

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 526**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2011** **PCT/US2011/047692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012** **WO12021876**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2011** **E 11817162 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2603600**

54 Título: **Macrociclos peptidomiméticos**

30 Prioridad:

13.08.2010 US 373638 P

13.08.2010 US 373701 P

16.08.2010 US 374163 P

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

06.05.2019

73 Titular/es:

AILERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

840 Memorial Drive

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

GUERLAVAIS, VINCENT y

KAWAHATA, NORIYUKI

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 711 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Macrociclos peptidomiméticos

5 **Antecedentes de la invención**

La proteína p53 del factor de transcripción humano induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño del ADN y al estrés celular y, de este modo, desempeña un papel crítico en la protección de células frente a la transformación maligna. La ubiquitina ligasa E3 de HDM2 regula negativamente la función de p53 a través de una interacción de unión directa que neutraliza la actividad de transactivación de p53, lleva a la exportación de p53 desde el núcleo, y dirige a la p53 para la degradación a través de la vía de ubiquitinación-proteosoma. La pérdida de actividad de p53, bien por delección, mutación o sobreexpresión de HDM2, es el defecto más común en los cánceres humanos. Los tumores que expresan la p53 de tipo silvestre son vulnerables a agentes farmacológicos que estabilizan o aumentan la concentración de p53 activa. En este contexto, la inhibición de las actividades de HDM2 ha emergido como una estrategia validada para restaurar la actividad de p53 y resensibilizar a las células cancerosas a la apoptosis *in vitro* e *in vivo*. Recientemente se ha identificado HDMX (HDM4) como un regulador negativo de p53 similar, y los estudios han revelado una homología estructural significativa entre las superficies de unión a p53 de HDM2 y HDMX.

Las interacciones proteína-proteína de p53-HDM2 y p53-HDMX están mediadas por el mismo dominio de p53 de transactivación de hélice alfa de 15 restos, que se inserta en las hendiduras hidrófobas en la superficie de HDM2 y HDMX. Tres restos en este dominio de p53 (F19, W23 y L26) son esenciales para la unión a HDM2 y HDMX. La presente invención proporciona macrociclos peptidomiméticos basados en p53 que modulan las actividades de p53 inhibiendo las interacciones entre las proteínas p53 y HDM2, p53 y HDMX, o p53 y tanto HDM2 como HDMX, y que se puede usar para tratar enfermedades que incluyen, pero sin limitación, cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas. Los documentos WO 2009/126292 y WO 2010/033617 desvelan un compuesto de macrociclo peptidomimético derivado de p53 que se une a HDM2 y/o HDMX. Bernal, F. et al., J. Am. Chem. Soc. (2007), 129, páginas 2456-2457, desvela péptidos macrocíclicos derivados de p53 y su actividad proapoptótica.

Sumario de la invención

A continuación se describen péptidos reticulados estables relacionados con una parte de la p53 humana ("macrociclos peptidomiméticos de p53"). Estos péptidos reticulados contienen al menos dos aminoácidos modificados que juntos forman una reticulación intramolecular que puede ayudar a estabilizar la estructura secundaria de hélice alfa de una parte de p53 que se cree que es importante para la unión de p53 a HDM2 y para la unión de p53 a HDMX. Por consiguiente, un polipéptido reticulado descrito en el presente documento puede tener actividad biológica mejorada en relación con un polipéptido correspondiente que no está reticulado. Se cree que los macrociclos peptidomiméticos de p53 interfieren con la unión de p53 a HDM2 y/o de p53 a HDMX, liberando de este modo p53 funcional e inhibiendo su destrucción. Los macrociclos peptidomiméticos de p53 descritos en el presente documento se pueden usar terapéuticamente, por ejemplo, para tratar cánceres y otros trastornos caracterizados por un indeseable bajo nivel o una baja actividad de p53 y/o para tratar cánceres y otros trastornos caracterizados por un indeseable elevado nivel de actividad de HDM2 o HDMX. Los macrociclos peptidomiméticos de p53 también pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier trastorno asociado con la regulación alterada de la vía transcripcional de p53, lo que lleva a afecciones de exceso de supervivencia y proliferación celular tales como cáncer y autoinmunidad, además de las afecciones de detención inapropiada del ciclo celular y apoptosis tales como neurodegeneración e inmunodeficiencias. En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos de p53 se unen a HDM2 (por ejemplo, GenBank® N.º de registro: 228952; GI:228952) y/o HDMX (también citado como HDM4; GenBank® N.º de registro: 88702791; GI:88702791).

La presente invención proporciona un macrociclo peptidomimético que interfiere con la unión entre p53 y HDM2 o HDMX, y que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 60 % idéntica a:

Leu Thr Phe \$₁ Glu Tyr Trp Ala Gln Leu \$₂ Ala;

en donde \$₁, es un aminoácido α, α-disustituido en la configuración R, en donde un sustituyente es un grupo metilo y el otro sustituyente es un grupo enlazador a \$₂; y en donde \$₂ es un aminoácido α, α-disustituido en la configuración S, en donde un sustituyente es un grupo metilo y el otro sustituyente es el grupo enlazador a \$₁; y en donde el grupo enlazador, comenzando desde \$₁ es -(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-.

Adicionalmente, se desvela una composición farmacéutica que comprende el macrociclo peptidomimético de la invención. También se proporciona un macrociclo peptidomimético o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La **FIGURA 1** describe la síntesis de Fmoc-Me-6-Cloro-Triptófano y Fmoc-6-Cloro-Triptófano.

La **FIGURA 2** muestra una señal de LC-MS de Me-6-Cloro-(Boc)Triptófano-Ni-S-BPB.

La **FIGURA 3** muestra una señal de 1H-RMN de Me-6-Cloro-(Boc)Triptófano-Ni-S-BPB.

La **FIGURA 4** muestra una señal de LC-MS de Fmoc-Me-6-Cloro-(Boc)Triptófano.

La **FIGURA 5** muestra un espectro de 1H-RMN de Fmoc-Me-6-Cloro-(Boc)Triptófano.

Las **FIGURAS 6a-f** describen los resultados de un ensayo de viabilidad celular, un ensayo de ELISA de competición, un ensayo GRIP, datos de Kd, un ensayo de activación de p21, datos de unión de competición de polarización fluorescente y datos de helicidad circular para los macrociclos peptidomiméticos de la divulgación.

Las **FIGURAS 7A-D** proporcionan datos de una variedad de macrociclos.

Las **FIGURAS 8A-B** proporcionan datos de una variedad de macrociclos.

Descripción detallada

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "macrociclo" se refiere a una macromolécula que tiene una estructura química que incluye un anillo o ciclo formado por al menos 9 átomos unidos de manera covalente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "macrociclo peptidomimético" o "polipéptido reticulado" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de restos de aminoácidos unidos por una pluralidad de enlaces peptídicos y al menos un enlazador formador del macrociclo que forma un macrociclo entre un primer resto de aminoácido de origen natural o no natural (o análogo) y un segundo resto de aminoácido de origen natural o no natural (o análogo) en la misma molécula. En macrociclo peptidomimético incluye casos en los que el enlazador formador del macrociclo conecta el carbono α del primer resto de aminoácido (o análogo) con el carbono α del segundo resto de aminoácido (o análogo). Los macrociclos peptidomiméticos opcionalmente incluyen uno o más enlaces no peptídicos entre uno o más restos de aminoácidos y/o restos de análogos de aminoácidos, y opcionalmente incluye uno o más restos de aminoácidos o restos de análogos de aminoácidos de origen no natural además de cualquiera que forme el macrociclo. Un "correspondiente polipéptido no reticulado" cuando se cita en el contexto de un macrociclo peptidomimético se entiende que se refiere a un polipéptido de la misma longitud que el macrociclo y que comprende los aminoácidos naturales equivalentes de la secuencia de tipo silvestre correspondiente con el macrociclo.

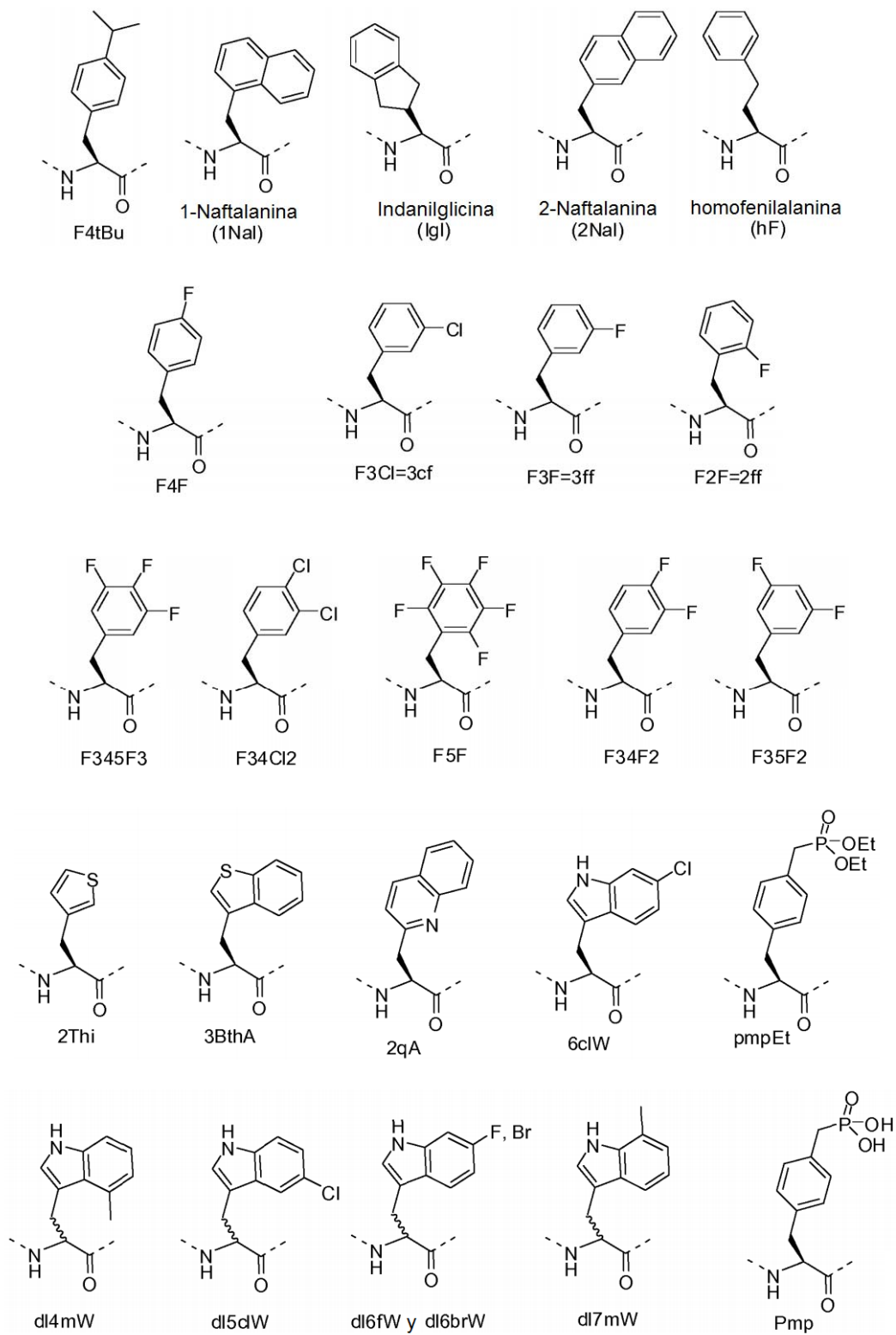
Tal como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una estructura secundaria definida en solución mediante un macrociclo peptidomimético de la invención tal como se mide mediante dicroísmo circular, RMN o cualquier otra medida biofísica, o resistencia a la degradación proteolítica *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de las estructuras secundarias son las hélices α , giros β y láminas β plegadas.

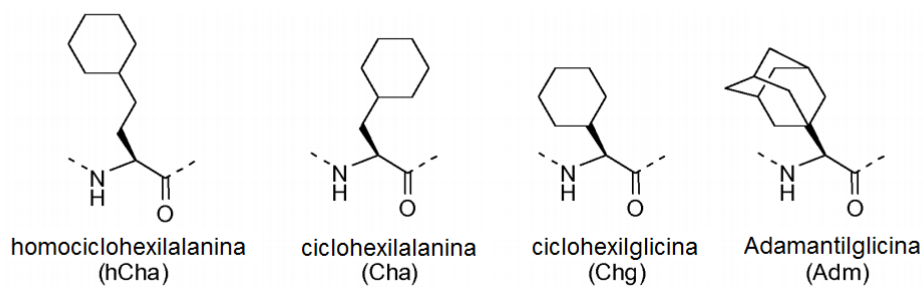
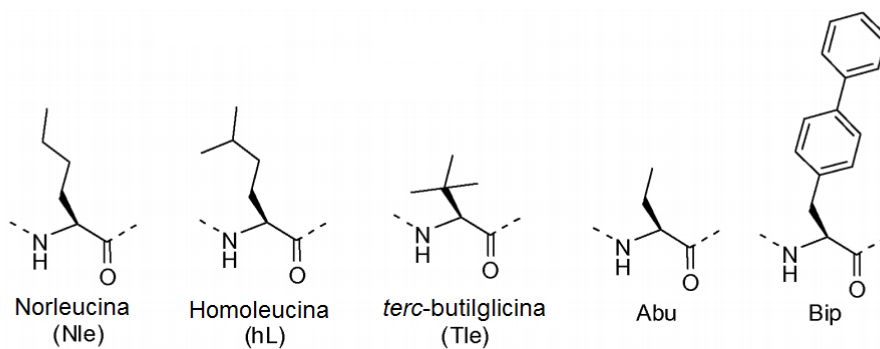
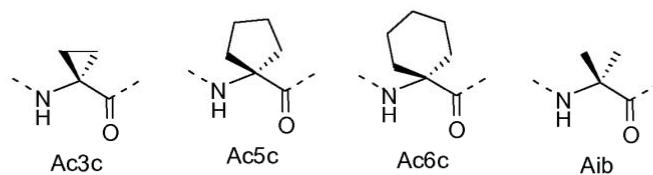
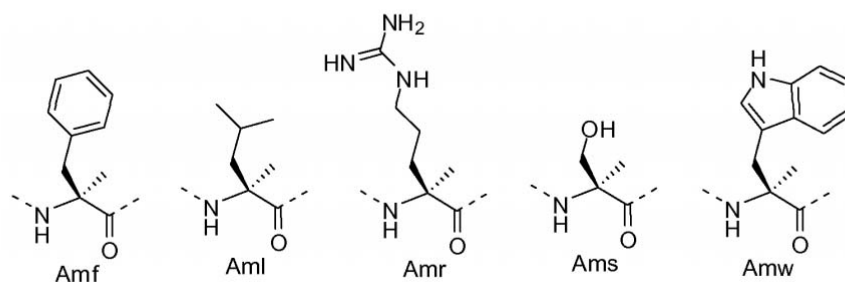
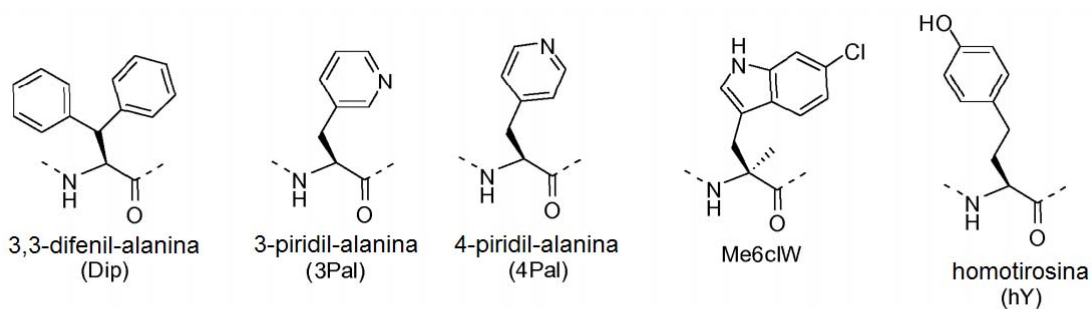
Tal como se usa en el presente documento, la expresión "estabilidad helicoidal" se refiere al mantenimiento de la estructura de la hélice α por un macrociclo peptidomimético de la divulgación tal como se mide mediante dicroísmo circular o RMN. Por ejemplo, en algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos de la divulgación presentan al menos un aumento de 1,25, 1,5, 1,75 o 2 veces en helicidad α tal como se determina por dicroísmo circular en comparación con un correspondiente macrociclo no reticulado.

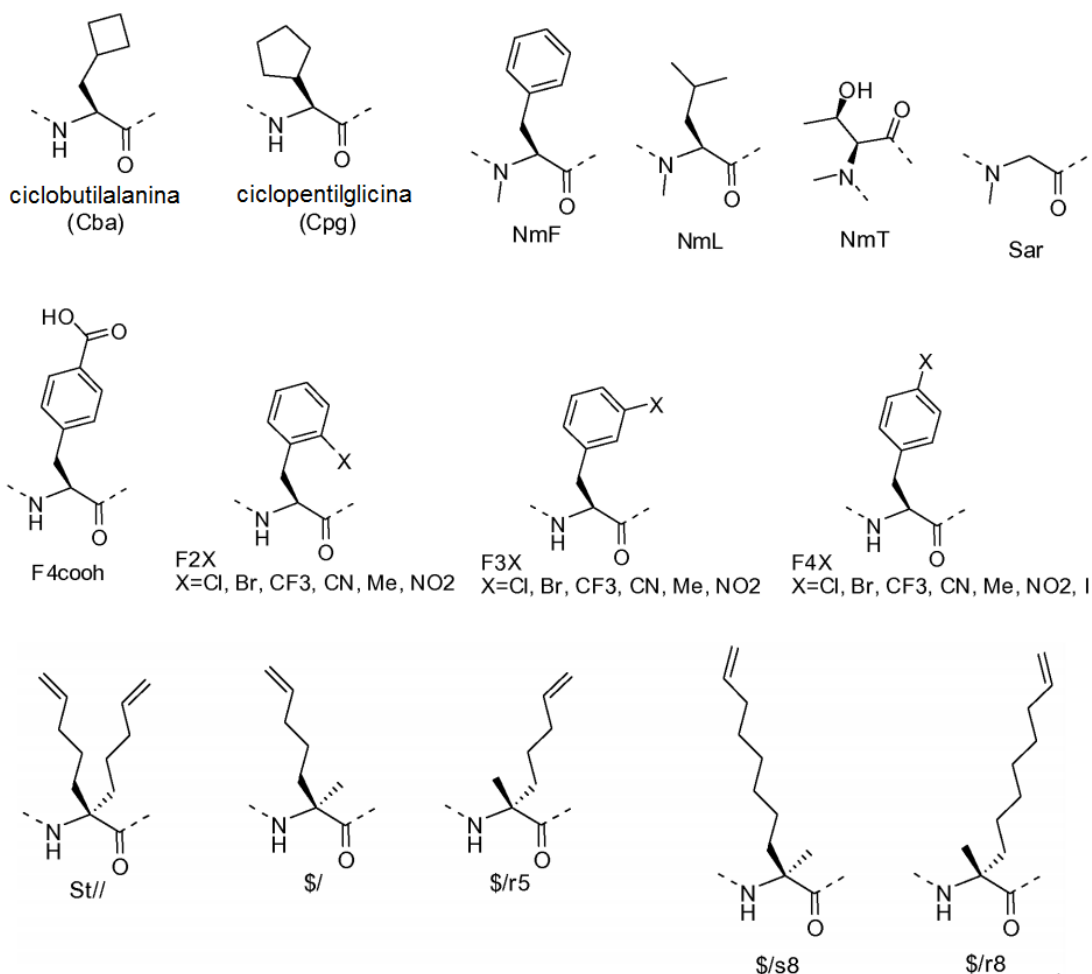
La expresión " α -aminoácido" o simplemente "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unidos a un carbono que se denomina el carbono α . Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, tanto los D-isómeros como los L-isómeros de los aminoácidos de origen natural, así como los aminoácidos de origen no natural preparados mediante la síntesis orgánica y otras vías metabólicas. Salvo que el contexto indique específicamente otra cosa, el término aminoácido, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir análogos de aminoácidos.

