K_d aparentes para proteína sérica mediante análisis del cambio en CE₅₀ proporciona un medio sencillo y rápido de cuantificar la propensión de los compuestos experimentales a unir ASH y otras proteínas séricas. Existe una relación lineal entre la CE₅₀ aparente en presencia de proteína sérica (CE'₅₀) y la cantidad de proteína sérica añadida a un ensayo *in vitro*. Esta relación se define mediante la afinidad de unión del compuesto por las proteínas séricas, expresada como K_d^* . Este término es una constante de disociación *aparente* determinada experimentalmente que puede ser el resultado de los efectos acumulativos de múltiples eventos de unión experimentalmente indistinguibles. La forma de esta relación se presenta aquí en la Ec. 0.3 y su derivación se puede encontrar en Copeland et al, Biorg. Med Chem Lett. 2004, 14:2309-2312.

$$(0.3) \quad CE'_{50} = CE_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{CE_{50}}} \right)$$

Una proporción significativa de unión de proteína sérica se puede atribuir a interacciones del fármaco con la ASH, debido a la alta concentración de esa proteína en el suero (35-50 g/L o 530-758 µM). Para calcular el valor de K_d

5 para estos compuestos hemos asumido que el cambio en CE₅₀ tras la adición de proteína se puede atribuir por completo a la ASH presente en el suero añadido, donde P es 700 µM para suero al 100 %, P es 70 µM para suero al 10 %, etc. Además, para simplificar, hicimos la suposición de que todos los compuestos unen ASH con una estequiometría 1:1 para que el término *n* de la Ec. (0.3) sea constantemente la unidad. Con estos parámetros definidos, calculamos el valor de *K_d** para cada péptido grapado a partir de los cambios en los valores de CE₅₀ con concentraciones crecientes de suero (y proteína sérica) mediante el análisis de regresión no lineal de la Ec. 0.3 usando Mathematica 4.1 (Wolfram Research, Inc., www.wolfram.com). Los valores de CE₅₀ en sangre entera se estiman ajustando P en la Ec. 0,3 a 700 µM [ASH].

10 La fracción libre en sangre se estima por la siguiente ecuación, como derivó Trainor, Expert Opin. Drug Disc., 2007, 2(1):51-64, en la que [ASH]_{total} se ajusta a 700 µM.

$$(0.4) \quad \text{Fracción libre} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [ASH]_{total}}$$

La Figura 2 muestra gráficos representativos de CE₅₀ frente a concentración de suero humano para el compuesto 1 y análogos relacionados. La Figura 3 muestra gráficos representativos de CE₅₀ frente a concentración de suero humano para el compuesto 10 y análogos relacionados.

15 La Tabla 11 muestra que mediante selección y optimización según la invención, los compuestos se pueden fabricar con sustancialmente menos cambio en suero que el cabeza de serie inicial (por ejemplo, compuesto 1 o compuesto 10) a la vez que siguen reteniendo buena actividad en el ensayo del Ejemplo 2.

Tabla 11

Número de compuesto	CE50 sin suero, µM	CE50 con un 2 % de suero, µM	CE50 con un 10 % de suero, µM	Kd* para suero	Fracción libre est. en sangre, µM	CE50 est. en sangre, µM
1	1,2	73,9	> 100	< 0,1	< 0,1 %	3636,2
2	1,6	20,5	97,1	< 0,1	< 0,1 %	957,2
3	1,2	14,9	88,9	< 0,1	< 0,1 %	890,1
4	1,0	11,3	73,1	< 0,1	< 0,1 %	734,8
5	1,6	16,7	63,0	0,2	< 0,04 %	606,9
6	1,0	10,1	49,7	0,4	< 0,07 %	490,0
7	2,2	12,4	48,2	1,1	< 0,19 %	459,1
8	2,4	10,5	37,7	2,3	< 0,39 %	352,2
9	1,1	5,6	20,2	2,9	< 0,48 %	190,0
10	1,3	36,9	> 100	< 0,1	< 0,1 %	1781,3
11	1,2	7,9	37,6	1,1	< 0,18 %	367,0
12	1,3	8,6	26,5	2,3	< 0,38 %	246,3
13	1,5	5,4	21,5	3,8	< 0,63 %	201,8
14	0,4	2,8	10,8	2,3	< 0,38 %	103,4
15	0,9	2,6	11,5	5,1	< 0,84 %	108,2
16	0,5	2,3	9,3	3,5	< 0,58 %	88,4
17	12,0	55,1	> 100	< 0,1	< 0,1 %	2167,0
18	> 20	> 100	> 100	< 0,1	< 0,1 %	> 4000

Número de compuesto	CE50 sin suero, μM	CE50 con un 2 % de suero, μM	CE50 con un 10 % de suero, μM	Kd* para suero	Fracción libre est. en sangre, μM	CE50 est. en sangre, μM
19	2,4	14,7	57,5	0,6	< 0,10 %	549,4

Ejemplo 4. Relación estructura-afinidad de la afinidad aparente por proteínas séricas humanas (K_d^*).

