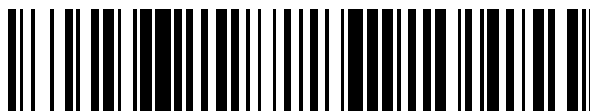


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 068**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2014** **PCT/US2014/039332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14190257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2014** **E 14800563 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2999483**

54 Título: **Síntesis química y cribado de bibliotecas de péptidos bicíclicos**

30 Prioridad:

23.05.2013 US 201361826805 P

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

21.03.2019

73 Titular/es:

**OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION
(100.0%)**

**1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**PEI, DEHUA;
UPADHYAYA, PUNIT;
LIAN, WENLONG y
TRINH, THI.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 705 068 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

Síntesis química y cribado de bibliotecas de péptidos bicíclicos

5 Antecedentes

Las interacciones proteína-proteína representan una nueva clase de dianas de fármacos excitantes, que generalmente se consideran "resistentes a fármacos" por los enfoques convencionales de molécula pequeña, porque sus sitios de unión suelen ser superficies grandes y planas que carecen de espacios bien definidos para que las moléculas pequeñas se unan.

Las interacciones proteína-proteína (PPI) son de importancia central esencialmente en todas las vías bioquímicas, incluidas las implicadas en los procesos de enfermedad. Por lo tanto, las PPI representan una gran clase de nuevos y excitantes dianas farmacológicas (Wells, J y McClendon, C. *Nature*, 2007, 450, 1001-1009). Sin embargo, los PPI se consideran las dianas prototípicas "no resistentes a fármacos" o "desafiantes" para el enfoque convencional de molécula pequeña, ya que los PPI generalmente implican interfaces grandes y planas, con las que una molécula pequeña generalmente no tiene suficientes puntos de contacto para impartir una alta afinidad o especificidad. Por otro lado, se ha vuelto relativamente sencillo desarrollar anticuerpos específicos de alta afinidad contra cualquier epítipo de proteínas, incluidas las superficies planas. Los andamios de proteínas diferentes de inmunoglobulina también se han convertido en aglutinantes específicos a proteínas diana a través del cribado de bibliotecas y/o la evolución *in vitro* (Koide, A et al., *J. Mol. Biol.*, 1998, 284, 1141-1151; Beste, G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 1898-1903; Xu, L.H. et al. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 933-942; Rutledge, SE et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14336-14347; Steiner, D et al., *J. Mol. Biol.*, 2008, 382, 1211-1227). Estos aglutinantes de proteínas y anticuerpos poseen grandes superficies de unión propias y son capaces de hacer múltiples contactos con una superficie diana (por ejemplo, los involucrados en los PPI). Desafortunadamente, los fármacos a base de proteínas son impermeables a la membrana celular de los mamíferos; como tales, generalmente se limitan a dirigirse a proteínas extracelulares y no están disponibles por vía oral. Recientemente, ha habido un gran interés en desarrollar compuestos macrocíclicos tales como péptidos cíclicos como inhibidores de PPI (Koide, A et al., *J. Mol. Biol.*, 1998, 284, 1141-1151; Beste, G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 1898-1903; Xu, L.H. et al. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 933-942; Rutledge, SE et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14336-14347; Steiner, D et al., *J. Mol. Biol.*, 2008, 382, 1211-1227; Dewan, V et al. *ACS Chem. Biol.*, 2012, 7, 761-769; Wu, X et al. *Med. Chem. Commun.*, 2013, 4, 378-382; Tavassoli, A et al. *ACS Chem. Biol.*, 2008, 3, 757-764; Millward, SW et al. *ACS Chem. Biol.*, 2007, 2, 625-634; Zhou, H et al. *J. Med. Chem.*, 2013, 56, 1113-1123; Yamagishi, Y et al. *Chem. Biol.*, 2011, 18, 1562-1570; Ardi, VC et al. *ACS Chem. Biol.*, 2011, 6, 1357-1366; Leduc, AM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 11273-11278). Estos macrociclos típicamente tienen pesos moleculares entre 500 y 2000 y ocupan un espacio terapéutico en gran parte sin explotar que a menudo se conoce como el "espacio medio". Debido a sus tamaños relativamente grandes y, por lo tanto, a la capacidad de establecer múltiples puntos de contacto con una diana, pueden competir con las proteínas para unirse a las superficies planas y, sin embargo, conservar muchas de las propiedades farmacocinéticas de las moléculas pequeñas. Los péptidos bicíclicos también se han generado para limitar sus estructuras y mejorar su afinidad/especificidad de unión y estabilidad metabólica (Sun, Y et al. *Org. Lett.*, 2001, 3, 1681-1684; Virta, P y Lonnberg, HJ. *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 8534; Hennis, C et al. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 502-507; Chen, S et al. *ChemBioChem.*, 2012, 13, 1032-1038; Sako, Y et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 7232-7234; Timmerman, P et al. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 34126-34134).

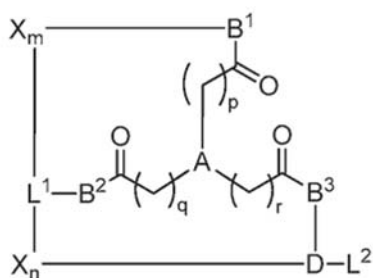
En el presente documento se describen compuestos, composiciones y métodos útiles para tales fines.

45 Sumario

En el presente documento se divulgan compuestos, composiciones, métodos para fabricar y seleccionar grandes bibliotecas combinatorias de péptidos bicíclicos mostrados en andamios de moléculas pequeñas. En algunos ejemplos, las moléculas bicíclicas en forma de disco en general son capaces de unirse a las superficies de proteínas planas, tales como las interfaces de las interacciones proteína-proteína. El cribado de una biblioteca de péptidos bicíclicos contra el factor de necrosis tumoral alfa identificó potentes antagonistas que protegen a las células de la muerte celular inducida por el factor de necrosis tumoral alfa. También se identificaron ligandos K-Ras potentes a partir de bibliotecas bicíclicas.

En el presente documento se divulgan compuestos peptídicos bicíclicos. En algunos ejemplos, los compuestos divulgados en el presente documento son compuestos anticancerosos. En algunos ejemplos, los compuestos se han preparado por síntesis en fase sólida. En algunos ejemplos, los compuestos pueden tener un peso molecular de 500 a 5000, tal como de 500 a 2000 o de 1000 a 2000.

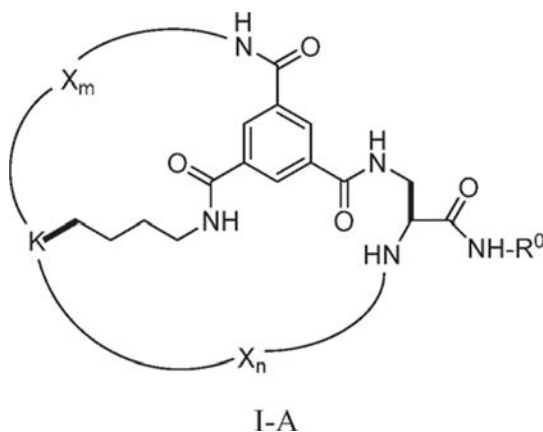
En algunos ejemplos, los compuestos son de Fórmula I:



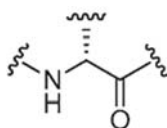
en la que

- 5 A se selecciona de N y benceno;
 p, q, y r se seleccionan independientemente de 0, 1, y 2;
 B₁, B₂, y B₃ se seleccionan independientemente de O y NR¹;
 en la que R¹ comprende H, o alquilo C₁-C₅ sustituido o sin sustituir;
 L₁ y L₂ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, aminoácido, y un
 10 enlazador a un soporte en fase sólida;
 D se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, o un residuo de aminoácido; y
 X_m y X_n comprenden independientemente una secuencia de 1-10 aminoácidos.

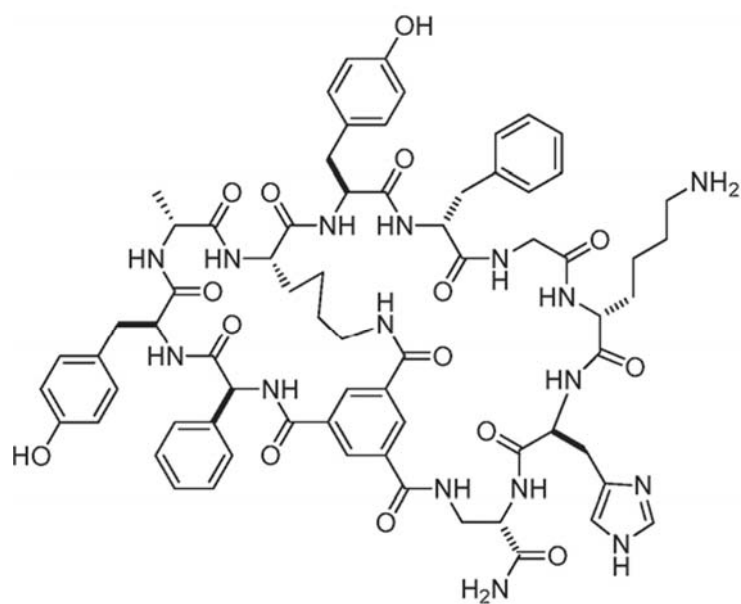
En algunos ejemplos de Fórmula I, los compuestos son de Fórmula I-A:



en la que X_m y X_n son como se definen en la Fórmula I; R⁰ se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin
 20 sustituir, o un enlazador a un soporte en fase sólida; y K tiene una estructura representada por una fórmula:

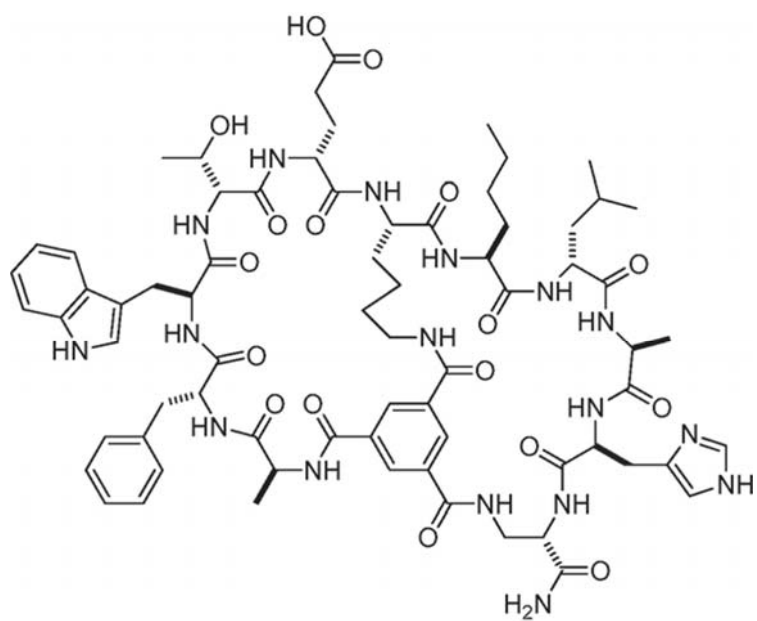


En algunos ejemplos de Fórmula I-A, el compuesto tiene una estructura representada por la Fórmula I-A-1.



I-A-1

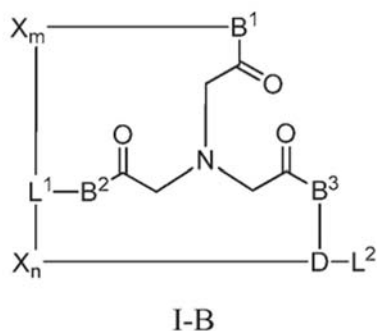
En algunos ejemplos de Fórmula I-A, el compuesto tiene una estructura representada por la Fórmula I-A-2.



I-A-2

En algunos ejemplos de Fórmula I, A comprende N. En algunos ejemplos de Fórmula I, p, q, y r son cada uno 1.

En algunos ejemplos de Fórmula I, los compuestos son de Fórmula I-B:



en la que X_m , X_n , L^1 , L^2 , B^1 , B^2 , B^3 y D son como se definen en la Fórmula I.

- 5 Se divulgan también en el presente documento, compuestos que comprenden a) un residuo de ácido trimésico, teniendo el residuo tres funcionalidades carboxilo; b) un residuo de lisina unido covalentemente a la primera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico; c) una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_m , unida covalentemente a la segunda funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico; y d) al residuo de lisina; y una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_n , unida covalentemente a la tercera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico y al residuo de lisina.
- 10

También se divulga una biblioteca que comprende una pluralidad de los compuestos divulgados.

- 15 También se divulga en el presente documento un método para fabricar un compuesto peptídico bicíclico, comprendiendo el método las etapas de: a) unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo; b) construir una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; c) unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica; d) construir una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina; e) unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; f) ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico; y g) ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico.
- 20

- 25 También se divulga en el presente documento un método para fabricar un compuesto peptídico bicíclico, comprendiendo el método las etapas de: a) unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo; b) construir una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena; c) unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica; d) construir una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena; e) unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; f) ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico; y g) ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico.
- 30

- 35 En el presente documento también se divulgan péptidos para su uso en un método para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto, tal como un ser humano, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto divulgado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos ejemplos, el sujeto es un animal, tal como un ser humano. En algunos ejemplos, se identifica que el sujeto tiene la necesidad de tratamiento del trastorno. En algunos ejemplos, el método trata un trastorno. En algunos ejemplos, el trastorno está asociado con la muerte celular inducida por $TNF-\alpha$, tal como la regulación disfuncional de la muerte celular inducida por $TNF-\alpha$. En algunos ejemplos, el trastorno está asociado con la proliferación celular incontrolada, tal como cáncer. En algunos ejemplos, el trastorno es cáncer. En algunos ejemplos, el trastorno es un trastorno inflamatorio. En algunos ejemplos, el trastorno es un trastorno autoinmune, tal como un trastorno seleccionado de artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, hidradenitis supurativa y asma refractaria.
- 40

- 45 En el presente documento también se divulga un método para identificar un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno, comprendiendo el método las etapas de: exponer un compuesto divulgado en el presente documento, un compuesto preparado mediante los métodos divulgados en el presente documento, una biblioteca divulgada en el presente documento, o una biblioteca preparada por los métodos divulgados para un receptor asociado con el trastorno; b) detectar la reacción entre el receptor y el compuesto o la biblioteca; y c) determinar la identidad del compuesto que reacciona con el receptor.
- 50

Descripción de las figuras

Las figuras adjuntas, que se incorporan y constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios aspectos y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

La Figura 1 muestra la síntesis de algunos de los compuestos divulgados, tal como una biblioteca de péptidos bicíclicos. Reactivos y condiciones: (a) Química estándar de Fmoc/HATU; (b) remojar en agua; (c) Fmoc-OSu 0,4 equiv. en Et₂O/CH₂Cl₂; (d) dicarbonato de di-*t*-butilo; (e) piperidina; (f) ácido 4-hidroxibenzoico/HBTU/HOBT; (g) Fmoc-13-Ala-OH/DIC; (h) TFA al 50 % en DCM; (i) síntesis de división y agrupación por química Fmoc/HATU; (j) TFA al 2 % en DCM (6x); (k) Fmoc-OSu/DIPEA en DCM; (l) Pd(PPh₃)₄; (m) ácido trimésico protegido con dialilo/HATU; (n) PyBOP/HOBT/DIPEA; (o) reactivo K modificado.

La Figura 2 muestra el cribado en fase de solución de los eventos iniciales (4ª ronda de cribado). 2A - Etiquetado selectivo de péptidos bicíclicos con TMR y su liberación de perlas individuales por hidrólisis básica. 2B - Evaluación de los 44 péptidos bicíclicos liberados para la unión a TNFα en solución por anisotropía fluorescente utilizando una concentración fija de TNFα (5 uM) y péptido bicíclico marcado con TMR (100 nM).

La Figura 3 muestra el análisis de FA de la afinidad de unión de la Necrostatina C1 y C2 resintetizada para TNFα. 3A - Estructuras de Necrostatina C1 y C2. 3B y 3C - Gráfico de los valores de FA en función de la concentración de TNFα para Necrostatina C1 y C2, respectivamente.

La Figura 4 muestra la inhibición de la interacción TNFα-TNFR1 por Necrostatina C1. Los valores de absorbancia en el eje y, que reflejan la cantidad de TNFR1 unido a TNFα inmovilizado en presencia de concentraciones crecientes de Necrostatina C1, son relativos a los de la ausencia de inhibidor de péptidos (100%).

La Figura 5 muestra la protección contra la muerte celular inducida por TNFα por Necrostatina C1. Las células WEHI-13VAR se incubaron durante una noche a 37 °C en presencia de TNFα (0,04 ng/ml) y concentraciones variables de péptido (0-25 uM), y el número de células vivas se cuantificó mediante el ensayo de MTT. Los valores de absorbancia en el eje y, que reflejan el número de células vivas, son relativos a los del control DMSO (sin TNFα, sin péptido).

La Figura 6 muestra espectros de masas que muestran la calidad de la biblioteca de péptidos bicíclicos. Diez perlas se seleccionaron al azar de la biblioteca y se trataron con CNBr, y los péptidos liberados se analizaron por MALDI-TOF MS. Cada cuenta produjo un par de picos separados por 528 amu.

La Figura 7 muestra el análisis de FA de la unión de TNFα por péptidos bicíclicos liberados de perlas individuales. Para cada perla, el péptido bicíclico marcado con TMR liberado (~50 nM) se incubó con concentraciones variables de TNFα (0-18 uM) y los valores de FA se representan frente a la concentración de TNFα. El ajuste de la curva (como se describe en el texto principal) dio los valores de K_D.

La Figura 8 muestra la determinación de secuencia de eventos positivos por PED-MS. Las perlas positivas después del cribado en fase de solución (4ª ronda) se sometieron a 11 ciclos de PED, y los péptidos se liberaron de cada perla mediante CNBr y se analizaron mediante MALDI-TOF MS. M*, homoserina lactona.

La Figura 9 muestra - 9A, Estructuras de Necrostatina C1 y C2 marcadas con FITC, los análogos lineales y monocíclicos de C1 y un péptido bicíclico de control. 9B, Unión de análogos de C1 y péptido bicíclico de control a TNFα según lo determinado por FA.

La Figura 10 muestra el análisis de FA de la unión de Necrostatina C1 y C2 marcados con FITC para controlar proteínas. BSA, albúmina sérica bovina; BRCT, fusión GST con el dominio BRCT de TopBP1; CA, proteína de la cápside del VIH-1; PLCγ2N, fusión GST con el dominio N-SH2 de SH2 de PLCγ; y PTP1B, proteína tirosina fosfatasa 1B.

La Figura 11 muestra la competencia entre la Necrostatina C1 y C2 para unirse al TNFα. TNFα (1600 nM), Necrostatina C1 o C2 marcada con FITC (100 nM), y concentraciones variables de Necrostatina C2 sin marcar (0-16 uM) se incubaron durante 1 hora a 37 °C y los valores de FA se midieron y se representaron en función de la concentración de Necrostatina C2.

La Figura 12 muestra la protección de la muerte celular inducida por TNFα por Necrostatina C1. Las células WEHI-13VAR se trataron con concentraciones crecientes de TNFα (0-250 ng/ml) en ausencia y presencia de Necrostatina C1 50 uM. Después de la incubación a 37 °C durante una noche, el número de células vivas se determinó mediante el ensayo MTT y se representó en función de la concentración de TNFα. Todos los valores del eje y son relativos a aquellos en ausencia de TNFα o Necrostatina C1 (100%).

La Figura 13 muestra un esquema de la síntesis de la biblioteca de péptidos I. Reactivos y condiciones: (a) Química estándar de Fmoc/HBTU; (b) Remojar en agua; (c) 0,5 equiv. de Fmoc-OSu; (d) anhídrido Boc, DMF; (e) piperidina al 20 %; (f) Fmoc-Dap(Alloc)-OH, HATU; (g) 95:5 de TFA/H₂O; (h) piperidina al 20 %; (i) Dividir en 2 porciones iguales, después química estándar de Fmoc/HATU; CPP = péptido que penetra en la célula (j) Agrupar las perlas, después Fmoc-Lys(Mtt)-OH, HATU; (k) Síntesis de división y agrupación.

La Figura 14 muestra los componentes básicos no naturales utilizados en la biblioteca.

La Figura 15 muestra un esquema de la preparación de la biblioteca de péptidos bicíclicos para el cribado. Reactivos y condiciones: (a) TFA al 2 % en DCM; (b) Fmoc-OSu; (c) Pd(PPh₃)₄; (d) Química de clic: DCAI-N₃, Cu(I); (e) Ácido trimésico, HATU; (f) DBU al 2 % en DMF; (g) pyBOP, HOBT.

La Figura 16 muestra un esquema de la síntesis de DCAI-N₃.

La Figura 17 muestra los resultados de un ensayo de competencia entre el péptido 2 marcado con FAM y DCAI.

La Figura 18 muestra las propiedades antiproliferativas del péptido 41 contra las células H1299 medidas mediante ensayos MTT de 24 horas.

La Figura 19 muestra las propiedades antiproliferativas del péptido 41 contra las células H1299 medidas mediante ensayos MTT de 72 horas.

La Figura 20 muestra secuencias de péptidos de eventos derivados del cribado de la biblioteca bicíclica contra K-Ras.

La Figura 21 muestra secuencias de péptidos de eventos de los resultados de cribado de la biblioteca II contra K-Ras biotinilado.

La figura 22a muestra estructuras de ciclorasina B2 y B3. La Figura 22b muestra un análisis de FA de la unión de K-Ras (mezcla de Ras-GTP y Ras-GDP) por la ciclorasina B2 marcada con FITC y sus homólogos monocíclicos y lineales. La Figura 22c muestra un análisis de FA de la unión de K-Ras por ciclorasina B3. La Figura 22d es una comparación de la unión de ciclorasina B2 marcada con FITC a Ras-GTP, Ras-GDP, y Ras-GPPNP. La Figura 22e es una comparación de la unión de ciclorasina B3 marcada con FITC a Ras-GTP, Ras-GDP, y Ras-GPPNP.

La Figura 23 muestra la caracterización biológica de la ciclorasina B3. La Figura 23a, b muestra un ensayo en perla de la inhibición de la interacción Ras-Raf por ciclorasina B3. En ausencia del inhibidor (a), la unión de K-Ras marcado con Texas-red (500 nM) a GST-Raf RBD inmovilizado hizo que las perlas se volvieran rojas, mientras que la adición de ciclorasina B3 10 μ M abolió la interacción Ras-Raf (b). La Figura 23c muestra la determinación de la potencia de ciclorasina B3 mediante el ensayo HTRF. La Figura 23d muestra el efecto de GST-Raf RBD en la unión de FITC-ciclorasina B3 (100 nM) a K-Ras (3 μ M). La Figura 23e muestra el efecto del compuesto 12 en la unión de FITC-ciclorasina B3 (100 nM) a K-Ras (3 μ M). La Figura 23f muestra el efecto de la ciclorasina B3 oleilada en la tasa de crecimiento de células de cáncer de pulmón H358 según se mide por el ensayo MTT.

Ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la siguiente descripción y, en parte, serán evidentes a partir de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Las ventajas de la invención se realizarán y alcanzarán mediante los elementos y combinaciones particularmente señaladas en las reivindicaciones anexas. Se debe entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada, son ejemplares y explicativas únicamente y no restrictivas de la invención, según se reivindica.

Descripción detallada

La presente invención se puede entender más rápidamente con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los Ejemplos incluidos en la misma.

Antes de que los presentes compuestos, composiciones, artículos, sistemas, dispositivos y/o métodos se divulguen y se describan, se ha de entender que no se limitan a métodos sintéticos específicos, a menos que se especifique lo contrario, ni a reactivos particulares, a menos que se especifique lo contrario, ya que pueden, por supuesto, variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento es para los fines de describir aspectos particulares únicamente y no pretende ser limitante. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas en el presente documento pueden ser distintas de las fechas de publicación reales, que pueden requerir una confirmación independiente.

Definiciones generales

Como se usa en el presente documento, la nomenclatura para los compuestos, incluidos los compuestos orgánicos, se puede dar usando los nombres comunes, recomendaciones de la IUPAC, IUBMB o CAS para la nomenclatura. Cuando una o más características estereoquímicas están presentes, se pueden emplear las reglas de Cahn-Ingold-Prelog para la estereoquímica para designar la prioridad estereoquímica, especificación *E/Z* y similares. Un experto en la materia puede rápidamente asegurar la estructura de un compuesto si se da un nombre, sea por reducción sistémica de la estructura del compuesto usando las convenciones de denominación, o por el programa disponible comercialmente, tal como CHEMDRAW™ (Cambridgesoft Corporation, EE.UU.).

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "un grupo funcional", "un alquilo", o "un residuo" incluye mezclas de dos o más de dichos grupos funcionales, alquilos o restos y similares.

Los intervalos se pueden expresar como desde "aproximadamente" un valor particular y /o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, un aspecto adicional incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma un aspecto adicional. Se entenderá

adicionalmente que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final. Se entiende también que en el presente documento se divulga un número de valores y que cada valor se divulga también en el presente documento como "aproximadamente" este valor particular además del valor mismo. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces se divulga también "aproximadamente 10". Se entiende también que cada unidad entre dos unidades particulares se divulgan también. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, entonces 11, 12, 13 y 14 se divulgan también.

Las referencias en la memoria descriptiva y las reivindicaciones finales a partes en peso de un elemento o componente en particular en una composición representan la relación de peso entre el elemento o componente y cualquier otros elementos o componentes en la composición o artículo para los que se expresa una parte en peso. Por lo tanto, en un compuesto que contiene 2 partes en peso del componente X y 5 partes en peso del componente Y, X e Y están presentes en una relación en peso de 2:5, y están presentes en dicha relación independientemente de si los componentes adicionales están contenidos en el compuesto.

Un porcentaje en peso (% en peso) de un componente, salvo que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

Como se usa en el presente documento, los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el evento o circunstancia descritos posteriormente se pueden producir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia se produce y casos en los que no.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a la diana de administración, por ejemplo, un sujeto. Por lo tanto, el sujeto de los métodos desvelados en el presente documento puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, un pez, un ave, un reptil o un anfibio. Como alternativa, el sujeto de los métodos desvelados en el presente documento puede ser un ser humano, un primate no humano, caballo, cerdo, conejo, perro, ovejas, cabra, vaca, gato, cobaya, peces, ave o roedor. El término no indica una edad o género en particular. Por lo tanto, sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra, están destinados a estar cubiertos. En algunos ejemplos, el sujeto es un mamífero. Un paciente se refiere a un sujeto afligido por una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En algunos ejemplos de los métodos divulgados, el sujeto ha sido diagnosticado con una necesidad de tratamiento del cáncer antes de la etapa de administración. En algunos ejemplos del método divulgado, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer antes de la etapa de administración. El término sujeto también incluye una célula, tal como un animal, por ejemplo una célula humana.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, recuperar, estabilizar, o prevenir una enfermedad, afección patológica, o trastorno asociado. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora de una enfermedad, afección patológica, o trastorno, y también incluye a tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica, o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, tratamiento designado para el alivio de los síntomas más que para la cura de la enfermedad, afección patológica, o trastorno asociado; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica, o trastorno asociado; y tratamiento de soporte, es decir, tratamiento que se emplea para complementar otra terapia específica que está dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica, o trastorno asociado. En algunos ejemplos, el término cubre cualquier tratamiento de un sujeto, incluido un mamífero (por ejemplo, un ser humano), e incluye: (i) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se le haya diagnosticado; (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (iii) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. En algunos ejemplos, el sujeto es un mamífero tal como un primate y, en algunos ejemplos, el sujeto es un ser humano. El término "sujeto" también incluye animales domesticados (por ejemplo, gatos, perros, etc.), ganado (por ejemplo, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, peces, pájaro, etc.), y animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya, mosca de la fruta, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" o "que previene" se refiere a evitar, prevenir, obviar, impedir, detener u obstaculizar algo de que ocurra, especialmente mediante una acción por avanzado. Se comprende que se usar reducir, inhibir o prevenir en el presente documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, el uso de las otras dos palabras también se desvela expresamente.

Como se usa en el presente documento, el término "diagnosticado" significa haber sido sometido a un examen físico por un experto, por ejemplo, un médico, y que se ha encontrado que tiene una afección que puede ser diagnosticada o tratada por los compuestos, composiciones, o métodos divulgados en el presente documento.

Por ejemplo, "diagnosticado con cáncer" significa haber sido sometido a un examen físico por un experto, por ejemplo, un médico, y que se ha encontrado que tiene una afección que puede ser diagnosticada o tratada por un compuesto o composición que puede tratar o prevenir cáncer. Como ejemplo adicional, "diagnosticado con una necesidad de tratar o prevenir el cáncer" se refiere a haber sido sometido a un examen físico por un experto, por ejemplo, por ejemplo, un médico, y que se ha encontrado que tiene una afección caracterizada por cáncer u otra enfermedad en la que tratar o prevenir el cáncer sería beneficioso para el sujeto.

Como se usa en el presente documento, la frase "identificada como que necesita tratamiento para un trastorno", o similares, se refiere a la selección de un sujeto basándose en la necesidad de tratamiento del trastorno. Por ejemplo, se puede identificar a un sujeto que tiene una necesidad de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, un trastorno relacionado con el cáncer) basado en un diagnóstico más temprano por parte de un experto y, posteriormente, sometido a tratamiento para el trastorno. Se contempla que la identificación puede realizarse, en algunos ejemplos, en algunos ejemplos, por una persona diferente de la persona que realiza el diagnóstico. También se contempla, en algunos ejemplos, que la administración puede realizarse por alguien que posteriormente realizó la administración.

Como se usa en el presente documento, los términos "administrar" y "administración" se refiere a cualquier método de provisión de una preparación farmacéutica a un sujeto. Tales métodos son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, administración oral, administración transdérmica, administración por inhalación, administración nasal, administración tópica, administración intravaginal, administración oftálmica, administración intraaural, administración intracerebral, administración rectal, administración sublingual, administración bucal y administración parenteral, incluido inyectable tal como administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular y administración subcutánea. La administración puede ser continua o intermitente. En algunos ejemplos, una preparación se puede administrar terapéuticamente; es decir, administrar para tratar una enfermedad o afección existente. En algunos ejemplos, una preparación se puede administrar profilácticamente; es decir, administrada para la prevención de una enfermedad o afección.

El término "contacto", como se usa en el presente documento, se refiere a reunir un compuesto divulgado y una célula, un receptor diana, u otra entidad biológica juntos de tal manera que el compuesto pueda afectar a la actividad de la diana (por ejemplo, receptor, factor de transcripción, célula, etc.), ya sea directamente; es decir, interactuando con la propia diana, o indirectamente; es decir, interactuando con otra molécula, cofactor, factor o proteína de la que depende la actividad de la diana.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado deseado o para tener un efecto en una afección no deseada. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado terapéutico deseado o para tener un efecto en los síntomas no deseados, pero generalmente es insuficiente para causar efectos secundarios adversos. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, género y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de excreción del compuesto empleado concreto; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o casuales con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de las habilidades del experto en iniciar dosis de un compuesto a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis para fines de administración. Por consiguiente, composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de la misma para componer la dosis diaria. Cada médico puede ajustar la dosis en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de la dosis diariamente, durante uno o varios días. Se pueden encontrar en la bibliografía directrices para las dosis adecuadas de clases dadas de productos farmacéuticos. En algunos ejemplos, una preparación puede administrarse en una "cantidad profilácticamente eficaz"; es decir, una cantidad eficaz para la prevención de una enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, "CE₅₀", pretende referirse a la concentración o dosis de una sustancia (por ejemplo, un compuesto o un fármaco) que se requiere para una mejora o activación del 50% de un proceso biológico, o componente de un proceso, incluyendo una proteína, subunidad, orgánulo, ribonucleoproteína, etc. CE₅₀ también se refiere a la concentración o dosis de una sustancia que se requiere para un aumento o activación del 50% *in vivo*, como se define en otra parte en el presente documento. Como alternativa, CE₅₀ puede referirse a la concentración o dosis de compuesto que provoca una respuesta a medio camino entre el valor inicial y la respuesta máxima. La respuesta se puede medir en un sistema *in vitro* o *in vivo* según sea conveniente y apropiado para la respuesta biológica de interés. Por ejemplo, la respuesta se puede medir *in vitro* utilizando células musculares cultivadas o en un sistema de cultivo de órganos *ex vivo* con fibras musculares aisladas. Como alternativa, la respuesta se puede medir *in vivo* utilizando un modelo de investigación apropiado, tal como un roedor, incluyendo ratones y ratas. El ratón o la rata pueden ser una cepa consanguínea con características fenotípicas de interés, tal como obesidad o diabetes. Según sea adecuado, la respuesta se puede medir en un ratón o rata transgénicos o knockout en los que el gen o los genes se han introducido o desactivado, según sea apropiado, para replicar un proceso de enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "CI₅₀", pretende referirse a la concentración o dosis de una sustancia (por ejemplo, un compuesto o un fármaco) que se requiere para la inhibición o disminución del 50% de un proceso biológico o componente de un proceso, incluyendo una proteína, subunidad, orgánulo, ribonucleoproteína, etc. CI₅₀ también se refiere a la concentración o dosis de una sustancia que se requiere para una inhibición o disminución del 50% *in vivo*, como se define en otra parte en el presente documento. Como alternativa, CI₅₀ también se refiere a la concentración inhibitoria (CI) máxima media (50%) o la dosis inhibitoria de una sustancia. La respuesta se puede medir en un sistema *in vitro* o *in vivo* según sea conveniente y apropiado para la respuesta biológica de interés. Por ejemplo, la respuesta

se puede medir *in vitro* utilizando células musculares cultivadas o en un sistema de cultivo de órganos *ex vivo* con fibras musculares aisladas. Como alternativa, la respuesta se puede medir *in vivo* utilizando un modelo de investigación apropiado, tal como un roedor, incluyendo ratones y ratas. El ratón o la rata pueden ser una cepa consanguínea con características fenotípicas de interés, tal como obesidad o diabetes. Según sea adecuado, la respuesta se puede medir en un ratón o rata transgénicos o knockout en los que un gen o los genes se han introducido o desactivado, según sea apropiado, para replicar un proceso de enfermedad.

El término "farmacéuticamente aceptable" describe un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, sin causar un nivel inaceptable de efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a un compuesto que tiene una estructura derivada de la estructura de un compuesto precursor (por ejemplo, un compuesto divulgado en el presente documento) y cuya estructura es suficientemente similar a las divulgadas en el presente documento y en base esa similitud, un experto en la técnica esperará que presente las mismas y similares actividades y utilidades que los compuestos reivindicados, o que induzca, como precursor, las mismas y similares actividades y utilidades que los compuestos reivindicados. Los derivados ejemplares incluyen sales, ésteres, amidas, sales de ésteres o amidas, y N-óxidos de un compuesto precursor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a soluciones acuosas o no acuosas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones, así como polvos estériles para su reconstrucción en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes de su uso. Ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse por la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retardan la absorción. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que con compatibles con tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Los transportadores inertes adecuados pueden incluir azúcares tales como lactosa. De forma deseable, al menos el 95 % en peso de las partículas del principio activo tiene un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros.

Un resto de una especie química, como se usa en la memoria descriptiva incluidas las reivindicaciones, se refiere a la fracción que es el producto resultante de la especie química en un esquema de reacción particular o posterior formulación o producto químico, independientemente de si la fracción se ha obtenido realmente de la especie química. Por lo tanto, un resto de etilenglicol en un poliéster se refiere a una o más unidades de $-OCH_2CH_2O-$ en el poliéster, independientemente de si se usó etilenglicol para preparar el poliéster. De manera similar, un resto de ácido sebácico en un poliéster se refiere a una o más fracciones de $-CO(CH_2)_8CO-$ en el poliéster, independientemente de si el resto se obtiene reaccionando ácido sebáceo o un éster del mismo para obtener el poliéster.