La expresión "aminoácido de origen natural" se refiere a uno cualquiera de los veinte aminoácidos comúnmente hallados en péptidos sintetizados en la naturaleza, y conocidos por las abreviaturas de una letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.

El término "análogo de aminoácido" o "aminoácido no natural" se refiere a una molécula que estructuralmente es similar a un aminoácido y que puede sustituir a un aminoácido en la formación de un macrociclo peptidomimético. Los análogos de aminoácidos incluyen, sin limitación, compuestos que son estructuralmente idénticos a un aminoácido, tal como se define en el presente documento, salvo por la inclusión de uno o más grupos metileno adicionales entre el grupo amino y carboxilo (por ejemplo, α -amino β -carboxi ácidos) o por la sustitución del grupo amino o carboxilo por un grupo reactivo similar (por ejemplo, sustitución de la amina primaria con una amina secundaria o terciaria, o sustitución del grupo carboxilo con un éster). Los aminoácidos no naturales incluyen estructuras de acuerdo con lo siguiente:



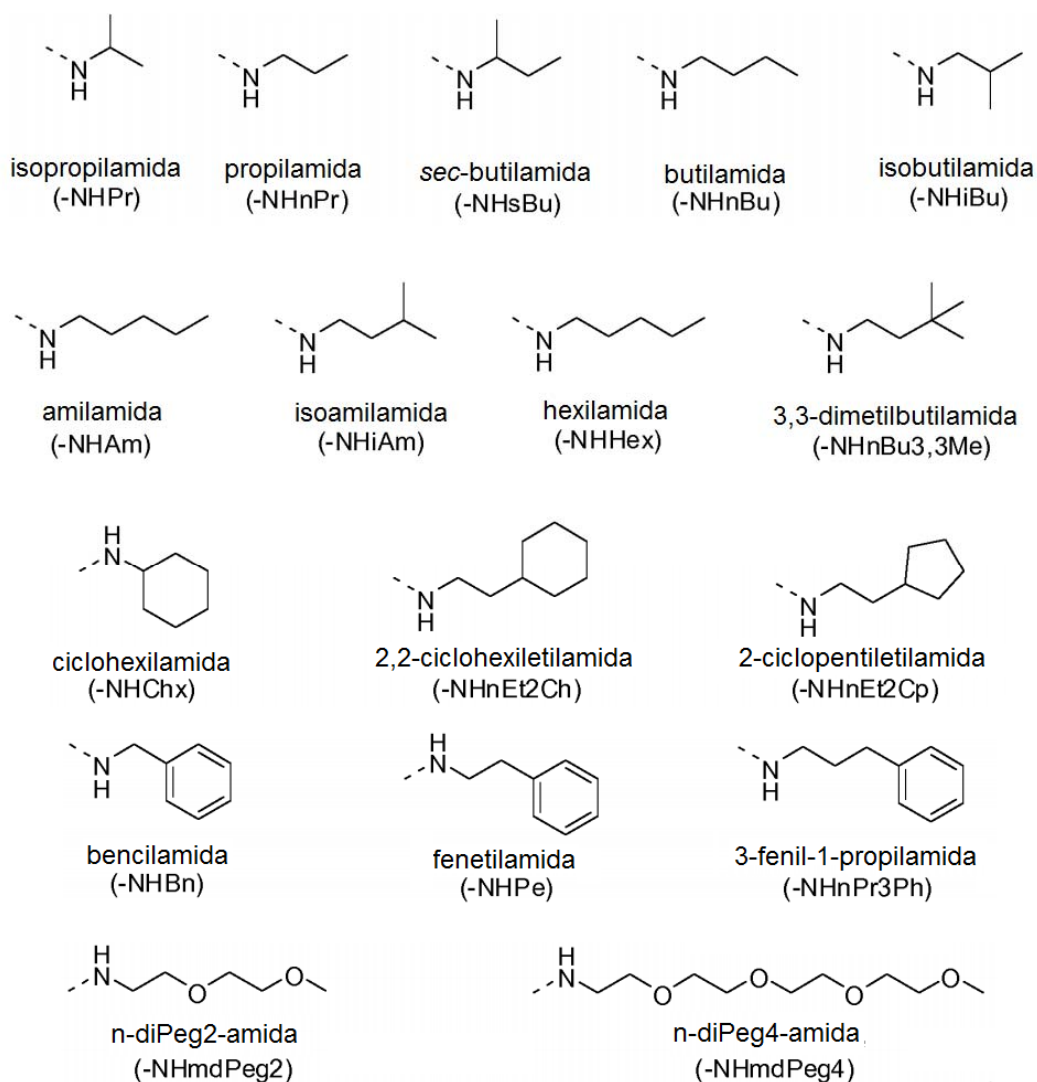




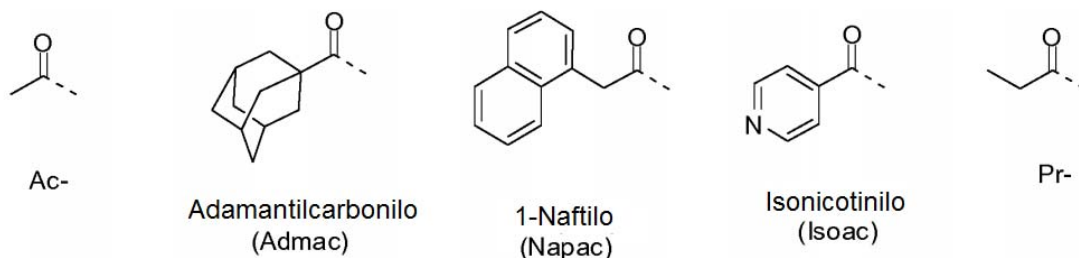
Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede estar alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido sin la supresión o la alteración sustancial de su actividad biológica o bioquímica esencial (por ejemplo, la unión al receptor o la activación). Un resto de aminoácido "esencial" es un resto que, cuando se altera a partir de la secuencia de tipo silvestre del polipéptido, da como resultado la supresión o la supresión sustancial de la actividad biológica o bioquímica esencial del polipéptido.

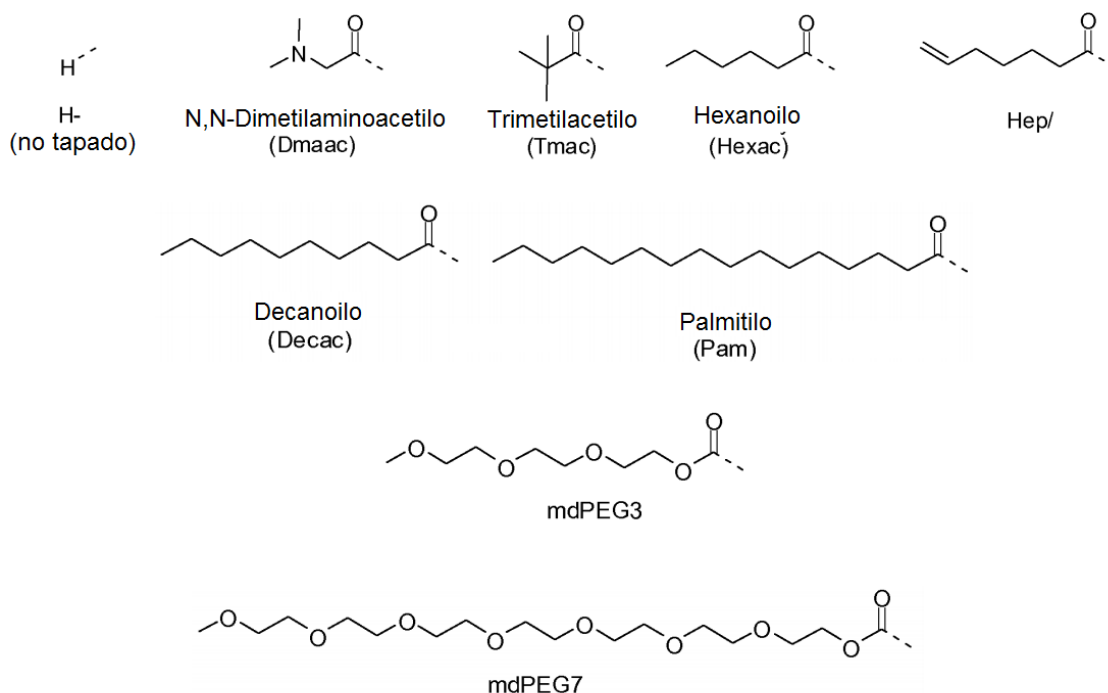
Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos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

La expresión "grupo de tapado" se refiere al resto químico que opcionalmente tiene lugar bien en el extremo carboxilo o amino de la cadena de polipéptido del macrociclo peptidomimético sujeto. El grupo de tapado de un extremo carboxilo incluye un ácido carboxílico no modificado (es decir, -COOH) o un ácido carboxílico con un sustituyente. Por ejemplo, el extremo carboxilo se puede sustituir con un grupo amino para producir una carboxamida en el extremo C-terminal. Diversos sustituyentes incluyen pero sin limitación aminas primarias y secundarias, incluyendo aminas secundarias pegiladas. Los grupos representativos de tapado de amina secundaria para el extremo C-terminal incluyen:



El grupo de tapado de un extremo amino incluye una amina no modificada (es decir, -NH₂) o una amina con un sustituyente. Por ejemplo, el extremo amino se puede sustituir con un grupo acilo para producir una carboxamida en el extremo N-terminal. Diversos sustituyentes incluyen pero sin limitación grupos acilo sustituidos, incluyendo los carbonilos C₁-C₆, los carbonilos C₇-C₃₀, y los carbamatos pegilados. Los grupos representativos de tapado para el extremo N-terminal incluyen:





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

La expresión "cadena lateral de aminoácidos" se refiere a un resto unido al carbono α en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácidos para alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácidos para fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácidos para cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácidos para aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácidos para tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etc. También se incluyen otras cadenas laterales de aminoácidos de origen no natural, por ejemplo, las de origen natural (por ejemplo, un metabolito de aminoácido) o las que están hechas sintéticamente (por ejemplo, un aminoácido α,ω disustituido).

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

El término "polipéptido" abarca dos o más aminoácidos de origen natural o no natural unidos por un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida). Los polipéptidos tal y como se describen en el presente documento incluyen proteínas de longitud completa (por ejemplo, proteínas de procesamiento completo) así como secuencias de aminoácidos más cortas (por ejemplo, fragmentos de proteínas de origen natural o fragmentos de polipéptido sintético).

La expresión "reactivo de microciclización" o "reactivo formador de macrociclo" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier reactivo que se puede usar para preparar un macrociclo peptidomimético de la divulgación mediante la reacción entre dos grupos reactivos. Los grupos reactivos pueden ser, por ejemplo, una azida y un alquino, en cuyo caso, los reactivos de macrociclización incluyen, sin limitación, reactivos de Cu tales como reactivos que proporcionan una especie de Cu(I) reactiva, tal como CuBr, CuI o CuOTf, así como sales de Cu(II) tales como Cu(CO₂CH₃)₂, CuSO₄, y CuCl₂ que se pueden convertir in situ a un reactivo de Cu(I) por la adición de un agente reductor tal como ácido ascórbico o ascorbato de sodio. Los reactivos de macrociclización pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, reactivos de Ru conocidos en la materia tales como Cp^{*}RuCl(PPh₃)₂, [Cp^{*}RuCl]₄ u otros reactivos de Ru que pueden proporcionar una especie de Ru(II) reactiva. En otros casos, los grupos reactivos son olefinas terminales. En tales casos, los reactivos de macrociclización o los reactivos formadores de macrociclo son catalizadores de metátesis que incluyen, pero sin limitación, catalizadores del complejo de carbeno de metal de transición tardía estabilizado, tales como catalizadores de carbeno de metal de transición del Grupo VIII. Por ejemplo, tales catalizadores son centros de metales de Ru y Os que tienen un estado de oxidación de +2, un recuento de electrones de 16 están pentacoordinados. Los catalizadores adicionales se describen en Grubbs et al., "Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis" Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452, y la Pat. de EE.UU. N.º 5.811.515.

5 En algunos casos, los compuestos contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden aparecer como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros y mezclas diastereoméricas. En algunos casos, los compuestos también se representan en múltiples formas tautoméricas (por ejemplo, si la alquilación de un sistema de anillos da como resultado la alquilación en múltiples sitios, la invención incluye todos los productos de reacción). Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en el presente documento se incluyen en la presente divulgación salvo que se indique expresamente lo contrario.

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos "aumentar" y "reducir" significan, respectivamente, provocar un aumento o una reducción estadísticamente significativa (es decir, $p < 0,1$) de al menos el 5 %.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se usa en sentido inclusivo de "y/o" y no en sentido exclusivo de "cualquiera/o".

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

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

En algunos casos, las secuencias de los péptidos derivan de la proteína p53.

25 A continuación se describen secuencias de péptidos adecuadas que derivan de p53 que se pueden usar para preparar péptidos macrocíclicos.

TABLA 1

Secuencia (negrita = resto crítico; X= aminoácido reticulado)																				Notas de diseño	
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	lineal		
Ac-	X	Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 1		
Ac-		X	Ser	Gln	Gln	X	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 2		
Ac-		Gln	Ser	X	Gln	Thr	Phe	X	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 3		
Ac-		Gln	Ser	Gln	X	Thr	Phe	X	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 4		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	X	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 5		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	X	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 6		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	X	Leu	Trp	Arg	X	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 7		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	X	Asn	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 8		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	X	Leu	Pro	Gln	X	-NH2	i-> i+4 x-enlace n.º 9		
Ac-	X	Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	X	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 1		
Ac-		X	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	X	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 2		
Ac-		Gln	X	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	X	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 3		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	X	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 4		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	X	Phe	Ser	Asn	Leu	Trp	Arg	X	Leu	Pro	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 5		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	X	Asn	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	X	Gln	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 6		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	X	Leu	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	X	Asn	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 7		
Ac-		Gln	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	X	Trp	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	X	-NH2	i-> i+7 x-enlace n.º 8		

TABLA 2

Secuencia (negrita = resto crítico; <u>X</u> = aminoácido reticulado)																Notas de diseño
Ac-		Leu	Thr	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	lineal
Ac-	<u>X</u>	Leu	Thr	Phe	<u>X</u>	His	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 1
Ac-		<u>X</u>	Thr	Phe	Glu	<u>X</u>	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 2
Ac-		Leu	<u>X</u>	Phe	Glu	His	<u>X</u>	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 3
Ac-		Leu	Thr	Phe	<u>X</u>	His	Tyr	Trp	<u>X</u>	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 4
Ac-		Leu	Thr	Phe	Glu	<u>X</u>	Tyr	Trp	Ala	<u>X</u>	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 5
Ac-		Leu	Thr	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	<u>X</u>	Gln	Leu	Thr	<u>X</u>		-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 6
Ac-		Leu	Thr	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	Ala	<u>X</u>	Leu	Thr	Ser	<u>X</u>	-NH2	i--> i+4 x-enlace n.º 7
Ac-		<u>X</u>	Thr	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	<u>X</u>	Gln	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+7 x-enlace n.º 1
Ac-		Gln	<u>X</u>	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	Ala	<u>X</u>	Leu	Thr	Ser		-NH2	i--> i+7 x-enlace n.º 2
Ac-		Gln	Thr	Phe	<u>X</u>	His	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	<u>X</u>	Ser		-NH2	i--> i+7 x-enlace n.º 3
Ac-		Gln	Thr	Phe	Glu	<u>X</u>	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	<u>X</u>		-NH2	i--> i+7 x-enlace n.º 4
Ac-		Gln	Thr	Phe	Glu	His	<u>X</u>	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser	<u>X</u>	-NH2	i--> i+7 x-enlace n.º 5

TABLA 3

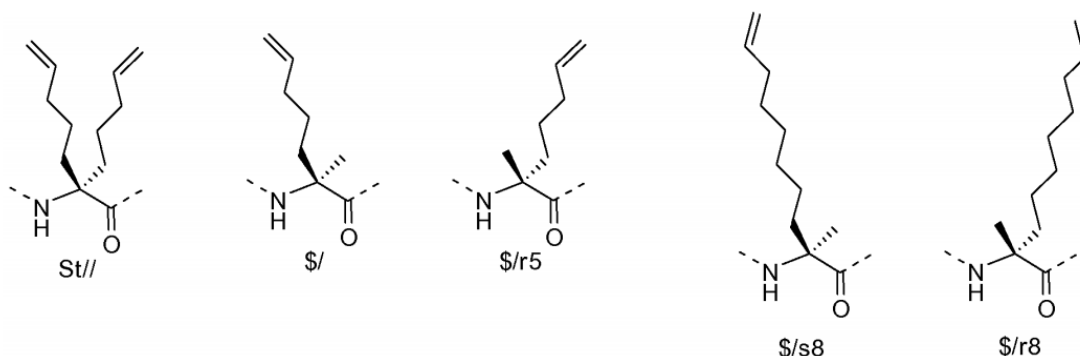
Secuencia (negrita = resto crítico; <u>X</u> = aminoácido reticulado)															Notas de diseño
Ac-		Phe	Met	Aib/His/Asn	Tyr	6-CITrp	Glu	Ac3c/Gln/leu	Leu					-NH ₂	lineal
Ac-	<u>X</u>	Phe	Met	Aib/His/Asn	<u>X</u>	6-CITrp	Glu	Ac3c/Gln/leu	Leu					-NH ₂	i--> i+4 x-enlace n.º 1
Ac-		Phe	<u>X</u>	Aib/His/Asn	Tyr	6-CITrp	<u>X</u>	Ac3c/Gln/leu	Leu					-NH ₂	i--> i+4 x-enlace n.º 2
Ac-		Phe	Met	<u>X</u>	Tyr	6-CITrp	Glu	<u>X</u>	Leu					-NH ₂	i--> i+4 x-enlace n.º 3
Ac-	<u>X</u>	Phe	Met	Aib/His/Asn	Tyr	6-CITrp	Glu	<u>X</u>	Leu					-NH ₂	i--> i+7 x-enlace n.º 1
Ac-		Phe	<u>X</u>	Aib/His/Asn	Tyr	6-CITrp	Glu	Ac3c/Gln/leu	Leu	<u>X</u>				-NH ₂	i--> i+7 x-enlace n.º 2

- 5 En la Tabla 3 y en otros lugares, "Aib" representa un resto de ácido 2-aminoisobutírico, mientras que "Ac3c" representa un resto de ácido aminociclopropano carboxílico.