La Figura 4 muestra representaciones de tipo rueda helicoidal de pares de péptidos entrecruzados de la invención en los que uno o más aminoácidos están alterados para proporcionar un análogo de péptido entrecruzado con eficacia mejorada para la diana o dianas intracelulares en ensayos de células enteras. A lo largo de varias secuencias, se observa que un motivo dipeptídico que consiste en una cadena lateral ácida (cargada negativamente) adyacente a una cadena lateral hidrofóbica grande proporciona una unión a proteínas séricas humanas tales como la albúmina con una afinidad más alta que un análogo en el que la cadena lateral ácida ha sido reemplazada por una cadena lateral neutra. En algunos casos, la sustitución de las cadenas laterales tanto ácida como hidrofóbica grande por cadenas laterales neutras y menos hidrofóbicas, respectivamente, proporciona una afinidad más baja por las proteínas séricas humanas. Esta relación estructura-actividad es consistente con la percepción de que las proteínas séricas humanas y, en particular, la albúmina sérica humana, unen ácidos grasos en condiciones fisiológicas y estos ácidos grasos son reconocidos por un motivo de unión ácido/hidrofóbico combinado. También se sabe que las membranas de las células humanas y animales consisten en fosfolípidos y que los grupos principales fosfato de la bicapa lipídica presentan una superficie cargada negativamente en la membrana externa que repelerá electrostáticamente las cadenas laterales ácidas (cargadas negativamente) de un péptido y, por tanto, la sustitución de una cadena lateral ácida por una cadena lateral neutra debería aumentar la asociación de un polipéptido entrecruzado a la membrana celular. Esta asociación a la membrana externa es la primera etapa requerida propuesta en la endocitosis de los polipéptidos entrecruzados de la invención.

20

REIVINDICACIONES

1. Método de cribado de un polipéptido que comprende una hélice alfa y un entrecruzador que conecta un primer aminoácido y un segundo aminoácido del polipéptido, en donde el polipéptido penetra las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía y se une a una diana intracelular, método que comprende:
- 5 (a) medir la eficacia *in vitro* del polipéptido en un ensayo de células enteras en donde la actividad está mediada por la unión a la diana intracelular, en presencia y en ausencia de suero humano;
- (b) calcular la CE₅₀ y la afinidad aparente (K_d*) del polipéptido por las proteínas séricas humanas, y
- (c) seleccionar un polipéptido, que tenga una K_d* de 1 a 700 micromolar.
2. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado tiene una K_d* inferior a 70 micromolar.
- 10 3. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado tiene una K_d* de 1-10 micromolar.
4. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado posee una fracción libre estimada en sangre humana del 0,1-50 %, en donde la fracción libre estimada se define por la ecuación
- $$\text{Fracción libre} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [\text{ASH}]_{\text{total}}}$$
- y [ASH]_{total} es 700 micromolar.
5. Método de la reivindicación 4, en donde el polipéptido seleccionado posee una fracción libre estimada en sangre humana del 0,5-10 %.
- 15 6. Método de la reivindicación 1, en donde el mecanismo de penetración celular dependiente de la energía es endocitosis.
7. Método de la reivindicación 1, en donde al menos uno del primero y segundo aminoácidos es un aminoácido α,α-disustituido.
- 20 8. Método de la reivindicación 1, en donde tanto el primero como el segundo aminoácidos son α,α-disustituidos.
9. Método de la reivindicación 1, en donde el primer aminoácido y el segundo aminoácido están separados por tres o seis aminoácidos.
10. Método de la reivindicación 1, en donde el entrecruzador abarca 1 o 2 giros de la hélice alfa.
- 25 11. Método de la reivindicación 1, en donde la longitud del entrecruzador es de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 9 Å por giro de la hélice alfa.
12. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado lleva una carga neta positiva a pH 7,4.
13. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado proporciona un efecto terapéutico.
14. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 1 micromolar o más débil.
- 30 15. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 3 micromolar o más débil.
16. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado posee una afinidad aparente por las proteínas séricas humanas de 10 micromolar o más débil.
- 35 17. Método de la reivindicación 1, en donde el polipéptido seleccionado posee una capacidad mejorada de penetrar las membranas celulares mediante un proceso dependiente de la energía con respecto a un polipéptido no entrecruzado correspondiente.
- $$CE'_{50} = CE_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{CE_{50}}} \right)$$
18. Método de la reivindicación 1, en donde K_d* se define por la ecuación
- 40 1. CE₅₀ es una eficacia *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en ausencia de suero humano alguno y CE'₅₀ es una eficacia *in vitro* medida en un ensayo de células enteras en un N % de suero humano en donde P es igual a (N/100) x (700) micromolar.