Definiciones químicas

Como se usa en el presente documento, el término "sustituido" se contempla que incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En algunos ejemplos, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes de compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados o no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos y aromáticos y no aromáticos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos a continuación. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferente para los compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de esta divulgación, los heteroátomos, tales como nitrógeno, puede tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en el presente documento que reúnan las valencias de los heteroátomos. Esta divulgación no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. También, los términos "sustitución" o "sustituido con" incluyen la condición implícita de que cada sustitución está conforme con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente y de que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, un compuesto que no sufre espontáneamente la transformación como por redistribución, ciclación, eliminación, etc. Se contempla también que, en determinados ejemplos, a menos

que se indique expresamente lo contrario, los sustituyentes individuales pueden estar además opcionalmente sustituidos (es decir, sustituidos o no sustituidos adicionalmente).

Para definir varios términos, "A¹", "A²", "A³", y "A⁴" se utilizan en el presente documento como símbolos genéricos para representar varios sustituyentes específicos. Estos símbolos pueden ser cualquier sustituyente, sin limitarse a los que se divulgan en el presente documento y cuando se define que son determinados sustituyentes en un caso, pueden, en otro caso, definirse como algún otro sustituyente.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento es un grupo hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado, de 1 a 24 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *s*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, *s*-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. El grupo alquilo puede ser cíclico o acíclico. El grupo alquilo puede estar ramificado o no ramificado. El grupo alquilo puede también estar sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el grupo alquilo puede estar sustituido por uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, como se describe en el presente documento. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo alquilo que contiene de uno a seis (por ejemplo, uno a cuatro) átomos de carbono.

A lo largo de la memoria descriptiva "alquilo" se usa generalmente para referirse tanto a grupos alquilo no sustituidos como a grupos alquilo sustituidos; sin embargo, también se hace referencia específicamente en el presente documento a los grupos alquilo sustituidos mediante identificación de los sustituyentes específicos en el grupo alquilo. Por ejemplo, el término "alquilo halogenado" o "haloalquilo" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido por uno o más haluros, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo. El término "alcoxialquilo" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido por uno o más grupos alcoxi, como se describe más adelante. El término "alquilamino" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido por uno o más grupos amino, como se describe a continuación y similares. Cuando se utiliza "alquilo" en un caso y un término específico como "alquilalcohol" se usa en otro caso, no pretende implicar que el término "alquilo" no se refiere tampoco a los términos específicos tales como "alquilalcohol" y similares.

Esta práctica se usa también para otros grupos descritos en el presente documento. Es decir, mientras que un término tal como "cicloalquilo" se refiere a ambas fracciones cicloalquilo sustituidas y no sustituidas, las fracciones sustituidas pueden, además, ser específicamente identificadas en el presente documento; por ejemplo, un cicloalquilo sustituido particular se puede denominar, por ejemplo, "alquilocicloalquilo". De manera similar, un alcoxi sustituido se puede denominar específicamente, por ejemplo, un "alcoxi halogenado", un alqueno sustituido particular puede ser, por ejemplo, un "alquenalcohol", y similares. De nuevo, la práctica de usar un término general, tal como "cicloalquilo", y un término específico, tal como "alquilocicloalquilo", no pretende implicar que el término general no incluye tampoco el término específico.

El término "cicloalquilo" como se usa en el presente documento es un anillo basado en carbono no aromático compuesto por al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo, y similares. El término "heterocicloalquilo" es un tipo de grupo cicloalquilo como se ha definido anteriormente y se incluye dentro del significado del término "cicloalquilo", cuando al menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos por uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, según se describe en el presente documento.

La expresión "grupo de polialquilenos" tal como se usa en el presente documento es un grupo que tiene dos o más grupos CH₂ unidos entre sí. El grupo de polialquilenos puede representarse por la fórmula -(CH₂)_a-, donde "a" es un número entero de 2 a 500.

Los términos "alcoxi" y "alcoxilo" como se usan en el presente documento para referirse a un grupo alquilo o cicloalquilo unido a través de un enlace éter; es decir, un grupo "alcoxi" se puede definir como -OA¹ donde A¹ es alquilo o cicloalquilo tal y como se ha definido anteriormente. "Alcoxi" también incluye polímeros de grupos alcoxi tal y como se acaban de describir; es decir, un alcoxi puede ser un poliéter tal como -OA¹-OA² o -OA¹-(OA²)_a-OA³, donde "a" es un número entero de 1 a 200 y A¹, A², y A³ son grupos alquilo y/o cicloalquilo.

El término "alqueno" como se usa en el presente documento es un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono con una fórmula estructural que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Las estructuras asimétricas tales como (A¹A²)C=C(A³A⁴) pretenden incluir los isómeros *E* y *Z*. Esto se puede suponer en las fórmulas estructurales en el presente documento en las que está presente un alqueno asimétrico o se puede indicar explícitamente por el símbolo de unión C=C. El grupo alqueno se puede sustituir por uno o varios grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxilo, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, como se describe en el presente documento.

El término "cicloalquenilo" como se usa en el presente documento es un anillo basado en carbono no aromático compuesto por al menos tres átomos de carbono y conteniendo al menos un doble enlace carbono-carbono, es decir, $C=C$. Ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, norbornenilo y similares. El término "heterocicloalquenilo" es un tipo de grupo cicloalquenilo según se ha definido anteriormente y se incluye en el significado del término "cicloalquenilo", cuando al menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquenilo y el grupo heterocicloalquenilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquenilo y el grupo heterocicloalquenilo pueden estar sustituidos por uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxilo, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, según se describe en el presente documento.

El término "alquinilo" como se usa en el presente documento es un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono con una fórmula estructural que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. El grupo alquinilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxilo, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, como se describe en el presente documento.

El término "cicloalquinilo" como se utiliza en el presente documento es un anillo basado en carbono no aromático compuesto por al menos siete átomos de carbono y conteniendo al menos un triple enlace carbono-carbono. Ejemplos de grupos cicloalquinilo incluyen, pero sin limitación, cicloheptenilo, ciclooctenilo, ciclodecenilo y similares. El término "heterocicloalquinilo" es un tipo de grupo cicloalquinilo tal como se ha definido anteriormente y está incluido en el significado del término "cicloalquinilo", cuando al menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquinilo y el grupo heterocicloalquinilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquinilo y el grupo heterocicloalquinilo pueden estar sustituidos por uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxilo, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, según se describe en el presente documento.

El término "arilo" como se usa en el presente documento es un grupo que contiene cualquier grupo aromático basado en carbono incluyendo, pero sin limitación, benceno, naftaleno, fenilo, bifenilo, fenoxibenceno y similares. El término "arilo" también incluye "heteroarilo", que se define como un grupo que contiene un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Ejemplos de heteroátomos incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Asimismo, el término "no heteroarilo", que se incluye también en el término "arilo", define un grupo que contiene un grupo aromático que no contiene un heteroátomo. El grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede estar sustituido por uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxilo, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, según se describe en el presente documento. El término "biarilo" es un tipo específico de grupo arilo y se incluye en la definición de "arilo". Biarilo se refiere a dos grupos arilo que se enlazan juntos *vía* una estructura de anillo condensado, como en naftaleno, o se fijan a través de uno o más enlaces carbono-carbono, como en bifenilo.

El término "aldehído" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula $-C(O)H$. En toda esta memoria descriptiva "C(O)" es una breve anotación a mano para un grupo carbonilo, es decir, $C=O$.

Los términos "amina" o "amino" como se usan en el presente documento están representados por la fórmula $-NA^1A^2$, donde A y A pueden ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento.

El término "alquilamino" como se usa en el presente documento se representa por la fórmula $-NH(-alquilo)$, donde el alquilo se describe en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, grupo metilamino, grupo etilamino, grupo propilamino, grupo isopropilamino, grupo butilamino, grupo isobutilamino, grupo (sec-butil)amino, grupo (terc-butil)amino, grupo pentilamino, grupo isopentilamino, grupo (terc-pentil)amino, grupo hexilamino, y similares.

El término "dialquilamino", como se usa en el presente documento, está representado por la fórmula $-N(-alquilo)_2$, en la que el alquilo se describe en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, grupo dimetilamino, grupo dietilamino, grupo dipropilamino, grupo diisopropilamino, grupo dibutilamino, grupo diisobutilamino, grupo di(sec-butil)amino, grupo di(terc-butil)amino, grupo diisopentilamino, grupo diisopentilamino, grupo di(terc-pentil)amino, grupo dihexilamino, grupo N-etil-N-metilamino, grupo N-metil-N-propilamino, grupo N-etil-N-propilamino, y similares.

El término "ácido carboxílico" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula $-C(O)OH$.

El término "éster" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula $-OC(O)A^1$ o $-C(O)OA^1$, donde A^1 puede ser un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo.

como se describe en el presente documento. El término "poliéster" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula $-(A^1O(O)C-A^2-C(O)O)_a-$ o $-(A^1O(O)C-A^2-OC(O))_a-$, donde A y A² pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo, o heteroarilo descrito en el presente documento y "a" es un número entero de 1 a 500. "Poliéster" es como el término usado para describir un grupo que está producido por la reacción entre un compuesto que tiene al menos dos grupos ácido carboxílico con un compuesto que tiene al menos dos grupos hidroxilo.

El término "éter" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula A¹OA², donde A¹ y A² pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo, o heteroarilo descrito en el presente documento. El término "poliéter" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula $-(A^1O-A^2O)_n-$, donde A¹ y A² pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo, o heteroarilo descrito en el presente documento y "a" es un número entero de 1 a 500. Ejemplos de grupos poliéter incluyen óxido de polietileno, óxido de polipropileno y óxido de polibutileno.

El término "haluro" como se usa en el presente documento se refiere a los halógenos flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "heterociclo", como se usa en el presente documento se refiere a sistemas anulares aromáticos o no aromáticos individuales o multicíclicos en los que al menos uno de los miembros del anillo es distinto del carbono.

Heterociclo incluye azetidina, dioxano, furano, imidazol, isotiazol, isoxazol, morfolina, oxazol, oxazol, incluyendo, 1,2,3-oxadiazol, 1,2,5-oxadiazol y 1,3,4-oxadiazol, piperazina, piperidina, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, tetrazina, incluyendo 1,2,4,5-tetrazina, tetrazol, incluyendo 1,2,3,4-tetrazol y 1,2,4,5-tetrazol, tiadiazol, incluyendo, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,5-tiadiazol y 1,3,4-tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazina, incluyendo 1,3,5-triazina y 1,2,4-triazina, triazol, incluyendo, 1,2,3-triazol, 1,3,4-triazol, y similares.

El término "hidroxilo" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula -OH.

El término "cetona" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula A¹C(O)A², donde A¹ y A² pueden ser, independientemente, un alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento.

El término "azida" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula -N₃.

El término "nitro" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula -NO₂.

El término "nitrilo" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula -CN.

El término "sililo" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula -SiA¹A²A³, donde A¹, A², y A³ puede ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento.

El término "sulfo-oxo" como se usa en el presente documento, se representa por las fórmulas -S(O)A¹, -S(O)₂A¹, -OS(O)₂A¹, u -OS(O)₂OA¹, donde A¹ puede ser hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento. A lo largo de esta memoria descriptiva, "S(O)" es una notación corta para S=O. El término "sulfonilo" se usa en el presente documento para referirse al grupo sulfo-oxo representado por la fórmula-S(O)₂A¹, donde A¹ puede ser hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento. El término "sulfona" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula A¹S(O)₂A², donde A¹ y A² pueden ser, independientemente, un alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento. El término "sulfóxido" como se usa en el presente documento, se representa por la fórmula A¹S(O)A², donde A¹ y A² pueden ser, independientemente, un alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, cicloalquino, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento.

El término "tiol" como se usa en el presente documento está representado por la fórmula -SH.

"R¹", "R²", "R³", "Rⁿ", donde n es un número entero, como se usa en el presente documento puede poseer, independientemente, uno o más de los grupos enumerados anteriormente. Por ejemplo, si R¹ es un grupo alquilo de cadena lineal, uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo alquilo, un haluro, y similares. Dependiendo de los grupos que se seleccionen, un primer grupo puede incorporarse dentro del segundo grupo o, como alternativa, el primer grupo puede ser colgante (es decir, unido) al segundo grupo. Por ejemplo, con la frase "un grupo alquilo que comprende un grupo amino", el grupo amino puede incorporarse dentro del esqueleto del grupo alquilo. Como alternativa, el grupo amino se puede unir al esqueleto del grupo alquilo. La naturaleza del grupo o los grupos seleccionados determinará si el primer grupo está incorporado o unido al segundo grupo.

Como se describe en el presente documento, los compuestos pueden contener restos "opcionalmente sustituidos". En general, el término "sustituido," ya esté precedido o no por el término "opcionalmente", significa que se sustituyen uno o más hidrógenos del resto designado por un sustituyente adecuado. A menos que se indique otra cosa, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida por más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas en el presente documento son preferentemente aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables o químicamente factibles. Se contempla también que, en algunos ejemplos, a menos que se indique expresamente lo contrario, los sustituyentes individuales pueden estar además opcionalmente sustituidos (es decir, sustituidos o no sustituidos adicionalmente).

El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no se alteran de forma sustancial cuando se los somete a condiciones para permitir su producción, detección y, en algunos ejemplos, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los propósitos divulgados en el presente documento.

Los sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R$, $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}$, $CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, que puede sustituirse por R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ que puede sustituirse por R° ; $-CH=CHPh$, que puede sustituirse por R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -piridilo que puede sustituirse por R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$, $SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ_2$; $-OP(O)R^\circ_2$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; SiR°_3 ; $-(alquileo lineal o ramificado C_{1-4})O-N(R^\circ)_2$; o $-(alquileo lineal o ramificado C_{1-4})C(O)O-N(R^\circ)_2$, en el que cada R° puede sustituirse como se define a continuación y es independientemente hidrógeno, C_{1-6} , alifático, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, $-CH_2$ -(anillo de heteroarilo de 5-6 miembros), o un anillo saturado de 5-6 miembros, parcialmente insaturado, o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R° , tomadas junto con su átomo o átomos intermedios, forman un anillo de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado, o arilo mono- o bíciclico que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, que puede sustituirse como se define a continuación.

Los sustituyentes monovalentes adecuados de R° (o el anillo formado tomando dos apariciones independientes de R° junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno, $-(CH_2)_{0-2}R^\circ$, $-(haloR^\circ)$, $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}O_2OR^\circ$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\circ)_2$; $-O(haloR^\circ)$, $-CN$, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\circ$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\circ$, $-(CH_2)_{0-2}$, zSR° , $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^\circ$, $-(CH_2)_{0-2}NR^\circ_2$, $-NO_2$, $-SiR^\circ_3$, $-OSiR^\circ_3$, $-C(O)SR^\circ$, $-(alquileo C_{1-4}$ lineal o ramificado) $C(O)OR^\circ$, o $-SSR^\circ$ en la que cada R° está no sustituido o cuando está precedido por "halo" está sustituido solamente con uno o más halógenos, y se selecciona independientemente entre hidrocarburo alifático C_{1-4} , $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de R° incluyen $=O$ y $=S$.

Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes: $=O$, $=S$, $=NNR^{*2}$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHC(O)OR^*$, $=NNHS(O)_2R^*$, $=NR^*$, $=NOR^*$, $-O(C(R^{*2}))_2$, $-O_3$, o $-S(C(R^{*2}))_2$, $-S$, en las que cada aparición independiente de R^* se selecciona entre hidrógeno, alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que se unen a carbonos sustituibles próximos de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen: $-O(CR^{*2})_2$, $-O$, en las que cada aparición independiente de R^* se selecciona entre hidrógeno, alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los sustituyentes adecuados del grupo alifático de R^* incluyen halógeno, $-R^*$, $-(haloR^*)$, $-OH$, $-OR^*$, $-O(haloR^*)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^*$, $-NH_2$, $-NHR^*$, $-NR^{*2}$, o $-NO_2$, en los que cada R^* no está sustituido o cuando está precedido por "halo" está sustituido solamente con uno o más halógenos, y es independientemente hidrocarburo alifático C_{1-4} , $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen $-R^\dagger$, $-NR^\dagger_2$, $-C(O)R^\dagger$, $-C(O)OR^\dagger$, $-C(O)C(O)R^\dagger$, $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$, $-S(O)_2R^\dagger$, $-S(O)_2NR^\dagger_2$, $-C(S)NR^\dagger_2$, $-C(NH)NR^\dagger_2$, o $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$; en los que cada $R^\dagger$ es independientemente hidrógeno, hidrocarburo alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, $-OPH$ no sustituido, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno, o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de $R^\dagger$, tomadas junto con su átomo o átomos intermedio (s) forman

un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril mono o bicíclico de 3-12 miembros, que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre.

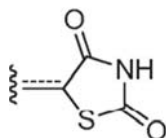
Los sustituyentes adecuados del grupo alifático de R^1 son independientemente halógeno, $-R^*$, $-(\text{halo}R^*)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^*$, $-\text{O}(\text{halo}R^*)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^*$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^*$, $-\text{NR}^{*2}$, o $-\text{NO}_2$, en los que cada R^* no está sustituido o cuando está precedido por "halo" está sustituido solamente con uno o más halógenos, y es independientemente hidrocarburo alifático C_{1-4} , $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

El término "grupo saliente" se refiere a un átomo (o un grupo de átomos) con capacidad de extracción de electrones que se puede desplazar como especie estable, llevando consigo los electrones de enlace. Ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen haluros y ésteres de sulfonato, incluyendo, pero sin limitación, triflato, mesilato, tosilato, y brosilato.

Los términos "grupo hidrolizable" y "resto hidrolizable" se refieren a un grupo funcional capaz de experimentar hidrólisis, por ejemplo, en condiciones básicas o ácidas. Los ejemplos de residuos hidrolizables incluyen, sin limitación, haluros de ácido, ácidos carboxílicos activados y diversos grupos protectores conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis," T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience, 1999).

El término "residuo orgánico" define un residuo que contiene carbono, es decir, un residuo que comprende al menos un átomo de carbono, e incluye, pero sin limitación, los grupos, residuos o radicales que contienen carbono definidos anteriormente en el presente documento. Los residuos orgánicos pueden contener diversos heteroátomos, o estar unidos a otra molécula a través de un heteroátomo, incluyendo oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o similares. Los ejemplos de residuos orgánicos incluyen, pero sin limitación, alquilo o alquilo sustituido, alcoxi o alcoxi sustituido, amino mono o di-sustituido, grupos amida, etc. Los residuos orgánicos pueden comprender preferiblemente de 1 a 18 átomos de carbono, de 1 a 15, átomos de carbono, de 1 a 12 átomos de carbono, de 1 a 8 átomos de carbono, de 1 a 6 átomos de carbono o de 1 a 4 átomos de carbono. En algunos ejemplos, un residuo orgánico puede comprender de 2 a 18 átomos de carbono, 2 a 15, átomos de carbono, de 2 a 12 átomos de carbono, de 2 a 8 átomos de carbono, de 2 a 4 átomos de carbono o de 2 a 4 átomos de carbono.

Un sinónimo muy próximo del término "resto" es el término "radical", que se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones concluyentes, se refiere a un fragmento, grupo o estructura de una molécula descrita en el presente documento, independientemente de cómo se haya preparado la molécula. Por ejemplo, el radical 2,4-tiazolidinadiona en un compuesto particular tiene la estructura



independientemente de si se usó tiazolidinadiona para preparar el compuesto. En algunas realizaciones, el radical (por ejemplo, un alquilo) se puede modificar adicionalmente (es decir, alquilo sustituido) teniendo uno o más "radicales sustituyentes" unidos al mismo. El número de átomos en un radical dado no es crítico para los compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento a menos que se indique lo contrario en otro lugar en el presente documento.

Los "radicales orgánicos", como se define y usa el término en el presente documento, contienen uno o más átomos de carbono. Un radical orgánico puede tener, por ejemplo, 1-26 átomos de carbono, 1-18 átomos de carbono, 1-12 átomos de carbono, 1-8 átomos de carbono, 1-6 átomos de carbono o 1-4 átomos de carbono. En algunos ejemplos, un radical orgánico puede tener 2-26 átomos de carbono, 2-18 átomos de carbono, 2-12 átomos de carbono, 2-8 átomos de carbono, 2-6 átomos de carbono o 2-4 átomos de carbono. Los radicales orgánicos a menudo tienen hidrógeno unido al menos a algunos de los átomos de carbono del radical orgánico. Un ejemplo de un radical orgánico que no comprende átomos inorgánicos es un radical 5, 6, 7, 8-tetrahidro-2-naftilo. En algunas realizaciones, un radical orgánico puede contener 1-10 heteroátomos inorgánicos unidos a los mismos o en los mismos, incluyendo halógenos, oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y similares. Los ejemplos de radicales orgánicos incluyen, pero sin limitación, un alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, amino mono-sustituido, aciloxi, ciano, carboxi, carboalcoxi, alquilcarboxamida, alquilcarboxamida sustituida, dialquilcarboxamida, dialquilcarboxamida sustituida, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, tioalquilo, tiohaloalquilo, alcoxi, alcoxi sustituido, haloalquilo, haloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, radicales heterocíclicos, o heterocíclicos sustituidos, en los que los términos se definen en otra parte en el presente documento. Algunos ejemplos no limitativos de radicales orgánicos que incluyen heteroátomos incluyen radicales alcoxi, radicales trifluorometoxi, radicales acetoxi, radicales dimetilamino, y similares.

Los "radicales inorgánicos", como se define y se usa el término en el presente documento, no contienen átomos de carbono y, por lo tanto, comprenden solo átomos distintos del carbono. Los radicales inorgánicos comprenden combinaciones unidas de átomos seleccionados de hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, azufre, selenio y

halógenos tal como flúor, cloro, bromo y yodo, que pueden estar presentes individualmente o unirse entre sí en sus combinaciones químicamente estables. Los radicales inorgánicos tienen 10 o menos, o preferiblemente de uno a seis o de uno a cuatro átomos inorgánicos, como se enumeraron anteriormente, unidos entre sí. Los ejemplos de radicales inorgánicos incluyen, pero sin limitación, amino, hidroxilo, halógenos, nitro, tiol, sulfato, fosfato, y radicales inorgánicos similares comúnmente conocidos. Los radicales inorgánicos no tienen unidos a los mismos elementos metálicos de la tabla periódica (tal como los metales alcalinos, metales alcalinotérreos, metales de transición, metales lantánidos, o metales actínidos), aunque dichos iones metálicos a veces pueden servir como un catión farmacéuticamente aceptable para radicales inorgánicos aniónicos, tales como un sulfato, fosfato, o un radical inorgánico aniónico similar. Los radicales inorgánicos no comprenden elementos metaloides tales como boro, aluminio, galio, germanio, arsénico, estaño, plomo o telurio, o los elementos de gas noble, a menos que se indique otra cosa específicamente en el presente documento.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más dobles enlaces y, por lo tanto, pueden dar lugar potencialmente a isómeros *cis/trans* (E/Z), así como a otros isómeros conformacionales. A menos que se indique lo contrario, los compuestos y composiciones divulgadas en el presente documento incluyen todos los isómeros posibles, así como mezclas de dichos isómeros.

A menos que se indique lo contrario, una fórmula con enlaces químicos mostrada únicamente como líneas gruesas y no como cuñas o líneas discontinuas contempla cada posible isómero, por ejemplo, cada enantiómero y diastereómero y una mezcla de isómeros, tal como una mezcla racémica o no racémica. Los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, dan lugar potencialmente a diastereómeros e isómeros ópticos. A menos que se indique lo contrario, los compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento incluyen todos los posibles diastereoisómeros, así como sus mezclas racémicas, sus enantiómeros puros rediseñados, todos los isómeros geométricos posibles, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La mezcla de estereoisómeros, así como estereoisómeros específicos aislados, se incluyen también. Durante el transcurso de los procedimientos sintéticos usados para preparar dichos compuestos o en la utilización de procedimientos de racemización o epimerización conocidos por los expertos en la técnica, los productos de dichos procedimientos pueden ser una mezcla de estereoisómeros.

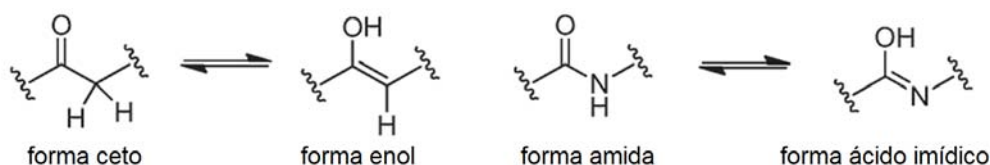
Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas que tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos compuestos, denominados estereoisómeros, son idénticos, excepto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina a menudo una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica. Muchos de los compuestos descritos en el presente documento pueden tener uno o más centros quirales y, por lo tanto, pueden existir en diferentes formas enantioméricas. Si se desea, un carbono quiral se puede designar con un asterisco (*). Cuando los enlaces al carbono quiral se representan como líneas rectas en las fórmulas descritas, se entiende que ambas configuraciones (R) y (S) del carbono quiral y, por tanto, ambos enantiómeros y mezclas de los mismos, se incluyen en la fórmula. Como se usa en la técnica, cuando se desea especificar la configuración absoluta sobre un carbono quiral, uno de los enlaces al carbono quiral se puede representar como una cuña (se une a los átomos por encima del plano) y el otro se puede representar como una serie o cuña de líneas paralelas cortas (se une a los átomos debajo del plano). El sistema Cahn-Ingold-Prelog se puede usar para asignar la configuración (R) o (S) a un carbono quiral.

Los compuestos descritos en el presente documento comprenden átomos tanto en su abundancia isotópica natural como en abundancia no natural. Los compuestos divulgados pueden ser compuestos marcados isotópicamente o isotópicamente sustituidos idénticos a los descritos, salvo por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra típicamente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos divulgados en el presente documento incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tal como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl respectivamente. Los compuestos comprenden además profármacos de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos o de dichos profármacos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de esta invención. Ciertos compuestos marcados con isótopos, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en los ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Los isótopos tritados, es decir, ^3H y carbono-14, es decir, ^{14}C , se prefieren particularmente por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ^2H , puede producir ciertas ventajas terapéuticas generadas por una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo semivida *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente y los profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente realizando los procedimientos a continuación, sustituyendo después un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden estar presentes como un solvato. En algunos casos, el disolvente utilizado para preparar el solvato es una solución acuosa, y el solvato se denomina a menudo un hidrato. Los compuestos pueden estar presentes como un hidrato, que pueden obtenerse, por ejemplo, por cristalización en un disolvente o en una solución acuosa. A este respecto, uno, dos, tres o cualquier número arbitrario de solvato o moléculas de agua se pueden combinar con los compuestos divulgados en el presente documento para formar solvatos e hidratos. A menos que se indique lo contrario, todos los solvatos posibles se incluyen en el análisis en el presente documento.

El término "co-cristal" significa una asociación física de dos o más moléculas que deben su estabilidad a través de una interacción no covalente. Uno o más componentes de este complejo molecular proporcionan un marco estable en la red cristalina. En ciertos casos, las moléculas huésped se incorporan en la red cristalina como anhidratos o solvatos, véase, por ejemplo, "Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases. Do Pharmaceutical Co-crystals Represent a New Path to Improved Medicines?" Almarasson, O., et. al., The Royal Society of Chemistry, 1889-1896, 2004. Los ejemplos de co-cristales incluyen ácido p-toluensulfónico y ácido benenosulfónico.

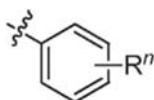
También se aprecia que ciertos compuestos descritos en el presente documento pueden estar presentes como un equilibrio de tautómeros. Por ejemplo, las cetonas con un α -hidrógeno pueden existir en un equilibrio de la forma ceto y la forma enol.



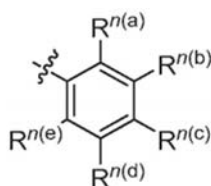
Asimismo, las amidas con un N-hidrógeno pueden existir en un equilibrio de la forma de amida y la forma de ácido imídico. A menos que se indique lo contrario, todos los tautómeros posibles se incluyen en el presente documento.

Se sabe que las sustancias químicas forman sólidos que están presentes en diferentes estados de orden que se denominan formas polimórficas o modificaciones. Las diferentes modificaciones de una sustancia polimórfica pueden diferir mucho en sus propiedades físicas. Los compuestos pueden estar presentes en diferentes formas polimórficas, siendo posible que las modificaciones particulares sean metaestables. A menos que se indique lo contrario, se incluyen todas las formas polimórficas posibles.

En algunos ejemplos, una estructura de un compuesto se puede representar por una fórmula:



que se entiende que es equivalente a la fórmula:



en la que n es típicamente un número entero. Es decir, R^n se entiende que representa cinco sustituyentes independientes, $R^{n(a)}$, $R^{n(b)}$, $R^{n(c)}$, $R^{n(d)}$, $R^{n(e)}$. Por "sustituyentes independientes", se entiende que cada sustituyente R se puede definir independientemente. Por ejemplo, si en un caso $R^{n(a)}$ es halógeno, entonces $R^{n(b)}$ no es necesariamente halógeno en este caso.

Ciertos materiales, compuestos, composiciones y componentes divulgados en el presente documento pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse fácilmente usando técnicas generalmente conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los materiales de partida y los reactivos utilizados en la preparación de los compuestos y composiciones que se divulgan están disponibles en proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wisconsin.), Acros Organics (Morris Plains, N.J.), Fisher Scientific (Pittsburgh, Pa.), o Sigma (St. Louis, Mo.) o se preparan por métodos conocidos por los expertos en la materia siguiendo procedimientos expuestos en referencias tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, volúmenes 1-5 y suplementos (Elsevier Science Publishers, 1989);

Organic Reactions, volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991); March's Advanced Organic Chemistry, (John Wiley and Sons, 4ª Edición); y Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989).

A menos que se indique expresamente lo contrario, no se pretende de ninguna manera que ningún método expuesto en el presente documento se interprete como requiriendo que sus etapas se realicen en un orden específico. En consecuencia, cuando una reivindicación del método no indica realmente una orden a seguir por sus etapas o no se indica específicamente de otra manera en las reivindicaciones o descripciones que las etapas deben limitarse a un orden específico, no se pretende de ninguna manera que se infiera un orden, en ningún caso. Esto se mantiene para cualquier posible base no expresa para su interpretación, incluyendo: cuestiones de lógica con respecto a la organización de las etapas o del flujo operacional; significado llano derivado de la organización o puntuación gramatical; y el número o tipo de realizaciones descritas en la memoria descriptiva.

Se divulgan los componentes que deben utilizarse para preparar las composiciones divulgadas en el presente documento, así como las composiciones mismas que deben usarse en los métodos divulgados en el presente documento. Estos y otros materiales se divulgan en el presente documento, y se entiende que cuando las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales se divulgan, aunque la referencia específica a cada una de varias combinaciones colectivas e individuales y la permutación de estos compuestos puede no estar explícitamente divulgada, cada uno se contempla específicamente y se describe en el presente documento. Por ejemplo, si un compuesto particular se divulga y se analiza, y se analiza una serie de modificaciones que pueden realizarse a varias moléculas incluidos los compuestos, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del compuesto, y las modificaciones que sean posibles salvo que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, si se divulga una clase de moléculas A, B, y C así como una clase de moléculas D, E, y F y se divulga un ejemplo de una molécula de combinación, A-D, entonces, incluso si cada una no se enumera individualmente, cada una se contempla individual y colectivamente, lo que significa que las combinaciones, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, y C-F se consideran divulgadas. Asimismo, cualquier subconjunto o combinación de estas se divulgan también. Por lo tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se consideraría divulgado. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud incluyendo, pero sin limitación, las etapas en los métodos para fabricar y usar las composiciones divulgadas en el presente documento. Por lo tanto, Si existe una variedad de etapas adicionales que se puedan realizar, se entiende que cada una de estas etapas se puede realizar con cualquier realización o combinación específica de realizaciones de los métodos divulgados en el presente documento.

Se entiende que las composiciones divulgadas en el presente documento tienen ciertas funciones. En el presente documento se divulgan ciertos requisitos estructurales para realizar las funciones divulgadas, y se entiende que hay una diversidad de estructuras que pueden realizar la misma función que están relacionadas con las estructuras divulgadas, y que estas estructuras generalmente obtendrán el mismo resultado.

Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina inflamatoria pleiotrópica de una diversidad de funciones, muchas de las cuales aún no se conocen completamente (Chen, G y Goeddel, DV. *Science*, 2002, 296, 1634-1635). TNF α es responsable de la caquexia, el debilitamiento en pacientes con enfermedades crónicas tal como el cáncer y la tuberculosis (Kawakami, M y Cerami, A. *J. Exp. Med.*, 1981, 154, 631-639) y está implicado en el desarrollo de choque séptico e insuficiencia orgánica en pacientes gravemente infectados (Beutler, B et al. *J. Exp. Med.*, 1985, 161, 984-995). También es responsable de numerosos trastornos inflamatorios crónicos, tal como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, hidradenitis supurativa y asma refractaria (Esposito, E y Cuzzocrea, S. *Curr. Med. Chem.*, 2009, 16, 3152-3167). Estos trastornos se tratan actualmente con inhibidores de proteínas, incluidos anticuerpos monoclonales infliximab (Remicade), adalimumab (Humira) o certolizumab pegol (Cimzia), y una proteína de fusión del receptor circulante etanercept (Enbrel). Estas proteínas se unen específicamente al TNF α y evitan su interacción con los receptores TNF α (TNFR). Estos fármacos biológicos se administran mediante inyecciones intravenosas intrahospitalarias. Se han realizado considerables esfuerzos en las últimas dos décadas para desarrollar inhibidores de moléculas pequeñas contra el TNF α , que tienen el potencial de administrarse por vía oral. Sin embargo, estos esfuerzos han conducido hasta ahora a solo unos pocos inhibidores débiles de moléculas pequeñas que se unen directamente a TNF α e interfieren con la interacción TNF α -TNFR (Alzani, R et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12526-12529; Mancini, F et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 58, 851-859; He, MM et al. *Science*, 2005, 310, 1022-1025; Chan, DS et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, 49, 2860-2864; Choi, H et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 6195-6198; Buller, F et al. *Chem. Biol.*, 2009, 16, 1075-1086; Leung, CH et al. *ChemMedChem*, 2011, 6, 765-768). Los péptidos cíclicos mediados por disulfuro correspondientes a los sitios de unión a TNF α en TNFR1 también han mostrado una actividad inhibitoria débil contra la unión de TNF α a su receptor y la apoptosis mediada por TNF α (Takasaki, W et al. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, 1266-1270; Saito, H et al. *Arthritis Rheum.*, 2007, 56, 1164-1174). La última observación nos inspiró a desarrollar compuestos macrocíclicos como inhibidores de TNF α . En el presente documento se divulga una metodología para la síntesis de alto rendimiento y el cribado de grandes bibliotecas combinatorias de péptidos bicíclicos y el descubrimiento de Necrostatina C1 como un potente antagonista peptídico bicíclico contra TNF α .