Preparación de macrociclos peptidomiméticos

- 10 Los macrociclos peptidomiméticos se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cualquiera de los restos indicados por "X" en las Tablas 1, 2, 3 o 4 se pueden sustituir con un resto capaz de formar un reticulador con un segundo resto en la misma molécula o un precursor de tal resto.

- 15 Se conocen en la materia diversos métodos para realizar la formación de macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, la preparación de macrociclos peptidomiméticos de Fórmula I se describe en Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister y Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky et al., Science 305:1466-1470 (2004); la Patente de EE.UU. N. 7.192.713 y la solicitud de PCT WO 2008/121767. Los aminoácidos α,α -disustituidos y los precursores de aminoácidos desvelados en las referencias citadas se pueden emplear en la síntesis de los polipéptidos precursores de macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, el "aminoácido S5-olefina" es
- 20 (S)- α -(2'-pentenil) alanina y el "aminoácido R8 olefina" es (R)- α -(2'-octenil) alanina. Tras la incorporación de tales aminoácidos en los polipéptidos precursores, se hace reaccionar las olefinas terminales con un catalizador de metátesis, lo que conduce a la formación del macrociclo peptidomimético. En diversos casos, se pueden emplear los siguientes aminoácidos en la síntesis del macrociclo peptidomimético:



Los métodos adicionales de formación de macrociclos peptidomiméticos incluyen los desvelados por Mustapa, M. Firouz Mohd et al., J. Org. Chem (2003), 68, págs. 8193-8198; Yang, Bin et al. Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, págs. 1403-1406; la patente de EE.UU. n.º 5.364.851; la patente de EE.UU. n.º 5.446.128; la patente de EE.UU. n.º 5.824.483; la patente de EE.UU. n.º 6.713.280; y la patente de EE.UU. n.º 7.202.332. En tales casos, se usan precursores de aminoácidos que contiene un sustituyente adicional R- en la posición alfa. Tales aminoácidos se incorporan en el precursor de macrociclo en las posiciones deseadas, que pueden ser las posiciones donde el reticulador se sustituye o, como alternativa, otro lado en la secuencia del precursor del macrociclo. La ciclización del precursor se efectúa después de acuerdo con el método indicado.

Ensayos

Se probaron las propiedades de los macrociclos peptidomiméticos, por ejemplo, usando los métodos descritos a continuación. En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene propiedades biológicas mejoradas en relación con un polipéptido correspondiente que carece de los sustituyentes descritos en el presente documento.

Ensayo para determinar la helicidad α .

En disolución, la estructura secundaria de los polipéptidos con dominios de hélice α alcanzarán un equilibrio dinámico entre las estructuras de hélice aleatoria y las estructuras de hélice α , a menudo expresado como un "porcentaje de helicidad". Por lo tanto, por ejemplo, los dominios de hélice alfa predominantemente son hélices aleatorias en solución, con un contenido de hélice α normalmente por debajo del 25 %. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados, por otro lado, poseen, por ejemplo, una helicidad alfa que es al menos dos veces mayor que la de un correspondiente polipéptido no reticulado. En algunos casos, los macrociclos poseerán una helicidad alfa de más del 50 %. Para evaluar la helicidad de los macrociclos peptidomiméticos, los compuestos se disuelven en una solución acuosa (por ejemplo, solución de fosfato de potasio 50 mM a pH 7, o H₂O destilada, a concentraciones de 25-50 μ M). Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) usando parámetros de medida estándar (por ejemplo, temperatura, 20 °C; longitud de onda, 190-260 nm; etapa de resolución, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 seg; ancho de banda, 1 nm; longitud de la vía, 0,1 cm). El contenido de la hélice α de cada péptido se calcula dividiendo la elipticidad media del resto (por ejemplo $[\Phi]_{222\text{obs}}$) entre el valor documentado para un modelo de decapeptido helicoidal (Yang et al. (1986), Methods Enzymol. 130:208)).

Ensayo para determinar la temperatura de fusión (Tf).

Un macrociclo peptidomimético de la invención que comprende una estructura secundaria tal como una hélice α presenta, por ejemplo, una mayor temperatura de fusión que un correspondiente polipéptido no reticulado. Normalmente, los macrociclos peptidomiméticos de la invención presentan una Tf de > 60 °C que representa una estructura altamente estable en soluciones acuosas. Para probar el efecto de la formación de macrociclo sobre la temperatura de fusión, los macrociclos peptidomiméticos o los péptidos no modificados se disuelven en H₂O destilada (por ejemplo, a una concentración final de 50 μ M) y la Tf se determina midiendo el cambio en la elipticidad sobre un intervalo de temperatura (por ejemplo, de 4 a 95 °C) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) usando los parámetros estándar (por ejemplo, longitud de onda de 222 nm; etapa de resolución, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 seg; ancho de banda, 1 nm; tasa de aumento de la temperatura: 1 °C/min; longitud de la vía, 0,1 cm).

Ensayo de resistencia de proteasa.

El enlace amida de la estructura principal del péptido es susceptible a la hidrólisis por proteasas, produciendo de este modo compuestos peptídicos vulnerables a la degradación rápida *in vivo*. La formación de hélices de péptidos, sin embargo, típicamente introduce la estructura principal de la amida y, por lo tanto, puede protegerla de la escisión proteolítica. Los macrociclos peptidomiméticos de la presente invención se pueden someter a proteólisis de tripsina *in*

vitro para evaluar cualquier cambio en la tasa de degradación en comparación con un correspondiente polipéptido no reticulado. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético y un correspondiente polipéptido no reticulado se incuban con tripsina agarosa y las reacciones se inactivaron en diversos puntos temporales mediante centrifugación y posterior inyección de HPLC para cuantificar el sustrato residual mediante absorción ultravioleta a 280 nm. En resumen, el macrociclo peptidomimético y el precursor peptidomimético (5 mcg) se incuban con tripsina agarosa (Pierce) (S/E - 125) durante 0, 10, 20, 90 y 180 minutos. Las reacciones se inactivan mediante centrifugación de mesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se cuantifica mediante detección del pico basada en HPLC a 280 nm. La reacción proteolítica presenta una cinética de primer orden, y la tasa constante, k , se determina a partir de un gráfico de $\ln[S]$ frente al tiempo ($k = -1 \times \text{pendiente}$).

Ensayo estabilidad *ex vivo*.

Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, una semivida *ex vivo* que es al menos dos veces mayor que la de un correspondiente polipéptido no reticulado, y posee una semivida *ex vivo* de 12 horas o más. Para los estudios de estabilidad en suero *ex vivo*, pueden utilizarse una variedad de ensayos. Por ejemplo, un macrociclo peptidomimético y un correspondiente polipéptido no reticulado (2 mcg) se incuban con suero reciente de ratón, rata y/o ser humano (2 ml) a 37 °C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Para determinar el nivel de compuesto intacto, se puede usar el siguiente procedimiento: Las muestras se extraen transfiriendo 100 µl de los sueros a tubos de centrifuga de 2 ml seguido por la adición de 10 µl de ácido fórmico al 50 % y 500 µl de acetonitrilo y centrifugación a 14.000 RPM durante 10 min a 4 ± 2 °C. Los sobrenadantes se transfieren después a tubos nuevos de 2 ml y se evaporan en Turbopap bajo N_2 < 10 psi, a 37 °C. Las muestras se reconstituyen en 100 µl de acetonitrilo:agua al 50:50 y se someten a análisis LC-MS/MS.

Ensayos de unión *in vitro*.

Para evaluar la unión y la afinidad de macrociclos peptidomiméticos y los precursores peptidomiméticos a proteínas aceptoras, se usa un ensayo de polarización fluorescente (FPA, del inglés *fluorescence polarization assay*), por ejemplo. La técnica de FPA mide la orientación y la movilidad molecular usando luz polarizada y el marcador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares claramente elevados (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten mayores niveles de fluorescencia polarizada debido a sus tasas de rotación más lentas en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en la solución).

Por ejemplo, los macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados (25 nM) se incuban con la proteína aceptora (251000 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCL 50 mM, a pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se mide la actividad de unión, por ejemplo, mediante polarización fluorescente en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d se pueden determinar mediante análisis de regresión no lineal usando, por ejemplo, el programa informático Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Un macrociclo peptidomimético de la invención presenta, en algunos casos, una K_d similar o menor que un correspondiente polipéptido no reticulado.

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

Para evaluar la unión y la afinidad de los compuestos que antagonizan la interacción entre un péptido y una proteína aceptora, se usó un ensayo de polarización fluorescente (FPA) utilizando un macrociclo peptidomimético fluoresceinado derivado de una secuencia de precursor de peptidomimético, por ejemplo. La técnica de FPA mide la orientación y la movilidad molecular usando luz polarizada y el marcador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con pesos moleculares claramente elevados (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten mayores niveles de fluorescencia polarizada debido a sus tasas de rotación más lentas en comparación con los marcadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en la solución). Un compuesto que antagoniza la interacción entre el macrociclo peptidomimético fluoresceinado y una proteína aceptora se detectará en un experimento de FPA de unión competitiva.

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

Cualquier clase de molécula, tales como moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos o proteínas se pueden examinar como posibles antagonistas en este ensayo.

Ensayo para la unión de proteína-ligando mediante selección por afinidad-espectrometría de masas

Para evaluar la unión y la afinidad de los compuestos de ensayo por las proteínas, se usó el ensayo de selección por afinidad- espectrometría de masas, por ejemplo. Se llevaron a cabo experimentos de unión de proteína-ligando de acuerdo con el siguiente procedimiento representativo resumido para un experimento de control de todo el sistema usando macrociclo peptidomimético 1 μM más hMDM2 5 μM . Se disuelve una alícuota de 1 μl de DMSO de una solución madre de 40 μM de macrociclo peptidomimético en 19 μl de PBS (solución salina tamponada con fosfato: 50 mM, a pH 7,5, tampón fosfato que contiene NaCl 150 mM). La solución resultante se mezcla mediante pipeteo repetido y se aclara mediante centrifugación a 10.000 g durante 10 min. A una alícuota de 4 μl del sobrenadante resultante se le añaden 4 μl de hMDM2 10 μM en PBS. Cada muestra experimental de 8,0 μl contiene, por lo tanto, 40 pmol (1,5 μg) de proteína a una concentración de 5,0 μM en PBS más macrociclo peptidomimético 1 μM y DMSO al 2,5 %. Las muestras duplicadas preparadas de este modo para cada punto de concentración se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrían hasta 4 °C antes del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño-LC-MS de inyecciones de 5,0 μl . Las muestras que contienen una proteína diana, complejos proteína-ligando y compuestos sin unir se inyectan en una columna de SEC, en donde los complejos se separan del componente no de unión mediante una etapa rápida de SEC. El eluato de la columna de SEC se controla usando detectores por UV para confirmar que la fracción de proteína de elución temprana, que eluye en el volumen de vacío de la columna de SEC, está bien redisoluto a partir de los componentes no unidos que están retenidos en la columna. Después de que el pico que contiene la proteína y los complejos proteína-ligando eluye desde el detector de UV primario, entra en un bucle de la muestra en donde se escinde de la corriente de flujo de la etapa de SEC y se transfiere directamente al LC-MS a través de un mecanismo por válvulas. El ion $(M + 3H)^{3+}$ del macrociclo peptidomimético se observa mediante ESI-MS a la m/z esperada, lo que confirma la detección del complejo proteína-ligando.

Ensayo para experimentos de titulación de K_d de proteína-ligando.

Para evaluar la unión y la afinidad de los compuestos de ensayo por las proteínas, se realizó un experimento de titulación de K_d de proteína-ligando, por ejemplo. Los experimentos de titulaciones de K_d de proteína-ligando se llevaron a cabo tal como sigue: Se prepararon alícuotas de 2 μl de una solución madre diluida de forma seriada de macrociclo peptidomimético valorante (5, 2,5, ..., 0,098 mM) disolviéndolas después en 38 μl de PBS. Las soluciones resultantes se mezclan mediante pipeteo repetido y se aclaran mediante centrifugación 10.000 g durante 10 min. A las alícuotas de 4,0 μl de los sobrenadantes resultantes se le añaden 4,0 μl de hMDM2 10 μM en PBS. Cada muestra experimental de 8,0 μl contiene, por lo tanto, 40 pmol (1,5 μg) de proteína a una concentración de 5,0 μM en PBS, concentraciones variables (125, 62,5, ..., 0,24 μM) del péptido valorante y DMSO al 2,5 %. Las mezclas duplicadas preparadas de este modo para cada punto de concentración se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se enfrían a 4 °C antes del análisis de SEC-LC-MS de inyecciones de 2,0 μl . El ion $(M + H)^{1+}$, $(M + 2H)^{2+}$, $(M + 3H)^{3+}$, y/o $(M + Na)^{1+}$ se observa mediante ESI-MS; los cromatogramas del ión extraído se cuantifican, después se ajustan a las ecuaciones para derivar la afinidad de unión, K_d tal como se describe en "A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures." Annis, D. A.; Nazef, N.; Chuang, C. C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503; también en "ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions" D. A. Annis, C.-C. Chuang, y N. Nazef. En Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Editado por Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH; 2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (Series Editors): Methods and Principles in Medicinal Chemistry.

Ensayo para experimentos de unión competitiva mediante selección por afinidad-espectrometría de masas

Para determinar la capacidad para probar compuestos para unirse de manera competitiva a proteínas, se realizó el ensayo de selección por afinidad- espectrometría de masas, por ejemplo. Se preparó una mezcla de ligandos a 40 μM por componente combinando alícuotas de 2 μl de reservorios de 400 μM de cada uno de los tres compuesto con 14 μl de DMSO. Después, las alícuotas de 1 μl de esta mezcla de 40 μM por componente se combinan con alícuotas de 1 μl de DMSO de una solución madre diluida de forma seriada de macrociclo peptidomimético valorante (10, 5, 2,5, ..., 0,078 mM). Estas muestras de 2 μl se disuelven en 38 μl de PBS. Las soluciones resultantes se mezclaron mediante pipeteo repetido y se aclararon mediante centrifugación 10.000 g durante 10 min. A las alícuotas de 4,0 μl de los sobrenadantes resultantes se le añaden 4,0 μl de proteína hMDM2 10 μM en PBS. Cada muestra experimental de 8,0 μl contiene, por lo tanto, 40 pmol (1,5 μg) de proteína a una concentración de 5,0 μM en PBS más ligando a 0,5 μM , DMSO al 2,5 % y concentraciones variables (125, 62,5, ..., 0,98 μM) del macrociclo peptidomimético valorante. Las mezclas duplicadas preparadas de este modo para cada punto de concentración se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos, después se enfrían a 4 °C antes del análisis de SEC-LC-MS de inyecciones de 2,0 μl . Los detalles adicionales de estos y de otros métodos se proporcionan en "A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures." Annis, D. A.; Nazef, N.; Chuang, C. C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503; también en "ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions" D. A. Annis, C.-C. Chuang, y N. Nazef. En Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Editado por Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH; 2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (Series Editors): Methods and Principles in Medicinal Chemistry.

Ensayos de unión en células intactas.

Es posible medir la unión de los péptidos o macrociclos peptidomiméticos a sus aceptores naturales en células intactas mediante experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, las células intactas se incuban con compuestos fluoresceinados (marcados con FITC) durante 4 horas en ausencia de suero, seguido por la sustitución del suero y la incubación adicional que varía de 4-18 horas. Las células después se sedimentan y se incuban en tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, CHAPS al 1 % y mezcla de inhibidor de proteasa) durante 10 minutos a 4 °C. Los extractos se centrifugan a 14.000 rpm durante 15 minutos y se recolectan los sobrenadantes y se incuban con 10 µl de anticuerpo anti-FITC de cabra durante 2 horas, rotando a 4 °C seguido por la incubación de 2 horas adicionales a 4 °C con proteína A/G Sepharose (50 µl de suspensión de perlas al 50 %). Tras una rápida centrifugación, los sedimentos se lavan en tampón de lisis que contiene concentraciones de sal en aumento (por ejemplo, 150, 300, 500 mM). Las perlas después se reequilibran en NaCl a 150 mM antes de la adición del tampón de la muestra que contiene SDS y se hierven. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se someten opcionalmente a electroforesis usando geles Bis-Tris de un gradiente del 4 % - 12 % seguido por la transferencia a membranas Immobilon-P. Tras el bloqueo, las transferencias opcionalmente se incuban con un anticuerpo que detecta FITC y también con uno o más anticuerpos que detectan proteínas que se unen al macrociclo peptidomimético.

Ensayos de penetrabilidad celular.

Un macrociclo peptidomimético es, por ejemplo, más penetrable en la célula en comparación con un correspondiente macrociclo no reticulado. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, penetrabilidad celular que es al menos dos veces mayor que un correspondiente macrociclo no reticulado, y a menudo, el 20 % o más del macrociclo peptidomimético se observará que ha penetrado en la célula después de 4 horas. Para medir la penetrabilidad celular de los macrociclos peptidomiméticos y el correspondiente macrociclo no reticulado, las células intactas se incuban con macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados o el correspondiente macrociclo no reticulado (10 µM) durante 4 horas en medios sin suero a 37 °C, se lavaron dos veces con medios y se incubaron con tripsina (al 0,25 %) durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en PBS. Se analizó la fluorescencia celular, por ejemplo, usando un citómetro de flujo FACSCalibur o un lector de HCS Cellomics' KineticScan ®.