Figura 1

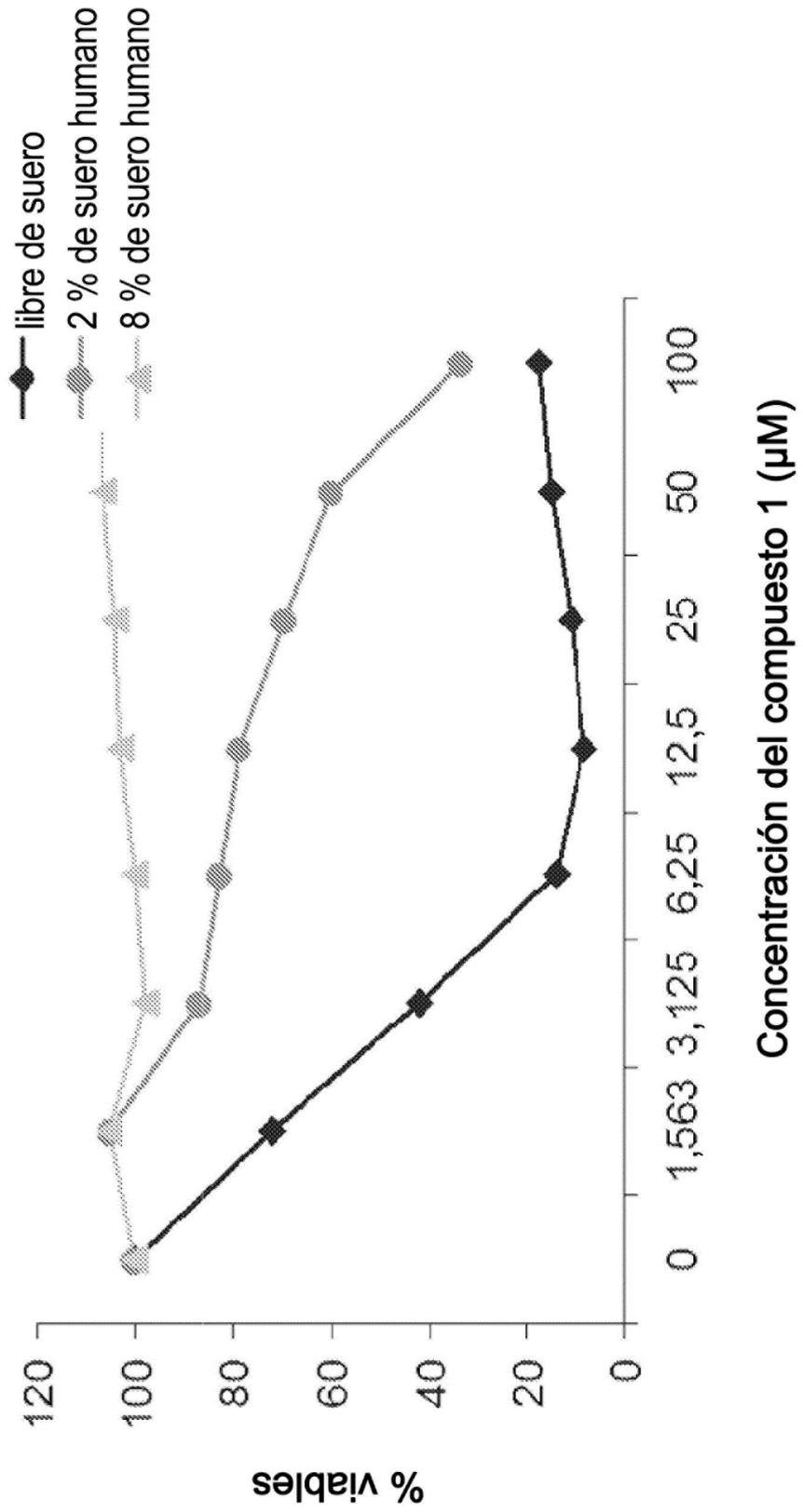


Figura 2

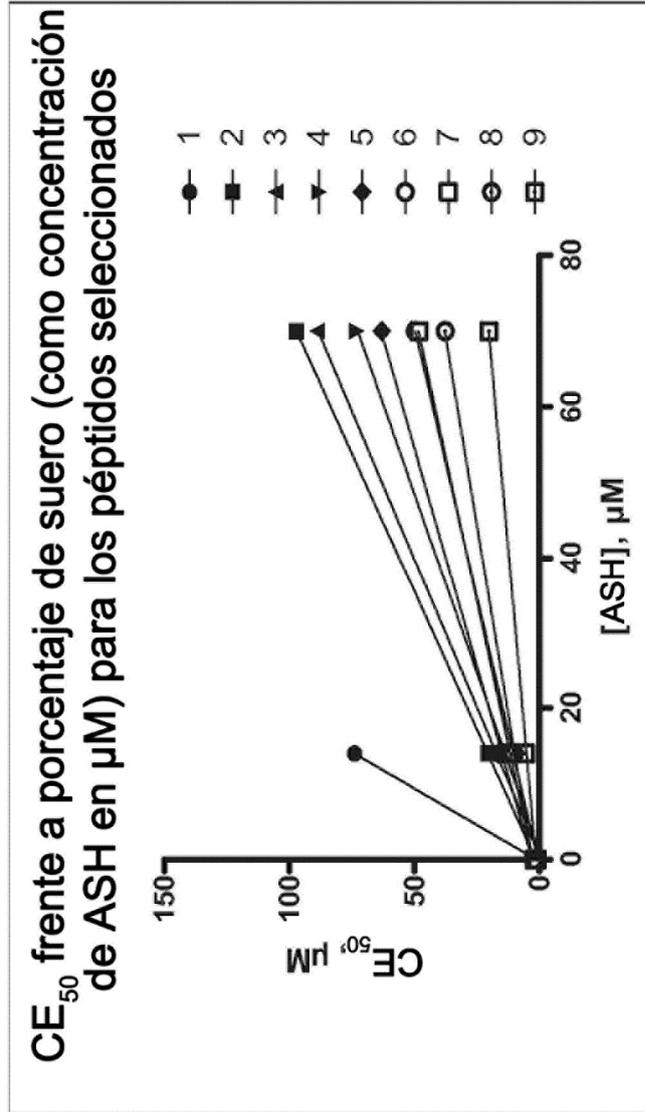