En el presente documento se describe una metodología para la síntesis química y el cribado de grandes bibliotecas combinatorias de péptidos bicíclicos mostrados en andamios de moléculas pequeñas. Al utilizar el ácido trimésico plano como el andamio, se muestra que las moléculas con forma de disco resultantes tienen el privilegio de unirse a las superficies de proteínas planas, tal como las interfaces de las interacciones proteína-proteína. El cribado de una biblioteca de péptidos bicíclicos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) identificó un potente antagonista que inhibe la interacción del receptor TNF α -TNF α y protege a las células de la muerte celular inducida por TNF α . Los péptidos bicíclicos de este tipo pueden proporcionar una solución general para la inhibición de las interacciones proteína-proteína.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un método para mostrar secuencias peptídicas o peptidomiméticas en andamios de moléculas pequeñas para formar moléculas bicíclicas que rivalizan con los anticuerpos para la afinidad y especificidad de unión. Los inhibidores se desarrollaron contra las PPI, que son una gran clase de dianas interesantes pero generalmente consideradas "no resistentes a fármacos" por los enfoques convencionales de moléculas pequeñas. Se eligió un andamio plano, ácido trimésico, con el fin de maximizar el área de superficie de las moléculas resultantes y, por lo tanto, su capacidad para interactuar con las superficies de proteínas planas, tales como las interfaces PPI. Se generó una biblioteca de péptidos bicíclicos "envolviendo" una secuencia peptídica de 6-10 residuos aleatorios alrededor del grupo trimesoilo. La ciclación del péptido se medió por la formación de tres enlaces amida entre el andamio trimesoilo y la amina N-terminal, la cadena lateral de un ácido L-2,3-diaminopropiónico C-terminal (Dap), y la cadena lateral de una lisina fija dentro de la región aleatoria. Los péptidos bicíclicos resultantes contenían 3-5 residuos aleatorios en cada anillo. La secuencia aleatoria se construyó con un conjunto de 25 aminoácidos seleccionado juiciosamente basándose en función de su diversidad estructural, estabilidad metabólica y disponibilidad comercial. Incluía 10 α -L-aminoácidos proteínogénicos [Ala, Arg, Asp, Gln, Gli, His, Ile, Ser, Trp, y Tyr], 5 α -L-aminoácidos no proteínogénicos [L-4-fluorofenilalanina (Fpa), L-norleucina (Nle), L-ornitina (Orn) y L-fenilglicina (Phg)], y 10 α -D-aminoácidos [D-2-naftilalanina (D-Nal), D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Leu, D-Lys, D-Phe, D-Pro, D-Thr, y D-Val]. Esta biblioteca tiene una diversidad teórica de $1,0 \times 10^6$. La inclusión de aminoácidos no naturales (y en el futuro componentes básicos no peptídicos) aumenta considerablemente la diversidad estructural y la estabilidad proteolítica de los compuestos, pero también requiere la síntesis química de las bibliotecas de compuestos resultantes.

Un principal desafío asociado con el cribado de bibliotecas de péptidos bicíclicos sintetizados químicamente es la determinación estructural de los compuestos acertados. Para superar esta dificultad, la biblioteca de péptidos bicíclicos se sintetizó en el formato de un compuesto de dos perlas en microperlas TentaGel (90 μ m, $2,86 \times 10^6$ perlas/g, ~ 100 pmol de péptido/perla), empleando una técnica publicada de segregación de perlas. Cada perla de biblioteca se segregó topológicamente en dos capas diferentes, mostrando la capa externa un péptido bicíclico único y conteniendo la capa interna el péptido lineal correspondiente como una etiqueta codificante. La simetría de la unidad de trimesoilo aseguró que se formó un único producto bicíclico en cada perla. La biblioteca se diseñó de tal manera que el péptido bicíclico en la superficie de perla también llevaba un residuo de L-propargilglicina (Pra) en su región enlazadora, mientras que el péptido de codificación lineal no.

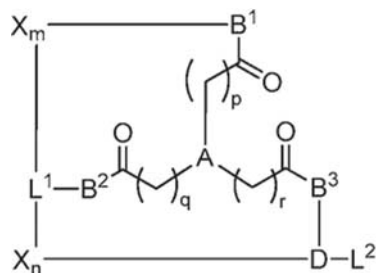
La selección de bibliotecas contra proteínas diana se puede realizar en cuatro etapas. Durante las etapas 1 y 2, la biblioteca se incubó con la proteína diana marcada con una biotina y las perlas positivas se aislaron mediante clasificación magnética (etapa 1) y un ensayo ligado a enzimas en perlas (etapa 2). En la etapa 3, las perlas positivas de la etapa 2 se ensayaron de nuevo contra la proteína diana marcada con fluorescencia y las perlas fluorescentes se aislaron. Por último, en la etapa 4, el péptido bicíclico se liberó selectivamente de cada perla positiva y se ensayó su unión a la proteína diana en solución mediante un ensayo de polarización de fluorescencia. Para los péptidos bicíclicos que mostraron actividad de unión en fase de solución, los péptidos codificantes en sus perlas correspondientes se secuenciaron individualmente mediante un método de espectrometría de masas previamente desarrollado en este laboratorio (PED-MS).

El cribado de la biblioteca de péptidos bicíclicos contra el factor de necrosis tumoral humano alfa (TNF-alfa) dio como resultado dos ligandos potentes, Necrostatina C1 y C2, con los valores de K_D de 0,45 y 1,9 μ M, respectivamente. Se seleccionó la necrostatina C1 para pruebas adicionales y se demostró que inhibe la unión del TNF-alfa a su receptor análogo con una CI_{50} de 3,1 micromolar. También protegió a las células de la muerte celular inducida por TNF-alfa. La misma biblioteca también se cribó contra la proteína K-Ras humana. Se descubrieron varios ligandos nanomolares de K-Ras, algunos de los cuales inhibieron la interacción entre K-Ras y sus proteínas efectoras (por ejemplo, la cinasa Raf). Los inhibidores de TNF-alfa son potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal como la artritis reumatoide. Los inhibidores de K-Ras proporcionarán una nueva clase de medicamentos contra el cáncer.

Compuestos

En el presente documento se divulgan compuestos peptídicos bicíclicos. En algunos ejemplos, los compuestos divulgados en el presente documento son compuestos anticancerosos. En algunos ejemplos, los compuestos se han preparado por síntesis en fase sólida. En algunos ejemplos, los compuestos pueden tener un peso molecular de 500 a 5000, tal como de 500 a 2000 o de 1000 a 2000.

En algunos ejemplos, los compuestos son de Fórmula I:



5 en la que

A se selecciona de N y benceno;

p, q, y r se seleccionan independientemente de 0, 1, y 2;

B¹, B², y B³ se seleccionan independientemente de O y NR¹;

10 en la que R¹ comprende H, o alquilo C₁-C₅ sustituido o sin sustituir;

L¹ y L² se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, aminoácido, y un enlazador a un soporte en fase sólida;

D se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, o un residuo de aminoácido; y

Xₘ y Xₙ comprenden independientemente una secuencia de 1-10 aminoácidos.

15 En algunos ejemplos, los compuestos divulgados en el presente documento de Fórmula I pueden comprender compuestos anticancerosos. En algunos ejemplos, los compuestos de Fórmula I pueden prepararse por síntesis en fase sólida.

20 En algunos ejemplos, los compuestos de Fórmula I pueden tener un peso molecular de 500 o más (por ejemplo, 1000 o superior, 1500 o superior, 2000 o superior, 2500 o superior, 3000 o superior, 3500 o superior, 4000 o superior o 4500 o superior). En algunos ejemplos, los compuestos de Fórmula I pueden tener un peso molecular de 5000 o menos (por ejemplo, 4500 o menos, 4000 o menos, 3500 o menos, 3000 o menos, 2500 o menos, 2000 o menos, 1500 o menos, o 1000 o menos). En algunos ejemplos, los compuestos de Fórmula I pueden tener un peso molecular de 500 a 5000 (por ejemplo, 500-2500, 500-1500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-5000, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500, 4500-5000, 2500-3500, 3500-4500, 500-2000, o 1000-2000).

Xₘ y Xₙ

30 Xₘ y Xₙ pueden comprender independientemente una secuencia de 1-10 aminoácidos. En algunos ejemplos, Xₘ y Xₙ pueden comprender independientemente 1 o más aminoácidos (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, o 9 o más). En algunos ejemplos, Xₘ y Xₙ pueden comprender independientemente 10 o menos aminoácidos (por ejemplo, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos). En algunos ejemplos, Xₘ y Xₙ pueden comprender independientemente 1-10 aminoácidos (por ejemplo, 1-5, 5-10, 1-3, 3-5, 5-8, 8-10, 1-8, 2-6, o 3-7 aminoácidos). Cada aminoácido puede ser un aminoácido natural o no natural. El término "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que es un congénito de un aminoácido natural en el sentido de que tiene una estructura similar a un aminoácido natural de manera que imita la estructura y la reactividad de un aminoácido natural. El aminoácido no natural puede ser un aminoácido modificado y/o un análogo de aminoácido, que no es uno de los 20 aminoácidos de origen natural comunes o los raros aminoácidos naturales selenocisteína o pirrolisina. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, alanina, alosoleucina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, naftilalanina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutámico, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, un derivado, o combinaciones de los mismos. Estos se enumeran en la Tabla 1 junto con sus abreviaturas utilizadas en el presente documento.

45

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviaturas*
alanina	Ala (A)
alosoleucina	Alle
arginina	Arg (R)
asparagina	Asn (N)
ácido aspártico	Asp (D)
cisteína	Cys (C)
ácido glutámico	Glu (E)

Aminoácido	Abreviaturas*
glutamina	Gln (Q)
glicina	Gly (G)
histidina	His (H)
isoleucina	Ile (I)
leucina	Leu (L)
lisina	Lys (K)
Metionina	Met (M)
naftilalanina	Nal(Φ)
Norleucina	Nle (Ω)
fenilalanina	Phe (F)
prolina	Pro (P)
selenocisteína	Sec (U)
serina	Ser(S)
treonina	Thr (T)
tirosina	Tyr(Y)
triptófano	Trp (W)
valina	Val (V)
Fenilglicina	Phg
Propargilglicina	Pra

Además, los aminoácidos no naturales y los D-aminoácidos se pueden usar en el presente documento. Los métodos y composiciones que se divulgan son particularmente adecuados para incorporar aminoácidos no naturales y D-aminoácidos.

5 Los aminoácidos pueden estar acoplados por un enlace peptídico. Los aminoácidos se pueden acoplar entre sí o a B¹, L¹ o D en el grupo amino, el grupo carboxilato o la cadena lateral.

10 En algunos ejemplos de Fórmula I, X_m y X_n pueden seleccionarse independientemente de cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de ejemplo para X_m y X_n.

SEQ ID NO	Secuencia	Abreviatura
	Phe-Tyr-Ala	FYA
1	His-Lys-Gly-Phe-Tyr	HKGFY
2	Ala-Phe-Trp-Thr-Glu	AFWTG
3	His-Ala-Leu-Nle	HAL-Nle
4	Phg-Tyr-Ala-Lys-Tyr-Phe-Gly-Lys-His-Dap	Phg-YAKYFGKH-Dap
5	Ala-Phe-Trp-Thr-Glu-Lys-Nle-Leu-Ala-His-Dap	AFWTEK-Nle-LAH-Dap
6	Phe-Dap-Ser-Val-Pro-Tyr-His-Dap	F-Dap-SVPYH-Dap
7	W-F-D-K-F-N-H-Dap	WFDKFNH-Dap
8	dNal-S-Q-Nal-K-F-R-V-R-Dap	dΦ-SO-dNal-KFRVR-Dap
9	R-R-Nal-R-fF-K-F-dQ-G-Dap	RRdΦ-R-fF-KFQG-Dap
10	O-R-Nal-R-fF-K-F-Q-G-Dap	OR-dΦ-R-fF-KFQG-Dap
11	R-dF-Z-Z-F-K	RFZZFK
12	R-D-Phg-Z-N-K	RD-Phg-ZNK
13	Z-Z-P-G-A-K	ZZPGAK
14	Z-Z-A-S-A-K	ZZASAK
15	Z-Z-L-P-dT-K	ZZLPTK
16	Phg-R-N-Z-I-K	Phg-RNZIK
17	Z-T-E-A-N-K	ZTEANK
18	Z-Nal-V-G-Q-K	Z-dΦ-VGQK
19	Z-Phg-S-Z-Z-K	Z-Phg-SZZK
20	Z-Phg-M-S-Z-K	Z-Phg-MSZK

SEQ ID NO	Secuencia	Abreviatura
21	Z-S-M-Z-G-K	ZSMZGK
22	Z-S-Phg-Z-Z-K	ZS-Phg-ZZK
23	Z-R-V-D-A-K	ZRVDAK
24	Arg-Asp-Phg-Pra-Asn	RD-Phg-Pra-N
25	FNalR ₄ -Dap	ΦRRRR-Dap
26	Phg-Arg-Asn-Pra-Ile	Phg-RN-Pra-I
27	Pra-Ser-Phg-Lys-Lys	Pra-S-Phg-KK
28	Pra-Arg-Val-Asp-Ala	Pra-RVDA
29	Ala-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile	A-Phg-RN-Pra-I
30	Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Ala	Phg-RN-Pra-IA
31	Ala-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Ala	A-Phg-RN-Pra-IA
32	Ala-Ala-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Ala	AA-Phg-RN-Pra-IA
33	A-F-Phg-R-N-Pra-I-A	AF-Phg-RN-Pra-I-A
34	A-Abu-Phg-R-N-Pra-I-Abu	A-Abu-Phg-RN-Pra-I-Abu
35	Phg-I-Phg-R-N-Pra-I-Abu-K	Phg-I-Phg-RN-Pra-I-Abu-K
36	Phg-Phg-R-N-Pra-I-Abu	Phg-Phg-RN-Pra-I-Abu
37	A-dL-Phg-R-N-Pra-I-D	AL-Phg-RN-Pra-ID
38	A-Q-Phg-R-N-Pra-I-D	AQ-Phg-RN-Pra-ID
39	I-E-Phg-R-N-Pra-I-D	IE-Phg-RN-Pra-ID
40	A-S-Phg-R-N-Pra-I-E	AS-Phg-RN-Pra-IE
41	L-Phg-R-N-Pra-I-E	L-Phg-RN-Pra-IE
42	A-Phg-Phg-R-N-Pra-I-F	A-Phg-Phg-RN-Pra-IF
43	A-Om-Phg-R-N-Pra-I-F	A-Om-Phg-RN-Pra-IF
44	A-Abu-Phg-R-N-Pra-I-N	A-Abu-Phg-RN-Pra-IN
45	A-A-Phg-R-N-Pra-I-N	dA-A-Phg-RN-Pra-IN
46	Phg-N-Phg-R-N-Pra-I-I	Phg-N-Phg-RN-Pra-II
47	A-Abu-Phg-R-N-Pra-I-Nle	A-Abu-Phg-RN-Pra-I-Nle
48	W-Phg-R-N-Pra-I-Phg	W-Phg-RN-Pra-I-Phg
49	A-N-Phg-R-N-Pra-I-R	AN-Phg-RN-Pra-IR
50	R-Nle-Phg-R-N-Pra-I-S	R-Nle-Phg-RN-Pra-IS
51	H-Phg-R-N-Pra-I-Y-K-FNal	H-Phg-RN-Pra-IYK-Nal
52	Ala-Abu-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Abu	A-Abu-Phg-RN-Pra-I-Abu
53	Phg-Ile-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Abu	Phg-I-Phg-RN -Pra-I-Abu
54	Ala-Leu-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Asp	AL-Phg-RN-Pra-ID
55	Ala-Gln-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Asp	AQ-Phg-RN -Pra-ID
56	Ala-Orn-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Phe	A-Orn-Phg-RN-Pra-IF
57	Ala-Phg-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Phe	A-Phg-Phg-RN-Pra-IF
58	Ala-Abu-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Abu	A-Abu-Phg-RN-Pra-I-Abu
59	Ala-Ala-Phg-Arg-Asn-Pra-Ile-Ala	AA-Phg-RN-Pra-IA
60	Ala-Ala-Phe-Arg-Asn-Pra-Ile-Ala	AAFRN -Pra-IA
61	Ala-Leu-Phe-Arg-Asn-Pra-Ile-Asp	ALFRN-Pra-ID
62	Phg-Tyr-Ala-Lys-Tyr-Phe-Gly-Lys-His	Phg-YAKYFGKH
63	Ala-Phe-Trp-Thr-Glu-Lys-Nle-Leu-Ala-His	AFWTEK-Nle-LAH

En algunos ejemplos, X_m puede ser cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:63. En algunos ejemplos, X_n puede ser cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:63. En algunos ejemplos, X_m puede ser una variante de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:25. En algunos ejemplos, X_n puede ser una variante de cualquiera de la SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:25. Las variantes de péptidos son bien comprendidas por los expertos en la materia y pueden implicar modificaciones de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, modificaciones de secuencias de aminoácidos típicamente entre en una o más de tres clases: variantes de sustitución, de inserción y de delección. Las inserciones incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo así como inserciones intrasecuenciales de únicos o múltiples restos de aminoácidos. Las inserciones normalmente será inserciones más pequeñas que las de las fusiones de extremos

amino o carboxilo, por ejemplo, en el orden de 1 a 3 residuos. Las deleciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia peptídica. Típicamente, no se eliminan más de 1 a 3 residuos en cualquier sitio dentro del péptido. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente restos únicos, pero puede producirse en una cantidad de distintos emplazamientos a la vez; las inserciones serán normalmente en el orden de aproximadamente 1 a 3 restos de aminoácidos; y las deleciones se encontrarán en el intervalo de 1 a 3 restos. Las deleciones o inserciones se realizan preferentemente en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 restos o una inserción de 2 residuos. Sustituciones, deleciones, inserciones y cualquier combinación de los mismos puede combinarse para llevar a una construcción final. Variantes de sustitución son las que se ha retirado al menos un resto y se ha insertado un resto distinto en su lugar. Tales sustituciones se realizan generalmente de acuerdo con la siguiente

Tabla 3 y se refieren como sustituciones conservadoras.

Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos

Sustituciones conservadoras ejemplares	
Ala se reemplaza por Ser	Leu se reemplaza por Ile o Val
Arg se reemplaza por Lys o Gln	Lys se reemplaza por Arg o Gln
Asn se reemplaza por Gln o His	Met se reemplaza por Leu o Ile
Asp se reemplaza por Glu	Phe se reemplaza por Met, Leu, Nal, Phg, o Tyr
Cys se reemplaza por Ser	Ser se reemplaza por Thr
Gln se reemplaza por Asn o Lys	Thr se reemplaza por Ser
Glu se reemplaza por Asp	Trp se reemplaza por Tyr
Gly se reemplaza por Pro	Tyr se reemplaza por Trp o Phe
His se reemplaza por Asn o Gln	Val se reemplaza por Ile o Leu
Ile se reemplaza por Leu o Val	

Los cambios sustanciales en la función se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las de la Tabla 3, es decir, seleccionando restos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades proteínicas serán en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) una que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para la sulfación y/o glucosilación.

Por ejemplo, la sustitución de un resto de aminoácido con otro que es biológicamente y/o químicamente similar es conocida por los expertos en la técnica como sustitución conservadora. Por ejemplo, una sustitución conservadora sería reemplazar un resto hidrófobo por otro o un resto polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gli, Ala, Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones conservativamente sustituidas para cada secuencia explícitamente desvelada se incluyen dentro de los péptidos proporcionados en el presente documento.

Se entiende que una forma de definir las variantes de X_m y X_n es a través de la definición de las variantes en términos de homología/identidad con respecto a las secuencias conocidas específicas. Por ejemplo, cada SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:63 se expone a una secuencia particular. Se divulgan específicamente las variantes de estos péptidos que tienen al menos un 85 %, 90 %, 95 %, o 97 % de homología con respecto a la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:63. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de modo que la homología se encuentra en su nivel más alto.

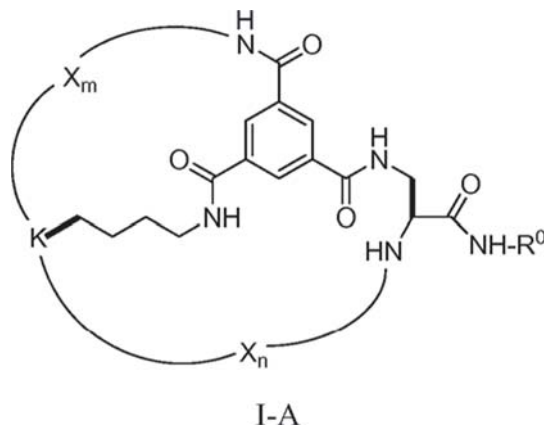
Además de las variantes de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 63 son derivados de estos péptidos que también funcionan en los métodos y composiciones que se divulgan. Los derivados se forman reemplazando uno o más residuos con un residuo modificado, donde se ha modificado la cadena lateral del residuo.

Ejemplos específicos

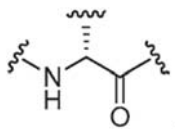
En algunos ejemplos de Fórmula I, A comprende benceno. En algunos ejemplos de Fórmula I,

B₁ comprende NH. En algunos ejemplos de Fórmula I, B₂ comprende NH. En algunos ejemplos de Fórmula I, B₃ comprende NH. En algunos ejemplos de Fórmula I, B₁, B₂, y cada B₂ comprende NH. En algunos ejemplos de Fórmula I, p, q, y r son cada uno 0.

En algunos ejemplos de Fórmula I, los compuestos son de Fórmula I-A:



- 5 en la que X_m y X_n son como se definen en la Fórmula I; R^0 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 sustituido o sin sustituir, o un enlazador a un soporte en fase sólida; y K tiene una estructura representada por una fórmula:



- 10 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, R^0 es hidrógeno. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, R^0 es un alquilo C_1 - C_6 sustituido o sin sustituir. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, R^0 es un enlazador a un soporte de fase sólida.

- 15 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 3-7 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 4-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende una cadena peptídica de 7 residuos de aminoácidos.

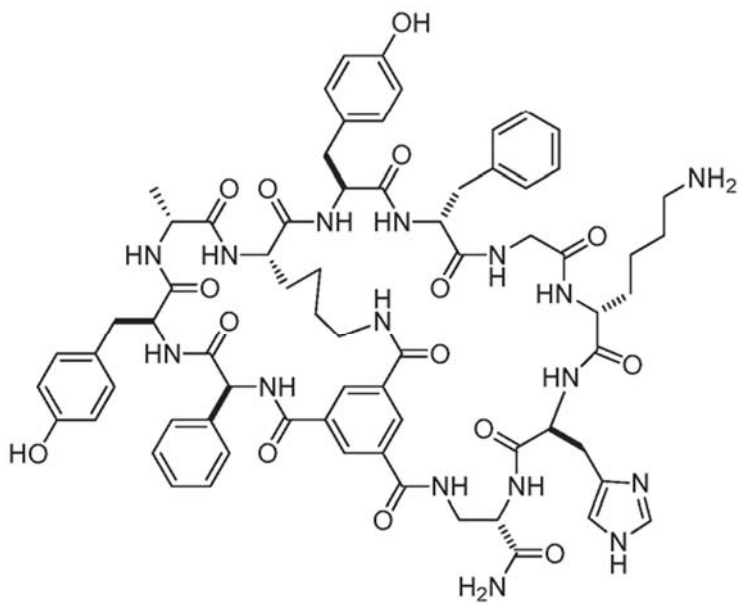
- 20 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m comprende todos los aminoácidos naturales.

- 25 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 2-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 3-5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 2 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos.

- 30 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_n comprende todos los aminoácidos naturales.

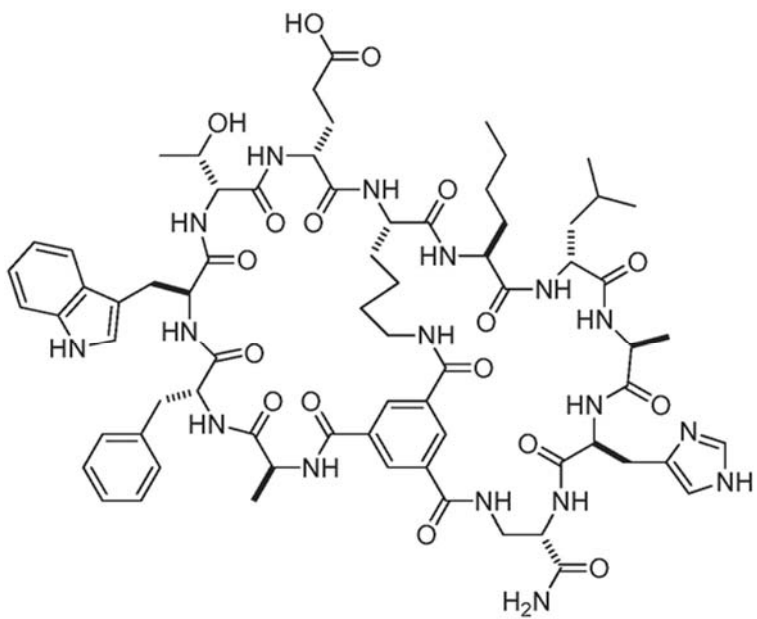
En algunos ejemplos de Fórmula I-A, X_m y X_n comprenden diferentes secuencias de aminoácidos.

- 35 En algunos ejemplos de Fórmula I-A, el compuesto tiene una estructura representada por la Fórmula I-A-1.



I-A-1

En algunos ejemplos de Fórmula I-A, el compuesto tiene una estructura representada por la Fórmula I-A-2.



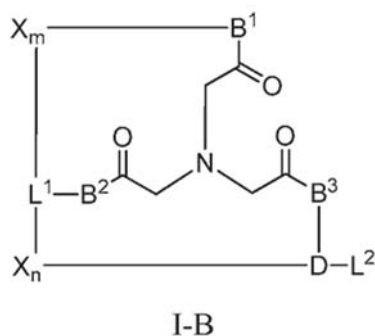
I-A-2

5

En algunos ejemplos de Fórmula I, A comprende N. En algunos ejemplos de Fórmula I, p, q, y r son cada uno 1.

En algunos ejemplos de Fórmula I, los compuestos son de Fórmula I-B:

10



en la que X_m , X_n , L^1 , L^2 , B^1 , B^2 , B^3 y D son como se definen en la Fórmula I.

- 5 En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 3-7 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 4-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende una cadena peptídica de 7 residuos de aminoácidos.

En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m comprende todos los aminoácidos naturales.

- 15 En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 2-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 3-5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 2 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos.

En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_n comprende todos los aminoácidos naturales.

- 25 En algunos ejemplos de Fórmula I-B, X_m y X_n comprenden diferentes secuencias de aminoácidos.

En el presente documento también se divulgan compuestos que comprenden un residuo de ácido trimésico, teniendo el residuo tres funcionalidades carboxilo; un residuo de lisina unido covalentemente a la primera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico; una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_m , unida covalentemente a la segunda funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico y al residuo de lisina; y una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_n , unida covalentemente a la tercera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico y al residuo de lisina.

En algunos ejemplos, El compuesto a base de ácido trimésico está unido covalentemente a un soporte de fase sólida.

- 35 En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 3-7 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 4-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos.

45 En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 7 residuos de aminoácidos.

En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica comprende todos los aminoácidos naturales.

- 50 En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 2-6 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 3-5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 2 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena

peptídica comprende una cadena peptídica de 3 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 4 residuos de aminoácidos.

En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 5 residuos de aminoácidos. En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende una cadena peptídica de 6 residuos de aminoácidos.

En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica comprenden diferentes secuencias de aminoácidos.

En algunos ejemplos de los compuestos a base de ácido trimésico, la segunda cadena peptídica comprende todos los aminoácidos naturales.

También se divulga en el presente documento una biblioteca que comprende una pluralidad de los compuestos divulgados. En algunos ejemplos, los compuestos en la biblioteca están unidos covalentemente a un soporte de fase sólida.

En algunos ejemplos, los compuestos en la biblioteca y/o el soporte de fase sólida llevan un resto de etiqueta. El resto de etiqueta puede comprender cualquier etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables adecuadas incluyen, pero sin limitación, una etiqueta UV-Vis, una etiqueta de infrarrojo cercano, un grupo luminiscente, un grupo fosforescente, una etiqueta de resonancia de espín magnético, un fotosensibilizante, un grupo fotoescindible, un centro quelante, un átomo pesado, un isótopo radioactivo, un marcador de resonancia de espín detectable por isótopos, un resto paramagnético, un cromóforo o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la etiqueta es detectable sin la adición de reactivos adicionales.

En algunas realizaciones, el resto de etiqueta es un resto de etiqueta biocompatible, de manera que los compuestos pueden ser adecuados para su uso en una diversidad de aplicaciones biológicas. "Biocompatible" y "biológicamente compatible", como se usa en el presente documento, generalmente se refieren a compuestos que son, junto con cualquier metabolito o producto de degradación de los mismos, generalmente no tóxicos para las células y tejidos, y que no causan ningún efecto adverso significativo para las células y tejidos cuando las células y los tejidos se incuban (por ejemplo, se cultivan) en su presencia.

El resto de etiqueta puede contener un luminóforo, tal como una etiqueta fluorescente o una etiqueta de infrarrojo cercano. Los ejemplos de luminóforos adecuados incluyen, pero sin limitación, porfirinas metálicas; benzoporfirinas; azabenzoporfirina; naftoporfirina; ftalocianina; hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como perileno, perilen diimina, pirenos; tintes azo; tintes de xanteno; diporometeno de boro, diporometeno de aza-boro, colorantes de cianina, complejo de metal-ligando tales como bipyridina, bipyridilos, fenantrolina, cumarina y acetilacetatos de rutenio e iridio; acridina, derivados de oxazina tales como benzofenoxazina; aza-anuleno, escuaraina; 8-hidroxiquinolina, polimetinas, nanopartículas que producen luminiscencia, tales como puntos cuánticos, nanocristales; carbostirilo; complejo de terbio; fósforo inorgánico; ionóforos tales como colorantes asociados o derivados de éteres corona; o combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de luminóforos adecuados incluyen, pero sin limitación, Pd (II) octaetilporfirina; Pt (II)-octaetilporfirina; Pd (II) tetrafenilporfirina; Pt (II) tetrafenilporfirina; Pd (II) mesotetrafenilporfirina tetrabenzoporfirina; Pt (II) meso-tetrafenilmetilbenzoporfirina; Pd (II) octaetilporfirina cetona; Pt (II) octaetilporfirina cetona; Pd (II) mesotetra(pentafluorofenil)porfirina; Pt (II) meso-tetra (pentafluorofenil)porfirina; Ru (II) tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (Ru (dpp)₃); Ru (II) tris(1,10-fenantrolina) (Ru(phen)₃), cloruro de tris(2,2'-bipyridina)rutenio (II) hexahidrato (Ru(bpy)₃); eritrosina B; fluoresceína; isotiocianato de fluoresceína (FITC); eosina; iridio (III) ((N-metil-bencimidazol-2-il)-7-(dietilamino)-cumarina)); indio (III) ((benzothiazol-2-il)-7-(dietilamino)-cumarina))-2-(acetilacetona); colorantes Lumogen; rojo fluorescente Macroflex; amarillo fluorescente Macrolex; Texas Red; rodamina B; rodamina 6G; azufre rodamina; m-cresol; azul de timol; azul de xilenol; rojo de cresol; azul de clorofenol; verde de bromocresol; rojo de bromocresol; azul de bromotimol; Cy2; un Cy3; un Cy5; un Cy5.5; Cy7; 4-nitrofenol; alizarina; fenolftalcina; o-cresolftaleína; rojo de clorofenol; calmagita; bromo-xilenol; rojo de fenol; rojo neutro; nitrazina; 3,4,5,6-tetrabromfenolftaleína; rojo congo; fluoresceína; eosina; 2',7'-diclorofluoresceína; 5(6)-carboxi-fluoresceína; carboxinaftofluoresceína; ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico; semi-natorodafluor; semi-naftofluoresceína; dicloruro de tris (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio (II); (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio (II) tetrafenilboro; platino (II) octaetilporfirina; dialquilcarbocianina; dioctadecilcicloxacarbocianina; cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo; 7-amino-4-metilcumarina (Amc); proteína verde fluorescente (GFP); y derivados o combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos, el resto de etiqueta es una etiqueta de fluorescencia. En algunos ejemplos, la etiqueta de fluorescencia es una molécula pequeña. Tales moléculas pequeñas se conocen en la técnica.

En algunos ejemplos, el resto de etiqueta tiene una estructura representada por una fórmula:

divulgados tratan o previenen el cáncer cuando se administran a una dosis oral superior a aproximadamente 1000 mg al día en un ser humano. En algunos ejemplos, los compuestos divulgados tratan o previenen el cáncer cuando se administran a una dosis oral superior a aproximadamente 1500 mg al día en un ser humano. En algunos ejemplos, los compuestos divulgados tratan o previenen el cáncer cuando se administran a una dosis oral superior a aproximadamente 2000 mg al día en un ser humano.

Composiciones farmacéuticas

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos divulgados. Es decir, se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto divulgado. En algunos ejemplos, se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad profilácticamente eficaz de al menos un compuesto divulgado.

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento, en el que el compuesto está presente en una cantidad eficaz. En el presente documento también se describen composiciones nutracéuticas que comprenden un vehículo nutracéuticamente aceptable y cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento, en el que el compuesto está presente en una cantidad eficaz.

En algunos ejemplos de las composiciones, el compuesto está presente en una cantidad mayor que aproximadamente una cantidad seleccionada de 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg, 1.500 mg, o 2.000 mg.

Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender además uno o más fármacos anticancerosos.