Ensayos de eficacia celular.

La eficacia de determinados macrociclos peptidomiméticos se determina, por ejemplo, en ensayos de muerte celular basados en células usando una variedad de líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas y células primarias que derivan de poblaciones de células humanas o de ratón. La viabilidad celular se controla, por ejemplo, durante 24-96 horas de incubación con macrociclos peptidomiméticos (0,5 a 50 µM) para identificar aquellos que provocan la muerte celular a CE50 < 10 µM. Varios ensayos convencionales que miden la viabilidad celular están comercialmente disponibles y opcionalmente se usan para evaluar la eficacia de los macrociclos peptidomiméticos. Además, los ensayos que miden la anexina V y la activación de la caspasa se usan opcionalmente para evaluar si los macrociclos peptidomiméticos eliminan células mediante la activación de la maquinaria apoptótica. Por ejemplo, se usa el ensayo Cell Titer-glo que determina la viabilidad celular en función de la concentración de ATP intracelular.

Ensayo de estabilidad *in vivo*.

Para investigar la estabilidad *in vivo* de los macrociclos peptidomiméticos, los compuestos, por ejemplo, se administran a ratones y/o ratas por vía IV, IP, PO o inhalación a concentraciones que varían desde 0,1 hasta 50 mg/kg y se extraen muestras de sangre a los 0 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 8 horas y 24 horas después de la inyección. Los niveles de compuesto intacto en 25 µl de suero reciente se miden después mediante LC-MS/MS como anteriormente.

Eficacia *in vivo* en modelos animales.

Para determinar la actividad antioncogénica de los macrociclos peptidomiméticos de la invención *in vivo*, los compuestos, por ejemplo, se dan solos (IP, IV, PO, por inhalación o vía nasal) o en combinación con dosis subóptimas de quimioterapia relevante (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido). En un ejemplo, 5 x 10⁶ RS4; se inyectaron 11 células (establecidas a partir de la médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) que expresan luciferasa de manera estable se inyectan mediante la vena de la cola en ratones NOD-SCID 3 horas después de que se hayan sometido a irradiación total del cuerpo. Si no se trata, esta forma de leucemia es letal en 3 semanas en este modelo. La leucemia se controla fácilmente, por ejemplo, inyectando a los ratones con D-luciferina (60 mg/kg) y obteniendo imágenes de los animales anestesiados (por ejemplo, mediante el sistema de obtención de imágenes *in vivo* de Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La bioluminiscencia total del cuerpo se cuantifica mediante la integración del flujo de fotones (fotones/seg) mediante el programa informático Living Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los macrociclos peptidomiméticos solo o en combinación con dosis subóptimas de agentes quimioterapéuticos relevantes, por ejemplo, se administran a ratones con leucemia (10 días después de la inyección/día 1 del experimento, en un intervalo de bioluminiscencia de 14-16) mediante las vías de la vena de la cola o IP que varían desde 0,1 mg/kg a 50 mg/kg durante 7 a 21 días. Opcionalmente, se obtienen imágenes de los ratones

a lo largo del experimento en días alternos y se controla diariamente la supervivencia durante la duración del experimento. Los ratones que han finalizado el tratamiento se someten opcionalmente a necropsia al finalizar el experimento. Otro modelo animal es la implantación en ratones NOD-SCID de DoHH2, una línea celular que deriva de linfoma folicular humano, que expresa luciferasa de manera estable. Estos ensayos *in vivo* opcionalmente generan datos farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicología preliminares.

Ensayos clínicos.

Para determinar la adecuación de los macrociclos peptidomiméticos para el tratamiento en seres humanos, se realizaron ensayos clínicos. Por ejemplo, se seleccionaron pacientes diagnosticados de cáncer y que necesitaban tratamiento y se separaron en el grupo de tratamiento y uno o más grupos de control, en donde al grupo de tratamiento se le administra un macrociclo peptidomimético, mientras que los grupos de control reciben un placebo o un fármaco anticancerígeno conocido. Por lo tanto, la seguridad y la eficacia de los macrociclos peptidomiméticos del tratamiento se puede evaluar realizando comparaciones de los grupos de pacientes con respecto a factores tales como la supervivencia y la calidad de vida. En este ejemplo, el grupo de pacientes tratado con un macrociclo peptidomimético mostró una supervivencia mejorada a largo plazo en comparación con un grupo de control tratado con un placebo.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Los macrociclos peptidomiméticos de la invención también incluyen sales farmacéuticamente aceptables, que, tras su administración a un receptor, son capaces de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la invención.

En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos se modifican uniendo grupos funcionales apropiados de manera covalente o no covalente para mejorar las propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, el sistema nervioso central), que aumentan la disponibilidad oral, que aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyección, que alteran el metabolismo y que alteran la tasa de excreción.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, pamoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales que derivan de las bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), de amonio y de N-(alquil)₄⁺.

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

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

Los excipientes sólidos adecuados son cargas de carbohidratos o proteínas e incluyen, pero sin limitación, azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas incluyendo goma arábiga y tragacanto; así como proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se añaden agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones acuosas de propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas pueden formularse en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

La preparación farmacéutica está preferentemente en una forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades concretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Asimismo, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, oblea o pastilla para chupar del mismo, o puede ser el número adecuado de cualquiera de estas en forma envasada.

Cuando las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de macrociclos peptidomiméticos y uno o más agentes terapéuticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional se encontrarían presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 a 100 % y más preferentemente entre aproximadamente 5 a 95 % de la dosis normalmente administrada en un régimen de monoterapia. En algunos casos, los agentes adicionales se administran por separado, como parte de un régimen de dosificación múltiple, de los compuestos de la presente invención. Como alternativa, esos agentes son parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos de la presente invención en una única composición.

Métodos de uso

En un aspecto, la presente divulgación proporciona nuevos macrociclos peptidomiméticos que son útiles en ensayos de unión competitiva para identificar agentes que se unen al ligando (o ligandos) natural de las proteínas o péptidos sobre los cuales se modelan los macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, en el sistema p53/HDMX, los macrociclos peptidomiméticos marcados basados en p53 se pueden usar en un ensayo de unión a HDMX junto con moléculas pequeñas que se unen de manera competitiva a HDMX. Los estudios de unión competitiva permiten una evaluación rápida *in vitro* y la determinación de los candidatos de fármaco específicos para el sistema p53/HDMX. Tales estudios de unión se pueden realizar con cualquiera de los macrociclos peptidomiméticos desvelados en el presente documento y sus miembros de unión.

La divulgación proporciona adicionalmente la generación de anticuerpos frente a los macrociclos peptidomiméticos. En algunos casos, estos anticuerpos se unen de manera específica tanto al macrociclo peptidomimético como a los péptidos precursores, tales como p53, con los que se relacionan los macrociclos peptidomiméticos. Tales anticuerpos, por ejemplo, alteran la interacción natural proteína-proteína, por ejemplo, la unión entre p53 y HDMX.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o la actividad anómala (por ejemplo, insuficiente o excesiva) de las moléculas, incluyendo p53, HDM2 o HDMX.

En otro caso, un trastorno está causado, al menos en parte, por un nivel anómalo de p53 o HDM2 o HDMX, (por ejemplo, sobreexpresión o infraexpresión) o por la presencia de p53 o HDM2 o HDMX que presenta una actividad anómala. Como tal, la reducción en el nivel y/o en la actividad de p53 o HDM2 o HDMX o la mejora del nivel y/o de la actividad de p53 o HDM2 o HDMX, por macrociclos peptidomiméticos derivados de p53, se usa, por ejemplo, para mejorar o reducir los síntomas adversos del trastorno.

En el presente documento se describen métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad incluyendo un trastorno hiperproliferativo y un trastorno inflamatorio interfiriendo con la interacción o la unión entre miembros de unión, por ejemplo, entre p53 y HDM2 o p53 y HDMX. Estos métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un animal de sangre caliente, incluyendo un ser humano. En algunos casos, la administración de los compuestos de la presente divulgación induce la detención del crecimiento celular o la apoptosis.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se define como la aplicación o la administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o la administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

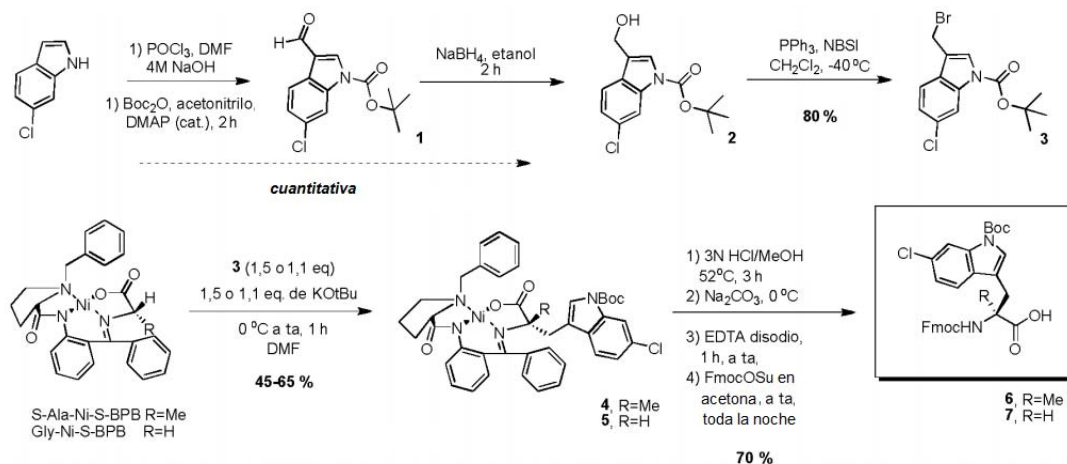
Los macrociclos peptidomiméticos de la invención se pueden usar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecer de manera autónoma, es decir, un estado anormal o afección caracterizado por un crecimiento celular de rápida proliferación. Los estados patológicos hiperproliferativos y neoplásicos pueden categorizarse como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen una patología o pueden categorizarse como no patológicos, es decir, una desviación respecto de la normalidad, pero no asociada a una patología. Se pretende que el término incluya todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados a malignos, independientemente del tipo histopatológico o del estado de invasividad. Un tumor metastásico puede surgir a partir de una multitud de tipos tumorales primarios, que incluyen, pero sin limitación, aquellos de origen de mama, pulmón, hígado, colon y ovario. Las células "hiperproliferativas patológicas" se producen en estados patológicos caracterizados por un crecimiento tumoral maligno. Los ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociada a la reparación de heridas. Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma o trastornos metastásicos. En algunas realizaciones, los macrociclos peptidomiméticos son nuevos agentes terapéuticos para control el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de tales cánceres y similares.

Los ejemplos de cánceres o afecciones neoplásicas incluyen, pero sin limitación, fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, cáncer

- gástrico, cáncer de esófago, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de piel, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículos, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma o sarcoma de Kaposi.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluyen enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de los linajes mieloide, linfocítico o eritroide o células precursoras de los mismos. Preferentemente, las enfermedades surgen a partir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides adicionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, leucemia promielocítica aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus (1991), Crit Rev. Oncol./Hematol. 11:267-97); las neoplasias linfocíticas incluyen, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (PLL), tricoleucemia (HLL) y macroglobulinemia de Waldenström (WM). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero sin limitación, linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfoma de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular de mama incluyen, pero sin limitación, enfermedad proliferativa de mama que incluye, por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante y papilomas de los conductos pequeños; tumores, por ejemplo, tumores estromales tales como fibroadenoma, tumores filoides y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma de conductos grandes; carcinoma de mama incluyendo carcinoma in situ (no invasivo) que incluye carcinoma ductal in situ (incluyendo la enfermedad de Paget) y carcinoma lobular in situ, y carcinoma invasivo (infiltrante) que incluye, pero sin limitación, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma colóide (mucinoso), carcinoma tubular y carcinoma papilar invasivo, y neoplasias malignas misceláneas. Los trastornos en mamas masculinas incluyen, pero sin limitación, ginecomastia y carcinoma.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular de pulmón incluyen, pero sin limitación, carcinoma broncogénico, incluyendo síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoides bronquiales, tumores misceláneos y tumores metastásicos; patologías de la pleura, incluyendo derrames pleurales inflamatorios, derrames pleurales no inflamatorios, neumotórax y tumores pleurales, incluyendo tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y mesotelioma maligno.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular de colon incluyen, pero sin limitación, pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes hereditarios, carcinogénesis colorrectal, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular de hígado incluyen, pero sin limitación, hiperplasias nodulares, adenomas y tumores malignos, incluyendo carcinoma primario del hígado y tumores metastásicos.
- Los ejemplos de trastornos proliferativos y/o de la diferenciación celular de ovario incluyen, pero sin limitación, tumores de ovario tales como, tumores del epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales de superficie; tumores de células germinales tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor de seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores del estroma de los cordones sexuales tales como, tumores de células teca-granulosa, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células de hil, y gonadoblastoma; y tumores metastásicos tales como tumores de Krukenberg.
- En otros casos o en casos adicionales, los macrociclos peptidomiméticos descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir o diagnosticar afecciones caracterizadas por una muerte celular hiperactiva o muerte celular debido a lesiones fisiológicas, etc. Algunos ejemplos de afecciones caracterizadas por la muerte celular prematura o indeseada son, o como alternativa, la proliferación celular indeseada o excesiva incluye, pero sin limitación, las afecciones hipocelular/hipoplasia, acelular/aplasia, o hiper celular/hiperplasia. Algunos ejemplos incluyen trastornos hematológicos que incluyen, pero sin limitación, anemia de Fanconi, anemia aplásica, talasemia, neutropenia congénita y mielodisplasia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de aminoácidos 6-clorotriptófano Fmoc



5

Terc-butyl 6-chloro-3-formil-1H-indol-1-carboxilato, **1**. A una solución agitada de DMF seco (12 ml) se le añadió por goteo POCl_3 (3,92 ml, 43 mmol, 1,3 equiv) a 0°C bajo argón. La solución se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos antes de que una solución de 6-cloroindol (5,0 g, 33 mmol, 1 eq.) en DMF seco (30 ml) se añadiese por goteo. Se permitió que la mezcla resultante se calentase a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 horas adicionales. Se añadió agua (50 ml) y la solución se neutralizó con NaOH acuoso 4 M (a pH ~ 8). El sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. Este material se usó directamente en la próxima etapa sin purificación adicional. A una solución agitada de formil indol crudo (33 mmol, 1 eq.) en THF (150 ml) se le añadió sucesivamente Boc_2O (7,91 g, 36,3 mmol, 1,1 equiv) y DMAP (0,4 g, 3,3 mmol, 0,1 equiv) a temperatura ambiente bajo N_2 . La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se evaporó el disolvente bajo presión reducida. El resto se tomó en EtOAc y se lavó con HCl 1 N, se secó y se concentró para dar el formil indol **1** (9 g, al 98 % durante 2 etapas) como un sólido blanco. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,70 (s, Boc, 9 H); 7,35 (dd, 1H); 8,21 (m, 3H); 10,07 (s, 1H).

10

15

Terc-butyl 6-chloro-3-(hidroximetil)-1H-indol-1-carboxilato, **2**. A una solución del compuesto **1** (8,86 g, 32 mmol, 1 eq.) en etanol (150 ml) se le añadió NaBH_4 (2,4 g, 63 mmol, 2 eq.). La reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y el resto se vertió en dietil éter y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido blanco (8,7 g, 98 %). Este material se usó directamente en la próxima etapa sin purificación adicional. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,65 (s, Boc, 9 H); 4,80 (s, 2H, CH_2); 7,21 (dd, 1H); 7,53 (m, 2H); 8,16 (bs, 1H).

20

25

Terc-butyl 3-(bromometil)-6-chloro-1H-indol-1-carboxilato, **3**. A una solución del compuesto **2** (4,1 g, 14,6 mmol, 1 eq.) en diclorometano (50 ml) bajo argón se le añadió una solución de trifenilfosfina (4,59 g, 17,5 mmol, 1,2 eq.) en diclorometano (50 ml) a -40°C . La solución de reacción se agitó 30 min adicionales a 40°C . Después se añadió NBS (3,38 g, 19 mmol, 1,3 eq.). Se permitió que la mezcla resultante se calentase a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. El diclorometano se evaporó, se añadió tetracloruro de carbono (100 ml) y la mezcla se agitó durante 1 h y se filtró. El filtrado se concentró, se cargó en un tapón de sílice y se eluyó rápidamente con EtOAc al 25 % en hexanos. La solución se concentró para dar una espuma blanca (3,84 g, 77 %). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,66 (s, Boc, 9 H); 4,63 (s, 2H, CH_2); 7,28 (dd, 1H); 7,57 (d, 1H); 7,64 (bs, 1H); 8,18 (bs, 1H).

30

α Me-6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **4**. A S-Ala-Ni-S-BPB (2,66 g, 5,2 mmol, 1 eq.) y KO-tBu (0,87 g, 7,8 mmol, 1,5 eq.) se le añadieron 50 ml de DMF bajo argón. El compuesto derivado de bromuro **3** (2,68 g, 7,8 mmol, 1,5 eq.) en solución de DMF (5,0 ml) se añadió a través de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se inactivó la solución con ácido acético acuoso al 5 % y se diluyó con agua. El producto deseado se extrajo en diclorometano, se secó y se concentró. El producto aceitoso **4** se purificó mediante cromatografía flash (de carga sólida) en fase normal usando EtOAc y Hexanos como eluyentes para dar un sólido rojo (1,78 g, rendimiento del 45 %). α Me-6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **4**: M+H calc. 775,21, M+H obs. 775,26; RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,23 (s, 3H, α Me); 1,56 (m, 11H, Boc + CH_2); 1,82-2,20 (m, 4H, 2 CH_2); 3,03 (m, 1H, CH_α); 3,24 (m, 2H, CH_2); 3,57 y 4,29 (sistema AB, 2H, CH_2 (bencilo), J= 12,8Hz); 6,62 (d, 2H); 6,98 (d, 1H); 7,14 (m, 2H); 7,23 (m, 1H); 7,32-7,36 (m, 5H); 7,50 (m, 2H); 7,67 (bs, 1H); 7,98 (d, 2H); 8,27 (m, 2H).