Figura 3

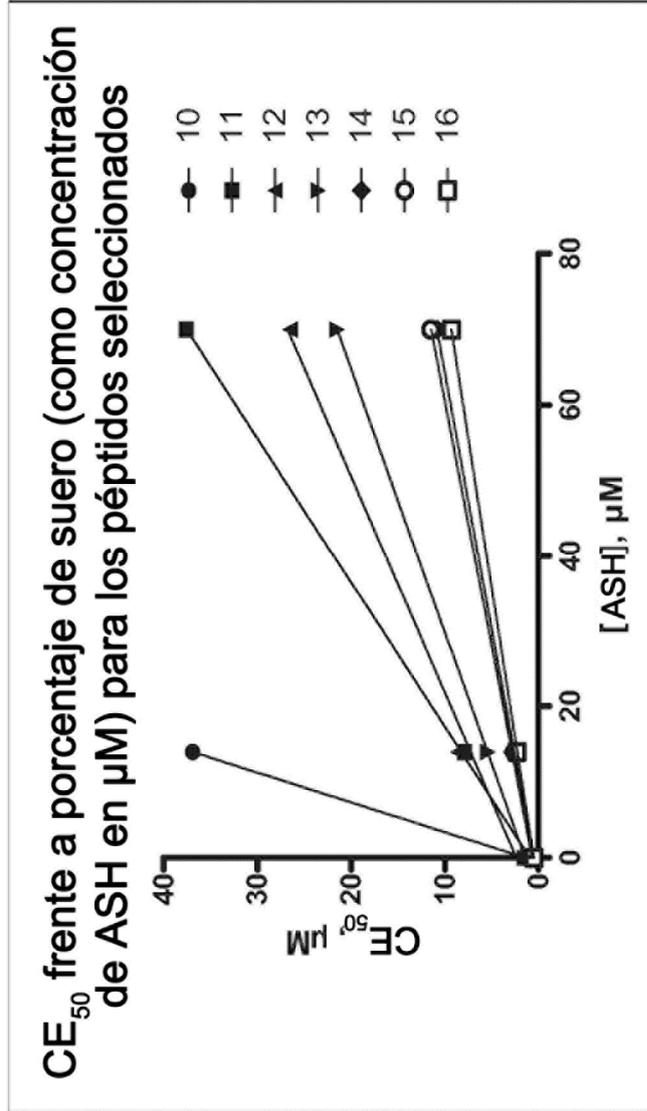


Figura 4