Los fármacos anticancerosos ejemplares incluyen ácido 13-cis-retinoico, 2-Amino-6-Mercaptopurina, 2-CdA, 2-clorodeoxiadenosina, 5-fluorouracilo, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, Accutane, Actinomicina-D, adriamicina, Aduvix, Agrylin, Ala- Cort, aldesleukina, Alemtuzumab, Alitretinoína, Alkaban-AQ, Alkeran, ácido All-transretinoico, interferón alfa, altretamina, Ametopterina, Amifostina, aminoglutetimida, anagrelida, Anandron, Anastrozol, Arabinosilcitosina, Aranesp, Aredia, Arimidex, Aromasina, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, ATRA, Avastina, BCG, BCNU, Bevacizumab, Bexaroteno, Bicalutamida, BiCNU, Bleonoxano, Bleomicina, Bortezomib, Busulfán, Busulfex, C225, leucovorina calcio, Campath, Camptosar, Camptotecina-11, capecitabina, Carac, carboplatino, Carmustina, oblea de Carmustina, Casodex, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidina, cetuximab, Clorambucilo, cisplatino, Citrovorum Factor, cladribina, Cortisona, Cosmegen, CPT-11, Ciclofosfamida, Cytadren, citarabina, citarabina liposomal, Cytosar-U, Cytoxan, Dacarbazina, Dactinomicina, darbepoetina alfa, Daunomicina, Daunorubicina, clorhidrato de daunorubicina, Daunorubicina liposomal, DaunoXome, Decadron, Delta-Cortef, Deltasone, denileukin difitox, DepoCyt, Dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, Dexasona, Dexrazoxano, DHAD, DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil, Doxorubicina, Doxorubicina liposomal, Droxi, DTIC, DTIC-Dome, Duralone, Efudex, Eligard, Ellence, Eloxatina, Elspar, Emcyt, epirubicina, epoetina alfa, Erbitux, Erwinia L-asparaginasa, estramustina, Ethyl, Etopophos, Etopósido, fosfato de etopósido, Eulexin, Evista, Exemestano, Fareston, Faslodex, Femara, filgrastim, floxuridina, Fludara, fludarabina, Fluoroplex, fluorouracilo, Fluorouracilo (crema), fluoximasterona, flutamida, ácido folínico, FUDR, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, gemcitabina, Gemtuzumab ozogamicina, Gemzar, Gleevec, Lupron, Lupron Depot, Matulano, Maxidex, mecloretamina, -clorhidrato de mecloretamina, Medrolone, Medrol, Megace, Megestrol, Megestrol Acetato, melfalán, mercaptopurina, Mesna, Mesnex, Metotrexato, Metotrexato sodio, Metilprednisolona, Mylocel, Letrozol, Neosar, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilandron, Nilutamida, Mostaza de nitrógeno, Novaldex, Novantrona, Octreotida, Octreotida acetato, Oncospar, Oncovin, Ontak, Onxal, Oprevelkin, Orapred, Orasone, oxaliplatino, paclitaxel, Pamidronato, Panretin, Paraplatino, PEDIAPRED, Interferón pegilado, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, PEG-INTRON, PEG-L-asparaginasa, mostaza de fenilalanina, Platinol, Platinol- AQ, Prednisolona, Prednisona, Prelone, procabazina, PROCIT, Proleukina, Prolifeprospan 20 con implante de carmustina, Purinetol, Raloxifeno, Rheumatrex, Rituxan, Rituximab, Roveron-A (interferón alfa-2a), Rubex, Rubidomicina clorhidrato, Sandostatin, Sandostatin LAR, sargramostim, Solu-Cortef, Solu-Medrol, STI-571, estreptozocina, Tamoxifeno, Targretin, Taxol, Taxotere, Temodar, temozolomida, tenipósido, TESP, Talidomida, Talomida, TheraCys, Tioguanina, Tioguanina Tabloid, Tiofosfoamida, Tioplex, Tiotepa, TICE, Toposar, topotecán, toremifeno, Trastuzumab, Tretinoína, Trexall, Trisenox, TSPA, VCR, Velban, Velcade, VePesid, Vesanoide, Viadur, Vinblastina, Vinblastina sulfato, Vincasar Pfs, vincristina, vinorelbina, vinorelbina tartrato, VLB, VP-16, Vumon, Xeloda, Zanosar, Zevalina, Zinecard, Zoladex, ácido zolendróico, Zometa, oblea Gliadel, Glivec, GM-CSF, Goserelina, factor estimulador de colonias de granulocitos, Halotestina, Herceptina, Hexadrol, Hexalen, Hexametilmelamina, HMM, Hicamtina, Hydrea, Acetato de hidrocort, Hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona sódica, succinato de hidrocortisona sódica, Hidrocortisona fosfato, hidroxiurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetan, Idamicina, idarrubicina, Ifex, IFN-alfa, ifosfamida, IL 2, IL-11, Imatinib mesilato, Imidazol Carboxamida, Interferón alfa, Interferón Alfa-2b (conjugado PEG), Interleucina 2, interleucina-11, Intrón A (interferón alfa-2b), leucovorina, Leukeran, Leukina, leuprolida, Leurocristina, Leustatina, Liposomal Ara-C, Pred líquido, Iomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Meticorten, mitomicina, Mitomicina-C, mitoxantrona, M-Prednisol, MTC, MTX, Mustargen, Mustina, Mutamicina, Myleran, Iressa, Irinotecán, Isotretinoína, Kidrolasa, Lanacort, L-asparaginasa, y LCR.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se administra a un sujeto. En algunos ejemplos, el sujeto es un mamífero, pez o ave. En algunos ejemplos, el mamífero es un primate. En algunos ejemplos, el mamífero es un ser humano. En algunos ejemplos, el ser humano es un paciente.

5 En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se administra después de la identificación del mamífero que necesita tratamiento para el cáncer. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica se administra después de la identificación del mamífero que necesita prevención para el cáncer. En algunos ejemplos, se ha diagnosticado que el mamífero necesita tratamiento del cáncer para la etapa de administración.

10 En algunos ejemplos, las composiciones farmacéuticas divulgadas comprenden los compuestos divulgados (incluyendo una o más sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) como un principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos o adyuvantes. Las composiciones instantáneas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la ruta más adecuada en cualquier caso
15 dado dependerá del huésped particular, y la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que el principio activo se está administrando. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y preparadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Como se usa en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente o nutracéuticamente aceptables. Cuando el compuesto es ácido, su sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre (cúprica y cuprosa), férricas, ferroso, litio, magnesio, manganeso (manganesica y manganosa), potasio, sodio, cinc, y sales similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales procedentes de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables
25 incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas tales como aminas sustituidas de origen natural y sintetizadas. Otras bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente o nutracéuticamente aceptables a partir de las cuales se pueden formar sales incluyen resinas de intercambio iónico tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripopilamina, trometamina y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables" incluye ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y sales preparadas de los mismos, por ejemplo, acético, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico, y similares.

40 Se prefieren los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico.

En la práctica, los compuestos descritos en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o sales nutracéuticamente aceptables de los mismos, pueden combinarse como el principio activo en una mezcla íntima con un vehículo farmacéutico o vehículo nutracéutico de acuerdo con técnicas de composición de
45 compuestos farmacéuticos convencionales o técnicas de composición de compuestos nutracéuticos convencionales. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa).

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas o composiciones nutracéuticas divulgadas en el presente documento pueden presentarse como unidades discretas adecuadas para la administración oral, tales como cápsulas, sobres o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo. Además, las composiciones se pueden presentar como un polvo, como gránulos, como una solución, como una suspensión en un líquido acuoso, como un líquido no acuoso, como una emulsión de aceite en agua o como una emulsión líquida de agua en aceite. Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, los compuestos divulgados en el presente
50 documento, y/o una o más sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden administrar por medio de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Las composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia. En general, tales métodos incluyen una etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos.
55 Después se le puede dar forma de manera conveniente al producto en la presentación deseada.

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos divulgados en el presente documento. Los compuestos divulgados en el presente documento, o sales farmacéuticamente
65 aceptables de los mismos, también se pueden incluir en composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos diferentes.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, líquido o gas. Los ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio y ácido esteárico. Los ejemplos de vehículos líquidos son jarabe de azúcar, aceite de cacahuete, aceite de oliva y agua. Los ejemplos de vehículos gaseosos incluyen dióxido de carbono y nitrógeno.

En la preparación de las composiciones para formas orales de dosificación, se puede emplear cualquier medio farmacéutico conveniente. Por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares pueden usarse para formar preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, elixires y soluciones; mientras que pueden usarse vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares para formar preparaciones orales sólidas tales como polvos, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, pueden usarse comprimidos y cápsulas para unidades de dosificación oral ventajosas en las que se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas habituales acuosas o no acuosas.

Un comprimido que contiene cualquiera de las composiciones divulgadas en el presente documento puede prepararse por compresión o moldeo, de manera opcional con uno o más ingredientes accesorios o adyuvantes. Los comprimidos que se han comprimido se pueden preparar mediante compresión, en una máquina adecuada, el principio activo en una forma de flujo libre tal como polvos o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos que se han moldeado se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden comprender cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento (o sales farmacéutica o nutracéuticamente aceptables) como principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable o un vehículo nutracéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos o adyuvantes adicionales. Las presentes composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá del huésped particular, y la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que el principio activo se está administrando. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y preparadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden prepararse como soluciones o suspensiones de los compuestos activos en agua. Se puede incluir un tensioactivo adecuado tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En algunos ejemplos, se puede incluir un conservante para evitar el crecimiento perjudicial de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. Adicionalmente, las composiciones pueden estar en la forma de polvos estériles para la preparación extemporánea de tales soluciones inyectables estériles o dispersiones. En algunos ejemplos, la forma inyectable final puede ser estéril y puede ser eficazmente fluida para una facilidad de inyección. En algunos ejemplos, las composiciones farmacéuticas pueden ser estables en condiciones de fabricación y almacenamiento; por lo tanto, pueden conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales y mezclas adecuadas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden estar en una forma adecuada para uso tópico tal como, por ejemplo, un aerosol, crema, ungüento, loción, polvo fino, enjuagues bucales, gargarismos, y similares. En algunos ejemplos, las composiciones pueden estar en una forma adecuada para su uso en dispositivos transdérmicos. Estas formulaciones se pueden preparar utilizando cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, mediante métodos de procesamiento convencionales. Como ejemplo, se puede preparar una crema o pomada mezclando material hidrófilo y agua, junto con aproximadamente del 5% en peso a aproximadamente el 10% en peso del compuesto, para producir una crema o ungüento que tenga una consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden estar en una forma adecuada para la administración rectal en donde el vehículo es un sólido. En algunos ejemplos, la mezcla forma supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados frecuentemente en la técnica. Los supositorios se pueden formar de manera conveniente mezclando en primer lugar la composición con los vehículos suavizados o fundidos seguido del enfriamiento y la conformación en moldes.

Además de los ingredientes de vehículos mencionados anteriormente, las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente pueden incluir, según sea apropiado, uno o más ingredientes de vehículo tal como diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo

antioxidantes) y similares. Adicionalmente, se pueden incluir otros adyuvantes para hacer la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado.

Las composiciones que contienen cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden preparar en forma de polvo o concentrado líquido.

En el tratamiento del cáncer, el nivel de dosificación del principio activo que comprende el compuesto o las composiciones descritas en el presente documento puede ser de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente al día y puede administrarse en dosis únicas o múltiples. En algunos ejemplos, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día; tal como de 0,5 a 100 mg/kg al día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg al día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg al día o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg al día. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, 0,5 a 5,0, o 5,0 a 50 mg/kg al día. Para administración oral, las composiciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900 y 1000 miligramos del principio activo, para el ajuste sintomático de la dosificación del paciente que se va a tratar. El compuesto se puede administrar en un régimen de 1 a 4 veces al día, tal como, por ejemplo, una o dos veces al día. Este régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Se entiende, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores. Dichos factores incluyen la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, y dieta del paciente. Otros factores incluyen el tiempo y la ruta de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y el tipo y la gravedad de la enfermedad o infección en particular que se está sometiendo a la terapia.

En el presente documento también se divulgan métodos para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en mamíferos (por ejemplo, seres humanos) que comprenden combinar uno o más compuestos, productos o composiciones divulgados con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, el método para fabricar un medicamento comprende combinar al menos un compuesto divulgado o al menos un producto divulgado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos, que se aplican habitualmente en el tratamiento de las afecciones patológicas mencionadas anteriormente.

Se entiende que las composiciones divulgadas pueden prepararse a partir de los compuestos divulgados. También se entiende que las composiciones divulgadas pueden emplearse en los métodos de uso divulgados.

Composiciones, formulaciones y métodos de administración

La aplicación *in vivo* de los compuestos divulgados, y las composiciones que los contienen, se puede lograr mediante cualquier método y técnica adecuada actualmente o prospectivamente conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos divulgados pueden formularse en una forma fisiológica o farmacéuticamente aceptable y administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las rutas de administración oral, nasal, rectal, tópica y parenteral. Como se usa en el presente documento, el término parenteral incluye administración subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal, tal como mediante inyección. La administración de los compuestos o composiciones que se divulgan puede ser una administración única, o a intervalos continuos o distintos, como puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Los compuestos divulgados en el presente documento, y las composiciones que los comprenden, también pueden administrarse utilizando tecnología de liposomas, cápsulas de liberación lenta, bombas implantables y recipientes biodegradables. Estos métodos de administración pueden, ventajosamente, proporcionar una dosificación uniforme durante un período prolongado de tiempo. Los compuestos también pueden administrarse en sus formas derivadas de sal o formas cristalinas.

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones se describen en detalle en varias fuentes que se conocen bien y están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science* de E.W. Martin (1995) describe formulaciones que se pueden usar en relación con los métodos divulgados. En general, los compuestos divulgados en el presente documento pueden formularse de manera que una cantidad eficaz del compuesto se combine con un vehículo adecuado para facilitar la administración eficaz del compuesto. Las composiciones utilizadas también pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones líquidas o una suspensión, supositorios, soluciones inyectables e infusibles y aerosoles. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también incluyen preferiblemente vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales que se conocen por los expertos en la técnica. Los ejemplos de vehículos o diluyentes para su uso con los compuestos incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, alúmina, almidón, solución salina y vehículos y diluyentes equivalentes. Para proporcionar la administración

de dichas dosificaciones para el tratamiento terapéutico deseado, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender ventajosamente entre aproximadamente el 0,1% y el 100% en peso del total de uno o más de los compuestos en cuestión en base al peso de la composición total, incluido el vehículo o diluyente.

Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen, por ejemplo, soluciones de inyección estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la condición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, antes de usar.

Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvo estéril, gránulos, comprimidos, etc. Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

Los compuestos divulgados en el presente documento, y las composiciones que los comprenden, pueden administrarse a una célula mediante contacto directo con la célula o mediante un medio portador. Los medios portadores para administrar compuestos y composiciones a las células se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, encapsular la composición en un resto liposoma. Otro medio para la administración de compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento a una célula comprende unir los compuestos a una proteína o ácido nucleico que se dirige a la administración a la célula diana. La Patente de Estados Unidos N.º 6.960.648 y las Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos N.º 20030032594 y 20020120100 divulgan secuencias de aminoácidos que pueden acoplarse a otra composición y que permiten que la composición se traslade a través de membranas biológicas. La publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20020035243 también describe composiciones para el transporte de restos biológicos a través de membranas celulares para administración intracelular. Los compuestos también pueden incorporarse en polímeros, cuyos ejemplos incluyen polímero de poli(D-L lactida-co-glicólida) para tumores intracraneales; poli[bis(p-carboxifenoxi) propano:ácido sebácico] en una relación molar de 20:80 (como se usa en GLIADEL); condroitina; quitina; y quitosano.

Para el tratamiento de trastornos oncológicos, los compuestos divulgados en el presente documento pueden administrarse a un paciente que necesita tratamiento en combinación con otras sustancias antitumorales o anticancerosas y/o con radioterapia y/o terapia fotodinámica y/o con tratamiento quirúrgico para eliminar un tumor. Estas otras sustancias o tratamientos pueden administrarse al mismo tiempo o en diferentes momentos a partir de los compuestos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los compuestos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con inhibidores mitóticos tales como taxol o vinblastina, agentes alquilantes tales como ciclofosamida o ifosfamida, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo o hidroxiaurea, intercaladores de ADN tales como adriamicina o bleomicina, inhibidores de topoisomerasa tales como etopósido o camptotecina, agentes antiangiogénicos tal como angiostatina, antiestrógenos tales como tamoxifeno y/u otros fármacos o anticuerpos contra el cáncer, tal como, por ejemplo, GLEEVEC (Novartis Pharmaceuticals Corporation) y HERCEPTIN (Genentech, Inc.), respectivamente, o un inmunoterapéutico tal como ipilimumab y bortezumib.

En algunos ejemplos, los compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento pueden administrarse localmente en uno o más sitios anatómicos, tales como sitios de crecimiento celular no deseado (tal como un sitio de tumor o crecimiento de piel benigno, por ejemplo, inyectados o aplicados por vía tópica al tumor o crecimiento de la piel), opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte.

Los compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento pueden administrarse por vía sistémica, tal como por vía intravenosa u oral, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte, o un vehículo comestible asimilable para administración oral. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en comprimidos o se pueden incorporar directamente a los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica por vía oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, pulverizaciones en aerosol, y similares.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio, y un agente edulcorante, tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saporífero tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza.

Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes diversos otros materiales como revestimientos o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden revestir con gelatina, cera, goma laca, o azúcar y

similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante como sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

Los compuestos y composiciones que se divulgan en el presente documento, incluyendo sales o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden administrarse por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones del agente activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclada con un tensioactivo no tóxico. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo, que están adaptadas para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infundibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La última forma de dosificación debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un medio de dispersión solvente o líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. Opcionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante otros diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando un compuesto y/o agente descrito en el presente documento en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones filtradas previamente estériles.

Para la administración tópica, los compuestos y agentes divulgados en el presente documento pueden aplicarse como un líquido o un sólido. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos por vía tópica a la piel como composiciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Los compuestos y agentes y composiciones que se divulgan en el presente documento pueden aplicarse por vía tópica a la piel de un sujeto para reducir el tamaño (y pueden incluir la eliminación completa) de tumores malignos o benignos, o para tratar un sitio de infección. Los compuestos y agentes que se divulgan en el presente documento pueden aplicarse directamente al sitio de crecimiento o infección. Preferiblemente, los compuestos y agentes se aplican al sitio de crecimiento o infección en una formulación tal como un unguento, crema, loción, solución, tintura o similares.

Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en las que los compuestos pueden disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden añadir adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar desde almohadillas absorbentes, pueden usarse para impregnar vendas y otros apósitos, o se pulverizan sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol, por ejemplo.

Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también se pueden emplear con vehículos líquidos para formar pastas extensibles, geles, pomadas, jabones y similares, para su aplicación directa a la piel del usuario.

Las dosis útiles de los compuestos y agentes y composiciones farmacéuticas que se divulgan en el presente documento pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosis eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos se conocen en la técnica.

Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se ven afectados los síntomas o el trastorno. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. En general, la dosificación variará con la edad, afección, género y grado de la enfermedad.

del paciente y puede determinarse por un experto en la técnica. Cada médico puede ajustar la dosis en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de la dosis diariamente, durante uno o varios días.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto divulgado en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, las composiciones farmacéuticas están adaptadas para administración oral, tópica o parenteral. La dosis administrada a un paciente, en particular, un ser humano, debe ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica en el paciente durante un periodo de tiempo razonable, sin toxicidad letal, y preferiblemente que no cause más que un nivel aceptable de efectos secundarios o morbilidad. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis dependerá de una diversidad de factores que incluyen la condición (salud) del sujeto, el peso corporal del sujeto, el tipo de tratamiento concurrente, si la hubiera, la frecuencia de tratamiento, la relación terapéutica, así como la gravedad y fase de la afección patológica.

Métodos de uso de los compuestos y composiciones

También se proporcionan en el presente documento métodos de uso de los compuestos o composiciones que se describen en el presente documento. En el presente documento también se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o patología en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos o composiciones que se describen en el presente documento.

Una aplicación muy importante es para la administración específica de fármacos tales como fármacos anticancerosos. Los péptidos bicíclicos divulgados en el presente documento pueden dirigirse a una proteína de superficie específica para el cáncer o sobreexpresada. Después, un fármaco anticanceroso se puede unir de manera covalente o no covalente al péptido bicíclico.

En el presente documento también se proporcionan métodos para tratar, prevenir o mejorar el cáncer en un sujeto. Los métodos incluyen administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones que se describen en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles para tratar el cáncer en seres humanos, por ejemplo, poblaciones pediátricas y geriátricas, y en animales, por ejemplo, aplicaciones veterinarias. Los métodos descritos pueden incluir opcionalmente la identificación de un paciente que tiene o puede necesitar tratamiento para un cáncer. Los ejemplos de tipos de cáncer que pueden tratarse con los compuestos y las composiciones que se describen en el presente documento incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer gastrointestinal, cáncer genitourinario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de piel y cáncer testicular. Otros ejemplos incluyen cáncer y/o tumores del ano, conducto biliar, hueso, médula ósea, intestino (incluyendo colon y recto), ojo, vesícula biliar, riñón, boca, laringe, esófago, estómago, testículos, cuello del útero, mesotelioma, neuroendocrino, pene, piel, médula espinal, tiroides, vagina, vulva, útero, hígado, músculo, células sanguíneas (incluidos linfocitos y otras células del sistema inmunitario). Otros ejemplos de cánceres tratables por los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento incluyen carcinomas, sarcoma de Kaposi, melanoma, mesotelioma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, leucemia (linfoblástica aguda, mieloide aguda, linfocítica crónica, mieloide crónica y otros), y linfoma (de Hodgkin y no Hodgkin) y mieloma múltiple.

En algunos ejemplos, el cáncer puede estar asociado con la muerte celular inducida por TNF- α .

Los métodos de tratamiento o prevención del cáncer que se describen en el presente documento pueden incluir además el tratamiento con uno o más agentes adicionales (por ejemplo, un agente contra el cáncer o radiación ionizante). El uno o más agentes adicionales y los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se describen en el presente documento pueden administrarse en cualquier orden, incluida la administración simultánea, así como en el orden espaciado temporalmente de hasta varios días. Los métodos también pueden incluir más de una sola administración del uno o más agentes adicionales y/o los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento. La administración de uno o más agentes adicionales y los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento, puede ser por la misma o por diferentes vías. Cuando se trata con uno o más agentes adicionales, los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento pueden combinarse en una composición farmacéutica que incluye uno o más agentes adicionales.

Por ejemplo, los compuestos o composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento, pueden combinarse en una composición farmacéutica con un agente anticanceroso adicional, tal como ácido 13-cis-Retinoico, 2-Amino-6-Mercaptopurina, 2-CdA, 2-clorodeoxiadenosina, 5-fluorouracilo, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, Accutane, Actinomicina-D, adriamicina, Aducril, Agrylin, Ala-Cort, aldesleukina, Alemtuzumab, Alitretinoína, Alkaban-AQ, Alkeran, ácido All-transretinoico, interferón alfa, altretamina, Ametopterina, Amifostina, aminoglutetimida, anagrelida, Anandron, Anastrozol, Arabinosilcitosina, Aranesp, Aredia, Arimidex, Aromasina, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, ATRA, Avastina, BCG, BCNU, Bevacizumab, Bexaroteno,

Bicalutamida, BiCNU, Blenoxano, Bleomicina, Bortezomib, Busulfán, Busulfex, C225, leucovorina calcio, Campath, Camptosar, Camptotecina-11, capecitabina, Carac, carboplatino, Carmustina, oblea de Carmustina, Casodex, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidina, cetuximab, Clorambucilo, cisplatino, Citrovorium Factor, cladribina, Cortisona, Cosmegen, CPT-11, Ciclofosfamida, Cytadren, citarabina, citarabina liposomal, Cytosar-U, Cytosan, Dacarbazina, Dactinomicina, darbepoetina alfa, Daunomicina, Daunorrubicina, clorhidrato de daunorrubicina, Daunorrubicina liposomal, DaunoXome, Decadron, Delta-Cortef, Deltasone, denileukin diftitox, DepoCyt, Dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, Dexasona, Dexrazoxano, DHAD, DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil, Doxorubicina, Doxorubicina liposomal, Droxiá, DTIC, DTIC-Dome, Duralone, Efudex, Eligard, Ellence, Eloxatina, Elspar, Emcyt, epirubicina, epoetina alfa, Erbitux, Erwinia L-asparaginasa, estramustina, Ethyol, Etopophos, Etopósido, fosfato de etopósido, Eulexin, Evista, Exemestano, Fareston, Faslodex, Femara, filgrastim, floxuridina, Fludara, fludarabina, Fluoroplex, fluorouracilo, Fluorouracilo (crema), fluoximasterona, flutamida, ácido folínico, FUDR, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, gemcitabina, Gemtuzumab ozogamicina, Gemzar, Gleevec, Lupron, Lupron Depot, Matulano, Maxidex, mecloretamina, -clorhidrato de mecloretamina, Medralone, Medrol, Megace, Megestrol, Megestrol Acetato, melfalán, mercaptopurina, Mesna, Mesnex, Metotrexato, Metotrexato sodio, Metilprednisolona, Mylocel, Letrozol, Neosar, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilandron, Nilutamida, Mostaza de nitrógeno, Novaldex, Novantrona, Octreotida, Octreotida acetato, Oncospar, Oncovin, Ontak, Onxal, Oprevelkin, Orapred, Orasone, oxaliplatino, paclitaxel, Pamidronato, Panretin, Paraplatino, PEDIAPRED, Interferón pegilado, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, PEG-INTRON, PEG-L-asparaginasa, mostaza de fenilalanina, Platinol, Platinol-AQ, Prednisolona, Prednisona, Prelone, procarbazona, PROCIT, Proleukina, Prolifeprospan 20 con implante de carmustina, Purinetol, Raloxifeno, Rheumatrex, Rituxan, Rituximab, Roveron-A (interferón alfa-2a), Rubex, Rubidomicina clorhidrato, Sandostatín, Sandostatín LAR, sargramostim, Solu-Cortef, Solu-Medrol, STI-571, estreptozocina, Tamoxifeno, Targretin, Taxol, Taxotere, Temodar, temozolomida, tenipósido, TESPA, Talidomida, Talomida, TheraCys, Tioguanina, Tioguanina Tabloid, Tiofosfoamida, Tioplex, Tiotepa, TICE, Toposar, topotecán, toremifeno, Trastuzumab, Tretinoína, Trexall, Trisenox, TSPA, VCR, Velban, Velcade, VePesid, Vesanoide, Viadur, Vinblastina, Vinblastina sulfato, Vincasar Pfs, vincristina, vinorelbina, vinorelbina tartrato, VLB, VP-16, Vumon, Xeloda, Zanosar, Zevalina, Zinecard, Zoladex, ácido zolendróico, Zometa, oblea Gliadel, Glivec, GM-CSF, Goserelina, factor estimulador de colonias de granulocitos, Halotestina, Herceptina, Hexadrol, Hexalen, Hexametilmelamina, HMM, Hicamtina, Hydrea, Acetato de hidrocort, Hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona sódica, succinato de hidrocortisona sódica, Hidrocortisona fosfato, hidroxixurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetan, Idamicina, idarrubicina, Ifex, IFN-alfa, ifosfamida, IL 2, IL-11, Imatinib mesilato, Imidazol Carboxamida, Interferón alfa, Interferón Alfa-2b (conjugado PEG), Interleucina 2, interleucina-11, Intrón A (interferón alfa-2b), leucovorina, Leukeran, Leukina, leuprolida, Leurocristina, Leustatina, Liposomal Ara-C, Pred líquido, lomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Meticorten, mitomicina, Mitomicina-C, mitoxantrona, M-Prednisol, MTC, MTX, Mustargen, Mustina, Mutamicina, Myleran, Iressa, Irinotecán, Isotretinoína, Kidrolasa, Lanacort, L-asparaginasa, y LCR. El agente anticanceroso adicional también puede incluir productos biofarmacéuticos tales como, por ejemplo, anticuerpos.

Muchos tumores y cánceres tienen genoma viral presente en el tumor o en las células cancerosas. Por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (VEB) está asociado con varias neoplasias de mamíferos. Los compuestos divulgados en el presente documento también se pueden usar solos o en combinación con agentes anticancerosos o antivirales, tal como ganciclovir, azidotimidina (AZT), lamivudina (3TC), etc., para tratar pacientes infectados con un virus que puede causar la transformación celular y/o para tratar a los pacientes que tienen un tumor o cáncer que está asociado con la presencia del genoma viral en las células. Los compuestos divulgados en el presente documento también se pueden usar en combinación con tratamientos basados en virus de enfermedades oncológicas.

Los métodos y compuestos como se describen en el presente documento son útiles tanto para el tratamiento profiláctico como para el tratamiento terapéutico. Como se usa en el presente documento, el término tratar o tratamiento incluye prevención; retraso en el inicio; disminución, erradicación o retraso en la exacerbación de signos o síntomas después del inicio; y prevención de recaídas. Para uso profiláctico, una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento se administra a un sujeto antes del inicio (por ejemplo, antes de signos obvios de cáncer), durante el inicio temprano (por ejemplo, tras los signos y síntomas iniciales de cáncer), o después de un desarrollo establecido de cáncer. La administración profiláctica puede tener lugar desde varios días hasta años antes de la manifestación de los síntomas de una infección. Se puede usar administración profiláctica, por ejemplo, en el tratamiento quimiopreventivo de los sujetos que presentan lesiones precancerosas, los diagnosticados con tumores malignos en fase temprana, y para los subgrupos con susceptibilidades (por ejemplo, familia, razas y/u ocupaciones) a cánceres particulares. El tratamiento terapéutico implica administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos y composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe en el presente documento después de que se diagnostica el cáncer.

También se divulgan en el presente documento métodos para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto, tal como un ser humano, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto divulgado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos ejemplos, el sujeto es un animal, tal como un ser humano. En algunos ejemplos, se identifica que el sujeto tiene la necesidad de tratamiento del trastorno. En algunos ejemplos, el método trata un trastorno. En algunos ejemplos, el trastorno está asociado con la muerte celular inducida por TNF- α , tal como la regulación disfuncional de la muerte celular inducida por TNF- α . En algunos ejemplos, el trastorno está asociado con la proliferación celular incontrolada, tal como cáncer. En algunos ejemplos, el trastorno

es cáncer. En algunos ejemplos, el trastorno es un trastorno inflamatorio. En algunos ejemplos, el trastorno es un trastorno autoinmune, tal como un trastorno seleccionado de artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, hidradenitis supurativa y asma refractaria.

5 En algunos ejemplos, el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno antes de la etapa de administración.

En algunos ejemplos, el compuesto se administra en una cantidad de entre aproximadamente 0,01 y 500 mg por kg de peso corporal del paciente al día y se puede administrar en dosis únicas o múltiples. En algunos ejemplos, el nivel de dosificación puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg al día o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg al día. En algunos ejemplos, la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, 0,5 a 5,0, o 5,0 a 50 mg/kg al día. En algunos ejemplos, el nivel de dosificación puede ser de 0,5 a 100 mg/kg al día. Para administración oral, las composiciones pueden proporcionarse en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, tal como 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900, y 1000 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis del paciente que se vaya a tratar. El compuesto se puede administrar en un régimen de 1 a 4 veces al día, tal como una o dos veces al día. Este régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

20 En algunos ejemplos, el sujeto es un animal domesticado. En algunos ejemplos, el animal domesticado es un pez domesticado, crustáceo domesticado o molusco domesticado. En algunos ejemplos, el animal domesticado es un ave de corral. En algunos ejemplos, las aves de corral se seleccionan de pollo, pavo, pato y ganso. En algunos ejemplos, el animal domesticado es ganado. En algunos ejemplos, el animal de ganado se selecciona de cerdo, vaca, caballo, cabra, bisonte y oveja.

25 En algunos ejemplos, el método comprende además la etapa de identificar al animal que necesita tratamiento o prevención del cáncer. En algunos ejemplos, el mamífero ha sido diagnosticado con una necesidad de tratamiento y prevención del cáncer antes de la etapa de administración.

Protección contra la muerte celular inducida por TNF- α

30 En el presente documento también se describen métodos para la protección contra la muerte celular inducida por TNF α . El método puede comprender administrar una cantidad eficaz de un compuesto divulgado en el presente documento, un compuesto creado mediante un método divulgado en el presente documento, una biblioteca divulgada en el presente documento, o un compuesto identificado mediante métodos divulgados en el presente documento a un sujeto identificado como que tiene la necesidad de protección contra la muerte celular inducida por TNF α .

En algunos ejemplos, la cantidad es terapéuticamente eficaz. En algunos ejemplos, la cantidad es profilácticamente eficaz.

40 En algunos ejemplos, el sujeto es una célula. En algunos ejemplos, el sujeto es un animal. En algunos ejemplos, el sujeto es un ser humano.

Fabricación de un medicamento

45 En el presente documento también se divulgan métodos para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer que comprenden combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o producto divulgado de un método divulgado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 En el presente documento también se describen métodos para fabricar un medicamento asociado con el tratamiento o la prevención del cáncer o la necesidad de tratar o prevenir el cáncer con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunos ejemplos, el medicamento comprende un compuesto divulgado.

55 *Kits*

También se describen kits que comprenden un compuesto descrito en el presente documento en uno o más recipientes. Los kits divulgados pueden incluir opcionalmente vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En una realización, un kit incluye uno o más diferentes componentes, auxiliares o adyuvantes como se describe en el presente documento. En otra realización, un kit incluye uno o más agentes anticancerosos, tales como los agentes descritos en el presente documento. En una realización, un kit incluye instrucciones o materiales de embalaje que describen cómo administrar un compuesto o composición del kit. Los recipientes del kit pueden ser de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, plástico, metal, etc., y de cualquier tamaño, forma o configuración adecuados. En una realización, un compuesto y/o agente divulgado en el presente documento se proporciona en el kit como un sólido, tal como una forma de comprimido, píldora o polvo. En otra realización, un compuesto y/o agente divulgado en el presente documento se proporciona en el kit como un líquido o solución. En una realización, el kit comprende una

ampolla o jeringa que contiene un compuesto y/o agente divulgado en el presente documento forma líquida o en solución.

- 5 En el presente documento también se describen kits que comprenden uno o más de los compuestos divulgados, y uno o más de: a) al menos un compuesto anticanceroso, b) instrucciones para tratar un trastorno asociado con el cáncer, o c) instrucciones para tratar el cáncer.

10 En algunos ejemplos, el kit comprende además al menos un agente, en el que el compuesto y el agente se formulan conjuntamente.

10 En algunos ejemplos, el compuesto y el agente se empaquetan conjuntamente. El agente puede ser cualquier agente como se divulga en el presente documento, que se sabe que tiene un efecto secundario del cáncer, un agente que se sabe que aumenta el riesgo de cáncer, un agente que se sabe que trata el cáncer en un sujeto.

15 Los kits también pueden comprender compuestos y/o productos empaquetados conjuntamente, formulados conjuntamente y/o entregados conjuntamente con otros componentes. Por ejemplo, un fabricante de fármacos, un distribuidor de fármacos, un médico, una tienda de fabricación de compuestos, o un farmacéutico, pueden proporcionar un kit que comprende un compuesto y/o producto divulgado y otro componente para su administración a un paciente.

20 Se contempla que los kits divulgados se pueden usar en relación con los métodos de fabricación divulgados, los métodos de uso divulgados, y/o las composiciones divulgadas.

Método para fabricar compuestos

25 Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica de la síntesis orgánica o variaciones de las mismas, como apreciarán los expertos en la técnica. Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Las condiciones óptimas de reacción pueden variar con los reactivos o disolventes particulares utilizados, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la técnica.

30 Las variaciones en los compuestos descritos en el presente documento incluyen la adición, resta o movimiento de los diversos constituyentes como se describe para cada compuesto. De manera similar, cuando uno o más centros quirales están presentes en una molécula, se puede cambiar la quiralidad de la molécula. Además, la síntesis de compuestos puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. El uso de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados pueden determinarse por un experto en la técnica. La química de grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en Wuts and Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4ª edición, Wiley & Sons, 2006, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 Los materiales de partida y los reactivos utilizados en la preparación de los compuestos y composiciones que se divulgan están disponibles en proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI), Acros Organics (Morris Plains, NJ), Fisher Scientific (Pittsburgh, PA), Sigma (St. Louis, MO), Pfizer (Nueva York, NY), GlaxoSmithKline (Raleigh, NC), Merck (Whitehouse Station, NJ), Johnson & Johnson (New Brunswick, NJ), Aventis (Bridgewater, NJ), AstraZeneca (Wilmington, DE), Novartis (Basel, Suiza), Wyeth (Madison, NJ), Bristol-Myers-Squibb (Nueva York, NY), Roche (Basel, Suiza), Lilly (Indianapolis, IN), Abbott (Abbott Park, IL), Schering Plough (Kenilworth, NJ), o Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania), o se preparan mediante métodos conocidos para los expertos en la materia siguiendo procedimientos expuestos en referencias como Fieser y Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's *Chemistry of Carbon Compounds*, volúmenes 1-5 y suplementos (Elsevier Science Publishers, 1989); *Organic Reactions*, volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991); *March's Advanced Organic Chemistry*, (John Wiley and Sons, 4ª Edición); y Larock's *Comprehensive Organic Transformations* (VCH Publishers Inc., 1989). Otros materiales, tales como los vehículos farmacéuticos divulgados en el presente documento pueden obtenerse de fuentes comerciales.