35

40

Fmoc- α Me-6Cl-Trp(Boc)-OH, **6**. A una solución de HCl 3N/MeOH (1/3, 15 ml) a 50°C se le añadió por goteo una solución del compuesto **4** (1,75 g, 2,3 mmol, 1 eq.) en MeOH (5 ml). El material de partida desapareció en 3-4 horas. La solución ácida se enfrió después a 0°C con un baño en hielo y se inactivó con una solución acuosa de Na_2CO_3 (1,21 g, 11,5 mmol, 5 eq.). Se retiró el metanol y se añadieron 8 equivalentes más de Na_2CO_3 (1,95 g, 18,4 mmol) a la suspensión. Luego se añadió dihidrato de sal disódica EDTA de eliminación de níquel (1,68 g, 4,5 mmol, 2 eq.) y la

45

suspensión se agitó durante 2 h. Se añadió una solución de Fmoc-OSu (0,84 g, 2,5 mmol, 1,1 eq.) en acetona (50 ml) y la reacción se agitó durante la noche. A continuación, la reacción se diluyó con dietil éter y HCl 1 N. La capa orgánica se secó después sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto deseado **6** se purificó en fase normal usando acetona y diclorometano como eluyentes para dar una espuma blanca (0,9 g, rendimiento del 70 %). Fmoc- α Me-6Cl-Trp(Boc)-OH, **6**: M+H calc. 575,19, M+H obs. 575,37; RMN ^1H (CDCl_3) 1,59 (s, 9H, Boc); 1,68 (s, 3H, Me); 3,48 (bs, 2H, CH_2); 4,22 (m, 1H, CH); 4,39 (bs, 2H, CH_2); 5,47 (s, 1H, NH); 7,10 (m, 1H); 7,18 (m, 2H); 7,27 (m, 2H); 7,39 (m, 2H); 7,50 (m, 2H); 7,75 (d, 2H); 8,12 (bs, 1H).

6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **5**. A **Gly-Ni-S-BPB** (4,6 g, 9,2 mmol, 1 eq.) y KO-*t*Bu (1,14 g, 10,1 mmol, 1,1 eq.) se le añadieron 95 ml de DMF bajo argón. El compuesto derivado de bromuro **3** (3,5 g, 4,6 mmol, 1,1 eq.) en solución de DMF (10 ml) se añadió a través de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se inactivó la solución con ácido acético acuoso al 5 % y se diluyó con agua. El producto deseado se extrajo en diclorometano, se secó y se concentró. El producto aceitoso **5** se purificó mediante cromatografía flash (de carga sólida) en fase normal usando EtOAc y Hexanos como eluyentes para dar un sólido rojo (5 g, rendimiento del 71 %). 6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **5**: M+H calc. 761,20, M+H obs. 761,34; RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,58 (m, 11H, Boc + CH_2); 1,84 (m, 1H); 1,96 (m, 1H); 2,24 (m, 2H, CH_2); 3,00 (m, 1H, CH_α); 3,22 (m, 2H, CH_2); 3,45 y 4,25 (sistema AB, 2H, CH_2 (bencilo), J = 12,8Hz); 4,27 (m, 1H, CH_α); 6,65 (d, 2H); 6,88 (d, 1H); 7,07 (m, 2H); 7,14 (m, 2H); 7,28 (m, 3H); 7,35-7,39 (m, 2H); 7,52 (m, 2H); 7,96 (d, 2H); 8,28 (m, 2H).

Fmoc-6Cl-Trp(Boc)-OH, **7**. A una solución de HCl 3N/MeOH (1/3, 44 ml) a 50 °C se le añadió por goteo una solución del compuesto **5** (5 g, 6,6 mmol, 1 eq.) en MeOH (10 ml). El material de partida desapareció en 3-4 horas. La solución ácida se enfrió después a 0 °C con un baño en hielo y se inactivó con una solución acuosa de Na_2CO_3 (3,48 g, 33 mmol, 5 eq.). Se retiró el metanol y se añadieron 8 equivalentes más de Na_2CO_3 (5,57 g, 52 mmol) a la suspensión. El dihidrato de sal disódica EDTA de eliminación de níquel (4,89 g, 13,1 mmol, 2 eq.) y la suspensión se agitó durante 2 h. Se añadió una solución de Fmoc-OSu (2,21 g, 6,55 mmol, 1,1 eq.) en acetona (100 ml) y la reacción se agitó durante la noche. A continuación, la reacción se diluyó con dietil éter y HCl 1 N. La capa orgánica se secó después sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto deseado **7** se purificó en fase normal usando acetona y diclorometano como eluyentes para dar una espuma blanca (2,6 g, rendimiento del 69 %). Fmoc-6Cl-Trp(Boc)-OH, **7**: M+H calc. 561,17, M+H obs. 561,37; RMN ^1H (CDCl_3) 1,63 (s, 9H, Boc); 3,26 (m, 2H, CH_2); 4,19 (m, 1H, CH); 4,39 (m, 2H, CH_2); 4,76 (m, 1H); 5,35 (d, 1H, NH); 7,18 (m, 2H); 7,28 (m, 2H); 7,39 (m, 3H); 7,50 (m, 2H); 7,75 (d, 2H); 8,14 (bs, 1H).

Ejemplo 2: Macrociclos peptidomiméticos de la invención

Se sintetizaron macrociclos peptidomiméticos, se purificaron y se analizaron tal como se ha descrito anteriormente y como se describe a continuación (Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister y Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky et al., Science 305:1466-1470 (2004); y la patente de Estados Unidos N.º 7.192.713). Se diseñaron macrociclos peptidomiméticos reemplazando dos o más aminoácidos de origen natural con los correspondientes aminoácidos sintéticos. Se hicieron sustituciones en las posiciones i e i+4, e i e i+7. La síntesis del péptido se realizó bien de forma manual o sobre un sintetizador automático de péptidos (modelo 433A de Applied Biosystems) usando las condiciones de fase sólida, la resina rink de amida AM (Novabiochem) y la química del grupo protector de la cadena principal de Fmoc. Para el acoplamiento de los aminoácidos naturales protegidos de Fmoc (Novabiochem), se emplearon 10 equivalentes de aminoácidos y una proporción molar de 1:1:2 de los agentes de acoplamiento HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA. Los aminoácidos no naturales (4 equiv) se acoplaron con una proporción molar de 1:1:2 de HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA. El extremo N-terminal de los péptidos sintéticos se acetilaron, mientras que el extremo C-terminal se amidó.

La purificación de los compuestos reticulados se logró mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Varian ProStar) en una columna C18 de fase inversa (Varian) para producir los compuestos puros. La composición química de los productos puros se confirmó mediante espectrometría de masas LC/MS (LCT de micromasa en interfaz con el sistema de HPLC Agilent 1100) y el análisis de aminoácidos (modelo 420A de Applied Biosystems).

La Tabla 4 muestra una lista de los macrociclos peptidomiméticos preparados.

Tabla 4

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-1	Ac-LSQETF\$ ϵ 8DLWKLL\$EN-NH ₂	2068,13	1035,07	1035,36
SP-2	Ac-LSQETF\$ ϵ 8NLWKLL\$QN-NH ₂	2066,16	1034,08	1034,31
SP-3	Ac-LSQQTF\$ ϵ 8NLWRLL\$QN-NH ₂	2093,18	1047,59	1047,73
SP-4	Ac-QSQQTF\$ ϵ 8NLWKLL\$QN-NH ₂	2080,15	1041,08	1041,31
SP-5	Ac-QSQQTF\$ ϵ 8NLWRLL\$QN-NH ₂	2108,15	1055,08	1055,32
SP-6	Ac-QSQQTA\$ ϵ 8NLWRLL\$QN-NH ₂	2032,12	1017,06	1017,24
SP-7	Ac-QAibQQTF\$ ϵ 8NLWRLL\$QN-NH ₂	2106,17	1054,09	1054,34

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-8	Ac-QSQQTFSNLWRLLPQN-NH2	2000,02	1001,01	1001,26
SP-9	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2136,18	1069,09	1069,37
SP-10	Ac-QSQAibTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2065,15	1033,58	1033,71
SP-11	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$AN-NH2	2051,13	1026,57	1026,70
SP-12	Ac-ASQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
SP-13	Ac-QSQQTF\$r8ALWRLL\$QN-NH2	2065,15	1033,58	1033,41
SP-14	Ac-QSQETF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
SP-15	Ac-RSQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2136,20	1069,10	1069,17
SP-16	Ac-RSQQTF\$r8NLWRLL\$EN-NH2	2137,18	1069,59	1069,75
SP-17	Ac-LSQETFSDLWKLLPEN-NH2	1959,99	981,00	981,24
SP-18	Ac-QSQ\$TFS\$LWRLLPQN-NH2	2008,09	1005,05	1004,97
SP-19	Ac-QSQQ\$FSN\$WRLLPQN-NH2	2036,06	1019,03	1018,86
SP-20	Ac-QSQQT\$SNL\$RLLPQN-NH2	1917,04	959,52	959,32
SP-21	Ac-QSQQTF\$NLW\$LLPQN-NH2	2007,06	1004,53	1004,97
SP-22	Ac-RTQATF\$r8NQWAibANie\$TNAibTR-NH2	2310,26	1156,13	1156,52
SP-23	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$RN-NH2	2136,20	1069,10	1068,94
SP-24	Ac-QSQRTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2136,20	1069,10	1068,94
SP-25	Ac-QSQQTF\$r8NNieWRLL\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,44
SP-26	Ac-QSQQTF\$r8NLWRNleL\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,84
SP-27	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLNle\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,12
SP-28	Ac-QSQQTY\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2124,15	1063,08	1062,92
SP-29	Ac-RAibQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2134,22	1068,11	1068,65
SP-30	Ac-MPRFMDYWEGLN-NH2	1598,70	800,35	800,45
SP-31	Ac-RSQQRF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2191,25	1096,63	1096,83
SP-32	Ac-QSQQRF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2163,21	1082,61	1082,87
SP-33	Ac-RAibQQRF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2189,27	1095,64	1096,37
SP-34	Ac-RSQQRF\$r8NFWRLL\$QN-NH2	2225,23	1113,62	1114,37
SP-35	Ac-RSQQRF\$r8NYWRLL\$QN-NH2	2241,23	1121,62	1122,37
SP-36	Ac-RSQQTF\$r8NLWQLL\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,29
SP-37	Ac-QSQQTF\$r8NLWQAmIL\$QN-NH2	2094,13	1048,07	1048,32
SP-38	Ac-QSQQTF\$r8NAmIWRLl\$QN-NH2	2122,17	1062,09	1062,35
SP-39	Ac-NiePRF\$r8DYWEGL\$QN-NH2	1869,98	935,99	936,20
SP-40	Ac-NiePRF\$r8NYWRLL\$QN-NH2	1952,12	977,06	977,35
SP-41	Ac-RF\$r8NLWRLL\$Q-NH2	1577,96	789,98	790,18
SP-42	Ac-QSQQTF\$r8N2ffWRLL\$QN-NH2	2160,13	1081,07	1081,40
SP-43	Ac-QSQQTF\$r8N3ffWRLL\$QN-NH2	2160,13	1081,07	1081,34
SP-44	Ac-QSQQTF#r8NLWRLL#QN-NH2	2080,12	1041,06	1041,34
SP-45	Ac-RSQQTA\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2060,16	1031,08	1031,38
SP-46	Ac-QSQQTF%r8NLWRLL%QN-NH2	2110,17	1056,09	1056,55
SP-47	HepQSQ\$TFSNLWRLLPQN-NH2	2051,10	1026,55	1026,82
SP-48	HepQSQ\$TF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2159,23	1080,62	1080,89
SP-49	Ac-QSQQTF\$r8NL6clWRLL\$QN-NH2	2142,11	1072,06	1072,35
SP-50	Ac-QSQQTF\$r8NLM6clwRLL\$QN-NH2	2156,13	1079,07	1079,27
SP-51	Ac-LTFEHYWAQLTS-NH2	1535,74	768,87	768,91
SP-52	Ac-LTF\$HYW\$QLTS-NH2	1585,83	793,92	794,17
SP-53	Ac-LTFE\$YWA\$LTS-NH2	1520,79	761,40	761,67
SP-54	Ac-LTF\$zr8HYWAQL\$zS-NH2	1597,87	799,94	800,06
SP-55	Ac-LTF\$r8HYWRQL\$S-NH2	1682,93	842,47	842,72
SP-56	Ac-QS\$QTFStNLWRLL\$S8QN-NH2	2145,21	1073,61	1073,90

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-57	Ac-QSQQTASNLRWLLPQN-NH2	1923,99	963,00	963,26
SP-58	Ac-QSQQTA\$/r8NLWRLL\$/QN-NH2	2060,15	1031,08	1031,24
SP-59	Ac-ASQQTF\$/r8NLWRLL\$/QN-NH2	2079,16	1040,58	1040,89
SP-60	Ac-\$SQQ\$F\$SNLRWLLAibQN-NH2	2009,09	1005,55	1005,86
SP-61	Ac-QS\$QTF\$NLWRLLAibQN-NH2	2023,10	1012,55	1012,79
SP-62	Ac-QSQQ\$F\$SN\$WRLLAibQN-NH2	2024,06	1013,03	1013,31
SP-63	Ac-QSQQTF\$NLW\$LLAibQN-NH2	1995,06	998,53	998,87
SP-64	Ac-QSQQTF\$SLWR\$LAibQN-NH2	2011,06	1006,53	1006,83
SP-65	Ac-QSQQTF\$SNLW\$LLA\$N-NH2	1940,02	971,01	971,29
SP-66	Ac-\$/SQQ\$/F\$SNLRWLLAibQN-NH2	2037,12	1019,56	1019,78
SP-67	Ac-QS\$/QTF\$/NLWRLLAibQN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
SP-68	Ac-QSQQ\$/F\$SN\$/WRLLAibQN-NH2	2052,09	1027,05	1027,36
SP-69	Ac-QSQQTF\$/NLW\$/LLAibQN-NH2	2023,09	1012,55	1013,82
SP-70	Ac-QSQQTF\$SLWRLLAibQN-NH2	1996,09	999,05	999,39
SP-71	Ac-QSQQ\$/TF\$/LWRLLAibQN-NH2	2024,12	1013,06	1013,37
SP-72	Ac-QS\$/QTF\$/NLWRLL\$/s8QN-NH2	2201,27	1101,64	1102,00
SP-73	Ac-\$r8SQQTF\$SLWRLLAibQN-NH2	2038,14	1020,07	1020,23
SP-74	Ac-QSQQr8TF\$SNLW\$LLAibQN-NH2	1996,08	999,04	999,32
SP-75	Ac-QSQQTF\$Sr8LWRLLA\$N-NH2	2024,12	1013,06	1013,37
SP-76	Ac-QS\$r5QTF\$NLW\$LLAibQN-NH2	2032,12	1017,06	1017,39
SP-77	Ac-\$/r8SQQTF\$/LWRLLAibQN-NH2	2066,17	1034,09	1034,80
SP-78	Ac-QSQQ\$/r8TF\$SNLW\$/LLAibQN-NH2	2024,11	1013,06	1014,34
SP-79	Ac-QSQQTF\$Sr8LWRLLA\$/N-NH2	2052,15	1027,08	1027,16
SP-80	Ac-QS\$/r5QTF\$/NLW\$/LLAibQN-NH2	2088,18	1045,09	1047,10
SP-81	Ac-QSQQTF\$SNLRWLLAibQN-NH2	1988,02	995,01	995,31
SP-82	Hep/QSQ\$/TF\$/r8NLWRLL\$/QN-NH2	2215,29	1108,65	1108,93
SP-83	Ac-ASQQTF\$r8NLRWLL\$QN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
SP-84	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLL\$/Q-NH2	2022,14	1012,07	1012,66
SP-85	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$Q-NH2	1994,11	998,06	998,42
SP-86	Ac-AAARAA\$r8AAARAA\$AA-NH2	1515,90	758,95	759,21
SP-87	Ac-LTFEHYWAQLTSA-NH2	1606,78	804,39	804,59
SP-88	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$SA-NH2	1668,90	835,45	835,67
SP-89	Ac-ASQQTF\$SNLRWLLPQN-NH2	1943,00	972,50	973,27
SP-90	Ac-QS\$QTF\$NLW\$r5LLAibQN-NH2	2032,12	1017,06	1017,30
SP-91	Ac-QSQQTF\$AibNLWRLLAibQN-NH2	1986,04	994,02	994,19
SP-92	Ac-QSQQTF\$NleNLWRLLNleQN-NH2	2042,11	1022,06	1022,23
SP-93	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLLAibQN-NH2	2082,14	1042,07	1042,23
SP-94	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLLNleQN-NH2	2110,17	1056,09	1056,29
SP-95	Ac-QSQQTF\$AibNLWRLL\$/QN-NH2	2040,09	1021,05	1021,25
SP-96	Ac-QSQQTF\$NleNLWRLL\$/QN-NH2	2068,12	1035,06	1035,31
SP-97	Ac-QSQQTF\$r8NL6clWRNleL%QN-NH2	2144,13	1073,07	1073,32
SP-98	Ac-QSQQTF\$r8NLMe6clWRLL%QN-NH2	2158,15	1080,08	1080,31
SP-101	Ac-FNle\$YWE\$L-NH2	1160,63	-	1161,70
SP-102	Ac-F\$r8AYWELL\$A-NH2	1344,75	-	1345,90
SP-103	Ac-F\$r8AYWQLL\$A-NH2	1343,76	-	1344,83
SP-104	Ac-NlePRF\$r8NYWELL\$QN-NH2	1925,06	963,53	963,69
SP-105	Ac-NlePRF\$r8DYWRLL\$QN-NH2	1953,10	977,55	977,68
SP-106	Ac-NlePRF\$r8NYWRLL\$Q-NH2	1838,07	920,04	920,18
SP-107	Ac-NlePRF\$r8NYWRLL\$-NH2	1710,01	856,01	856,13

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-108	Ac-QSQQTF\$r8DLWRLL\$QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,64
SP-109	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$EN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
SP-110	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$QD-NH2	2109,14	1055,57	1055,64
SP-111	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLL\$S-NH2	1953,08	977,54	977,60
SP-112	Ac-ESQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
SP-113	Ac-LTF\$r8NLWRNleL\$Q-NH2	1635,99	819,00	819,10
SP-114	Ac-LRF\$r8NLWRNleL\$Q-NH2	1691,04	846,52	846,68
SP-115	Ac-QSQQTF\$r8NWWRNleL\$QN-NH2	2181,15	1091,58	1091,64
SP-116	Ac-QSQQTF\$r8NLWRNleL\$Q-NH2	1994,11	998,06	998,07
SP-117	Ac-QTF\$r8NLWRNleL\$QN-NH2	1765,00	883,50	883,59
SP-118	Ac-NlePRF\$r8NWWRLL\$QN-NH2	1975,13	988,57	988,75
SP-119	Ac-NlePRF\$r8NWWRLL\$A-NH2	1804,07	903,04	903,08
SP-120	Ac-TSFAEYWNLLSP-NH2	1467,70	734,85	734,90
SP-121	Ac-QTF\$r8HWWSQL\$S-NH2	1651,85	826,93	827,12
SP-122	Ac-FM\$YWE\$L-NH2	1178,58	-	1179,64
SP-123	Ac-QTFEHWWSQLLS-N H2	1601,76	801,88	801,94
SP-124	Ac-QSQQTF\$r8NLAmwRLNle\$QN-NH2	2122,17	1062,09	1062,24
SP-125	Ac-FMAibY6ciWEAc3cL-NH2	1130,47	-	1131,53
SP-126	Ac-FNle\$Y6ciWE\$L-NH2	1194,59	-	1195,64
SP-127	Ac-F\$zr8AY6ciWEAc3cL\$z-NH2	1277,63	639,82	1278,71
SP-128	Ac-F\$r8AY6ciWEAc3cL\$A-NH2	1348,66	-	1350,72
SP-129	Ac-NlePRF\$r8NY6ciWRLL\$QN-NH2	1986,08	994,04	994,64
SP-130	Ac-AF\$r8AAWALA\$A-NH2	1223,71	-	1224,71
SP-131	Ac-TF\$r8AAWRLA\$Q-NH2	1395,80	698,90	399,04
SP-132	Pr-TF\$r8AAWRLA\$Q-NH2	1409,82	705,91	706,04
SP-133	Ac-QSQQTF\$r8NLWRNleL%QN-NH2	2110,17	1056,09	1056,22
SP-134	Ac-LTF\$r8HYWAQL%SA-NH2	1670,92	836,46	836,58
SP-135	Ac-NlePRF\$r8NYWRLL%QN-NH2	1954,13	978,07	978,19
SP-136	Ac-NlePRF\$r8NY6ciWRLL%QN-NH2	1988,09	995,05	995,68
SP-137	Ac-LTF\$r8HY6ciWAQL%S-NH2	1633,84	817,92	817,93
SP-138	Ac-QS%QTF%StNLWRLL%\$8QN-NH2	2149,24	1075,62	1075,65
SP-139	Ac-LTF\$r8HY6ciWRQL%S-NH2	1718,91	860,46	860,54
SP-140	Ac-QSQQTF\$r8NL6ciWRLL%QN-NH2	2144,13	1073,07	1073,64
SP-141	Ac-%r8SQQTFS%LWRLLAibQN-NH2	2040,15	1021,08	1021,13
SP-142	Ac-LTF\$r8HYWAQL%S-NH2	1599,88	800,94	801,09
SP-143	Ac-TSF\$r8QYWNLL%P-NH2	1602,88	802,44	802,58
SP-147	Ac-LTFEHYWAQLTS-NH2	1535,74	768,87	769,5
SP-152	Ac-F\$er8AY6ciWEAc3cL\$e-NH2	1277,63	639,82	1278,71
SP-153	Ac-AF\$r8AAWALA\$A-NH2	1277,63	639,82	1277,84
SP-154	Ac-TF\$r8AAWRLA\$Q-NH2	1395,80	698,90	699,04
SP-155	Pr-TF\$r8AAWRLA\$Q-NH2	1409,82	705,91	706,04
SP-156	Ac-LTF\$er8HYWAQL\$eS-NH2	1597,87	799,94	800,44
SP-159	Ac-CCPGCCBaQSQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2745,30	1373,65	1372,99
SP-160	Ac-CCPGCCBaQSQQTA\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2669,27	1335,64	1336,09
SP-161	Ac-CCPGCCBaNlePRF\$r8NYWRLL\$QN-NH2	2589,26	1295,63	1296,2
SP-162	Ac-LTF\$/r8HYWAQL\$/S-NH2	1625,90	813,95	814,18
SP-163	Ac-F%r8HY6ciWRAC3cL%-NH2	1372,72	687,36	687,59
SP-164	Ac-QTF\$r8HWWSQL%S-NH2	1653,87	827,94	827,94
SP-165	Ac-LTA\$r8HYWRQL\$S-NH2	1606,90	804,45	804,66

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-166	Ac-Q\$8QQTF\$N\$WRLLaibQN-NH2	2080,12	1041,06	1041,61
SP-167	Ac-QSQQ\$8F\$SNLWR\$LaibQN-NH2	2066,11	1034,06	1034,58
SP-168	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$A-NH2	1314,70	658,35	1315,88
SP-169	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$S-NH2	1330,70	666,35	1331,87
SP-170	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$Q-NH2	1371,72	686,86	1372,72
SP-171	Ac-F\$8AYWEaibL\$S-NH2	1332,71	667,36	1334,83
SP-172	Ac-F\$8AYWEAL\$S-NH2	1318,70	660,35	1319,73
SP-173	Ac-F\$8AYWEQL\$S-NH2	1375,72	688,86	1377,53
SP-174	Ac-F\$8HYWEQL\$S-NH2	1441,74	721,87	1443,48
SP-175	Ac-F\$8HYWAQL\$S-NH2	1383,73	692,87	1385,38
SP-176	Ac-F\$8HYWAAc3cL\$S-NH2	1338,71	670,36	1340,82
SP-177	Ac-F\$8HYWRAC3cL\$S-NH2	1423,78	712,89	713,04
SP-178	Ac-F\$8AYWEAc3cL#A-NH2	1300,69	651,35	1302,78
SP-179	Ac-NiePTF%r8NYWRLL%QN-NH2	1899,08	950,54	950,56
SP-180	Ac-TF\$8AAWRAL\$Q-NH2	1395,80	698,90	699,13
SP-181	Ac-TSF%r8HYWAQL%S-NH2	1573,83	787,92	787,98
SP-184	Ac-F%r8AY6ciWEAc3cL%A-NH2	1350,68	676,34	676,91
SP-185	Ac-LTF\$8HYWAQI\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
SP-186	Ac-LTF\$8HYWAQNie\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
SP-187	Ac-LTF\$8HYWAQL\$A-NH2	1581,87	791,94	792,45
SP-188	Ac-LTF\$8HYWAQL\$Abu-NH2	1595,89	798,95	799,03
SP-189	Ac-LTF\$8HYWAbuQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807,47
SP-190	Ac-LTF\$er8AYWAQL\$eS-NH2	1531,84	766,92	766,96
SP-191	Ac-LAF\$8HYWAQL\$S-NH2	1567,86	784,93	785,49
SP-192	Ac-LAF\$8AYWAQL\$S-NH2	1501,83	751,92	752,01
SP-193	Ac-LTF\$er8AYWAQL\$eA-NH2	1515,85	758,93	758,97
SP-194	Ac-LAF\$8AYWAQL\$A-NH2	1485,84	743,92	744,05
SP-195	Ac-LTF\$8NLWANIEl\$Q-NH2	1550,92	776,46	776,61
SP-196	Ac-LTF\$8NLWANIEl\$A-NH2	1493,90	747,95	1495,6
SP-197	Ac-LTF\$8ALWANIEl\$Q-NH2	1507,92	754,96	755
SP-198	Ac-LAF\$8NLWANIEl\$Q-NH2	1520,91	761,46	761,96
SP-199	Ac-LAF\$8ALWANIEl\$A-NH2	1420,89	711,45	1421,74
SP-200	Ac-A\$8AYWEAc3cL\$A-NH2	1238,67	620,34	1239,65
SP-201	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AA-NH2	1385,74	693,87	1386,64
SP-202	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$Abu-NH2	1328,72	665,36	1330,17
SP-203	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$Nie-NH2	1356,75	679,38	1358,22
SP-204	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$8A-NH2	1314,70	658,35	1315,51
SP-205	Ac-F\$AYWEAc3cL\$8A-NH2	1314,70	658,35	1315,66
SP-206	Ac-F\$8AYWEAc3ci\$A-NH2	1314,70	658,35	1316,18
SP-207	Ac-F\$8AYWEAc3cNie\$A-NH2	1314,70	658,35	1315,66
SP-208	Ac-F\$8AYWEAmi L\$A-N H2	1358,76	680,38	1360,21
SP-209	Ac-F\$8AYWENIEl\$A-NH2	1344,75	673,38	1345,71
SP-210	Ac-F\$8AYWQAac3cL\$A-NH2	1313,72	657,86	1314,7
SP-211	Ac-F\$8AYWAAc3cL\$A-NH2	1256,70	629,35	1257,56
SP-212	Ac-F\$8AYWAbuAc3cL\$A-NH2	1270,71	636,36	1272,14
SP-213	Ac-F\$8AYWNIEAc3cL\$A-NH2	1298,74	650,37	1299,67
SP-214	Ac-F\$8AbuYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	1329,65
SP-215	Ac-F\$8NieYWEAc3cL\$A-NH2	1356,75	679,38	1358,66
SP-216	5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH2	1922,82	962,41	962,87

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-217	5-FAM-BaLTF%r8HYWAQL%S-NH2	1986,96	994,48	994,97
SP-218	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-219	Ac-LTF\$r8HYWAQTle\$S-NH2	1597,87	799,94	799,97
SP-220	Ac-LTF\$r8HYWAQAdm\$S-NH2	1675,91	838,96	839,09
SP-221	Ac-LTF\$r8HYWAQhCha\$S-NH2	1651,91	826,96	826,98
SP-222	Ac-LTF\$r8HYWAQCha\$S-NH2	1637,90	819,95	820,02
SP-223	Ac-LTF\$r8HYWA6cQL\$S-NH2	1651,91	826,96	826,98
SP-224	Ac-LTF\$r8HYWA5cQL\$S-NH2	1637,90	819,95	820,02
SP-225	Ac-LThF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-226	Ac-LTlgl\$r8HYWAQL\$S-N H2	1625,90	813,95	812,99
SP-227	Ac-LTF\$r8HYWAQChg\$S-NH2	1623,88	812,94	812,99
SP-228	Ac-LTF\$r8HYWAQF\$S-NH2	1631,85	816,93	816,99
SP-229	Ac-LTF\$r8HYWAQlgl\$S-N H2	1659,88	830,94	829,94
SP-230	Ac-LTF\$r8HYWAQCba\$S-NH2	1609,87	805,94	805,96
SP-231	Ac-LTF\$r8HYWAQCpg\$S-NH2	1609,87	805,94	805,96
SP-232	Ac-LTF\$r8HhYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-233	Ac-F\$r8AYWEAc3chL\$A-N H 2	1328,72	665,36	665,43
SP-234	Ac-F\$r8AYWEAc3cTle\$A-NH2	1314,70	658,35	1315,62
SP-235	Ac-F\$r8AYWEAc3cAdm\$A-NH2	1392,75	697,38	697,47
SP-236	Ac-F\$r8AYWEAc3chCha\$A-NH2	1368,75	685,38	685,34
SP-237	Ac-F\$r8AYWEAc3cCha\$A-NH2	1354,73	678,37	678,38
SP-238	Ac-F\$r8AYWEAc6cL\$A-NH2	1356,75	679,38	679,42
SP-239	Ac-F\$r8AYWEAc5cL\$A-NH2	1342,73	672,37	672,46
SP-240	Ac-hF\$r8AYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	665,43
SP-241	Ac-lgl\$r8AYWEAc3cL\$A-NH2	1342,73	672,37	671,5
SP-243	Ac-F\$r8AYWEAc3cF\$A-NH2	1348,69	675,35	675,35
SP-244	Ac-F\$r8AYWEAc3cgl\$A-NH2	1376,72	689,36	688,37
SP-245	Ac-F\$r8AYWEAc3cCba\$A-NH2	1326,70	664,35	664,47
SP-246	Ac-F\$r8AYWEAc3cCpg\$A-NH2	1326,70	664,35	664,39
SP-247	Ac-F\$r8AhYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	665,43
SP-248	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$Q-NH2	1371,72	686,86	1372,87
SP-249	Ac-F\$r8AYWEAibL\$A-NH2	1316,72	659,36	1318,18
SP-250	Ac-F\$r8AYWEAL\$A-NH2	1302,70	652,35	1303,75
SP-251	Ac-LAF\$r8AYWAAL\$A-NH2	1428,82	715,41	715,49
SP-252	Ac-LTF\$r8HYWAAc3cL\$S-NH2	1552,84	777,42	777,5
SP-253	Ac-NleTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1597,87	799,94	800,04
SP-254	Ac-VTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1583,85	792,93	793,04
SP-255	Ac-FTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1631,85	816,93	817,02
SP-256	Ac-WTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1670,86	836,43	836,85
SP-257	Ac-RTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1640,88	821,44	821,9
SP-258	Ac-KTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1612,88	807,44	807,91
SP-259	Ac-LNleF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1609,90	805,95	806,43
SP-260	Ac-LVF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1595,89	798,95	798,93
SP-261	Ac-LFF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1643,89	822,95	823,38
SP-262	Ac-LWF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1682,90	842,45	842,55
SP-263	Ac-LRF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1652,92	827,46	827,52
SP-264	Ac-LKF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1624,91	813,46	813,51
SP-265	Ac-LTF\$r8NleYWAQL\$S-NH2	1573,89	787,95	788,05
SP-266	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$S-NH2	1559,88	780,94	780,98

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-267	Ac-LTF\$r8FYWAQL\$S-NH2	1607,88	804,94	805,32
SP-268	Ac-LTF\$r8WYWAQL\$S-NH2	1646,89	824,45	824,86
SP-269	Ac-LTF\$r8RYWAQL\$S-NH2	1616,91	809,46	809,51
SP-270	Ac-LTF\$r8KYWAQL\$S-NH2	1588,90	795,45	795,48
SP-271	Ac-LTF\$r8HNIeWAQL\$S-NH2	1547,89	774,95	774,98
SP-272	Ac-LTF\$r8HVWAQL\$S-NH2	1533,87	767,94	767,95
SP-273	Ac-LTF\$r8HFWAQL\$S-NH2	1581,87	791,94	792,3
SP-274	Ac-LTF\$r8HWWAQL\$S-NH2	1620,88	811,44	811,54
SP-275	Ac-LTF\$r8HRWAQL\$S-NH2	1590,90	796,45	796,52
SP-276	Ac-LTF\$r8HKWAQL\$S-NH2	1562,90	782,45	782,53
SP-277	Ac-LTF\$r8HYWNIeQL\$S-NH2	1639,91	820,96	820,98
SP-278	Ac-LTF\$r8HYWVQL\$S-NH2	1625,90	813,95	814,03
SP-279	Ac-LTF\$r8HYWFQL\$S-NH2	1673,90	837,95	838,03
SP-280	Ac-LTF\$r8HYWWQL\$S-NH2	1712,91	857,46	857,5
SP-281	Ac-LTF\$r8HYWKQL\$S-NH2	1654,92	828,46	828,49
SP-282	Ac-LTF\$r8HYWANIeL\$S-NH2	1582,89	792,45	792,52
SP-283	Ac-LTF\$r8HYWAVL\$S-NH2	1568,88	785,44	785,49
SP-284	Ac-LTF\$r8HYWAFLL\$S-NH2	1616,88	809,44	809,47
SP-285	Ac-LTF\$r8HYWAWL\$S-NH2	1655,89	828,95	829
SP-286	Ac-LTF\$r8HYWARL\$S-NH2	1625,91	813,96	813,98
SP-287	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$NIe-NH2	1623,92	812,96	813,39
SP-288	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$V-NH2	1609,90	805,95	805,99
SP-289	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$F-NH2	1657,90	829,95	830,26
SP-290	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$W-NH2	1696,91	849,46	849,5
SP-291	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$R-NH2	1666,94	834,47	834,56
SP-292	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$K-NH2	1638,93	820,47	820,49
SP-293	Ac-Q\$r8QQTF\$SN\$WRLLaibQN-NH2	2080,12	1041,06	1041,54
SP-294	Ac-QSQQ\$r8F\$SNLWR\$LAibQN-NH2	2066,11	1034,06	1034,58
SP-295	Ac-LT2Pal\$r8HYWAQL\$S-NH2	1598,86	800,43	800,49
SP-296	Ac-LT3Pal\$r8HYWAQL\$S-NH2	1598,86	800,43	800,49
SP-297	Ac-LT4Pal\$r8HYWAQL\$S-NH2	1598,86	800,43	800,49
SP-298	Ac-LTF2CF3\$r8HYWAQL\$S-NH2	1665,85	833,93	834,01
SP-299	Ac-LTF2CN\$r8HYWAQL\$S-NH2	1622,86	812,43	812,47
SP-300	Ac-LTF2Me\$r8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-301	Ac-LTF3CI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1631,83	816,92	816,99
SP-302	Ac-LTF4CF3\$r8HYWAQL\$S-NH2	1665,85	833,93	833,94
SP-303	Ac-LTF4tBu\$r8HYWAQL\$S-NH2	1653,93	827,97	828,02
SP-304	Ac-LTF5F\$r8HYWAQL\$S-NH2	1687,82	844,91	844,96
SP-305	Ac-LTF\$r8HY3BthAAQL\$S-NH2	1614,83	808,42	808,48
SP-306	Ac-LTF2Br\$r8HYWAQL\$S-NH2	1675,78	838,89	838,97
SP-307	Ac-LTF4Br\$r8HYWAQL\$S-NH2	1675,78	838,89	839,86
SP-308	Ac-LTF2CI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1631,83	816,92	816,99
SP-309	Ac-LTF4CI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1631,83	816,92	817,36
SP-310	Ac-LTF3CN\$r8HYWAQL\$S-NH2	1622,86	812,43	812,47
SP-311	Ac-LTF4CN\$r8HYWAQL\$S-NH2	1622,86	812,43	812,47
SP-312	Ac-LTF34CI2\$r8HYWAQL\$S-NH2	1665,79	833,90	833,94
SP-313	Ac-LTF34F2\$r8HYWAQL\$S-NH2	1633,85	817,93	817,95
SP-314	Ac-LTF35F2\$r8HYWAQL\$S-NH2	1633,85	817,93	817,95
SP-315	Ac-LTDip\$r8HYWAQL\$S-NH2	1673,90	837,95	838,01