55 Las reacciones para producir los compuestos descritos en el presente documento se pueden realizar en disolventes, que pueden seleccionarse por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactantes), los intermedios, o productos en las condiciones a las que se realizan las reacciones, es decir, la temperatura y la presión. Las reacciones pueden realizarse en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. El producto o la formación de intermedios se pueden controlar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto puede controlarse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), espectrometría de masas, o por cromatografía, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina.

65 Los compuestos divulgados pueden prepararse mediante síntesis peptídica en fase sólida en la que el aminoácido α -N-terminal está protegido por un grupo protector de ácido o base. Dichos grupos protectores deberían tener las propiedades de ser estables en las condiciones de formación de enlaces peptídicos, mientras que pueden eliminarse fácilmente sin destruir la cadena peptídica en crecimiento o la racemización de cualquiera de los centros quirales

contenidos en la misma. Los grupos protectores adecuados son 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), t-butiloxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Cbz), bifenilisopropiloxycarbonilo, t-amiloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxycarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-t-butiloxycarbonilo, y similares. El grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) es particularmente preferido para la síntesis de los compuestos divulgados. Otros grupos protectores de cadena lateral preferidos son, para grupos amino de cadena lateral como lisina y arginina, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (pmc), nitro, p-toluenosulfonilo, 4-metoxibenceno-sulfonilo, Cbz, Boc y adamantiloxycarbonilo; para tirosina, bencilo, o-bromobenciloxi-carbonilo, 2,6-diclorobencilo, isopropilo, t-butilo (t-Bu), ciclohexilo, ciclopentilo y acetilo (Ac); para serina, t-butilo, bencilo y tetrahidropirano; para histidina, tritilo, bencilo, Cbz, p-toluenosulfonilo y 2,4-dinitrofenilo; para triptófano, formilo; para ácido aspártico y ácido glutámico, bencilo y t-butilo y para cisteína, trifenilmetilo (tritilo). En el método de síntesis de péptidos en fase sólida, el aminoácido α -C-terminal se une a un soporte sólido o resina adecuado. Los soportes sólidos adecuados útiles para la síntesis anterior son aquellos materiales que son inertes a los reactivos y las condiciones de reacción de las reacciones de desprotección por condensación por etapas, además de ser insolubles en los medios utilizados. Los soportes sólidos para la síntesis de péptidos carboxi α -C-terminales son 4-hidroximetilfenoximetil-copoli(estireno-divinilbenceno al 1%) o la resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetil disponible en Applied Biosystems (Foster City, California). El aminoácido α -C-terminal se acopla a la resina por medio de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) o hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), con o sin 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina (BOPCl), acoplamiento mediado durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas a una temperatura de entre 10 °C y 50 °C en un disolvente tal como diclorometano o DMF. Cuando el soporte sólido es la resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetil, el grupo Fmoc se escinde con una amina secundaria, preferiblemente piperidina, antes del acoplamiento con el aminoácido α -C-terminal como se ha descrito anteriormente. Un método para acoplarse a la resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetil desprotegida es hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1 equiv.) en DMF. El acoplamiento de aminoácidos protegidos sucesivos se puede realizar en un sintetizador automático de polipéptidos. En un ejemplo, el α -N-terminal en los aminoácidos de la cadena peptídica en crecimiento están protegidos con Fmoc. La eliminación del grupo protector Fmoc del lado α -N-terminal del péptido en crecimiento se logra mediante el tratamiento con una amina secundaria, preferiblemente piperidina. Cada aminoácido protegido se introduce luego en un exceso molar de aproximadamente 3 veces, y el acoplamiento se lleva a cabo preferiblemente en DMF. El agente de acoplamiento puede ser hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1 equiv.). Al final de la síntesis en fase sólida, el polipéptido se elimina de la resina y se desprotege, ya sea de forma sucesiva o en una sola operación. La eliminación del polipéptido y la desprotección se pueden lograr en una única operación tratando el polipéptido unido a la resina con un reactivo de escisión que comprende tianisol, agua, etanoditilo y ácido trifluoroacético. En los casos en los que el α -C-terminal del polipéptido es una alquilamida, la resina se escinde por aminólisis con una alquilamina. Como alternativa, el péptido se puede eliminar por transesterificación, por ejemplo, con metanol, seguido de aminólisis o por transamidación directa. El péptido protegido se puede purificar en este punto o llevar directamente a la siguiente etapa. La eliminación de los grupos protectores de cadena lateral se puede lograr utilizando el cóctel de escisión descrito anteriormente. El péptido totalmente desprotegido se puede purificar mediante una secuencia de etapas cromatográficas que emplean cualquiera o todos los siguientes tipos: intercambio iónico en una resina débilmente básica (forma de acetato); cromatografía de adsorción hidrófoba en poliestireno-divinilbenceno sin derivar (por ejemplo, Amberlite XAD); cromatografía de adsorción en gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico sobre carboximetilcelulosa; cromatografía de partición, por ejemplo, en Sephadex G-25, LH-20 o distribución a contracorriente; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), especialmente HPLC de fase inversa en el relleno de columna de fase unida de octilo u octadecilsililo-sílice.

En el presente documento se divulgan métodos para preparar un compuesto peptídico bicíclico, los métodos pueden comprender: a) unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo; b) construir una primera cadena peptídica de 2-6 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; c) unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica; d) construir una segunda cadena peptídica de 3-7 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina; e) unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; f) ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico; y g) ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico.

En algunos ejemplos, el método comprende además la etapa de unir un resto de etiqueta al compuesto.

En algunos ejemplos, el método comprende además la etapa de escindir el compuesto del soporte de fase sólida. También se describe un método para hacer una biblioteca de compuestos peptídicos bicíclicos, comprendiendo el método las etapas de: a) unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo; b) construir una primera cadena peptídica de 2-6 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena; c) unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica; d) construir una segunda cadena peptídica de 3-7 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena; e) unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico; f) ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad

carboxilo del ácido trimésico; y g) ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico.

Métodos de identificación

5 En el presente documento también se describen métodos para identificar un fármaco candidato. En algunos ejemplos, el fármaco candidato es un compuesto divulgado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En el presente documento se divulga un método para identificar un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno, comprendiendo el método las etapas de: exponer un compuesto divulgado en el presente documento, un compuesto preparado mediante los métodos divulgados en el presente documento, una biblioteca divulgada en el presente documento, o una biblioteca preparada por los métodos divulgados para un receptor asociado con el trastorno; b) detectar la reacción entre el receptor y el compuesto o la biblioteca; y c) determinar la identidad del
15 compuesto que reacciona con el receptor.

En el presente documento también se divulga un compuesto identificado por el método para identificar un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno.

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se elaboran y se evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en el presente documento se realizan y evalúan y están previstos para que sean puramente ejemplares
25 de la invención y no están previstos para limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún así obtener un resultado similar o parecido sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

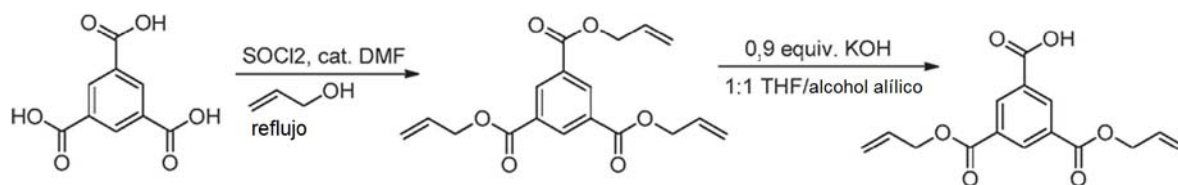
30 Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o es una temperatura ambiente, y la presión está en o cerca de la atmosférica.

35 Ciertos materiales, reactivos y kits se obtuvieron de proveedores específicos como se indica a continuación y, según corresponda, se indica el catálogo del proveedor, la parte u otro número que especifica el artículo.

Ejemplo 1

40 Los L-aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron en Advanced ChemTech (Louisville, KY), Peptides International (Louisville, KY), o Aapptec (Louisville, KY). El hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (HOBt) eran de Aapptec. Se preparó tetrametilrodamina azida como se ha descrito previamente (Wells, J y McClendon, C. *Nature*, 2007, *450*, 1001-1009). Todos los disolventes y otros reactivos químicos se obtuvieron en Sigma-Aldrich, Fisher Scientific (Pittsburgh, PA), or VWR (West Chester, PA) y se utilizaron sin purificación adicional a menos que se indique otra cosa. La N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) era de Advanced ChemTech. Se adquirió isotiocianato de fenilo en
45 ampollas selladas de 1 ml en Sigma-Aldrich, y se utilizó una ampolla recién abierta en cada experimento.

Síntesis del ácido dialiltrimésico. Se disolvió ácido trimésico (2 g, 9,52 mmol) en 20 ml de alcohol alílico y se enfrió a 0 °C. Se añadieron lentamente cinco equiv. de cloruro de tionilo y 0,1 equiv. de DMF a la solución anterior y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se sometió a reflujo durante una noche y se detuvo por evaporación hasta sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó. El producto resultante se disolvió en 1:1 de THF/alcohol alílico y se añadieron 0,9 equiv. de KOH. La solución se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en DCM y se extrajo con NaOH 0,1 M. La capa orgánica se descartó. Se añadió HCl concentrado a la capa acuosa hasta que el producto precipitó completamente de la solución. El precipitado se recogió por filtración al vacío y se secó al vacío para proporcionar el producto deseado (rendimiento del 80%). ¹H RMN (250 MHz, DMSO-d₆): 6,8,67-8,69 (m, 3H), 6,02-6,18 (m, 2H), 5,47 (d, J_{trans} = 17,5 Hz, 2H), 5,35 (d, J_{cis} = 10 Hz, 2H), y 4,88 (d, 4H).
50
55
60



Expresión y purificación de proteínas. El gen que codifica el dominio extracelular de TNF α humano (aa 77-233) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el ADNc de longitud completa (Open Biosystem) como plantilla y los oligonucleótidos 5'-catctcgagtcacagggaatgatccaaagt-3' (SEQ ID NO.: 64) y 5'-caccgcaagcttgatcatctctctgaacc-3' (SEQ ID NO.: 65) como cebadores. El fragmento de ADN resultante se digirió con las endonucleasas *Hind* III y *Xho* I y se insertó en el vector procariota pET-22b(+)-ybbR (Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 2005, 102, 15815-15820). Este procedimiento de clonación dio como resultado la adición de una etiqueta ybbR (MVLDSLEFIASKL; SEQ ID NO.: 66) al extremo N de TNF α . Se cultivaron células BL21(DE3) de *E. coli* transformadas con el plásmido pET22b-ybbR-TNF α a 37 °C en caldo de Luria (LB) complementado con 0,05 mg/ml de ampicilina a una OD₆₀₀ de 0,50, cuando se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (concentración final 150 μ M). Después de 5 h a 30 °C, las células (1 l) se recogieron por centrifugación. El sedimento celular se suspendió en 20 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) más sulfato de protamina al 0,5%, 20 mg/ml de inhibidor de tripsina, 100 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 100 mg/ml de lisozima. La mezcla se agitó a 4 °C durante 30 min y se sonicó brevemente (2 x pulsos de 10 s). El lisado en bruto se centrifugó para producir un sobrenadante transparente, que se diluyó 10 veces en tampón de ejecución (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, triton X100 al 0,5%, pH 8,0) y se pasó a través de una columna de Q-Sepharose. La columna se eluyó con 50 ml de tampón de ejecución con un gradiente de NaCl 0-1000 mM. Las fracciones de TNF α etiquetadas con ybbR se agruparon y se concentraron hasta ~1 ml usando un filtro de membrana de celulosa Amicon Ultra-15. La solución resultante se pasó a través de una columna de intercambio aniónico Mono-Q 10/100 GL equilibrada en el tampón de ejecución. La columna se eluyó con el tampón de ejecución más un gradiente lineal de NaCl 0-1000 mM. Las fracciones que contenían TNF α se agruparon y se concentraron en un filtro de celulosa Amicon Ultra-15. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Etiquetado de proteínas. La biotilación de TNF α se realizó mediante el tratamiento de la proteína TNF α etiquetada con ybbR (80 μ M) en HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM con Sfp fosfopanteteinil transferasa (1 μ M) y biotina-CoA (Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 2005, 102, 15815-15820) (100 μ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El etiquetado Texas-Red de TNF α se realizó de manera similar, excepto que se utilizó un aducto Texas Red-CoA (Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 2005, 102, 15815-15820) en lugar de biotina-CoA. La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de desalinización rápida G-25 equilibrada en HEPES 30 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM para eliminar cualquier biotina libre o moléculas de colorante.

Anisotropía de fluorescencia. Se realizó un experimento primario de FA incubando un péptido bicíclico marcado con TMR 100 nM con TNF α 2 μ M en el tampón de bloqueo. El experimento completo de titulación de FA se realizó de manera similar incubando un péptido bicíclico marcado con 50 nM con concentraciones variables (0-6 μ M) de TNF α . Los valores de FA se midieron en un espectrofluorímetro Spectramax M5 de Molecular Devices, con longitudes de onda de excitación y emisión a 545 y 585 nm, respectivamente. Las constantes de disociación de equilibrio (K_D) se determinaron mediante la representación de los valores de anisotropía de fluorescencia en función de la concentración de TNF α . Las curvas de titulación se ajustaron a la siguiente ecuación

$$Y = \frac{\left(A_{\min} + \left(A_{\max} \times \frac{Q_b}{Q_f} - A_{\min} \right) \left(\frac{(L + x + K_D) - \sqrt{((L + x + K_D)^2 - 4Lx)}}{2L} \right) \right)}{\left(1 + \left(\frac{Q_b}{Q_f} - 1 \right) \left(\frac{(L + x + K_D) - \sqrt{((L + x + K_D)^2 - 4Lx)}}{2L} \right) \right)}$$

donde Y es la anisotropía medida en una concentración de TNF α dada x; L es la concentración de péptido bicíclico; Q_b/Q_f es el hecho de corrección para la interacción colorante-proteína; $A_{\max}$ es la máxima anisotropía cuando todos los péptidos están unidos a TNF α , mientras que $A_{\min}$ es la anisotropía mínima.

Secuenciación de péptidos por PED-MS. Las perlas que contenían los péptidos lineales codificantes se colocaron en pocillos individuales de una placa de filtro de 96 pocillos AcroPrep (Pall Corporation, PN5030) con una perla por pocillo. A cada pocillo se le añadió una solución recién mezclada que contenía 25 μ l de piridina/agua (v/v 2:1) más trietilamina

al 0,1% y 25 μ l de Fmoc-OSu (2 μ mol) e isotiocianato de fenilo (100 μ mol) en piridina seca. La reacción se dejó proceder durante 6 minutos y se drenó mediante un sistema de colector de vacío universal diseñado para placas de 96 pocillos (United Chemical Technologies, Inc.). La perla se lavó cinco veces con DCM y una vez con TFA, y se incubó con 100 μ l de TFA (2 x 6 min). La perla se lavó con DCM y piridina y el ciclo de PED se repitió 11 veces. Después del último ciclo de PED, el grupo Fmoc N-terminal se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20% en DMF. Para el análisis MALDI-TOF, cada perla se trató con 100 μ l de TFA que contenía yoduro de amonio (1,0 mg) y dimetilsulfuro (10 μ l) durante 20 minutos para reducir cualquier Met oxidado. La perla se lavó con agua, se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se trató durante una noche con 20 μ l de CNBr en TFA al 70% (40 mg/ml) en la oscuridad. Los disolventes se evaporaron al vacío a sequedad y los péptidos liberados de la perla se disolvieron en 5 μ l de TFA al 0,1% en agua. Un μ l de la solución peptídica se mezcló con 2 μ l de ácido 4-hidroxi- α -cianocinámico saturado en acetonitrilo/TFA al 0,1% (1:1) y se manchó 1 μ l de la mezcla en una placa de muestras de MALDI. La espectrometría de masas se realizó en un instrumento Bruker Microflex MALDI-TOF. Los datos obtenidos se analizaron por el software Moverz (Proteometrics LLC, Winnipeg, Canadá).

Síntesis de la biblioteca. La biblioteca de péptidos bicíclicos se sintetizó en 2,0 g de resina TentaGel S NH₂ (90 μ m, 0,2 mmol/g). Todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa. La secuencia de enlazador (BBFM) se sintetizó con 4 equiv. de Fmoc-aminoácidos, utilizando HBTU/HOBt/DIPEA como reactivos de acoplamiento. La reacción de acoplamiento típicamente se dejó avanzar durante 1 h, y las perlas se lavaron con DMF (3x) y DCM (3x). El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento dos veces con piperidina al 20% en DMF (5 + 15 min), y las perlas se lavaron exhaustivamente con DMF (6x). Para segregar espacialmente las perlas en capas externas e internas, la resina (después de la eliminación del grupo Fmoc N-terminal) se lavó con DMF y agua, y se empapó en agua durante una noche. La resina se drenó rápidamente y se suspendió en una solución de Fmoc-OSu (0,26 mmol, 0,50 equiv.) y diisopropiletilamina (1,2 mmol o 2,0 equiv.) en 30 ml de 55:45 (v/v) de DCM/éter dietílico. La mezcla se incubó en un agitador de carrusel durante 30 min. Las perlas se lavaron con 55:45 de DCM/éter dietílico (3x) y DMF (8x) para eliminar el agua de las perlas y después se trataron con 5 equiv. de dicarbonato de di-*t*-butilo en DMF. A continuación, el grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina y se añadieron a la resina 2 equiv. de ácido 4-hidroximetilbenzoico y HBTU/HOBt/DIEA (2:2:4 equiv.). Se acopló Fmoc- β -Ala-OH (5 equiv.) al enlazador Hmb utilizando DIC/DMAP (5,5:0,1 equiv.), y el acoplamiento se repitió dos veces para que la reacción se completara. A continuación, Fmoc-L-Pra-OH, dos Fmoc-(3-Ala-OH, y Fmoc-L-Dap(Alloc)-OH se acoplaron secuencialmente por la química estándar de Fmoc/HBTU. El grupo protector Boc en el péptido codificante se eliminó mediante tratamiento con TFA/agua/triisopropilsilano (95:2,5:2,5) y la amina expuesta se acopló con Fmoc-Arg(Pbf)-OH. La región aleatoria se sintetizó mediante el método de división y agrupación (Lam, KS et al. *Nature*, 1991, 354, 82-84; Houghten, RA et al. *Nature*, 1991, 354, 84-86; Furka, A et al. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, 1991, 37, 487-493; Thakkar, A et al. *ACS Comb. Sci.*, 2013, 15, 120-129; Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 15815-15820) usando 5 equiv. de aminoácidos Fmoc y HATU como agente de acoplamiento. La reacción de acoplamiento se repitió una vez para asegurar una reacción completa en cada etapa. Para diferenciar los aminoácidos isobáricos durante el análisis PED-MS, se añadió el 4% (mol/mol) de CD₃CO₂D a las reacciones de acoplamiento de D-Ala, D-Leu, D-Lys, y Orn, mientras que se añadió el 4% de CH₃CD₂CO₂D a las reacciones de Nle (Thakkar, A et al. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5935-5939). Fmoc-Lys(Mmt)-OH se colocó en el centro de las posiciones aleatorias utilizando HATU/DIPEA (4 y 8 equiv.) para facilitar la formación de compuestos bicíclicos. Después de que se sintetizó la secuencia completa, el grupo Alloc en el residuo Dap C-terminal se eliminó mediante tratamiento con una solución de DCM que contenía tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,25 equiv.) y fenilsilano (5 equiv.) durante 15 min (3x). Las perlas se lavaron secuencialmente con diisopropiletilamina al 0,5% en DMF, dimetilditiocarbamato sódico hidratado al 0,5% en DMF, DMF (3x), DCM (3x), y DMF (3x). La amina libre resultante se acopló a ácido tímico protegido con dialilo usando HATU/DIPEA (5 equiv., 10 equiv.) durante 2 h. Los grupos protectores de alilo en el andamio de ácido trimésico se eliminaron utilizando el mismo procedimiento que se ha descrito para el grupo Alloc. El grupo de lisina Mmt se eliminó utilizando TFA al 2%/triisopropilsilano al 5% en DCM durante 40 min. El grupo Fmoc N-terminal se eliminó después con piperidina al 20% en DMF. Las perlas se lavaron con DMF (6x), HOBt 1 M en DMF (3x), DMF (3x), y DCM (3x). Para la ciclación de péptidos, una solución de PyBOP/HOBt/NMM (5, 5, 10 equiv, respectivamente) en DMF se mezcló con la resina y la mezcla se incubó en un agitador de carrusel durante 3 h. La resina se lavó con DMF (3x) y DCM (3x) y se secó al vacío durante >1 h. La desprotección de la cadena lateral se realizó con reactivo modificado K (fenol al 7,5%, agua al 5%, tioanisol al 5%, etanoditiol al 2,5%, anisol al 1% y triisopropilsilano al 1% en TFA) durante 1 h. La resina se lavó con TFA y DCM y se secó al vacío antes de su almacenamiento a -20 °C.

Selección de bibliotecas. La resina de biblioteca (100 mg) se hinchó en DCM, se lavó abundantemente con DMF, H₂O doblemente destilada, y se incubó en 1 ml de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05% y gelatina al 0,1%) que contenía TNF α biotinilado 800 nM durante una noche a 4 °C. Las perlas se lavaron con el tampón de bloqueo, se suspendieron en 1 ml del tampón de bloqueo complementado con 10 μ l de Dynabeads recubiertas con estreptavidina M280 (Invitrogen) y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las perlas magnéticas se separaron del resto de la resina utilizando un concentrador de partículas magnéticas TA Dynal MPC-1 (Invitrogen). Los eventos del cribado magnético se transfirieron a una columna BioSpin (0,8 ml, BioRad) y se lavaron exhaustivamente con clorhidrato de guanidina 6 M, agua, y el tampón de bloqueo para eliminar las proteínas unidas. La segunda ronda de cribado se realizó incubando los eventos iniciales con TNF α biotinilado 1,5 μ M como se ha descrito anteriormente. Después del lavado con el tampón de bloqueo, las perlas se suspendieron en 1 ml del tampón de bloqueo que contenía estreptavidina-fosfatasa alcalina (1 μ g/ml de concentración final) a 4 °C durante 10 min. Las perlas se lavaron rápidamente con 1 ml del tampón de bloqueo (3x) y 1 ml de un tampón de tinción (Tris 30 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM,

MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 20 µM) (3x). A continuación, se añadió 1 ml del tampón de tinción y 100 µl de una solución madre de BCIP (5 mg/ml) a las perlas y se desarrolló un color turquesa intenso en las perlas positivas en 25 min. Las perlas de color turquesa se eliminaron manualmente bajo un microscopio de disección y se sometieron a una tercera ronda de cribado después de un lavado exhaustivo con PBS, ddH₂O, y clorhidrato de guanidina 8 M. Las perlas resultantes se incubaron durante una noche a 4 °C con TNFα marcado con Texas-red 300 nM en el tampón de bloqueo. Las perlas se observaron bajo un microscopio Olympus SZX12 equipado con un iluminador de fluorescencia (Olympus America, Center Valley, PA) y las perlas intensamente fluorescentes se recolectaron manualmente como resultados positivos.

Etiquetado en perla y liberación de péptidos: Las perlas positivas derivadas de un cribado en perla se agruparon, se lavaron con agua y DMF y se empaparon en 60 µl de una mezcla 1:1 de agua/DMF (v/v). La reacción de etiquetado se inició mediante la adición de 20 µl de soluciones de ácido ascórbico y sulfato de cobre recién preparadas (cada una a 5 mg/ml en agua) y 5 µl de tetrametilrodamina azida en DMSO (10 mM). La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante una noche en la oscuridad. La reacción se terminó mediante un lavado exhaustivo de las perlas con agua/DMF, y las perlas se transfirieron a tubos de microcentrífuga individuales (una perla/tubo) y cada una se trató con 5 µl de una solución 0,1 M de NaOH durante 4 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La solución se neutralizó mediante la adición de 5,5 µl de HCl 0,1 M, se transfirió a un nuevo tubo, se evaporó a sequedad en un concentrador de vacío y se redisolvió en 26 µl de agua destilada doble para generar una solución madre de péptido bicíclico de ~1 µM. Las perlas que contenían los péptidos de codificación lineal se mantuvieron en los tubos originales y se almacenaron para un análisis posterior de PED-MS.

Efecto del péptido bicíclico en la interacción TNFα-TNFR1. El TNFR1 recombinante se adquirió en R&D Systems. La peroxidasa activada EZ-Link Plus, una forma reactiva con amina de HRP, se adquirió en Thermo Scientific. TNFR1 se marcó con HRP combinando 50 µl de TNFR1 (1,0 µM) y 4 µl de HRP (2,7 pNI) en 950 pt, de tampón de Na₂CO₃ (Na₂CO₃ 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 9,0) durante 1 h. El conjugado TNFR1-HRP resultante se trató con NaCNBH₃ para reducir la base de Schiff resultante y se inactivó con 20 µl de etanolamina. Se recubrió una placa Nunc 96F Maxisorp durante una noche con 100 µl de 5 mg/ml de Neutravidina (en Na₂CO₃ 50 mM, pH 9,0) a 4 °C. La solución se eliminó y cada pocillo se lavó con 100 µl del tampón de bloqueo que contenía BSA al 3%. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de TNFα biotinilado 7,5 nM en PBS y se incubaron a 4 °C durante 1 h. Los pocillos se lavaron rápidamente dos veces con un tampón de lavado (Tween 20 al 0,01% en tampón PBS). Se añadieron péptidos de concentraciones variables (50 µl) a los pocillos seguido de la adición de 50 µl de TNFR1-HRP 0,5 nM. Después de la incubación a 4 °C durante 1,5 h, la placa se lavó dos veces con el tampón de lavado y se incubó con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma) durante 30 min. La reacción se interrumpió mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M. La absorbancia a 450 nm se midió y se representó en función de la concentración del péptido y el valor de CI50 se obtuvo mediante ajuste de la curva.

Ensayo MTT. Los fibroblastos WEHI-13VAR (Colección Americana de Cultivos Tipo) se sembraron a una densidad de 5 x 10⁴ células/pocillo en 100 µl de medio de cultivo (FBS al 10% en RPMI 1640) y se dejaron crecer durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5%. TNFα (concentración final de 0,04 ng/ml), concentraciones variables de péptido (0-25 µM) y actinomicina D (1 µg/ml) se mezclaron y se incubaron durante 1 h en la incubadora de CO₂. A continuación, se añadieron 50 µl de la mezcla resultante a cada pocillo y la placa se incubó durante una noche. Se añadieron diez µl de reactivo de etiquetado de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h. Se añadieron cien µl de la solución de solubilización de MTT (Roche) a cada pocillo y la placa se dejó en reposo en la incubadora durante una noche y se midió la absorbancia a 550 nm y se representó en función de la concentración peptídica.

Antagonistas de peptidilo bicíclico del factor de necrosis tumoral-alfa

Diseño y síntesis de biblioteca de péptidos bicíclicos. Los anticuerpos reconocen antígenos específicos utilizando seis pequeños bucles, llamados "regiones determinantes de complementariedad". Al injertar dos o más bucles flexibles en andamios de proteínas, otros investigadores han modificado aglutinantes de proteínas de afinidad y especificidad de tipo anticuerpo (Koide, A et al., *J. Mol. Biol.*, 1998, 284, 1141-1151; Beste, G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 1898-1903; Xu, L.H. et al. *Chem. Biol.*, 2002, 9, 933-942; Rutledge, SE et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14336-14347; Steiner, D et al., *J. Mol. Biol.*, 2008, 382, 1211-1227). La visualización de bucles peptídicos o peptidomiméticos en andamios de moléculas pequeñas también puede generar moléculas que rivalizan con los anticuerpos para la afinidad y especificidad de unión. Para desarrollar inhibidores contra los PPI, se eligió una estructura plana como el andamio, con el fin de maximizar el área de superficie de las moléculas resultantes y, por lo tanto, su capacidad para interactuar con las superficies de proteínas planas. Para ensayar la validez de este enfoque, se diseñó una biblioteca de péptidos bicíclicos "envolviendo" una secuencia peptídica de 6-10 residuos aleatorios alrededor de un grupo trimesoilo (Figura 1). La ciclación peptídica fue mediada por la formación de tres enlaces amida entre el ácido trimésico y la amina N-terminal, la cadena lateral de un ácido L-2,3-diaminopropiónico C-terminal (Dap), y la cadena lateral de una lisina fija dentro de la región aleatoria. Los péptidos bicíclicos resultantes contenían 3-5 residuos aleatorios en cada anillo. La secuencia aleatoria se construyó con un conjunto de 25 aminoácidos seleccionado basándose en función de su diversidad estructural, estabilidad metabólica y disponibilidad comercial. Incluía 10 α-L-aminoácidos proteinogénicos [Ala, Arg, Asp, Gln, Gli, His, Ile, Ser, Trp, y Tyr], 5 α-L-aminoácidos no proteinogénicos [L-4-fluorofenilalanina (Fpa), L-norleucina (Nle), L-ornitina (Orn) y L-fenilglicina (Phg)], y 10 α-D-aminoácidos [D-2-naftilalanina (D-Nal), D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Feu, D-Fys, D-Phe, D-Pro, D-Thr, y D-Val]. Esta biblioteca tiene una

diversidad teórica de $1,0 \times 10^4$. En la práctica, el tamaño de la biblioteca está limitado por la cantidad de resina empleada y, típicamente, del orden de 10^7 (infra). Aunque la diversidad real representa solo una fracción muy pequeña de todas las estructuras posibles, los compuestos de la biblioteca pueden muestrear un gran espacio estructural. Una vez que se identifica un compuesto activo, su afinidad y especificidad por la diana deseada se puede mejorar sintetizando y cribando una biblioteca de segunda generación que contenía los análogos del evento inicial. Para maximizar el espacio estructural mientras se mantiene el peso molecular al mínimo (por ejemplo, <2000), se concluyó que además de los 20 aminoácidos proteínogénicos, también pueden emplearse aminoácidos no naturales y componentes básicos potencialmente no peptídicos y dichas bibliotecas de compuestos pueden prepararse más convenientemente mediante síntesis química.

El principal desafío asociado con el cribado de bibliotecas de péptidos bicíclicos sintetizados químicamente es la determinación estructural de los compuestos acertados; todavía no se dispone de una metodología para secuenciar directamente los péptidos bicíclicos derivados de bibliotecas combinatorias. Para superar esta dificultad, la biblioteca de péptidos bicíclicos se sintetizó en el formato de compuesto de dos perlas (Joo, SH et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 13000-13009; Liu, T et al. *ACS Comb. Sci.*, 2011, 13, 537-546) en 2,0 g de micropérlas TentaGel (90 μ m, $2,86 \times 10^6$ perlas/g, ~ 100 pmol de péptido/perla). Cada perla de biblioteca se segregó topológicamente en dos capas diferentes, mostrando la capa externa un péptido bicíclico único y conteniendo la capa interna el péptido lineal correspondiente como una etiqueta codificante. Para segregar espacialmente las perlas, la resina TentaGel se empapó en agua, se drenó y se suspendió rápidamente en 1:1 (v/v) de DCM/Et₂O que contenía 0,5 equivalentes de N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) (Liu, R et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 7678-7680). Debido a que el disolvente orgánico es inmiscible con agua, solo los péptidos en la superficie de las perlas se expusieron a y reaccionaron con Fmoc-OSu. Las perlas se lavaron con DMF y las aminas N-terminales libres restantes dentro de las perlas se protegieron con un grupo Boc. Después de la eliminación del grupo Fmoc, se añadió un enlazador de ácido p-hidroximetilbenzoico (Hmb) (para la liberación selectiva del péptido bicíclico), seguido de la adición de β -Ala, L-propargilglicina (Pra), dos β -Ala, y Fmoc-L-Dap(Alloc)-OH. El residuo de Pra sirve como un identificador para el etiquetado selectivo del péptido bicíclico a través de la química de clic (vide infra). El residuo Dap permite la unión del péptido bicíclico al soporte sólido, así como proporcionar una cadena lateral para la ciclación peptídica. El grupo Boc N-terminal se eliminó después de los péptidos internos mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) y se añadió un residuo de arginina para proporcionar una carga positiva fija, que facilita la posterior secuenciación de péptidos por espectrometría de masas. La región aleatoria se sintetizó mediante el método de división y agrupación (Lam, KS et al. *Nature*, 1991, 354, 82-84; Houghten, RA et al. *Nature*, 1991, 354, 84-86; Furka, A et al. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, 1991, 37, 487-493) y se añadió una lisina protegida con N $^{\epsilon}$ -4-metoxitritilo (Mmt) en el medio de la secuencia aleatoria para proporcionar una amina de cadena lateral para la ciclación de péptidos. Después de completar la síntesis del péptido lineal, el grupo Mmt se eliminó utilizando TFA al 2% en DCM y se reemplazó con un grupo Fmoc (el grupo Mmt se eliminó parcialmente durante la desprotección del grupo Alloc). El grupo Alloc en el Dap C-terminal se eliminó mediante tratamiento con Pd(PPh₃)₄ y la amina de la cadena lateral expuesta se aciló con ácido dialil-trimésico. Por último, se eliminaron los grupos protectores alilo (en el resto de timesilo) y Fmoc (en el extremo N-terminal y la cadena lateral de lisina) y los péptidos de superficie se ciclaron mediante tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP). Los péptidos en el interior de las perlas no se vieron afectados por el procedimiento de ciclación debido a la falta del residuo Dap y permanecieron en forma lineal para servir como etiquetas codificantes. Se ha de tener en cuenta que las dianas macromoleculares (por ejemplo, las proteínas) no pueden difundirse en el interior de las perlas y, por lo tanto, los péptidos de codificación lineal no interfieren con el cribado de bibliotecas. La simetría de la unidad de trimesoilo aseguró que se formó un único producto bicíclico en cada perla.

Para evaluar la calidad de la biblioteca bicíclica, se seleccionaron aleatoriamente 10 perlas para el análisis de MS. El péptido en cada perla se liberó por escisión de CNBr después de la metionina C-terminal y se analizó mediante MALDI-TOF EM. Para cada una de las 10 perlas, los péptidos liberados mostraron dos picos separados por 528 unidades de masa, como se esperaba para la diferencia de masa molecular entre la secuencia de codificación lineal (m/z M) y el péptido bicíclico correspondiente (m/z M + 528) (Figura 6). Estudios anteriores han demostrado que la ciclación en resina de péptidos hexa y más largos con PyBOP es esencialmente cuantitativa para el 799,96% de las secuencias (Joo, SH et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 13000-13009; Thakkar, A et al. *ACS Comb. Sci.*, 2013, 15, 120-129).

Cribado de bibliotecas contra TNF α . La biblioteca de péptidos bicíclicos se sometió a cuatro rondas de cribado frente a TNF α . TNF α se expresó en *Escherichia coli* como una fusión a una etiqueta ybbR N-terminal (MVLDSLEFIASKL; SEQ ID NO.: 66) y se marcó específicamente en la etiqueta ybbR con un una biotina o colorante fluorescente usando fosfopantenotil transferasa Sfp (Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 15815-15820). Durante la primera ronda, se incubaron 100 mg de la biblioteca de péptidos bicíclicos ($\sim 3 \times 10^5$ perlas) con TNF α biotinilado (0,8 μ M) y partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las perlas magnéticas (positivas) resultantes (~ 400 perlas) se separaron del resto de perlas de la biblioteca aplicando un campo magnético a la pared del recipiente; las perlas positivas fueron atraídas hacia la pared, mientras que las perlas negativas se asentaron en el fondo del recipiente (clasificación magnética) (Kodadek, T y Bachhawat-Sikder, K. *Mol. BioSyst.*, 2006, 2, 25-35; Hu, BH et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 7275-7285). Las ~ 400 perlas se lavaron, se incubaron de nuevo con el TNF α biotinilado (1,5 μ M) y se sometieron a una segunda ronda de cribado utilizando un ensayo ligado a enzimas en perla y un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP) (Sweeney, MC et al. *Biochemistry*, 2005, 44, 14932-14947). La unión de TNF α a una perla recluta SA-AP a la superficie de las perlas y tras la adición de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), produce un precipitado de color turquesa en esa perla. Este procedimiento dio como resultado 150 perlas de

color turquesa intenso, que se aislaron manualmente usando una micropipeta con la ayuda de un microscopio de disección y se lavaron exhaustivamente para eliminar las proteínas unidas y las moléculas de colorante. Durante la tercera ronda de cribado, las 150 perlas se incubaron con TNF α marcado con Texas-rojo (0,3 μ M) y las 44 perlas más fluorescentes se aislaron manualmente bajo un microscopio de fluorescencia.