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-316	Ac-LTF2F\$8HYWAQL\$S-NH2	1615,86	808,93	809
SP-317	Ac-LTF3F\$8HYWAQL\$S-NH2	1615,86	808,93	809
SP-318	Ac-LTF4F\$8HYWAQL\$S-NH2	1615,86	808,93	809
SP-319	Ac-LTF4I\$8HYWAQL\$S-NH2	1723,76	862,88	862,94
SP-320	Ac-LTF3Me\$8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807,07
SP-321	Ac-LTF4Me\$8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-322	Ac-LT1NaI\$8HYWAQL\$S-NH2	1647,88	824,94	824,98
SP-323	Ac-LT2NaI\$8HYWAQL\$S-NH2	1647,88	824,94	825,06
SP-324	Ac-LTF3CF3\$8HYWAQL\$S-NH2	1665,85	833,93	834,01
SP-325	Ac-LTF4NO2\$8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,46
SP-326	Ac-LTF3NO2\$8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,46
SP-327	Ac-LTF\$82ThiYWAQL\$S-NH2	1613,83	807,92	807,96
SP-328	Ac-LTF\$8HBipWAQL\$S-NH2	1657,90	829,95	830,01
SP-329	Ac-LTF\$8HF4tBuWAQL\$S-NH2	1637,93	819,97	820,02
SP-330	Ac-LTF\$8HF4CF3WAQL\$S-NH2	1649,86	825,93	826,02
SP-331	Ac-LTF\$8HF4CIWAQL\$S-NH2	1615,83	808,92	809,37
SP-332	Ac-LTF\$8HF4MeWAQL\$S-NH2	1595,89	798,95	799,01
SP-333	Ac-LTF\$8HF4BrWAQL\$S-NH2	1659,78	830,89	830,98
SP-334	Ac-LTF\$8HF4CNWAQL\$S-NH2	1606,87	804,44	804,56
SP-335	Ac-LTF\$8HF4NO2WAQL\$S-NH2	1626,86	814,43	814,55
SP-336	Ac-LTF\$8H1NaIWAQL\$S-NH2	1631,89	816,95	817,06
SP-337	Ac-LTF\$8H2NaIWAQL\$S-NH2	1631,89	816,95	816,99
SP-338	Ac-LTF\$8HWAQL\$S-NH2	1434,80	718,40	718,49
SP-339	Ac-LTF\$8HY1NaIAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,52
SP-340	Ac-LTF\$8HY2NaIAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,52
SP-341	Ac-LTF\$8HYWAQI\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
SP-342	Ac-LTF\$8HYWAQNIe\$S-N H2	1597,87	799,94	800,44
SP-343	Ac-LTF\$8HYWAQL\$eA-NH2	1581,87	791,94	791,98
SP-344	Ac-LTF\$8HYWAQL\$Abu-NH2	1595,89	798,95	799,03
SP-345	Ac-LTF\$8HYWAbuQL\$S-NH2	1611,88	806,94	804,47
SP-346	Ac-LAF\$8HYWAQL\$S-NH2	1567,86	784,93	785,49
SP-347	Ac-LTF\$8NLWANIEl\$Q-NH2	1550,92	776,46	777,5
SP-348	Ac-LTF\$8ALWANIEl\$Q-N H2	1507,92	754,96	755,52
SP-349	Ac-LAF\$8NLWANIEl\$Q-NH2	1520,91	761,46	762,48
SP-350	Ac-F\$8AYWAAc3cL\$A-NH2	1256,70	629,35	1257,56
SP-351	Ac-LTF\$8AYWAAL\$S-NH2	1474,82	738,41	738,55
SP-352	Ac-LVF\$8AYWAQL\$S-NH2	1529,87	765,94	766
SP-353	Ac-LTF\$8AYWAbuQL\$S-NH2	1545,86	773,93	773,92
SP-354	Ac-LTF\$8AYWNIeQL\$S-NH2	1573,89	787,95	788,17
SP-355	Ac-LTF\$8AbuYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	773,99
SP-356	Ac-LTF\$8AYWHQL\$S-NH2	1597,87	799,94	799,97
SP-357	Ac-LTF\$8AYWKQL\$S-NH2	1588,90	795,45	795,53
SP-358	Ac-LTF\$8AYWOQL\$S-NH2	1574,89	788,45	788,5
SP-359	Ac-LTF\$8AYWRQL\$S-NH2	1616,91	809,46	809,51
SP-360	Ac-LTF\$8AYWSQL\$S-NH2	1547,84	774,92	774,96
SP-361	Ac-LTF\$8AYWRAL\$S-NH2	1559,89	780,95	780,95
SP-362	Ac-LTF\$8AYWRQL\$A-NH2	1600,91	801,46	801,52
SP-363	Ac-LTF\$8AYWRAL\$A-NH2	1543,89	772,95	773,03
SP-364	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S8S-NH2	1597,87	799,94	799,97

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-365	Ac-LTF\$HYWAQL\$r8S-NH2	1597,87	799,94	799,97
SP-366	Ac-LTF\$r8HYWAAL\$S-NH2	1540,84	771,42	771,48
SP-367	Ac-LTF\$r8HYWAABuL\$S-NH2	1554,86	778,43	778,51
SP-368	Ac-LTF\$r8HYWALL\$S-NH2	1582,89	792,45	792,49
SP-369	Ac-F\$r8AYWHAAL\$A-NH2	1310,72	656,36	656,4
SP-370	Ac-F\$r8AYWAAL\$A-NH2	1244,70	623,35	1245,61
SP-371	Ac-F\$r8AYWSAL\$A-NH2	1260,69	631,35	1261,6
SP-372	Ac-F\$r8AYWRAL\$A-NH2	1329,76	665,88	1330,72
SP-373	Ac-F\$r8AYWKAL\$A-NH2	1301,75	651,88	1302,67
SP-374	Ac-F\$r8AYWOAL\$A-NH2	1287,74	644,87	1289,13
SP-375	Ac-F\$r8VYWEAc3cL\$A-NH2	1342,73	672,37	1343,67
SP-376	Ac-F\$r8FYWEAc3cL\$A-NH2	1390,73	696,37	1392,14
SP-377	Ac-F\$r8WYWEAc3cL\$A-NH2	1429,74	715,87	1431,44
SP-378	Ac-F\$r8RYWEAc3cL\$A-NH2	1399,77	700,89	700,95
SP-379	Ac-F\$r8KYWEAc3cL\$A-NH2	1371,76	686,88	686,97
SP-380	Ac-F\$r8ANIeWEAc3cL\$A-NH2	1264,72	633,36	1265,59
SP-381	Ac-F\$r8AVWEAc3cL\$A-NH2	1250,71	626,36	1252,2
SP-382	Ac-F\$r8AFWEAc3cL\$A-NH2	1298,71	650,36	1299,64
SP-383	Ac-F\$r8AWWEAc3cL\$A-NH2	1337,72	669,86	1338,64
SP-384	Ac-F\$r8ARWEAc3cL\$A-NH2	1307,74	654,87	655
SP-385	Ac-F\$r8AKWEAc3cL\$A-NH2	1279,73	640,87	641,01
SP-386	Ac-F\$r8AYWVAc3cL\$A-NH2	1284,73	643,37	643,38
SP-387	Ac-F\$r8AYWFAc3cL\$A-NH2	1332,73	667,37	667,43
SP-388	Ac-F\$r8AYWWAc3cL\$A-NH2	1371,74	686,87	686,97
SP-389	Ac-F\$r8AYWRAc3cL\$A-NH2	1341,76	671,88	671,94
SP-390	Ac-F\$r8AYWKAc3cL\$A-NH2	1313,75	657,88	657,88
SP-391	Ac-F\$r8AYWEVL\$A-NH2	1330,73	666,37	666,47
SP-392	Ac-F\$r8AYWEFL\$A-NH2	1378,73	690,37	690,44
SP-393	Ac-F\$r8AYWEWL\$A-NH2	1417,74	709,87	709,91
SP-394	Ac-F\$r8AYWERL\$A-NH2	1387,77	694,89	1388,66
SP-395	Ac-F\$r8AYWEKL\$A-NH2	1359,76	680,88	1361,21
SP-396	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$V-NH2	1342,73	672,37	1343,59
SP-397	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$F-NH2	1390,73	696,37	1392,58
SP-398	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$W-NH2	1429,74	715,87	1431,29
SP-399	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$R-NH2	1399,77	700,89	700,95
SP-400	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$K-NH2	1371,76	686,88	686,97
SP-401	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AV-NH2	1413,77	707,89	707,91
SP-402	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AF-NH2	1461,77	731,89	731,96
SP-403	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AW-NH2	1500,78	751,39	751,5
SP-404	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AR-NH2	1470,80	736,40	736,47
SP-405	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AK-NH2	1442,80	722,40	722,41
SP-406	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AH-NH2	1451,76	726,88	726,93
SP-407	Ac-LTF2NO2\$r8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,54
SP-408	Ac-LTA\$r8HYAAQL\$S-NH2	1406,79	704,40	704,5
SP-409	Ac-LTF\$r8HYAAQL\$S-NH2	1482,82	742,41	742,47
SP-410	Ac-QSQQTF\$r8NLWALL\$AN-NH2	1966,07	984,04	984,38
SP-411	Ac-QAibQQTF\$r8NLWALL\$AN-NH2	1964,09	983,05	983,42
SP-412	Ac-QAibQQTF\$r8ALWALL\$AN-NH2	1921,08	961,54	961,59
SP-413	Ac-AAATF\$r8AAWAAL\$AA-NH2	1608,90	805,45	805,52

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-414	Ac-F\$8AAWRAL\$Q-NH2	1294,76	648,38	648,48
SP-415	Ac-TF\$8AAWAAL\$Q-NH2	1310,74	656,37	1311,62
SP-416	Ac-TF\$8AAWRAL\$A-NH2	1338,78	670,39	670,46
SP-417	Ac-VF\$8AAWRAL\$Q-NH2	1393,82	697,91	697,99
SP-418	Ac-AF\$8AAWAAL\$A-NH2	1223,71	612,86	1224,67
SP-420	Ac-TF\$8AAWKAL\$Q-NH2	1367,80	684,90	684,97
SP-421	Ac-TF\$8AAWOAL\$Q-NH2	1353,78	677,89	678,01
SP-422	Ac-TF\$8AAWSAL\$Q-NH2	1326,73	664,37	664,47
SP-423	Ac-LTF\$8AAWRAL\$Q-NH2	1508,89	755,45	755,49
SP-424	Ac-F\$8AYWAQL\$A-NH2	1301,72	651,86	651,96
SP-425	Ac-F\$8AWWAAL\$A-NH2	1267,71	634,86	634,87
SP-426	Ac-F\$8AWWAQL\$A-NH2	1324,73	663,37	663,43
SP-427	Ac-F\$8AYWEAL\$-NH2	1231,66	616,83	1232,93
SP-428	Ac-F\$8AYWAAL\$-NH2	1173,66	587,83	1175,09
SP-429	Ac-F\$8AYWKAL\$-NH2	1230,72	616,36	616,44
SP-430	Ac-F\$8AYWOAL\$-NH2	1216,70	609,35	609,48
SP-431	Ac-F\$8AYWQAL\$-NH2	1230,68	616,34	616,44
SP-432	Ac-F\$8AYWAQL\$-NH2	1230,68	616,34	616,37
SP-433	Ac-F\$8HYWDQL\$S-NH2	1427,72	714,86	714,86
SP-434	Ac-F\$8HFWEQL\$S-NH2	1425,74	713,87	713,98
SP-435	Ac-F\$8AYWHQL\$S-NH2	1383,73	692,87	692,96
SP-436	Ac-F\$8AYWKQL\$S-NH2	1374,77	688,39	688,45
SP-437	Ac-F\$8AYWOQL\$S-NH2	1360,75	681,38	681,49
SP-438	Ac-F\$8HYWSQL\$S-NH2	1399,73	700,87	700,95
SP-439	Ac-F\$8HWWEQL\$S-NH2	1464,76	733,38	733,44
SP-440	Ac-F\$8HWWAQL\$S-NH2	1406,75	704,38	704,43
SP-441	Ac-F\$8AWWHQL\$S-NH2	1406,75	704,38	704,43
SP-442	Ac-F\$8AWWKQL\$S-NH2	1397,79	699,90	699,92
SP-443	Ac-F\$8AWWOQL\$S-NH2	1383,77	692,89	692,96
SP-444	Ac-F\$8HWWSQL\$S-NH2	1422,75	712,38	712,42
SP-445	Ac-LTF\$8NYWANiEL\$Q-NH2	1600,90	801,45	801,52
SP-446	Ac-LTF\$8NLWAQL\$Q-NH2	1565,90	783,95	784,06
SP-447	Ac-LTF\$8NYWANiEL\$A-NH2	1543,88	772,94	773,03
SP-448	Ac-LTF\$8NLWAQL\$A-NH2	1508,88	755,44	755,49
SP-449	Ac-LTF\$8AYWANiEL\$Q-NH2	1557,90	779,95	780,06
SP-450	Ac-LTF\$8ALWAQL\$Q-NH2	1522,89	762,45	762,45
SP-451	Ac-LAF\$8NYWANiEL\$Q-NH2	1570,89	786,45	786,5
SP-452	Ac-LAF\$8NLWAQL\$Q-NH2	1535,89	768,95	769,03
SP-453	Ac-LAF\$8AYWANiEL\$A-NH2	1470,86	736,43	736,47
SP-454	Ac-LAF\$8ALWAQL\$A-NH2	1435,86	718,93	719,01
SP-455	Ac-LAF\$8AYWAAL\$A-NH2	1428,82	715,41	715,41
SP-456	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AAib-NH2	1399,75	700,88	700,95
SP-457	Ac-F\$8AYWAQL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,78
SP-458	Ac-F\$8AYWAAc3cL\$AA-NH2	1327,73	664,87	664,84
SP-459	Ac-F\$8AYWSAc3cL\$AA-NH2	1343,73	672,87	672,9
SP-460	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AS-NH2	1401,73	701,87	701,84
SP-461	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AT-NH2	1415,75	708,88	708,87
SP-462	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AL-NH2	1427,79	714,90	714,94
SP-463	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AQ-NH2	1442,76	722,38	722,41

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-464	Ac-F\$r8AFWEAc3cL\$AA-NH2	1369,74	685,87	685,93
SP-465	Ac-F\$r8AWWEAc3cL\$AA-NH2	1408,75	705,38	705,39
SP-466	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$SA-NH2	1401,73	701,87	701,99
SP-467	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
SP-468	Ac-F\$r8AYWENieL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
SP-469	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AbuA-NH2	1399,75	700,88	700,95
SP-470	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$NieA-NH2	1427,79	714,90	714,86
SP-471	Ac-F\$r8AYWEAibL\$NieA-NH2	1429,80	715,90	715,97
SP-472	Ac-F\$r8AYWEAL\$NieA-NH2	1415,79	708,90	708,94
SP-473	Ac-F\$r8AYWENieL\$NieA-NH2	1457,83	729,92	729,96
SP-474	Ac-F\$r8AYWEAibL\$Abu-NH2	1330,73	666,37	666,39
SP-475	Ac-F\$r8AYWENieL\$Abu-NH2	1358,76	680,38	680,39
SP-476	Ac-F\$r8AYWEAL\$Abu-NH2	1316,72	659,36	659,36
SP-477	Ac-LTF\$r8AFWAQL\$S-NH2	1515,85	758,93	759,12
SP-478	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$S-NH2	1554,86	778,43	778,51
SP-479	Ac-LTF\$r8AYWAQI\$S-NH2	1531,84	766,92	766,96
SP-480	Ac-LTF\$r8AYWAQNie\$S-N H2	1531,84	766,92	766,96
SP-481	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SA-NH2	1602,88	802,44	802,48
SP-482	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$A-NH2	1538,87	770,44	770,89
SP-483	Ac-LTF\$r8AYWAQI\$A-NH2	1515,85	758,93	759,42
SP-484	Ac-LTF\$r8AYWAQNie\$A-NH2	1515,85	758,93	759,42
SP-485	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AA-NH2	1586,89	794,45	794,94
SP-486	Ac-LTF\$r8HWWAQL\$S-NH2	1620,88	811,44	811,47
SP-487	Ac-LTF\$r8HRWAQL\$S-NH2	1590,90	796,45	796,52
SP-488	Ac-LTF\$r8HKWAQL\$S-NH2	1562,90	782,45	782,53
SP-489	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$W-NH2	1696,91	849,46	849,5
SP-491	Ac-F\$r8AYWAbuAL\$A-NH2	1258,71	630,36	630,5
SP-492	Ac-F\$r8AbuYWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,51
SP-493	Ac-NiePRF%r8NYWRLL%QN-NH2	1954,13	978,07	978,54
SP-494	Ac-TSF%r8HYWAQL%S-NH2	1573,83	787,92	787,98
SP-495	Ac-LTF%r8AYWAQL%S-NH2	1533,86	767,93	768
SP-496	Ac-HTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1621,84	811,92	811,96
SP-497	Ac-LHF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1633,88	817,94	818,02
SP-498	Ac-LTF\$r8HHWAQL\$S-NH2	1571,86	786,93	786,94
SP-499	Ac-LTF\$r8HYWHQL\$S-NH2	1663,89	832,95	832,38
SP-500	Ac-LTF\$r8HYWAHL\$S-NH2	1606,87	804,44	804,48
SP-501	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$H-NH2	1647,89	824,95	824,98
SP-502	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHPr	1639,91	820,96	820,98
SP-503	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHsBu	1653,93	827,97	828,02
SP-504	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHiBu	1653,93	827,97	828,02
SP-505	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHBn	1687,91	844,96	844,44
SP-506	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHPe	1700,92	851,46	851,99
SP-507	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHChx	1679,94	840,97	841,04
SP-508	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1547,80	774,90	774,96
SP-509	Ac-STF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1505,79	753,90	753,94
SP-510	Ac-LEF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1559,84	780,92	781,25
SP-511	Ac-LSF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1517,83	759,92	759,93
SP-512	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$S-NH2	1589,85	795,93	795,97
SP-513	Ac-LTF\$r8SYWAQL\$S-NH2	1547,84	774,92	774,96