Por último, los 44 eventos derivados de los ensayos en perla anteriores se ensayaron individualmente para determinar la unión a TNF α en solución por polarización de fluorescencia (FA) (cuarta ronda) (Liu, T et al. *ACS Comb. Sci.*, 2011, 13, 537-546; Hintersteiner, M et al. *Chem. Biol.*, 2009, 16, 724-735). Por lo tanto, las 44 perlas se trataron con tetrametilrodamina (TMR) azida en presencia de Cu (I), dando como resultado un etiquetado selectivo de los péptidos bicíclicos en el residuo de Pra (Figura 2a). Después, las perlas se colocaron luego en tubos de microcentrífuga individuales (1 perla/tubo) y el péptido bicíclico marcado con TMR se liberó de cada perla por tratamiento con NaOH 0,1 M, que hidrolizó selectivamente el enlace éster Hmb asociado con el péptido bicíclico. Después de la neutralización y la evaporación del disolvente, el péptido bicíclico liberado de cada perla se disolvió en agua para dar una solución madre de $\sim$ 1 μ M. Las mediciones de FA también se realizaron en dos etapas. Durante la etapa inicial, cada uno de los 44 péptidos bicíclicos (100 nM) se incubó con una concentración única de TNF α (5 μ M) y se midió el aumento de la anisotropía en relación con el control (sin TNF α). De los 44 péptidos, 12 mostraron un aumento de $>15\%$ (Figura 2b). Estos 12 péptidos bicíclicos se analizaron adicionalmente a concentraciones variables de TNF α (0-18 μ M) para generar una curva de unión completa para cada péptido, a partir de la cual se calculó una constante de disociación (K_D). Se obtuvieron curvas de unión completas para 6 de los 12 péptidos bicíclicos (perlas N.º 1, 16, 22, 24, 36, y 41) y sus valores de K_D variaron de 0,8 a 7,8 μ M (Figura 7). No se observó una unión significativa a TNF α para los péptidos bicíclicos liberados de las otras 6 perlas (N.º 18, 19, 28, 29, 31 y 44). A continuación, para los 6 péptidos bicíclicos que mostraron una unión significativa al TNF α , las perlas correspondientes que contenían los péptidos codificantes lineales se recuperaron de los tubos de microcentrífuga y se sometieron a un análisis de espectrometría de masas de degradación de Edman (PED-MS) (Thakkar, A et al. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5935-5939). Dos de las perlas (eventos N.º 1 y 36) produjeron espectros de masas de calidad suficiente, a partir de los cuales se obtuvieron secuencias completas e inequívocas de biciclo(Phg-Tyr-D-Ala-Lys-Tyr-D-Phe-Gly-D-Lys-His-Dap; SEQ ID NO.: 67) y biciclo(Ala-D-Phe-Trp-D-Thr-Gln-Lys-Nle-D-Leu-Ala-His-Dap; SEQ ID NO. 68) (Figura 3a y Figura 8). Estos compuestos se denominan Necrostatina C1 y C2 a partir de entonces, respectivamente.

El hecho de que solo un número relativamente pequeño de eventos derivados del cribado en perla (6 de las 44 perlas) tuvo una fuerte unión al TNF α en solución sugiere que muchos de los eventos iniciales fueron falsos positivos o aglutinantes débiles, un problema común asociado con el cribado en perla que probablemente es causado por las altas densidades de aglutinantes en las perlas ($\sim$ 100 mM) y las interacciones multidentadas (es decir, la interacción simultánea de una única molécula de TNF α con dos o más péptidos bicíclicos unidos a la resina) (Chen, X et al. *J. Comb. Chem.*, 2009, 11, 604-611). Los falsos negativos también son posibles debido a ciertas dificultades técnicas (por ejemplo, escasa solubilidad acuosa, liberación ineficaz de la resina por medio de NaOH 0,1 M debido a la fuerte unión a la resina TentaGel y/o fuerte unión de un péptido bicíclico a la albúmina de suero bovino que estaba presente en todos los ensayos de FA). Esto resalta la importancia de este diseño de biblioteca, que permite la liberación selectiva del péptido bicíclico y, por lo tanto, el análisis de unión en fase de solución y evita la necesidad de resintetizar individualmente los 44 eventos iniciales.

Afinidad y especificidad de unión para TNF α . Para confirmar su afinidad y especificidad de unión para TNF α , Necrostatina C1, C2, y las variantes lineales y monocíclicas de Necrostatina C1 se volvieron a sintetizar con una etiqueta de isotiocianato de fluoresceína (FITC) unida al residuo Dap (a través de un enlazador de lisina) (Figura 9), se purificaron por HPLC y se ensayaron frente a TNF α mediante análisis de FA. La Necrostatina C1 y C2 se unieron a TNF α con valores de K_D de 0,45 y 1,9 μ M, respectivamente (Figura 3b). Estos valores de K_D son algo diferentes de los derivados del análisis de FA de una sola perla (Figura 7), probablemente debido a las impurezas presentes en las muestras peptídicas derivadas de perlas y la concentración de péptidos menor a la esperada que hizo que los resultados del análisis de una sola perla fueran menos fiables. La variante lineal C1 solo mostró una unión débil a TNF α ($K_D >10$ μ M), mientras que el péptido monocíclico no mostró una afinidad de unión significativa (Figura 9). Biciclo(Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Dap-Ser-D-Val-Pro-pTyr-His-Dap; SEQ ID NO.: 69), un péptido de control seleccionado arbitrariamente de otra biblioteca (no relacionado con TNF α), también se probó y no tuvo una unión detectable a TNF α (Figura 9). Estos resultados demuestran que tanto la secuencia peptídica como la estructura bicíclica global pueden desempeñar un papel en la unión a la proteína diana. Presumiblemente, el andamio bicíclico puede restringir la secuencia peptídica a una o más conformaciones que son inaccesibles energéticamente por el péptido lineal o monocíclico. Para determinar si la Necrostatina C1 y C2 son ligandos específicos de TNF α , se analizaron para determinar su unión a otras cinco proteínas de diversas estructuras y funciones, incluida la albúmina sérica bovina (BSA), un dominio de fusión glutatión-S-transferasa-PLC7 (GST). SH2), proteína fosfatasa PTP1B, proteína de la cápside del VIH y una proteína de fusión de dominio GST-BRCT. La Necrostatina C1 mostró una unión débil a BSA ($K_D \sim 34$ μ M), pero no a ninguna de las demás proteínas, mientras que la Necrostatina C2 fue menos selectiva y mostró afinidades variables a las proteínas BSA, GST-SH2, y PTP1B ($K_D = 3,0-37$ μ M; Figura 10). Finalmente, la Necrostatina C2 (sin marcar) inhibió la unión de Necrostatina C1 y C2 marcada con FITC a TNF α de una manera dependiente de la concentración (valores de CI_{50} de ~ 4 y ~ 2 μ M, respectivamente) (Figura 11), lo que sugiere que ambos compuestos se unen al mismo sitio (o por superposición) en TNF α . Cabe señalar que la afinidad de unión intermedia a las proteínas séricas puede tener beneficios terapéuticos, ya que aumenta considerablemente

el tiempo de residencia del agente terapéutico en circulación (Liu, X et al. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, 11, 450-466). Debido a su mayor afinidad y especificidad por TNF α , se seleccionó la Necrostatina C1 para otros ensayos biológicos.

Inhibición de la interacción del receptor de TNF α -TNF por Necrostatina C1. La señalización de TNF α comienza con la unión del trímero de TNF α al dominio extracelular de TNFR1, lo que desencadena la liberación de la proteína inhibitoria, el silenciador de los dominios de muerte (SODD), del dominio intracelular de TNFR1 (Chen, G y Goeddel, DV. *Science*, 2002, 296, 1634-1635). Para probar si la Necrostatina C1 inhibe la interacción entre TNF α y TNFR1, se inmovilizó TNF α biotinilado en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta de Neutravidina. La placa se incubó con TNFR1 conjugado con peroxidasa de rábano picante 0,5 nM (HRP) en presencia de concentraciones variables de Necrostatina C1. Después del lavado, la cantidad de HRP-TNFR1 unida a cada pocillo se cuantificó mediante ELISA utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de HRP, que se convirtió en 3,3',5,5'-tetrametilbencidina diimina por HRP que da como resultado una absorbancia a 450 nm (Martin, TL et al. *J. Histochem. Cytochem.*, 1984, 32, 793). La necrostatina C1 inhibió la interacción TNF α -TNFR1 de una manera dependiente de la concentración, con un valor de CI de $3,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Figura 4).

La Necrostatina C1 protege a las células de la apoptosis inducida por TNF α . La capacidad de la Necrostatina C1 para proteger las células contra la muerte celular inducida por TNF α se ensayó con fibroblastos WEHI-13VAR cultivados, que son altamente sensibles a TNF α en presencia de actinomicina-D (intervalo de LD₅₀: 0,005-0,065 ng/ml) (Khabar, KS et al. *Immunol. Lett.*, 1995, 46, 107-110). Las células WEHI-13VAR se trataron con una concentración fija de TNF α (0,04 ng/ml) y concentraciones variables de Necrostatina C1 (0-25 μM) y la fracción de células vivas se cuantificó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La Necrostatina C1 protegió a las células de la muerte celular inducida por TNF α de una manera dependiente de la concentración, mientras que los péptidos monocíclicos y lineales correspondientes no lo hicieron (Figura 5). El péptido bicíclico de control, biciclo(Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Dap-Ser-D-Val-Pro-pTyr-His-Dap; SEQ ID NO.: 70), que no se une a TNF α , no tenía efecto protector. El ensayo de MTT también se realizó a una concentración fija de Necrostatina C1 (50 μM) pero con concentraciones variables de TNF α (0-250 ng/ml). En condiciones de ensayo, TNF α mostró exhibió un valor de LD₅₀ de 0,46 ng/ml en ausencia de inhibidor de TNF α ; en presencia de Necrostatina C1 50 μM , el valor de LD₅₀ se cambió a 1,8 ng/ml (Figura 12). En conjunto, estos datos sugieren que la Necrostatina C1 se une a TNF α en o cerca de la interfaz TNF α -TNFR1.

Conclusiones. En conclusión, se divulga en el presente documento una metodología para la síntesis química y el cribado de grandes bibliotecas combinatorias de péptidos bicíclicos contra dianas macromoleculares de importancia biomédica. En comparación con los métodos descritos previamente para la síntesis de bibliotecas de péptidos bicíclicos (Sun, Y et al. *Org. Lett.*, 2001, 3, 1681-1684; Virta, P y Lonnberg, HJ. *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 8534; Hennis, C et al. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 502-507; Chen, S et al. *ChemBioChem.*, 2012, 13, 1032-1038; Sako, Y et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 7232-7234; Timmerman, P et al., *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 34126-34134), la mayoría de los cuales implican la síntesis de péptidos ribosómicos seguida de ciclación química, los métodos divulgados tienen la ventaja de que permiten la incorporación de cualquier aminoácido no natural o componentes básicos no peptídicos, lo que da como resultado una mayor diversidad estructural y mejora la estabilidad metabólica de los péptidos cíclicos. Además, la síntesis química permite el uso de grupos protectores ortogonales, lo que a su vez permite que más condiciones de reacción "forzadas" lleven a cabo la reacción de ciclación deseada y pueden evitar que tenga lugar cualquier reacción de ciclación no deseada. También se demostró que los péptidos bicíclicos, tales como los compuestos divulgados en el presente documento, que contienen un andamio plano son capaces de unirse a superficies de proteínas planas, tales como las interfaces PPI. Con un valor K_D de 0,45 μM , la Necrostatina C1 es el inhibidor de TNF α no proteico más potente informado hasta la fecha. La metodología de la biblioteca bicíclica que se describe aquí debe ser aplicable a otras proteínas y dianas de ácido nucleico.

Ejemplo 2

Ligandos de péptidos bicíclicos contra K-Ras

Se seleccionaron aproximadamente 300 mg de la biblioteca bicíclica frente a K-Ras biotinilado o marcado con fluorescencia en 4 rondas, como se describe para TNF α . Este cribado produjo 130 eventos iniciales después de la tercera ronda (cribado contra K-Ras etiquetado con Texas-red). El análisis de FA a una concentración única de péptido (~100 nM) y proteína K-Ras (5 mM) mostró que 8 eventos produjeron aumentos de FA de $\geq 25\%$. Estos 8 eventos se sometieron a un análisis de la curva de unión completa utilizando un péptido 50 nM y K-Ras 0-20 μM . Seis mostraron una unión significativa en la fase de solución y sus perlas correspondientes se secuenciaron por PED-MS. Las secuencias completas se obtuvieron para los eventos n.º 38, N.º 28, N.º 13, n.º 82 y n.º 105 (Tabla 4). El evento resintetizado n.º 13 no mostró una unión significativa, mientras que 28 resintetizado mostró una unión débil (K_D >5 μM).

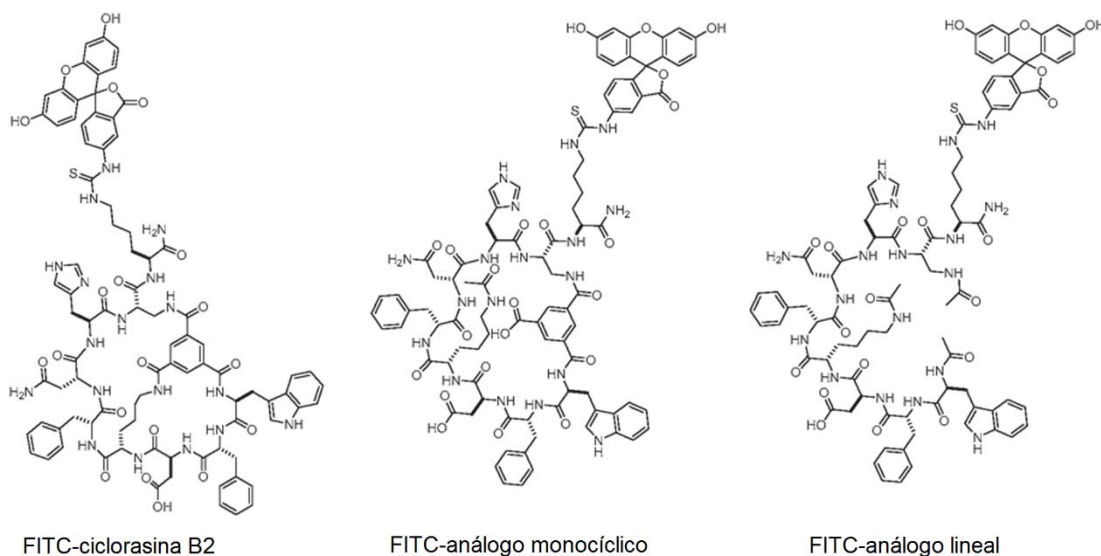
Tabla 4. Afinidades de unión de eventos de la biblioteca.

Evento N.º	Secuencia ^a	SEQ ID NO.	Afinidad de unión a partir de análisis de perla única (K_D , μM)	K_D de péptido resintetizado (μM)
13	Gln-Gln-val-Asp-Lys-Fpa-phe-nal-ala-Gly-Dap	94	$5,1 \pm 1,8\text{NA}$	NA
28	Tyr-nal-leu-Lys-ala-Gln-Ala-Gly-Ser-Dap	95	$3,2 \pm 1,6$	$6,8 \pm 4,5$
38	Trp-phc-Asp-Lys-phe-asn-His-Dap	71	$2,6 \pm 0,6$	$0,49 \pm 0,08$
82	nal-Ser-Gln-nal-Phg-Lys-phe-Arg-val-Arg-Dap	72	$3,3 \pm 1,1$	$2,1 \pm 0,9$
105A	Arg-Arg-nal-Arg-Fpa-Lys-phe-glu-Gly-Dap	73	ND	$1,4 \pm 0,4$
105B	Orn-Arg-nal-Arg-Fpa-Lys-phe-glu-Gly-Dap	74	$0,052 \pm 0,020$	$2,6 \pm 1,3$

^aLos códigos de tres letras para los L-aminoácidos tienen la primera letra en mayúscula, mientras que los de los D-aminoácidos tienen letras minúsculas. NA, sin actividad de unión significativa; ND, no determinado.

Los péptidos bicíclicos 13, 28, 38, 82 y 105 se resintetizaron, se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una Lys C-terminal añadida (Figura 22a y Esquema 1), y se analizaron para determinar la unión a K-Ras mediante FA.

Esquema 1



- 10 Los péptidos 28, 38, 82 y 105 se unieron a K-Ras recombinante con valores de K_D de 6,3, 0,49, 2,1 y 2,6 μM (Figura 22b y Tabla 4) y se denominaron "ciclorasina B1-4" (para inhibidor dicíclico de *ras cíclico*), respectivamente. El péptido 13 no mostró una unión significativa a K-Ras. La discrepancia entre las afinidades de unión derivadas del análisis de una sola perla y las determinadas con péptidos resintetizados y purificados pueden ser causadas por las impurezas presentes en las muestras de péptidos liberadas de las perlas individuales (por ejemplo, péptidos truncados), que
- 15 pueden interferir con la unión del péptido bicíclico con K-ras. Se seleccionó ciclorasina B2-4 para una caracterización adicional debido a sus potencias relativamente altas.

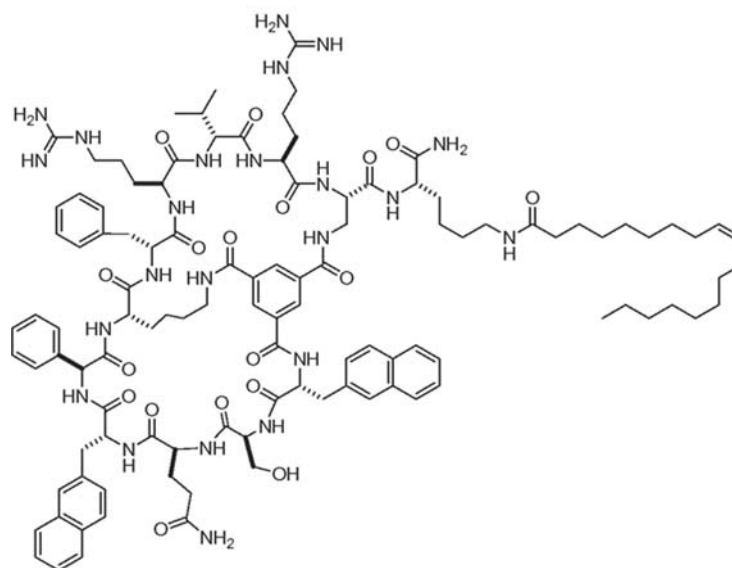
- La capacidad de la ciclorasina B2-4 para bloquear las interacciones Ras-efector se evaluó primero mediante un ensayo cualitativo de unión de perlas (Wu, *et al.*, *Med. Chem. Commun.* 2013, 4, 378-382). En resumen, se inmovilizó GST-Raf en perlas de glutatión y se incubó con proteína Ras marcada con Texas-red; la unión de la proteína Ras a la Raf inmovilizada hizo que las perlas se volvieran intensamente rojas (Figura 23a). Sin embargo, la interacción Ras-Raf se eliminó completamente en presencia de ciclorasina B3 o B4 10 μM (Figura 23b), pero no ciclorasina B2. La potencia para la inhibición de la interacción Ras-Raf se determinó a continuación mediante un ensayo de fluorescencia de tiempo resuelto homogéneo (HTRF) (Leyris, J. P. et al. *Anal. Biochem.* 2011, 408, 253-262), dando un valor de CI_{50}
- 20 de $\sim 1,4 \mu\text{M}$ para ciclorasina B3 (Figura 23c). Ciclorasina B2 de nuevo no mostró inhibición. El ensayo de HTRF no tuvo éxito para la ciclorasina B4 debido a la agregación y la precipitación de B4 en concentraciones más altas. La capacidad de la ciclorasina B2-4 para competir con el dominio de unión a Ras (RBD) de Raf (GST-Raf RBD) y el
- 25

compuesto 12, el inhibidor monocíclico de K-Ras que se indicó previamente, se examinó para determinar la unión a K-Ras utilizando un ensayo de competición basado en FA. La adición de GST-Raf RBD (Figura 23d) o compuesto 12 (Figura 23e) inhibió la unión de la ciclorasina B3 marcada con FITC a K-Ras de una manera dependiente de la concentración. El compuesto 12 también abolió la unión de la ciclorasina B4 pero no de B2 a K-Ras. Estos resultados sugieren que, como el compuesto 12, la ciclorasina B3 y B4 se unen a uno o más sitios en o cerca de la interfaz de Ras-Raf, mientras que la ciclorasina B2 se une a un sitio diferente de la interfaz de Ras-Raf.

Para evaluar la especificidad de la ciclorasina B2-4 para K-Ras, se examinó la capacidad de la ciclorasina B2-4 para autocompetir por la unión a K-Ras y para unirse a otras proteínas. La adición de ciclorasina B2 sin marcar inhibió la unión de B2 marcada con FITC a K-Ras de una manera dependiente de la concentración. Asimismo, la ciclorasina B4 sin marcar inhibió la unión de B4 marcada con FITC a K-Ras. Estos resultados apoyan adicionalmente la idea de que la ciclorasina B2-4 se une a un sitio específico en K-Ras. Para determinar si la estructura bicíclica es importante para la unión a K-Ras, se sintetizaron los homólogos monocíclicos y lineales de la ciclorasina B2 (Figura S3) y se midió su afinidad de unión por K-Ras. Los péptidos monocíclicos y lineales se unieron a K-Ras con valores de K_D de 7,4 y 58 μM , o una afinidad de 15 y 120 veces más baja que la ciclorasina B2, respectivamente (Figura 22b). Por lo tanto, tanto la estructura bicíclica como la secuencia de aminoácidos son necesarias para la unión de alta afinidad a K-Ras. Para probar si los péptidos cíclicos tienen alguna selectividad para la forma activa de señalización de Ras, K-Ras se cargó específicamente con GTP, GDP o GPPNP (un análogo de GTP). La ciclorasina B2 se unió a las tres formas de Ras esencialmente con la misma afinidad ($K_D = 0,49, 0,64$ y $0,76 \mu\text{M}$, respectivamente) (Figura 22d). Por el contrario, la ciclorasina B3 se unió a Ras-GTP y Ras-GPPNP con una afinidad aproximadamente 8 veces más alta que Ras-GDP (valores de K_D de 1,2, 1,6 y $9,3 \mu\text{M}$, respectivamente) (Figura 22e). Finalmente, se analizó la unión de ciclorasina B2 y B3 a cinco proteínas seleccionadas arbitrariamente, incluida la albúmina sérica bovina (BSA), la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), la proteína de fusión del dominio GST-SHD SH2, la fusión del dominio proteína de unión a la maltosa-XIAP BIR3 (MBP-BIR3), y la proteína de fusión GST-FKBP12. La ciclorasina B2 es un ligando selectivo de K-Ras, que muestra una unión débil a las proteínas BSA, GST-SHD SH2, y MBP-BIR3 ($K_D = 23-57 \mu\text{M}$, que son 47-120 veces más altas que las de K-Ras), pero sin unión a PTP1B o GST-FKBP12 (Figura S5). La ciclorasina B3 es algo menos selectiva que la ciclorasina B2 y está unida a MBP-BIR3 y BSA con valores de K_D de 16 y $17 \mu\text{M}$, respectivamente, y muy débilmente a PTP1B, GST-SHD SH2, y GST-FKBP12.

Se analizó la inhibición de la proliferación celular de ciclorasina B2-B4 mediante el ensayo MTT. Ninguno de los compuestos mostró un efecto significativo sobre la proliferación de células cancerosas cultivadas hasta una concentración de $50 \mu\text{M}$, debido a la mala permeabilidad de la membrana de los péptidos cíclicos (según lo determinado por microscopía confocal de células tratadas con péptidos marcados con FITC). Cuando se une a un grupo de ácido oleico para mejorar su permeabilidad de membrana (Esquema II), la ciclorasina B3 mostró una actividad antiproliferativa moderada contra las células de cáncer de pulmón H358 (Figura 23f).

Esquema II

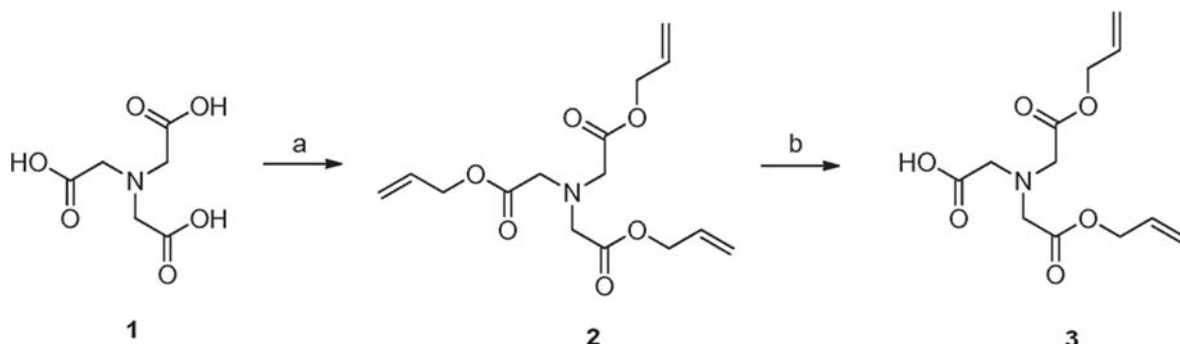


Ciclorasina B3 conjugada con ácido oleico

La conjugación de ciclorasina B2 a un ácido graso o péptido que penetra en las células (Arg₁₁) no confirió ninguna actividad celular.

Ejemplo 3

Síntesis de ácido dialil nitrilotriacético



Síntesis de [2]. En un matraz de fondo redondo secado a la llama de 25 ml se añadió 1 (ácido nitrilotriacético, 1,00 g, 5,24 mmol, 1,0 equiv.) y alcohol alílico (10 ml). Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (2 ml, 26,18 mmol, 5,0 equiv.) a 0°C, seguido de DMF (40 µl, 0,524, 0,1 equiv.). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente antes de calentarse a 75 °C durante una noche. La reacción se concentró a presión reducida y se añadieron agua (10 ml) y DCM (10 ml). La capa orgánica se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio (1x) y luego se extrajo con DCM (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron para producir 2 cuantitativamente.

Síntesis de [3]. Al residuo en bruto de 2 se le añadieron THF (10 ml), KOH (0,264 g, 4,7 mmol, 0,9 equiv.) y alcohol alílico (6 ml). La mezcla se dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, y después se concentró a presión reducida. Después, se extrajo con alcohol isopropílico (3x), y los extractos se combinaron, se filtraron y se concentraron para producir una mezcla de 2 y 3 (~60% 3 por RMN).

Ejemplo 4

Diseño de biblioteca de péptidos

Se diseñó una biblioteca de péptidos bicíclicos (biblioteca I) en forma de Fmoc-NH-X₅-Lys(Mtt)-(transportador de membrana)-Dap(Aloc)-BBM-Resina (donde B es β-alanina) utilizando una estrategia publicada previamente (Figura 13). El anillo C-terminal contiene una secuencia transportadora de membrana en dos direcciones (Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg or Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe) mientras que el anillo N-terminal contiene los aminoácidos aleatorios. Para facilitar la unión de una pequeña molécula a la biblioteca a través de la química de clic, se incorporó propargilglicina (Pra) en la región aleatoria. La cantidad de Pra en cada perla se redujo en 10 veces al co-acoplar Fmoc-Pra-OH con un aminoácido inerte (Fmoc-Lys(Ac)-OH) en una relación del 10% de Pra al 90% de Lys(Ac). El residuo de Lys(Ac) sirve convenientemente como codificador para la secuenciación después de que el residuo de Pra se modificó por química de clic. En cada posición aleatoria, el 20% de la biblioteca se separó y se acopló con Pra/Lys(Ac). El 80% restante de la biblioteca se dividió por igual en 25 vasos y se acopló con un aminoácido del conjunto de 25 aminoácidos, que incluye 10 aminoácidos proteinogénicos (Ala, Asp, Gli, His, Ile, Gln, Arg, Ser, Trp, Tyr), 9 D-aminoácidos (ala, glu, phe, lys, leu, asn, pro, thr, val), y 6 aminoácidos no naturales (L-Abu (Cys reemplazado), L-Nle (Met reemplazado), L-Phg, L-Fpa, D-Nal, L-Orn) (Figura 14).

La biblioteca se sintetizó en una resina TentaGel de 90 µm, comenzando con la adición del enlazador BBM utilizando química estándar de Fmoc/HBTU. La segregación espacial de las perlas en dos capas se logró empapando las perlas en agua durante una noche, seguido de tratamiento con 0,5 equiv. de Fmoc-OSu en 1:1 (v/v) de CH₂Cl₂/Et₂O. Las aminas N-terminales restantes (~50%) en el interior de las perlas se taparon con anhídrido de Boc. La posterior eliminación del grupo Fmoc en la capa externa, seguido del acoplamiento con Fmoc-Dap(Aloc)-OH aseguró que solo la capa externa pueda experimentar una biciclización. Después de la eliminación de los grupos Boc y Fmoc, las perlas se dividieron en dos porciones iguales y la secuencia del transportador de membrana se acopló en dos direcciones opuestas (Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg or Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe). Las perlas se agruparon y se acoplaron con Fmoc-Lys(Mtt)-OH. En cada posición aleatoria, el 20% de las perlas se acoplaron con 9:1 de Fmoc-Lys(Ac)-OH/Fmoc-Pra-OH mientras que el 80% restante se dividió y se acopló con uno de los 25 aminoácidos.

Para facilitar la incorporación de una molécula pequeña y la biciclización, el grupo protector Mtt se eliminó por TFA al 2% en DCM, y la cadena lateral de Lys expuesta se protegió mediante tratamiento con Fmoc-OSu. Después de la eliminación del grupo Aloc en la cadena lateral de Dap, las perlas se trataron con la azida apropiada (80 - 100 mM), CuSO₄ 25 mM y ácido ascórbico 25 mM en 8:1:1 de DMF/H₂O/alcohol t-butilico durante una noche (química de clic). Después del lavado para eliminar los reactivos de la química de clic, se acopló ácido trimésico a la cadena lateral de Dap usando HATU como reactivo de acoplamiento. La eliminación de los grupos Fmoc con piperidina y el tratamiento

con pyBOP/HOBt/NMM proporcionaron los péptidos bicíclicos que contenían el "grupo principal" de moléculas pequeñas en los residuos de Pra (Figura 15).

Selección y síntesis de sonda de molécula pequeña

Se ha informado que varias moléculas pequeñas se unen a K-Ras con baja afinidad. Entre ellos, el 4,6-dicloro-2-metil-3-aminoetil-indol (DCAI) es atractivo debido a su bajo peso molecular, relativamente buena afinidad de unión a K-Ras (1,1 mM) y disponibilidad comercial. La estructura de cocrystal de DCAI con K-Ras reveló que la porción de indol se une a un bolsillo en la superficie de K-Ras, mientras que la alquilamina solo tiene una interacción mínima con la proteína. Esto proporciona una posición conveniente para la unión a péptidos bicíclicos a través de la primera conversión de la amina a azida y la posterior química de clic con el grupo alquino de los residuos de Pra. El DCAI se convirtió en la azida correspondiente usando clorhidrato de imidazol-1-sulfonil azida como reactivo de transferencia diazo (Figura 16).

Estrategia de cribado y resultados

La proteína K-Ras G12V marcada con GST se purificó y se marcó con biotina. Una reacción de cribado típica consistió en incubar 100 mg de la resina de la biblioteca (~300.000 perlas) con el K-Ras biotinilado durante una noche. Después del lavado, las perlas se trataron con estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP), seguido de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP). La unión de K-Ras a una perla recluta SA-AP para las perlas (a través de la unión a biotina por estreptavidina). Después de la desfosforilación por fosfatasa alcalina, el producto indolilo se dimeriza en el aire para formar un color turquesa en las perlas positivas. Las perlas coloreadas se seleccionaron bajo un microscopio y se sometieron a secuenciación por PED/MS.

El cribado de 100 mg de la biblioteca bicíclica marcada con DCAI frente a K-Ras biotinilado (300 nM) produjo 21 eventos, dando como resultado 13 secuencias completas después del análisis de PED/MS (Figura 20). Las secuencias revelaron varias tendencias. La secuencia del transportador se prefiere en la orientación directa (Phe-Nal-Arg-Arg-Arg), conteniendo 12 de los 13 eventos este motivo. Se prefiere el residuo Pra/lys(Ac) (Z) en la posición X₁ o X₃, conteniendo todas las secuencias Z en X₁, X₃ o ambas posiciones (Figura 20). Cuando una secuencia contiene dos residuos Z, lo más probable es que uno de ellos sea Pra, mientras que el otro es Lys(Ac).

Análisis de unión del péptido seleccionado por anisotropía de fluorescencia

Para confirmar los resultados del cribado, se seleccionaron cuatro secuencias de evento (péptidos A2, A8, B5 y B8; en lo sucesivo denominados péptidos 1-4) para la resíntesis y se probó la unión a K-Ras en solución por anisotropía de fluorescencia. Los péptidos se sintetizaron en resina Rink Amida, se escindieron, se desprotegeron y se purificaron mediante HPLC de fase inversa. Cada péptido contiene un Lys fuera de los anillos bicíclicos que sirve como punto de etiquetado con un colorante fluorescente reactivo con amina (FAM-NHS o FITC). Los péptidos 2 y 4 mostraron una unión bastante potente a K-Ras, con valores de K_D de 5,1 μM y 9 μM, respectivamente. El péptido 3 se une a K-Ras con afinidad débil (20 μM), mientras que el péptido 1 no se une a K-Ras (Tabla 5).

Tabla 5. Afinidades de unión de los péptidos 1-4 contra K-Ras. NB = sin unión

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO.	K _D (μM)
1	biciclo(Arg-Asp-Phg-Pra-d-Asn-K-FNalR ₄ -Dap)-K	75	NB
2	biciclo(Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-K-FNalR ₄ -Dap)-K	76	5,1
3	biciclo(Pra-Ser-Phg-Lys(Ac)-Lys(Ac)-K-FNalR ₄ -Dap)-K	77	20
4	biciclo(Pra-Arg-d-Val-Asp-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	78	9

Para probar si el péptido 2 y el DCAI se unen a sitios similares, se realizó un experimento de competición en el que se analizó la unión del péptido 2 marcado con FITC a K-Ras en presencia de concentraciones crecientes de DCAI (Figura 17). El DCAI inhibió la unión del péptido 2 con un valor de CI₅₀ de 1,4 mM, lo que indica que el péptido 2 ocupa el mismo bolsillo de unión que reconoce DCAI.

Optimización del péptido 2

Para probar si la expansión del anillo mejoraría la afinidad de unión, se sintetizaron cuatro péptidos (péptido 5-8) insertando de uno a tres Ala en el anillo que contenía Pra. Se encontró que la adición de solo un Ala a cada lado de la secuencia que contenía Pra (péptido 5 y 6) no mejoró significativamente la unión (K_D de 6,4 μM y 5,6 μM respectivamente). Sin embargo, la adición de un residuo de Ala a ambos lados del motivo (péptido 7) mejoró la afinidad de unión a 1,8 μM, mientras que la adición de tres residuos de Ala (dos en el extremo N y uno en el extremo C del terminal Pra) mejoró la afinidad de unión a 1,1 μM (Tabla 6).

Tabla 6. Afinidades de unión del péptido 5-8 contra K-Ras

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO.	K _D (μM)
5	biciclo(Ala-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-K-FNalR ₄ -Dap)-K	79	6,4
6	biciclo(Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	80	5,6
7	biciclo(Ala-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	81	1,8
8	biciclo(Ala-Ala-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	82	1,1

A continuación, se probó si el reemplazo de los residuos de Ala añadidos por otros aminoácidos podría mejorar adicionalmente la potencia del péptido. Una biblioteca bicíclica enfocada (biblioteca II) basada en la secuencia del péptido 2 se sintetizó en la forma de: biciclo(X¹-X²-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-X³-K-FNalR₄-Dap)-BBM-TentaGel, donde X es cualquiera de los 25 aminoácidos utilizados para la biblioteca I. El cribado de 50 mg de la biblioteca 2 contra 100 nM de K-Ras biotinilado produjo 25 eventos, que dieron 19 secuencias completas después de PED/MS. Los resultados mostraron que se prefieren los pequeños aminoácidos hidrófobos (Ala, d-Ala) en la posición X¹, mientras que las posiciones X² y X³ tenían poca selectividad (Figura 21).

Nueve de los péptidos de evento (D4, D6, D9, E1, E3, E4, E5, E6 y E8) se resintetizaron y se probó su unión a K-Ras en solución. Los péptidos seleccionados de la biblioteca II mostraron solo afinidades de unión moderadamente mejoradas sobre el péptido 2, con valores de K_D de 1,1 μM - 6 μM (Tabla 7). El péptido 11 [biciclo(A-dl-Phg-R-dN-Pra-I-D-K-FNalR₄-Dap)-K] mostró la mayor afinidad hacia K-Ras (1,1 μM) y se eligió para una optimización adicional.

Tabla 7. Afinidades de unión del péptido seleccionado de la biblioteca II hacia K-Ras. NE = no ensayado

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO.	K _D (μM)
9	biciclo(d-Ala-Abu-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Abu-K-FNalR ₄ -Dap)-K	83	2,5
10	biciclo(Phg-Ile-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Abu-K-FNalR ₄ -Dap)-K	84	2,4
11	biciclo(Ala-d-Leu-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Asp-K-FNalR ₄ -Dap)-K	85	1,1
12	biciclo(d-Ala-Gln-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Asp-K-FNalR ₄ -Dap)-K	86	2
13	biciclo(Ala-Orn-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-d-Phe-K-FNalR ₄ -Dap)-K	87	6,3
14	biciclo(d-Ala-Phg-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-d-Phe-K-FNalR ₄ -Dap)-K	88	4,9
18	biciclo(d-Ala-Abu-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Abu-K-FNalR ₄ -Dap)-K	89	NT
19	biciclo(Ala-Ala-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	90	NT
20	biciclo(Ala-Ala-Phg-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K	91	4

Los péptidos 8 y 11 se sometieron a una campaña SAR de química médica convencional, haciendo sustituciones conservadoras (por ejemplo, de Ile a Leu, de d-Asn a d-Asp). Se encontró que el reemplazo del residuo de Phg resultó ser fructífero. Por ejemplo, la sustitución de Phe por los residuos de Phe en el péptido 8 y 11, dio lugar a los péptidos 29 y 41, que tienen valores de K_D de 0,8 y 0,3 μM para K-Ras, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Afinidades de unión del péptido 29 y 41

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO.	K _D (μM)
29	biciclo(Ala-Ala-Phe-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Ala-K-FNalR ₄ -Dap)-K.	92	0,8
41	biciclo(Ala-d-Leu-Phe-Arg-d-Asn-Pra-Ile-Asp-K-FNalR ₄ -Dap)-K	93	0,3

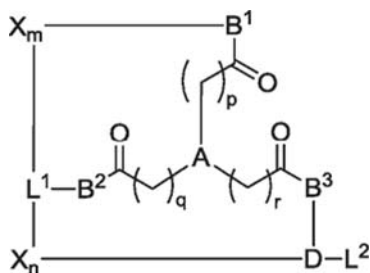
El péptido 41 es biológicamente activo

Se evaluó la actividad antiproliferativa del péptido 41 contra las células de cáncer de pulmón H1299 mediante ensayos de proliferación de MTT. Se colocaron cien μl de células H1299 (0,5 x 10⁵ células/ml) en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se dejó crecer durante una noche. Se añadieron concentraciones variables del péptido 41 (0-40 μM) a cada pocillo y las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% durante 24-72 h. Se añadieron diez μl de una solución madre de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C durante 4 h. Después, se añadieron a cada pocillo 100 μl de tampón de solubilización SDS-HCl, y la solución resultante se mezcló vigorosamente. La placa se incubó a 37 °C durante una noche. La absorbancia del producto de formazán se midió a 570 nm utilizando un lector de placa Molecular Devices Spectramax M5. Las células tratadas con DMSO se utilizaron como control. El péptido 41 mostró una actividad antiproliferativa moderada con un ED₅₀ de ~9 μM (Figura 18). En las mismas condiciones, un péptido de control que carece del resto DCAI pero que de otro modo es idéntico al péptido 41, mostró un ED₅₀ >40 μM después del tratamiento de 24 horas. Después de 72 h, el péptido 41 inhibió el crecimiento celular con un ED₅₀ ~7 μM. El péptido de control también mostró una toxicidad celular moderada, pero de nuevo fue menos potente que el péptido 41 (Figura 19).

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención divulgada.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:



I

en la que

A se selecciona de N y benceno;

p, q, y r se seleccionan independientemente de 0, 1, y 2;

B¹, B², y B³ se seleccionan independientemente de O y NR¹;

en la que R¹ comprende H, o alquilo C₁-C₅ sustituido o sin sustituir;

L¹ y L² se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, aminoácido, y un enlazador a un soporte en fase sólida;

D se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, o un residuo de aminoácido; y

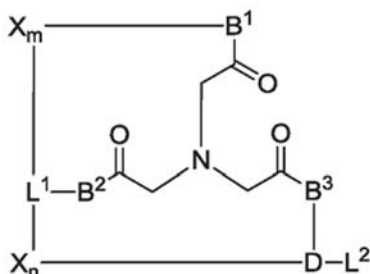
Xₘ y Xₙ comprenden independientemente una secuencia de 1-10 aminoácidos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que p es 1; y/o

q es 1; y/o

r es 1.

3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el compuesto es de Fórmula I-B:



I-B

en la que Xₘ, Xₙ, L¹, L², B¹, B², B³ y D son como se definen en la Fórmula I.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que A es benceno.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que B¹ es NH; y/o.

B² es NH; y/o

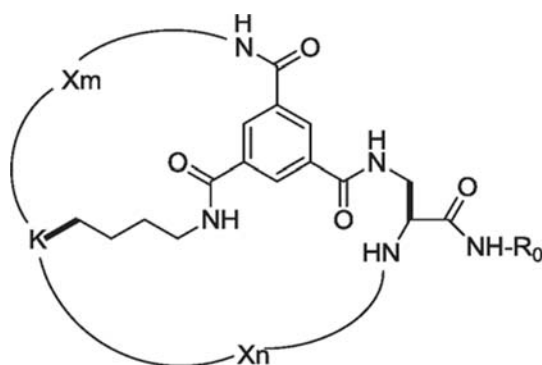
B³ es NH.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-5, en el que p es 0; y/o

q es 1; y/o

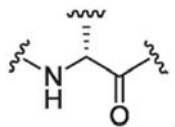
r es 1.

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-6, en el que el compuesto es de Fórmula I-A:



I-A

en la que X_m y X_n son como se definen en la Fórmula I; R^0 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o sin sustituir, o un enlazador a un soporte en fase sólida; y K tiene una estructura representada por una fórmula:



8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 -7, en el que X_m y X_n comprenden diferentes secuencias de aminoácidos.

9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que X_m comprende 3-7 residuos, preferiblemente 4-6 residuos, más preferiblemente 5 residuos.

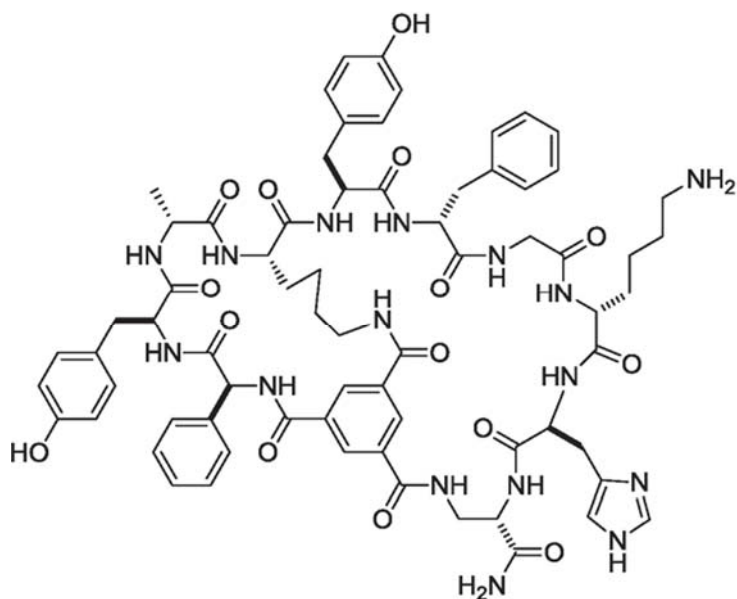
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que los residuos de aminoácidos en X_m y/o X_n son todos aminoácidos naturales.

11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que X_n comprende 2-6 residuos; preferiblemente 3-5 residuos, más preferiblemente 4 residuos.

12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el compuesto se ha preparado por síntesis de fase sólida.

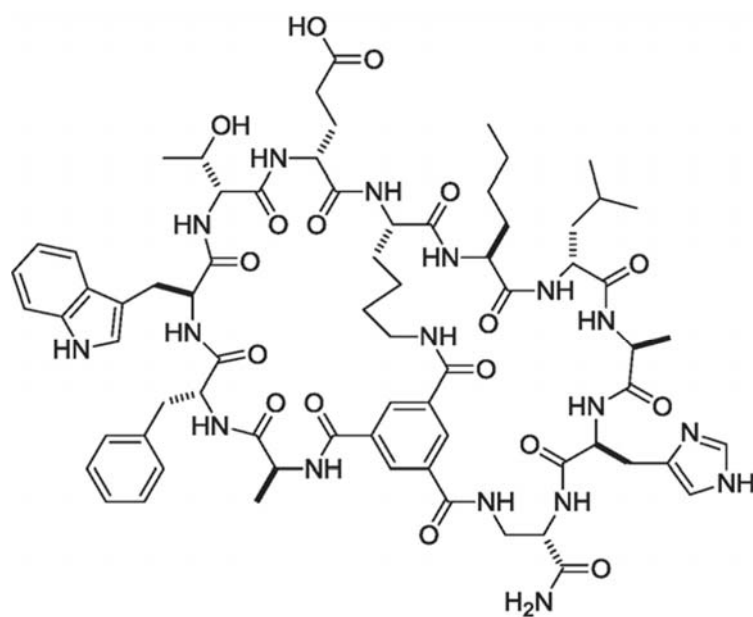
13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el compuesto tiene un peso molecular de 500-5000, preferiblemente 500-2000.

14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 12, en el que el compuesto es de Fórmula I-A-1:



I-A-1

; o en la que el compuesto es de Fórmula I-A-2:



I-A-2

5

15. Un compuesto que comprende:

- (a) Un residuo de ácido trimésico, teniendo el residuo tres funcionalidades carboxilo;
- (b) Un residuo de lisina unido covalentemente a la primera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico;
- (c) Una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_m , unida covalentemente a la segunda funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico y al residuo de lisina; y
- (d) Una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos, X_n , unida covalentemente a la tercera funcionalidad carboxilo del residuo de ácido trimésico y al residuo de lisina.

15

16. El compuesto de la reivindicación 15, en el que el compuesto está unido covalentemente a un soporte de fase sólida.

17. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 15-16, en el que la primera cadena peptídica comprende 3-7 residuos, preferiblemente

4-6 residuos, más preferiblemente
5 residuos.

18. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que todos los residuos en la primera y/o segunda cadena peptídica son aminoácidos naturales.

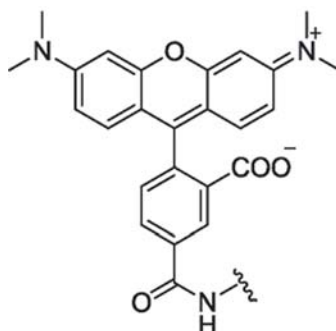
19. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que la segunda cadena peptídica comprende 2-6 residuos, preferiblemente

3-5 residuos, más preferiblemente
4 residuos.

20. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en el que el compuesto tiene un peso molecular entre 500 y 5000, preferiblemente 500 y 2000.

21. Una biblioteca que comprende una pluralidad de compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 1 -20, en la que los compuestos están unidos covalentemente preferiblemente a un soporte de fase sólida.

22. La biblioteca de la reivindicación 21, en la que los compuestos y/o el soporte de fase sólida tienen un resto de etiqueta, en la que el resto de etiqueta es preferiblemente una etiqueta de fluorescencia, por ejemplo, en la que el resto de etiqueta tiene una estructura representada por una fórmula:



23. Un método para fabricar compuestos de péptidos bicíclicos, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) Unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo;
- (b) Construir una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico;
- (c) Unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica;
- (d) Construir una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina;
- (e) Unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico;
- (f) Ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico; y
- (g) Ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico;

opcionalmente, que comprende además la etapa o etapas de unir un resto de etiqueta al compuesto y/o escindir el compuesto del soporte de fase sólida.

24. Un método para hacer una biblioteca de compuestos peptídicos bicíclicos, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) Unir ácido 2,3-diaminopropanoico a un soporte de fase sólida a través de su funcionalidad carboxilo;
- (b) Construir una primera cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos a partir de la funcionalidad 2-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena;
- (c) Unir un residuo de lisina al extremo distal de la primera cadena peptídica;
- (d) Construir una segunda cadena peptídica de 1-10 residuos de aminoácidos sobre el residuo de lisina, utilizando una técnica de división y agrupación para preparar la cadena;
- (e) Unir el ácido trimésico a la funcionalidad 3-amino del residuo de ácido 2,3-diaminopropanoico;
- (f) Ciclar el residuo de aminoácido distal de la segunda cadena peptídica con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico; y

(g) Ciclar la cadena lateral amino del residuo de lisina con una funcionalidad carboxilo del ácido trimésico.

25. Un método para identificar un fármaco candidato para el tratamiento de un trastorno, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) Exponer cualquiera de los compuestos de las reivindicaciones 1-20, cualquiera de los compuestos preparados por el método de la reivindicación 23, una biblioteca de las reivindicaciones 21-22, o una biblioteca preparada por el método de la reivindicación 24 a un receptor asociado con el trastorno;
- 10 (b) Detectar la reacción entre el receptor y el compuesto o la biblioteca; y
- (c) Determinar la identidad de un compuesto que reacciona con el receptor.

26. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para tratar un trastorno, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto a un sujeto identificado por necesitar el tratamiento del trastorno.

27. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, cualquiera de los compuestos preparados por el método de la reivindicación 23, una biblioteca de las reivindicaciones 21-22 y/o una biblioteca preparada por el método de la reivindicación 24 para su uso en un método de protección contra la muerte celular inducida por $TNF\alpha$, dicho método comprende administrar una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz) de dicho compuesto y/o biblioteca a un sujeto (por ejemplo, una célula o un paciente) identificado por tener una necesidad de protección contra la muerte celular inducida por $TNF\alpha$.

28. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, cualquiera de los compuestos preparados por el método de la reivindicación 23, una biblioteca de las reivindicaciones 21-22 y/o una biblioteca preparada por el método de la reivindicación 24 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, hidradenitis supurativa, o asma refractaria) o un trastorno de proliferación celular descontrolada (por ejemplo, un cáncer), comprendiendo dicho tratamiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto y/o biblioteca a un sujeto identificado por tener una necesidad de tratamiento del trastorno, en el que, preferiblemente, el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno antes de la etapa de administración.

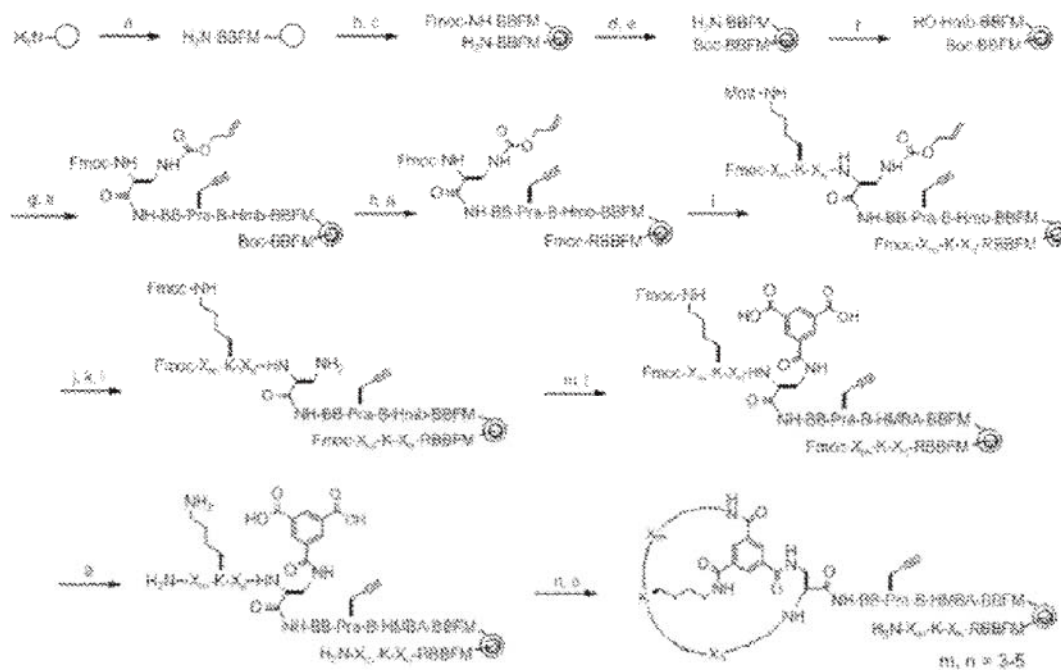


Figura 1

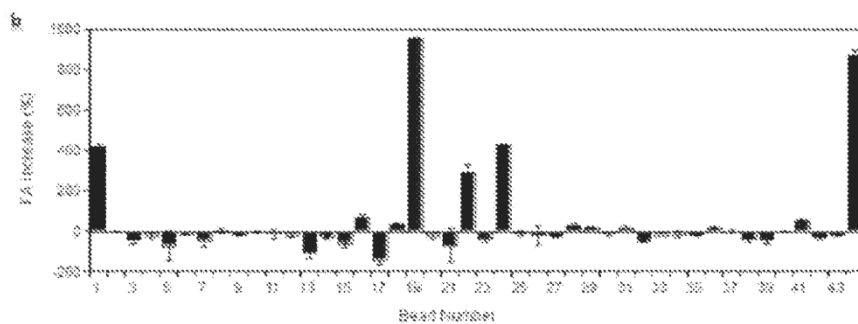
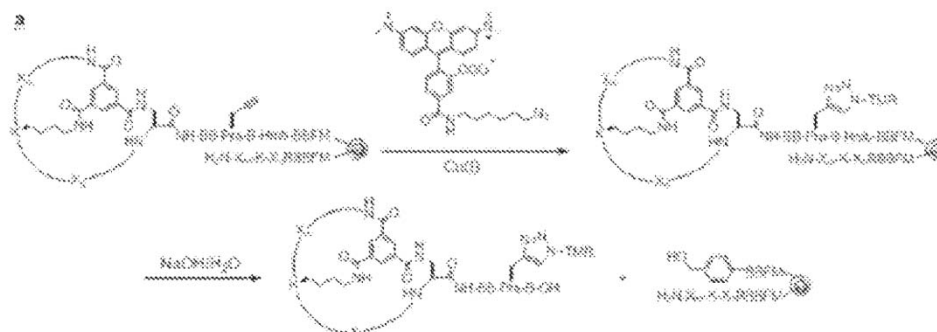


Figura 2

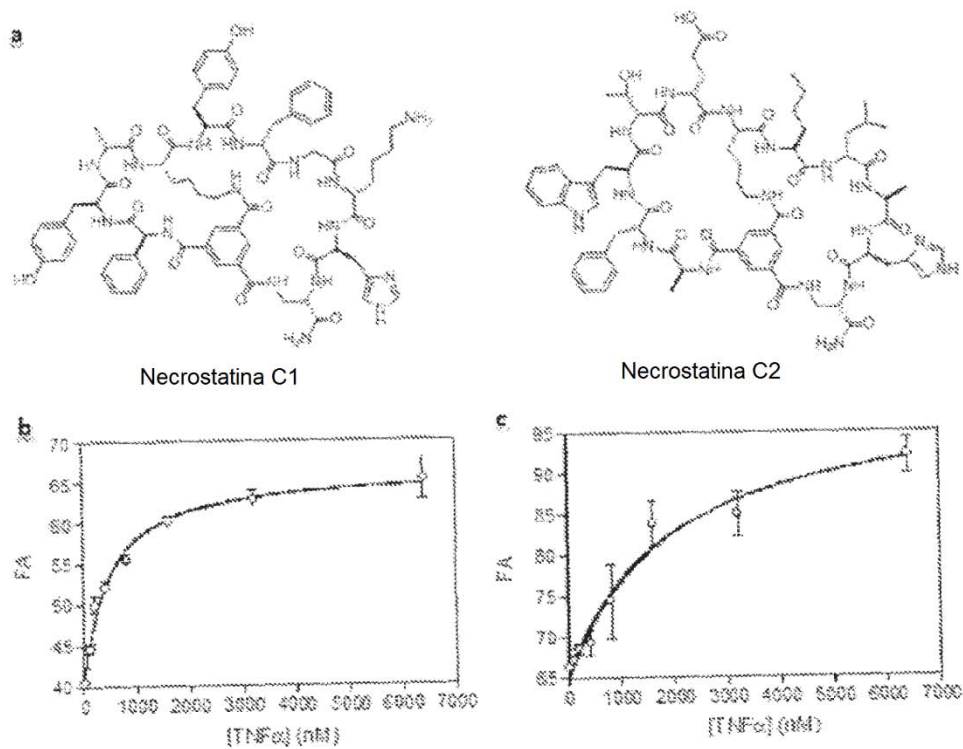


Figura 3

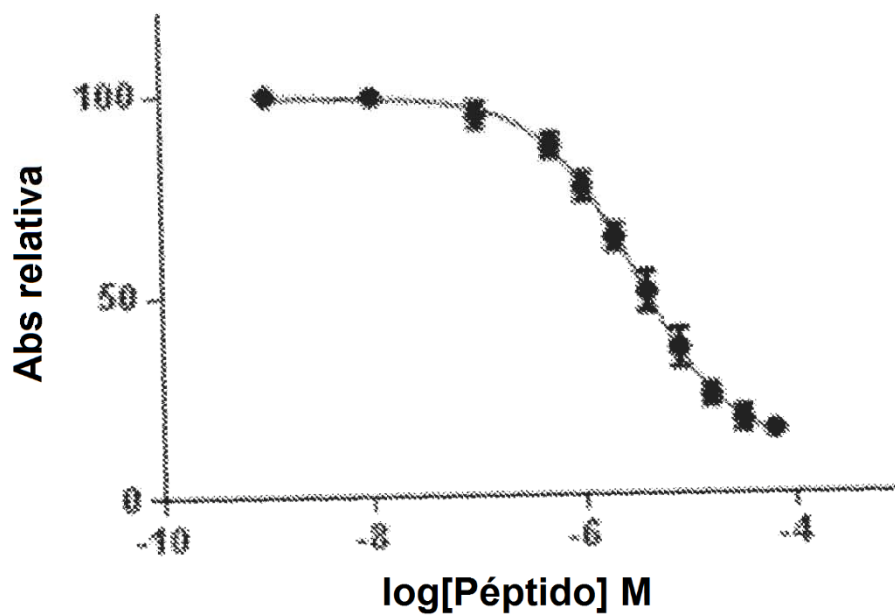


Figura 4

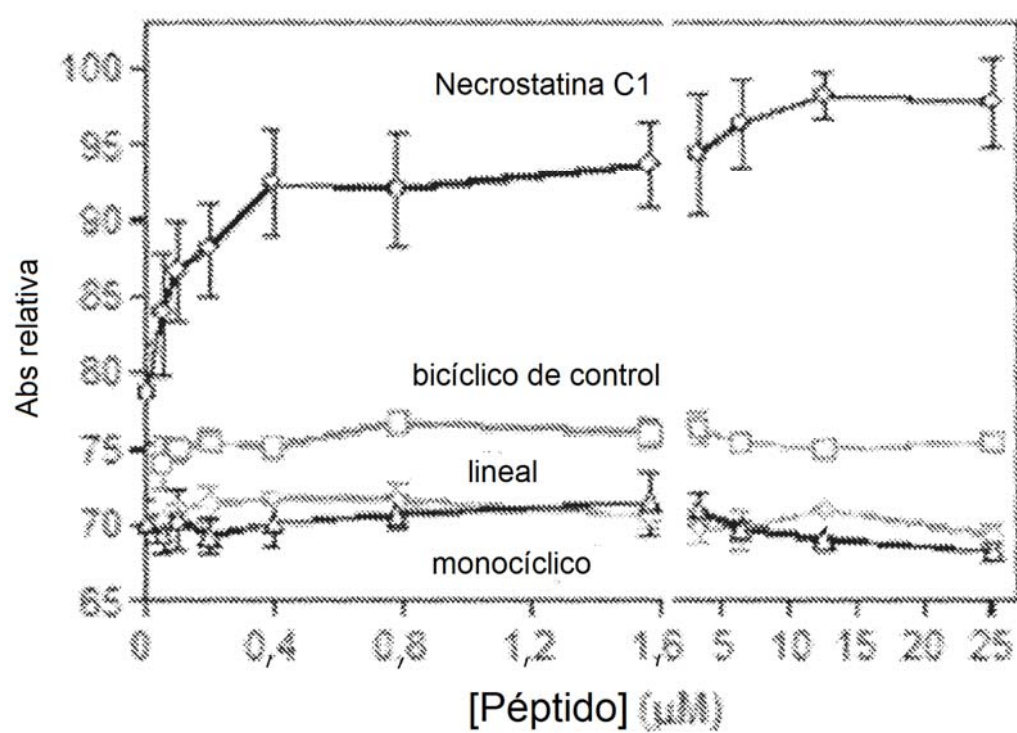


Figura 5

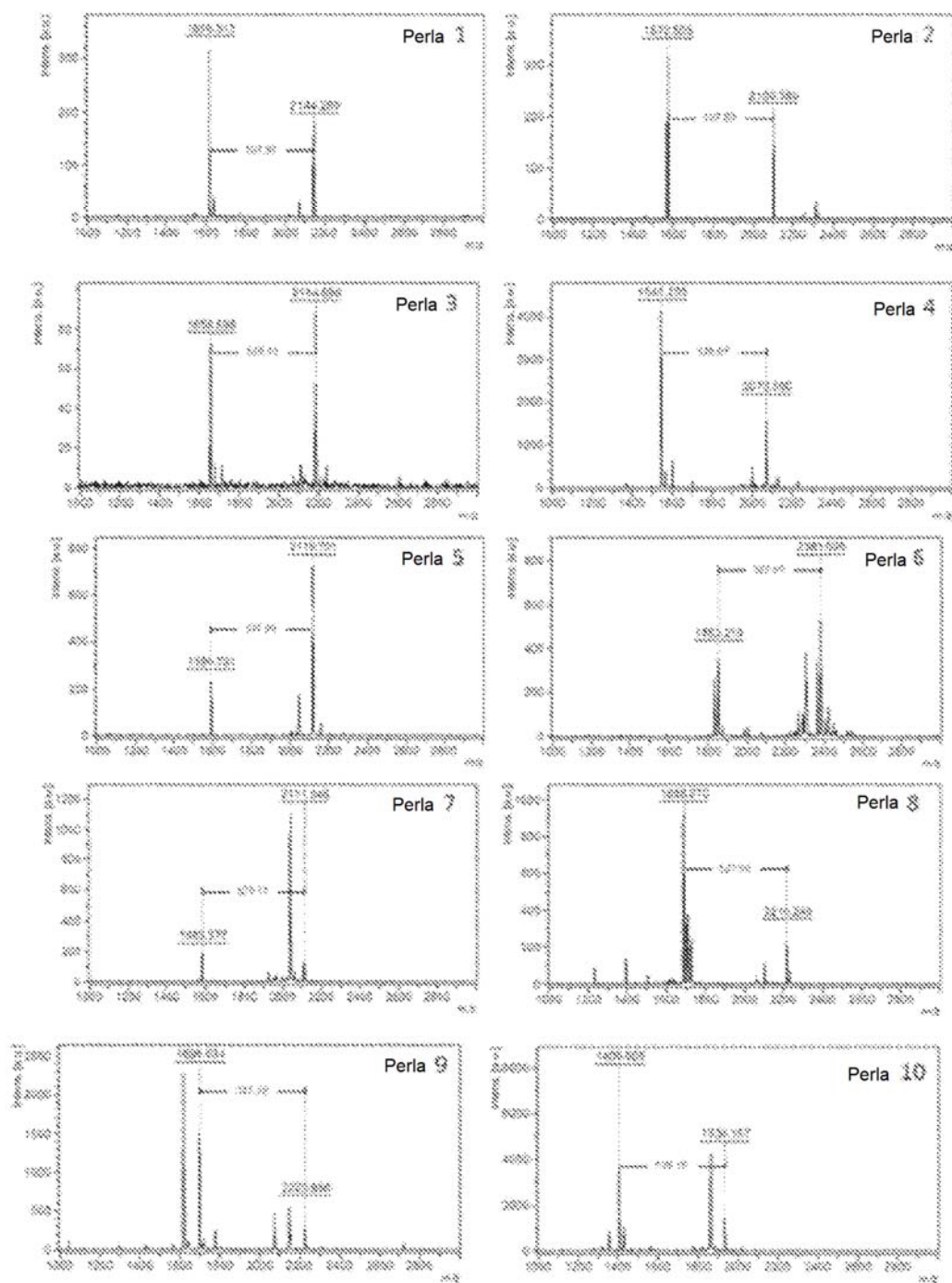


Figura 6

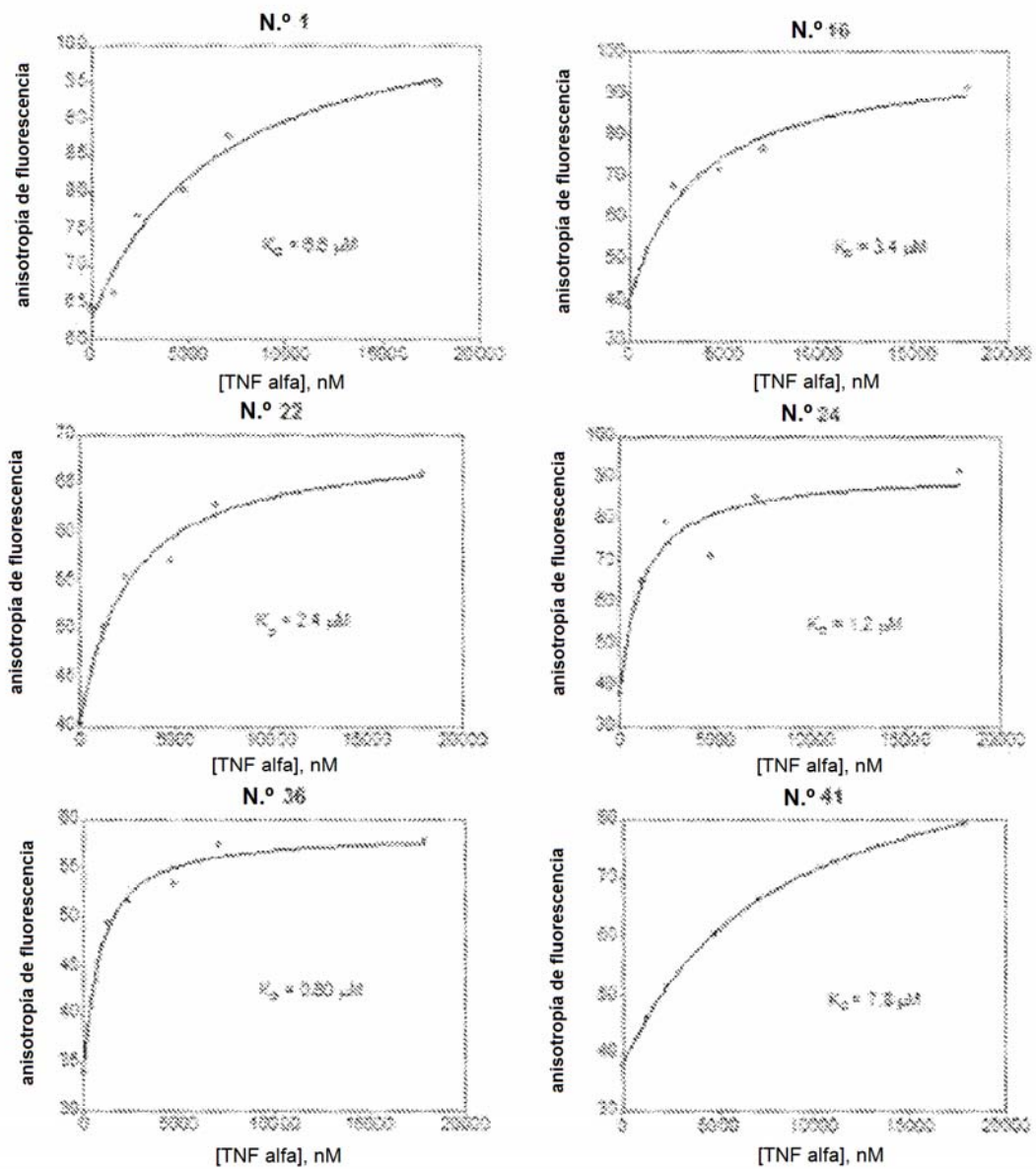
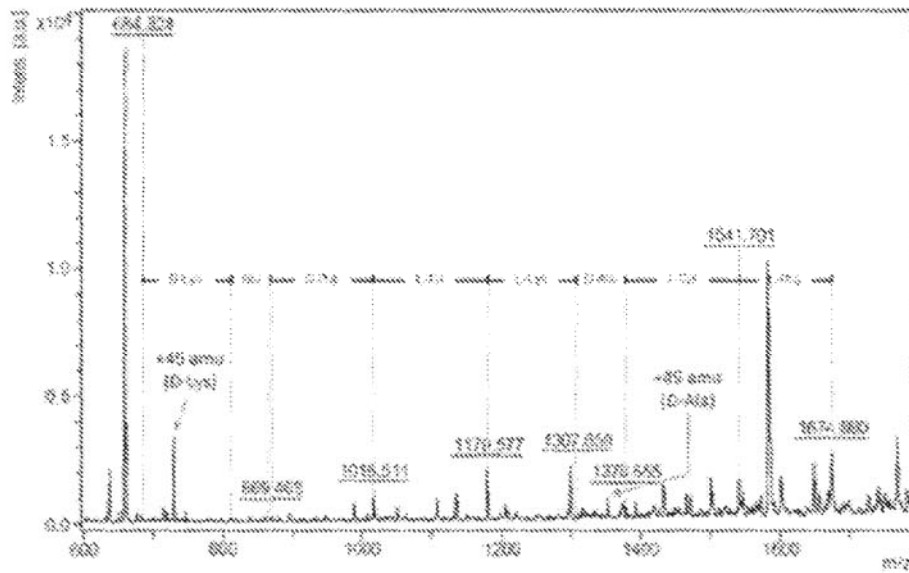


Figura 7

(a) Necrostatina C1: Phe-Tyr-D-Ala-Lys-Tyr-D-Phe-Gly-D-Lys-His-RBBFM[®]



(b) Necrostatina C2: Ala-D-Phe-Tyr-D-Thr-D-Gly-Lys-Nle-D-Leu-Ala-His-RBBFM[®]

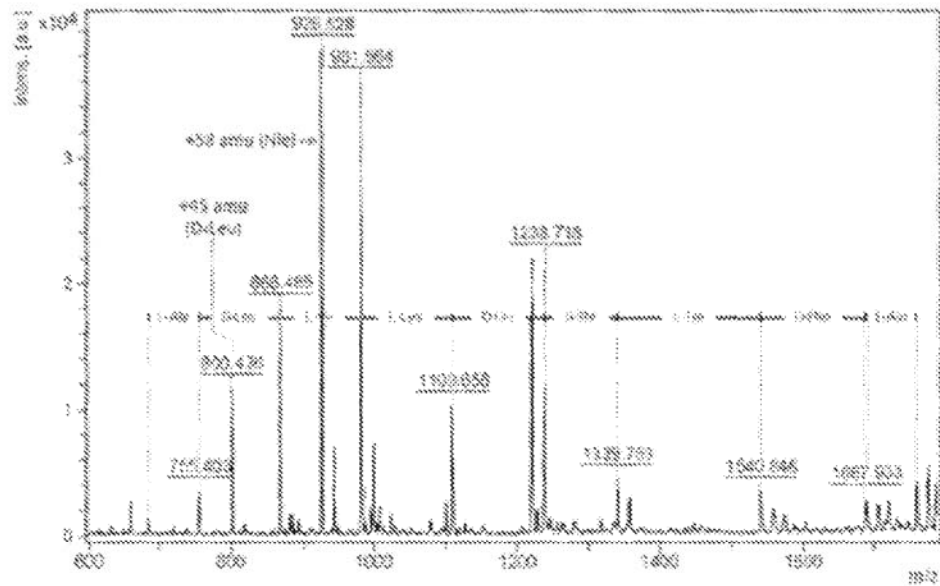


Figura 8

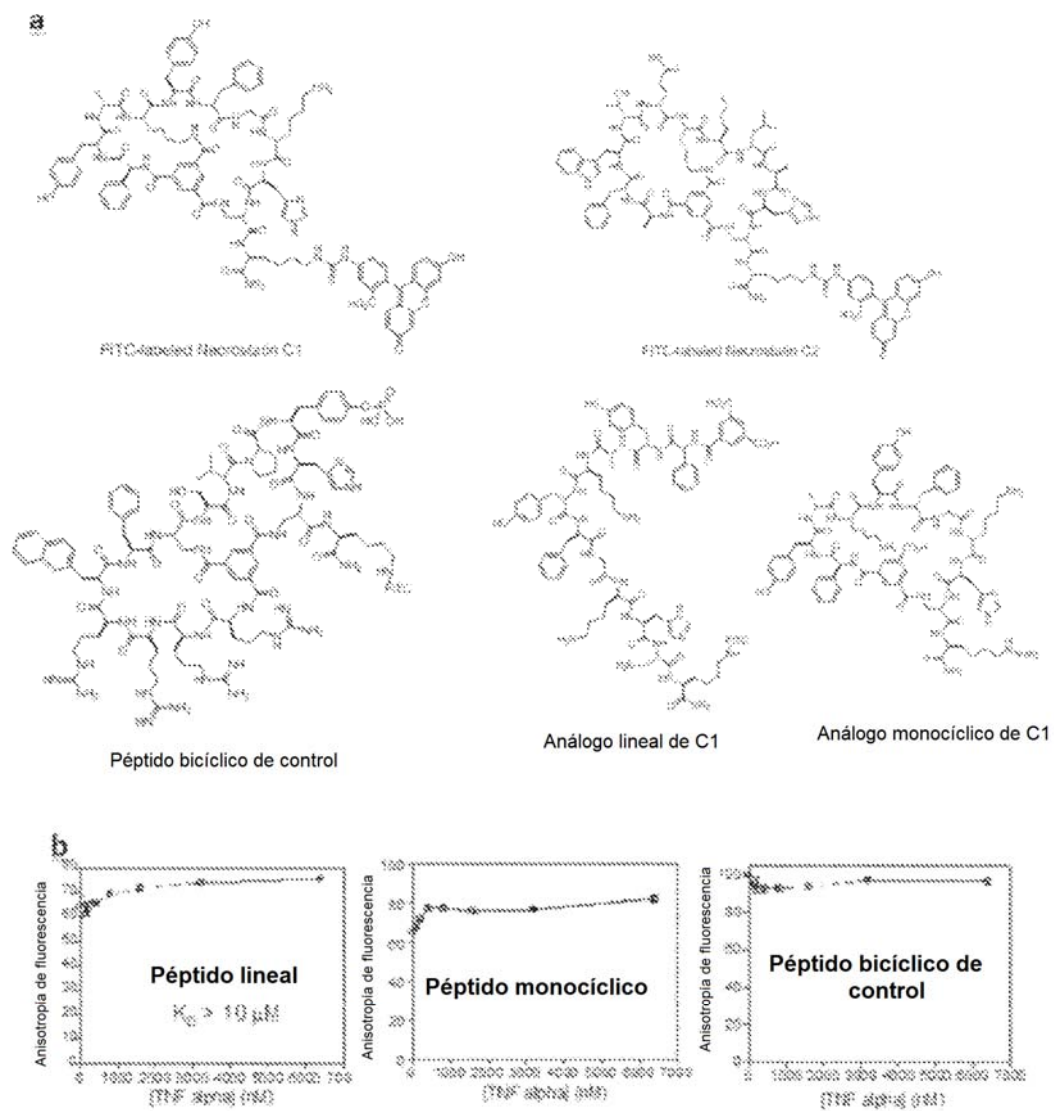


Figura 9

(a) Necrostatina C1

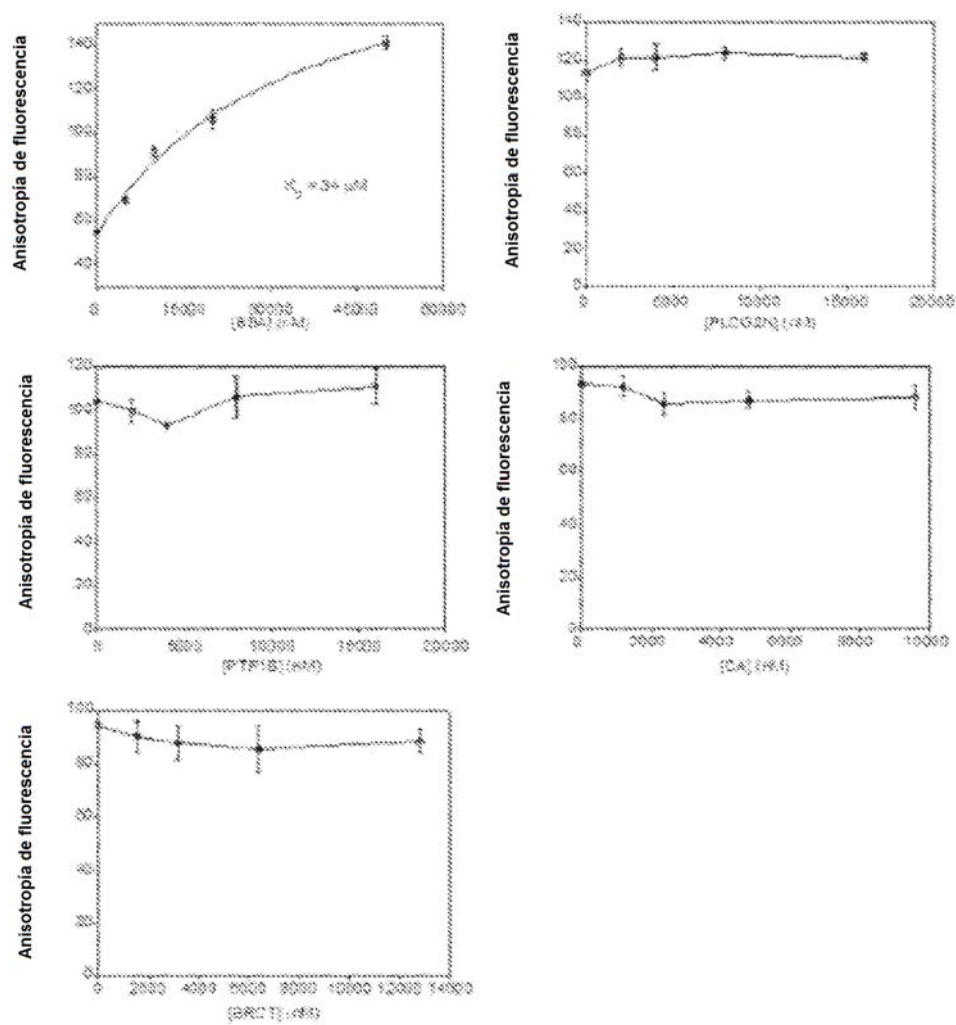


Figura 10A

(b) Necrostatina C2

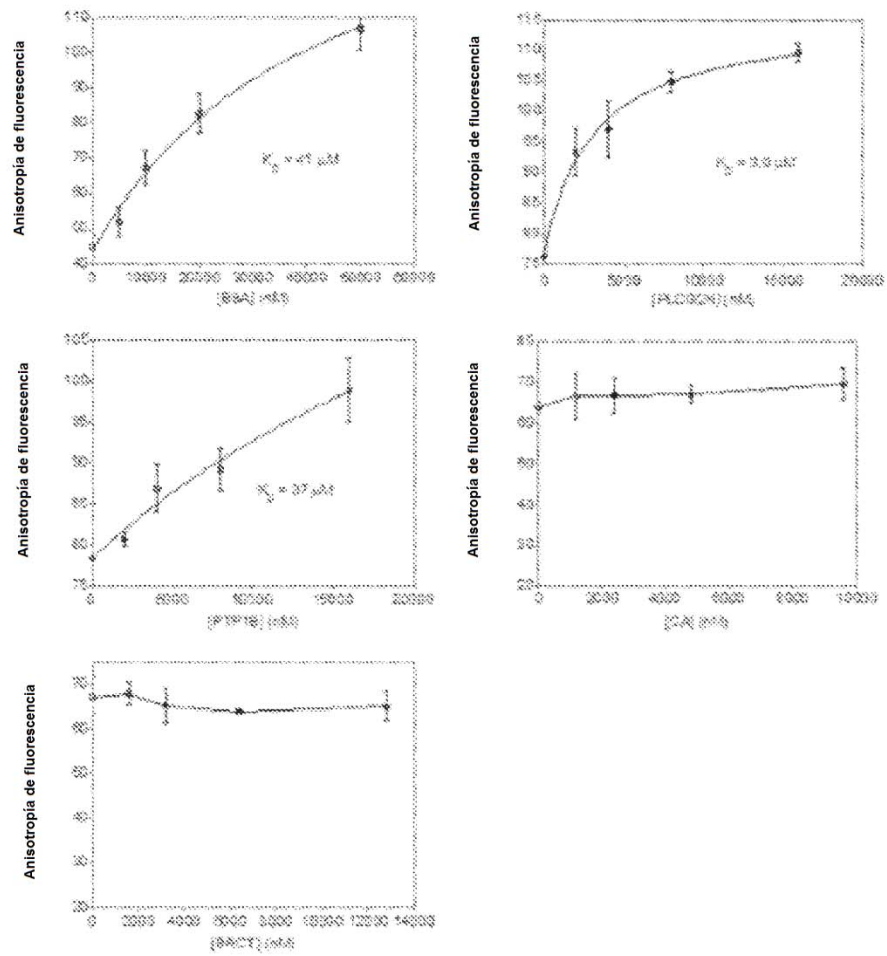


Figura 10B

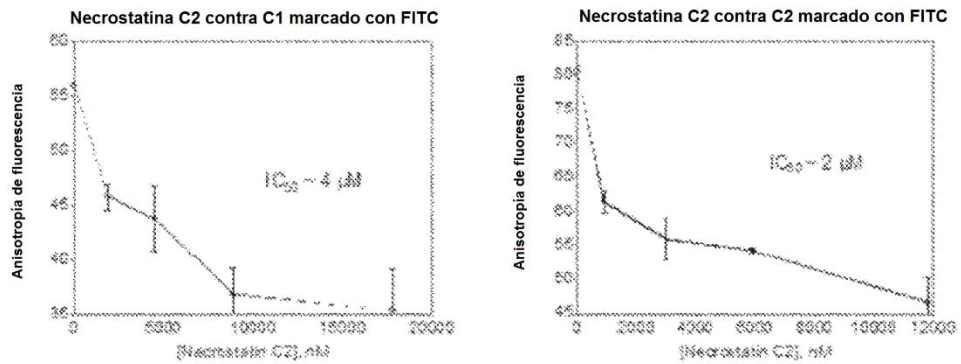


Figura 11

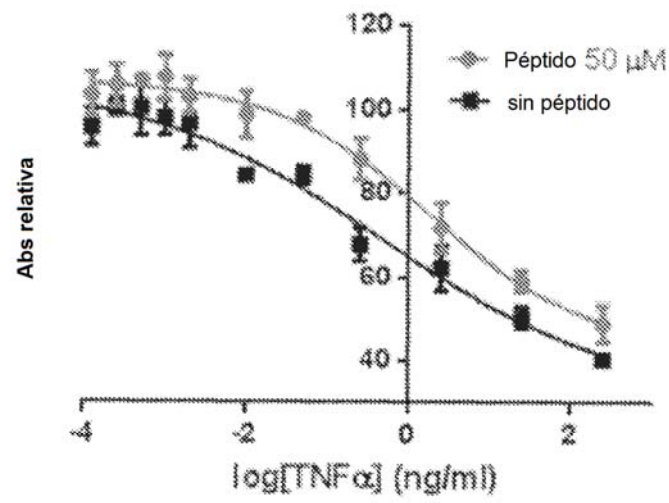


Figura 12

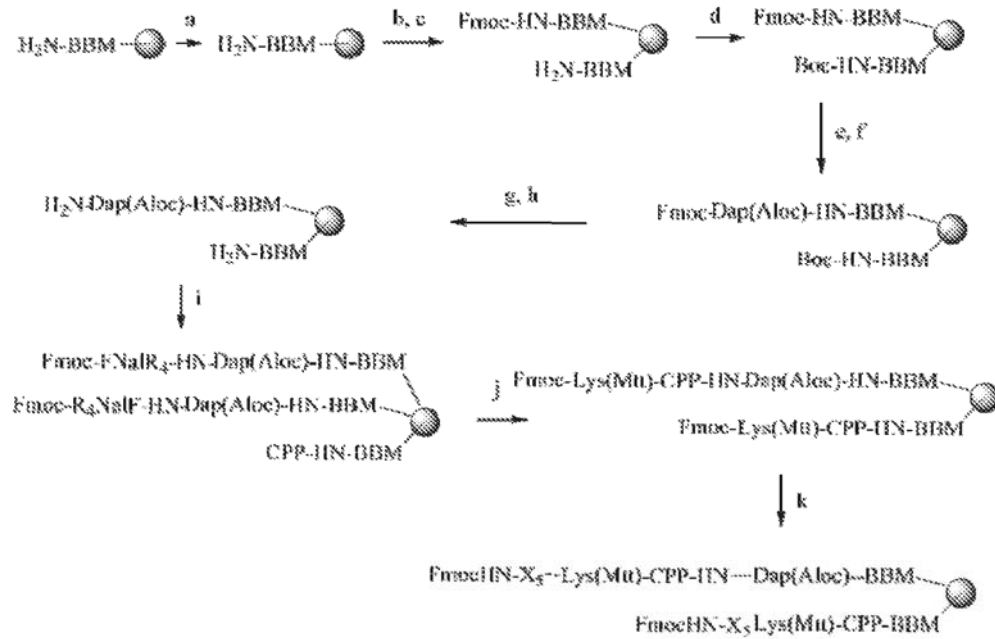


Figura 13

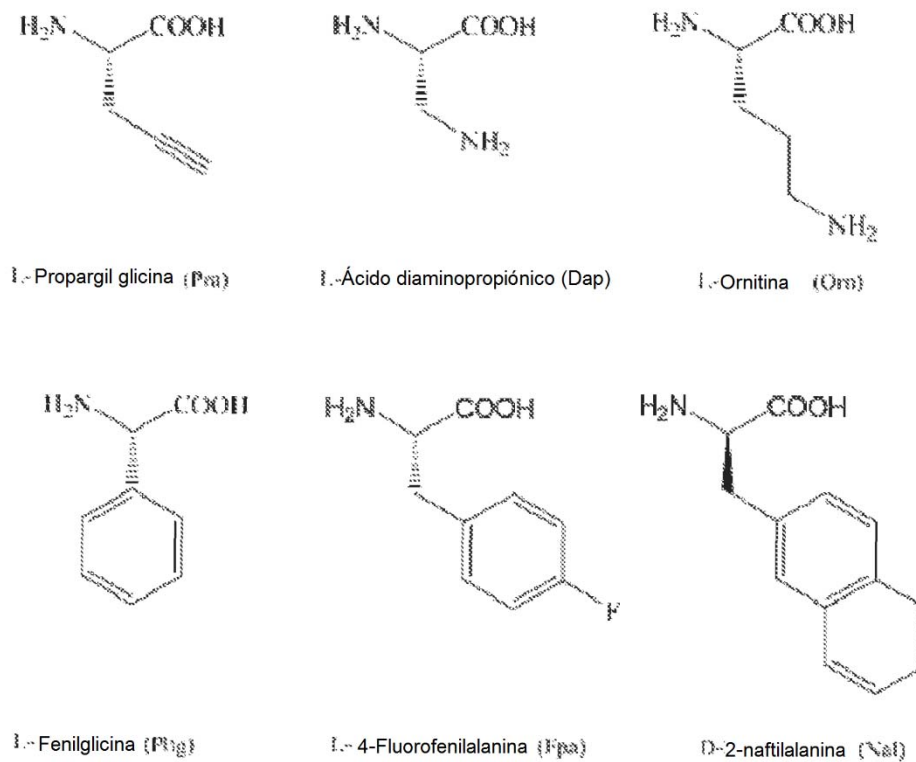


Figura 14

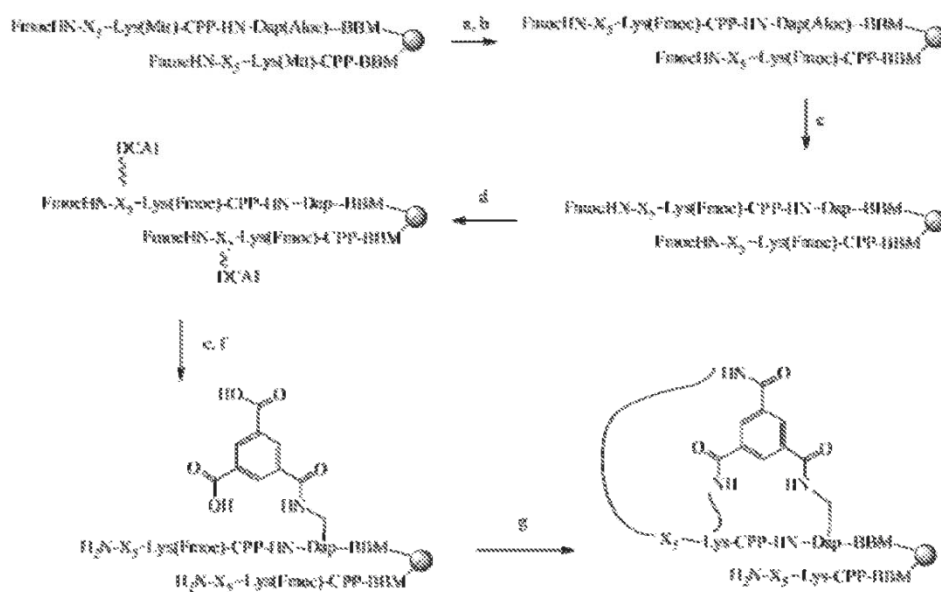


Figura 15

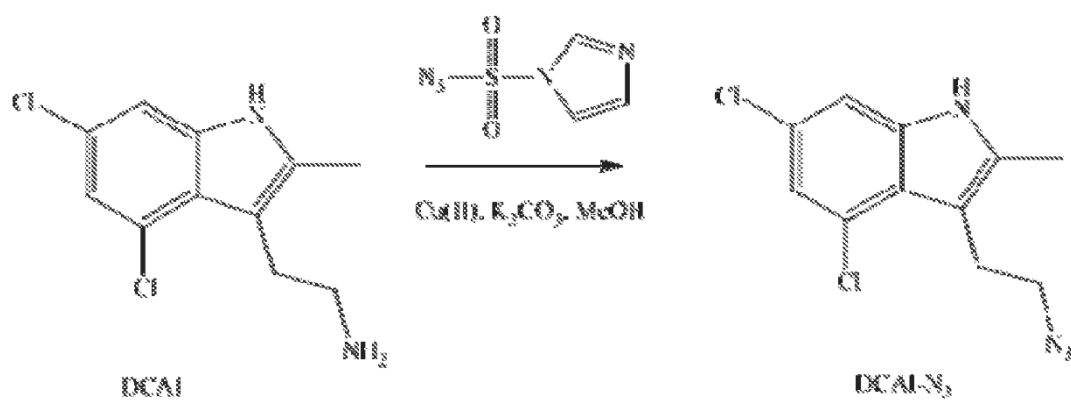


Figura 16

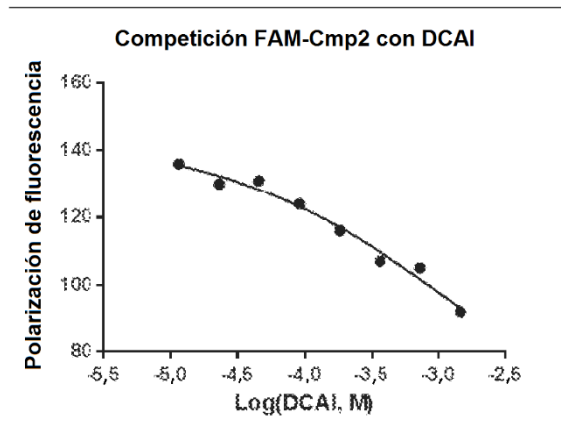


Figura 17

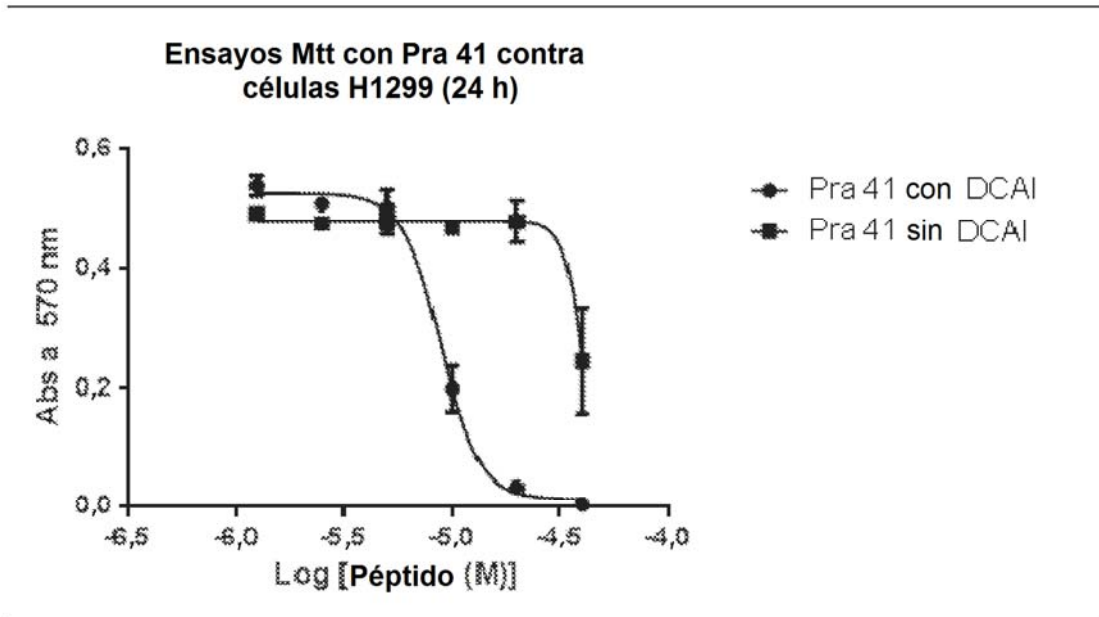


Figura 18

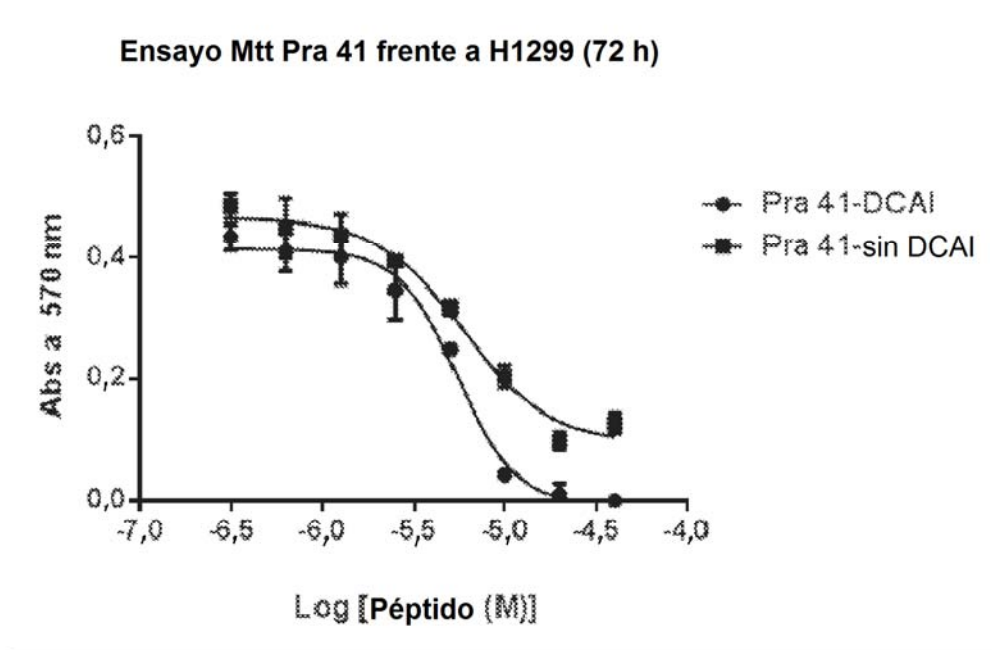


Figura 19

	X1	X2	X3	X4	X5							
TT042413-A1	R	dF	Z	Z	dF	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A2	R	D	Phg	Z	dN	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A3	Z	Z	dP	G	A	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A4	Z	Z	A	S	A	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A5	Z	Z	dL	dP	dT	K	R	R	R	R	Nal	F
TT042413-A8	Phg	R	dN	Z	I	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A9	Z	dT	dS	A	dN	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A10	Z	dNal	dV	G	Q	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-A12	Z	Phg	S	Z	Z	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-B1	Z	Phg	M	S	Z	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-B3	Z	S	M	Z	G	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-B5	Z	S	Phg	Z	Z	K	F	Nal	R	R	R	R
TT042413-B8	Z	R	dV	D	A	K	F	Nal	R	R	R	R

Figura 20

	X1	X2		X3		
TT111113D1	A	dF	Phg R dN Pra I	A	K	FNalR4
TT111113D4	dA	Abu	Phg R dN Pra I	Abu	K	FNalR4
TT111113E4	Phg	I	Phg R dN Pra I	Abu	K	FNalR4
TT111113D11	ninguno	Phg	Phg R dN Pra I	Abu	K	FNalR4
TT111113E3	A	dL	Phg R dN Pra I	D	K	FNalR4
TT111113E5	dA	Q	Phg R dN Pra I	D	K	FNalR4
TT111113E7	I	dE	Phg R dN Pra I	D	K	FNalR4
TT111113D5	dA	S	Phg R dN Pra I	dE	K	FNalR4
TT111113D8	ninguno	dL	Phg R dN Pra I	dE	K	FNalR4
TT111113E1	dA	Phg	Phg R dN Pra I	dF	K	FNalR4
TT111113E6	A	Orn	Phg R dN Pra I	dF	K	FNalR4
TT111113D12	A	Abu	Phg R dN Pra I	dN	K	FNalR4
TT111113E8	dA	A	Phg R dN Pra I	dN	K	FNalR4
TT111113D7	Phg	dN	Phg R dN Pra I	I	K	FNalR4
TT111113D9	dA	Abu	Phg R dN Pra I	Nle	K	FNalR4
TT111113D2	ninguno	W	Phg R dN Pra I	Phg	K	FNalR4
TT111113E2	A	dN	Phg R dN Pra I	R	K	FNalR4
TT111113D6	R	Nle	Phg R dN Pra I	S	K	FNalR4
TT111113D10	ninguno	H	Phg R dN Pra I	Y	K	FNalR4

Figura 21

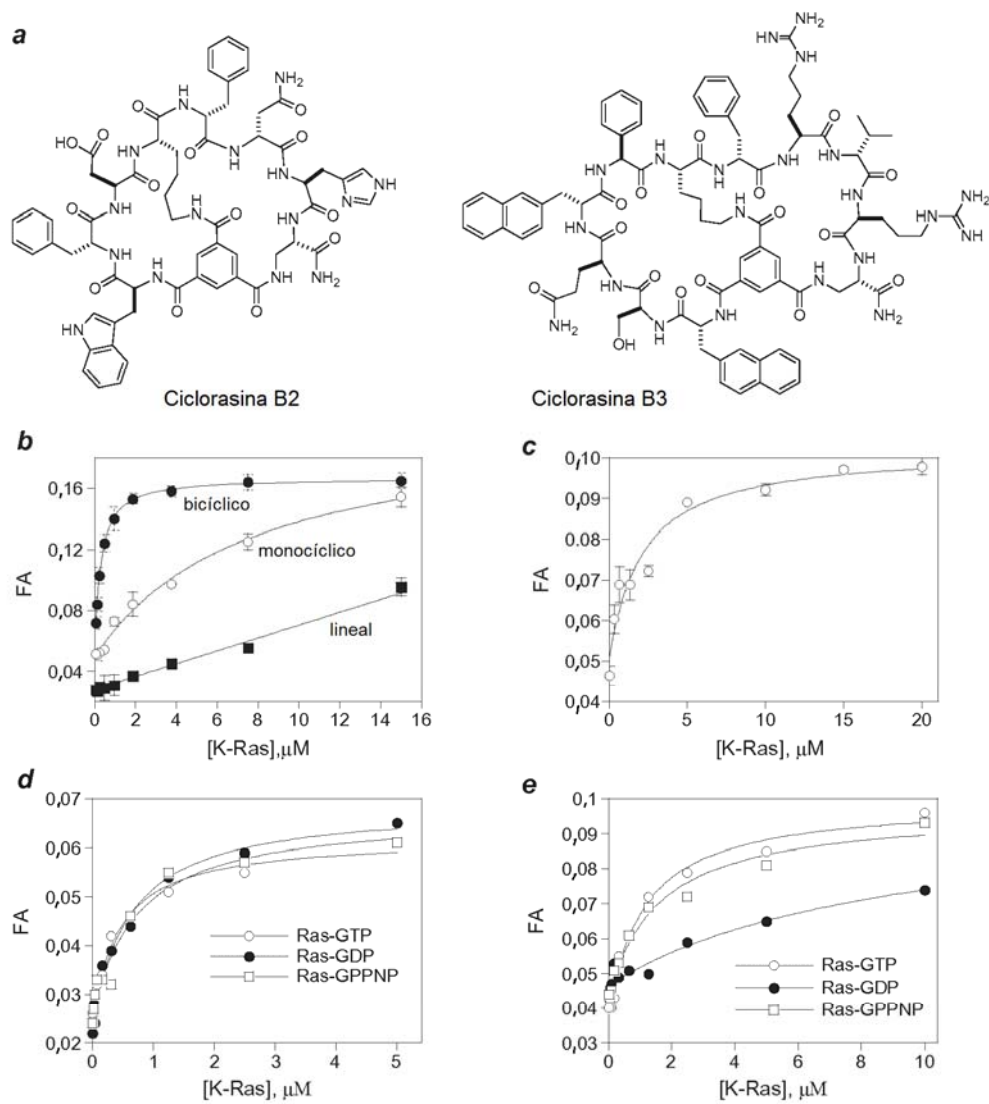


Figura 22

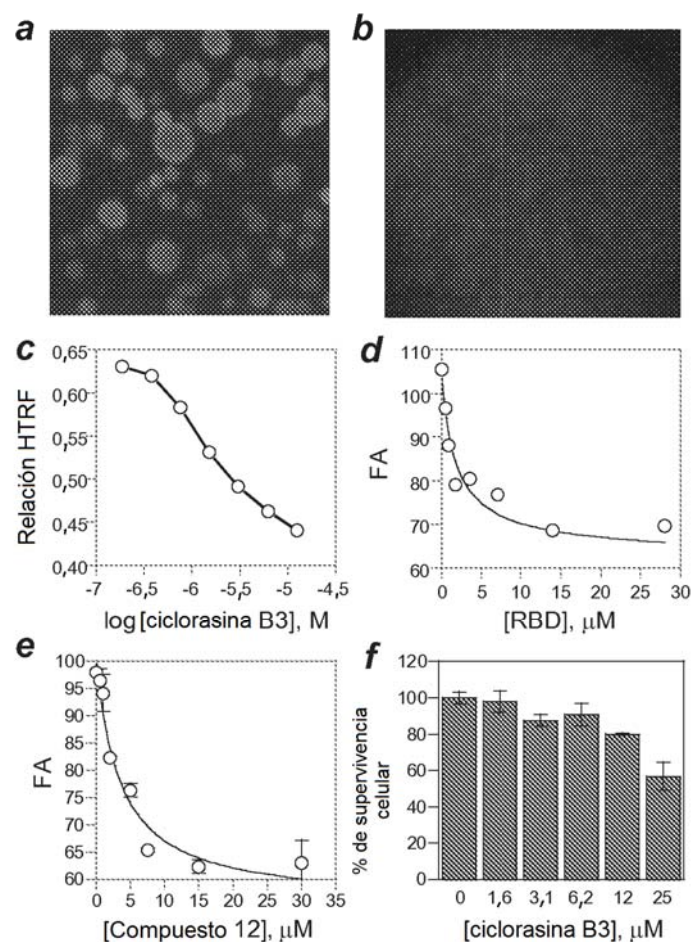


Figura 23