ES 2 711 526 T3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-514	Ac-LTF\$r8AYWEQL\$S-NH2	1589,85	795,93	795,9
SP-515	Ac-LTF\$r8AYWAEI\$S-NH2	1532,83	767,42	766,96
SP-516	Ac-LTF\$r8AYWASL\$S-NH2	1490,82	746,41	746,46
SP-517	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$E-NH2	1573,85	787,93	787,98
SP-518	Ac-LTF2CN\$r8HYWAQL\$S-NH2	1622,86	812,43	812,47
SP-519	Ac-LTF3CI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1631,83	816,92	816,99
SP-520	Ac-LTDip\$r8HYWAQL\$S-NH2	1673,90	837,95	838,01
SP-521	Ac-LTF\$r8HYWAQTIe\$S-NH2	1597,87	799,94	800,04
SP-522	Ac-F\$r8AY6cIWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	1338,56
SP-523	Ac-F\$r8AYdI6brWEAL\$A-NH2	1380,61	691,31	692,2
SP-524	Ac-F\$r8AYdI6fWEAL\$A-NH2	1320,69	661,35	1321,61
SP-525	Ac-F\$r8AYdI4mWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,36
SP-526	Ac-F\$r8AYdI5cIWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	669,35
SP-527	Ac-F\$r8AYdI7mWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,36
SP-528	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$A-NH2	1583,89	792,95	793,01
SP-529	Ac-LTF\$r8HCouWAQL\$S-NH2	1679,87	840,94	841,38
SP-530	Ac-LTFEHCouWAQLTS-NH2	1617,75	809,88	809,96
SP-531	Ac-LTA\$r8HCouWAQL\$S-NH2	1603,84	802,92	803,36
SP-532	Ac-F\$r8AYWEAL\$AbuA-NH2	1387,75	694,88	694,88
SP-533	Ac-F\$r8AYWEAI\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
SP-534	Ac-F\$r8AYWEANIe\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
SP-535	Ac-F\$r8AYWEAmIL\$AA-N H 2	1429,80	715,90	715,97
SP-536	Ac-F\$r8AYWQAL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,48
SP-537	Ac-F\$r8AYWAAL\$AA-NH2	1315,73	658,87	658,92
SP-538	Ac-F\$r8AYWAbuAL\$AA-NH2	1329,75	665,88	665,95
SP-539	Ac-F\$r8AYWNIeAL\$AA-NH2	1357,78	679,89	679,94
SP-540	Ac-F\$r8AbuYWEAL\$AA-NH2	1387,75	694,88	694,96
SP-541	Ac-F\$r8NIeYWEAL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
SP-542	Ac-F\$r8FYWEAL\$AA-NH2	1449,77	725,89	725,97
SP-543	Ac-LTF\$r8HYWAQhL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
SP-544	Ac-LTF\$r8HYWAQAdm\$S-NH2	1675,91	838,96	839,04
SP-545	Ac-LTF\$r8HYWAQIgl\$S-N H 2	1659,88	830,94	829,94
SP-546	Ac-F\$r8AYWAQL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,48
SP-547	Ac-LTF\$r8ALWAQL\$Q-NH2	1522,89	762,45	762,52
SP-548	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
SP-549	Ac-F\$r8AYWENIeL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
SP-550	Ac-F\$r8AYWEAibL\$Abu-NH2	1330,73	666,37	666,39
SP-551	Ac-F\$r8AYWENIeL\$Abu-NH2	1358,76	680,38	680,38
SP-552	Ac-F\$r8AYWEAL\$Abu-NH2	1316,72	659,36	659,36
SP-553	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AbuA-NH2	1399,75	700,88	700,95
SP-554	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$NIeA-NH2	1427,79	714,90	715,01
SP-555	H-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1489,83	745,92	745,95
SP-556	mdPEG3-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1679,92	840,96	840,97
SP-557	mdPEG7-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1856,02	929,01	929,03
SP-558	Ac-F\$r8ApmpEt6cIWEAL\$A-NH2	1470,71	736,36	788,17
SP-559	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQL\$S-NH2	1565,81	783,91	809,18
SP-560	Ac-LTF3CI\$r8HYWAQL\$A-NH2	1615,83	808,92	875,24
SP-561	Ac-LTF3CI\$r8HYWWQL\$S-NH2	1746,87	874,44	841,65
SP-562	Ac-LTF3CI\$r8AYWWQL\$S-NH2	1680,85	841,43	824,63

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-563	Ac-LTF\$r8AYWWQL\$S-NH2	1646,89	824,45	849,98
SP-564	Ac-LTF\$r8HYWWQL\$A-NH2	1696,91	849,46	816,67
SP-565	Ac-LTF\$r8AYWWQL\$A-NH2	1630,89	816,45	776,15
SP-566	Ac-LTF4F\$r8AYWAQL\$S-NH2	1549,83	775,92	776,15
SP-567	Ac-LTF2F\$r8AYWAQL\$S-NH2	1549,83	775,92	776,15
SP-568	Ac-LTF3F\$r8AYWAQL\$S-NH2	1549,83	775,92	785,12
SP-569	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQL\$S-NH2	1567,83	784,92	785,12
SP-570	Ac-LTF35F2\$r8AYWAQL\$S-NH2	1567,83	784,92	1338,74
SP-571	Ac-F3CI\$r8AYWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	705,28
SP-572	Ac-F3CI\$r8AYWEAL\$AA-NH2	1407,70	704,85	680,11
SP-573	Ac-F\$r8AY6ciWEAL\$AA-NH2	1407,70	704,85	736,83
SP-574	Ac-F\$r8AY6ciWEAL\$-NH2	1265,63	633,82	784,1
SP-575	Ac-LTF\$r8HYWAQLSt/S-NH2	16,03	9,02	826,98
SP-576	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHsBu	1653,93	827,97	828,02
SP-577	Ac-STF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1505,79	753,90	753,94
SP-578	Ac-LTF\$r8AYWAEL\$S-NH2	1532,83	767,42	767,41
SP-579	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$E-NH2	1573,85	787,93	787,98
SP-580	mdPEG3-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1679,92	840,96	840,97
SP-581	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,31
SP-583	Ac-LTF\$r8AYWAQCha\$S-NH2	1571,88	786,94	787,3
SP-584	Ac-LTF\$r8AYWAQChg\$S-NH2	1557,86	779,93	780,4
SP-585	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$S-NH2	1543,84	772,92	780,13
SP-586	Ac-LTF\$r8AYWAQF\$S-NH2	1565,83	783,92	784,2
SP-587	Ac-LTF4F\$r8HYWAQhL\$S-NH2	1629,87	815,94	815,36
SP-588	Ac-LTF4F\$r8HYWAQCha\$S-NH2	1655,89	828,95	828,39
SP-589	Ac-LTF4F\$r8HYWAQChg\$S-NH2	1641,87	821,94	821,35
SP-590	Ac-LTF4F\$r8HYWAQCba\$S-NH2	1627,86	814,93	814,32
SP-591	Ac-LTF4F\$r8AYWAQhL\$S-NH2	1563,85	782,93	782,36
SP-592	Ac-LTF4F\$r8AYWAQCha\$S-NH2	1589,87	795,94	795,38
SP-593	Ac-LTF4F\$r8AYWAQChg\$S-NH2	1575,85	788,93	788,35
SP-594	Ac-LTF4F\$r8AYWAQCba\$S-NH2	1561,83	781,92	781,39
SP-595	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQhL\$S-NH2	1579,82	790,91	790,35
SP-596	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCha\$S-NH2	1605,84	803,92	803,67
SP-597	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQChg\$S-NH2	1591,82	796,91	796,34
SP-598	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCba\$S-NH2	1577,81	789,91	789,39
SP-599	Ac-LTF\$r8AYWAQhF\$S-NH2	1579,84	790,92	791,14
SP-600	Ac-LTF\$r8AYWAQF3CF3\$S-NH2	1633,82	817,91	818,15
SP-601	Ac-LTF\$r8AYWAQF3Me\$S-NH2	1581,86	791,93	791,32
SP-602	Ac-LTF\$r8AYWAQ1NaI\$S-NH2	1615,84	808,92	809,18
SP-603	Ac-LTF\$r8AYWAQBip\$S-NH2	1641,86	821,93	822,13
SP-604	Ac-LTF\$r8FYWAQL\$A-NH2	1591,88	796,94	797,33
SP-605	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHAm	1667,94	834,97	835,92
SP-606	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHiAm	1667,94	834,97	835,55
SP-607	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnPr3Ph	1715,94	858,97	859,79
SP-608	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnBu3,3Me	1681,96	841,98	842,49
SP-610	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnPr	1639,91	820,96	821,58
SP-611	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnEt2Ch	1707,98	854,99	855,35
SP-612	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHHex	1681,96	841,98	842,4
SP-613	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NHmdPeg2	1633,91	817,96	818,35

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-614	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$A-NHmdPeg2	1617,92	809,96	810,3
SP-615	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$A-NHmdPeg4	1705,97	853,99	854,33
SP-616	Ac-F\$r8AYdI4mWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,44
SP-617	Ac-F\$r8AYdI5cIWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	669,43
SP-618	Ac-LThF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,11
SP-619	Ac-LT2Nal\$r8AYWAQL\$S-NH2	1581,86	791,93	792,43
SP-620	Ac-LTA\$r8AYWAQL\$S-NH2	1455,81	728,91	729,15
SP-621	Ac-LTF\$r8AYWVQL\$S-NH2	1559,88	780,94	781,24
SP-622	Ac-LTF\$r8HYWAAL\$A-NH2	1524,85	763,43	763,86
SP-623	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$A-NH2	1543,88	772,94	773,37
SP-624	Ac-LTF\$r8IYWAQL\$S-NH2	1573,89	787,95	788,17
SP-625	Ac-FTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1609,85	805,93	806,22
SP-626	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$S-NH2	1607,88	804,94	805,2
SP-627	Ac-2NalTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1659,87	830,94	831,2
SP-628	Ac-ITF\$r8LYWSQL\$S-NH2	1589,89	795,95	796,13
SP-629	Ac-FTF\$r8FYWAQL\$S-NH2	1641,86	821,93	822,13
SP-630	Ac-WTF\$r8VYWAQL\$S-NH2	1632,87	817,44	817,69
SP-631	Ac-WTF\$r8WYWAQL\$S-NH2	1719,88	860,94	861,36
SP-632	Ac-VTF\$r8AYWSQL\$S-NH2	1533,82	767,91	768,19
SP-633	Ac-WTF\$r8FYWSQL\$S-NH2	1696,87	849,44	849,7
SP-634	Ac-FTF\$r8IYWAQL\$S-NH2	1607,88	804,94	805,2
SP-635	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1648,87	825,44	824,8
SP-636	Ac-FTF\$r8LYWSQL\$S-NH2	1623,87	812,94	812,8
SP-637	Ac-YTF\$r8FYWSQL\$S-NH2	1673,85	837,93	837,8
SP-638	Ac-LTF\$r8AY6cIWEAL\$A-NH2	1550,79	776,40	776,14
SP-639	Ac-LTF\$r8AY6cIWSQL\$S-NH2	1581,80	791,90	791,68
SP-640	Ac-F\$r8AY6cIWSAL\$A-NH2	1294,65	648,33	647,67
SP-641	Ac-F\$r8AY6cIWQAL\$AA-NH2	1406,72	704,36	703,84
SP-642	Ac-LHF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1567,86	784,93	785,21
SP-643	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1531,84	766,92	767,17
SP-644	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$S-NH2	1505,84	753,92	754,13
SP-645	Ac-LTF\$r8AYWAH L\$S-N H 2	1540,84	771,42	771,61
SP-646	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$H-NH2	1581,87	791,94	792,15
SP-647	H-LTF\$r8AYWAQL\$A-NH2	1473,84	737,92	737,29
SP-648	Ac-HHF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1591,83	796,92	797,35
SP-649	Ac-aIbWTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1804,96	903,48	903,64
SP-650	Ac-AibWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1755,91	878,96	879,4
SP-651	Ac-AibAWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1826,95	914,48	914,7
SP-652	Ac-fWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1817,93	909,97	910,1
SP-653	Ac-AibWWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1941,99	972,00	972,2
SP-654	Ac-WTF\$r8LYWSQL\$S-NH2	1662,88	832,44	832,8
SP-655	Ac-WTF\$r8NieYWSQL\$S-NH2	1662,88	832,44	832,6
SP-656	Ac-LTF\$r8AYWSQL\$a-NH2	1531,84	766,92	767,2
SP-657	Ac-LTF\$r8EYWARL\$A-NH2	1601,90	801,95	802,1
SP-658	Ac-LTF\$r8EYWAH L\$A-N H 2	1582,86	792,43	792,6
SP-659	Ac-aTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1489,80	745,90	746,08
SP-660	Ac-AibTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1503,81	752,91	753,11
SP-661	Ac-AmfTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1579,84	790,92	791,14
SP-662	Ac-AmwTF\$r8AYWAQL\$S-N H 2	1618,86	810,43	810,66

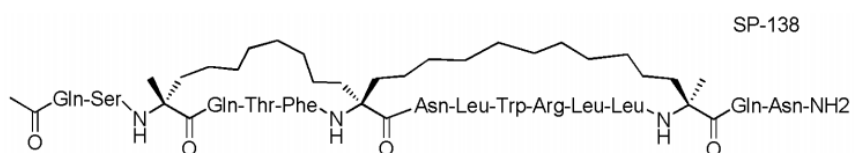
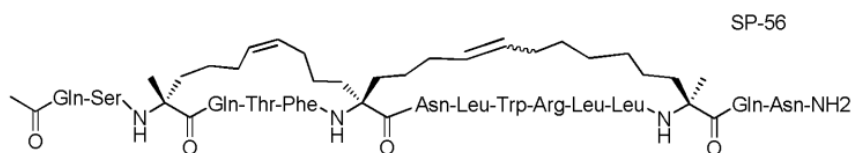
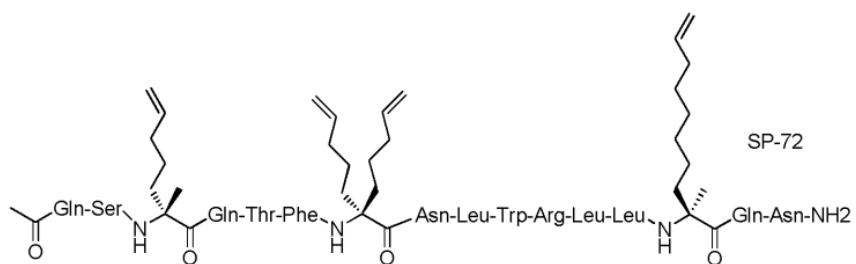
SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-663	Ac-NmLTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,11
SP-664	Ac-LNmTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,11
SP-665	Ac-LSarF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1501,83	751,92	752,18
SP-667	Ac-LGF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1487,82	744,91	745,15
SP-668	Ac-LTNmF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,2
SP-669	Ac-TF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1418,76	710,38	710,64
SP-670	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$A-NH2	1531,81	766,91	767,2
SP-671	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$A-NH2	1573,85	787,93	788,1
SP-672	Ac-LT2Nal\$r8AYWSQL\$S-NH2	1597,85	799,93	800,4
SP-673	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$S-NH2	1474,82	738,41	738,68
SP-674	Ac-LTF\$r8AYWAQhCha\$S-NH2	1585,89	793,95	794,19
SP-675	Ac-LTF\$r8AYWAQChg\$S-NH2	1557,86	779,93	780,97
SP-676	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$S-NH2	1543,84	772,92	773,19
SP-677	Ac-LTF\$r8AYWAQF3CF3\$S-NH2	1633,82	817,91	818,15
SP-678	Ac-LTF\$r8AYWAQ1Nal\$S-NH2	1615,84	808,92	809,18
SP-679	Ac-LTF\$r8AYWAQBip\$S-NH2	1641,86	821,93	822,32
SP-680	Ac-LT2Nal\$r8AYWAQL\$S-NH2	1581,86	791,93	792,15
SP-681	Ac-LTF\$r8AYWVQL\$S-NH2	1559,88	780,94	781,62
SP-682	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$S-NH2	1554,86	778,43	778,65
SP-683	Ac-FTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1609,85	805,93	806,12
SP-684	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$S-NH2	1607,88	804,94	805,2
SP-685	Ac-ITF\$r8LYWSQL\$S-NH2	1589,89	795,95	796,22
SP-686	Ac-FTF\$r8FYWAQL\$S-NH2	1641,86	821,93	822,41
SP-687	Ac-VTF\$r8AYWSQL\$S-NH2	1533,82	767,91	768,19
SP-688	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$S-NH2	1505,84	753,92	754,31
SP-689	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$H-NH2	1581,87	791,94	791,94
SP-690	Ac-LTF\$r8AYWAH L\$S-NH 2	1540,84	771,42	771,61
SP-691	Ac-aAibWTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1804,96	903,48	903,9
SP-692	Ac-AibWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1755,91	878,96	879,5
SP-693	Ac-AibAWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1826,95	914,48	914,7
SP-694	Ac-fWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1817,93	909,97	910,2
SP-695	Ac-AibWWTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1941,99	972,00	972,7
SP-696	Ac-WTF\$r8LYWSQL\$S-NH2	1662,88	832,44	832,7
SP-697	Ac-WTF\$r8NieYWSQL\$S-NH2	1662,88	832,44	832,7
SP-698	Ac-LTF\$r8AYWSQL\$a-NH2	1531,84	766,92	767,2
SP-699	Ac-LTF\$r8EYWARL\$A-NH2	1601,90	801,95	802,2
SP-700	Ac-LTF\$r8EYWAH L\$A-NH 2	1582,86	792,43	792,6
SP-701	Ac-aTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1489,80	745,90	746,1
SP-702	Ac-AibTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1503,81	752,91	753,2
SP-703	Ac-AmfTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1579,84	790,92	791,2
SP-704	Ac-AmwTF\$r8AYWAQL\$S-N H2	1618,86	810,43	810,7
SP-705	Ac-NmLTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,1
SP-706	Ac-LNmTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	774,4
SP-707	Ac-LSarF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1501,83	751,92	752,1
SP-708	Ac-TF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1418,76	710,38	710,8
SP-709	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$A-NH2	1531,81	766,91	767,4
SP-710	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$A-NH2	1573,85	787,93	788,2
SP-711	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$S-NH2	1648,87	825,44	825,2
SP-713	Ac-YTF\$r8FYWSQL\$S-NH2	1673,85	837,93	837,3

SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-714	Ac-F\$8AY6clWSAL\$A-NH2	1294,65	648,33	647,74
SP-715	Ac-ETF\$8EYVWQL\$S-NH2	1633,84	817,92	817,36
SP-716	Ac-ETF\$8EHWAQL\$A-NH2	1563,81	782,91	782,36
SP-717	Ac-ITF\$8EYWAQL\$S-NH2	1589,85	795,93	795,38
SP-718	Ac-ITF\$8EHVWQL\$A-NH2	1575,88	788,94	788,42
SP-719	Ac-ITF\$8EHWAQL\$S-NH2	1563,85	782,93	782,43
SP-720	Ac-LTF4F\$8AYWAQCba\$S-NH2	1561,83	781,92	781,32
SP-721	Ac-LTF3CI\$8AYWAQhL\$S-NH2	1579,82	790,91	790,64
SP-722	Ac-LTF3CI\$8AYWAQCha\$S-NH2	1605,84	803,92	803,37
SP-723	Ac-LTF3CI\$8AYWAQChg\$S-NH2	1591,82	796,91	796,27
SP-724	Ac-LTF3CI\$8AYWAQCba\$S-NH2	1577,81	789,91	789,83
SP-725	Ac-LTF\$8AY6clWSQL\$S-NH2	1581,80	791,90	791,75
SP-726	Ac-LTF4F\$8HYWAQhL\$S-NH2	1629,87	815,94	815,36
SP-727	Ac-LTF4F\$8HYWAQCba\$S-NH2	1627,86	814,93	814,32
SP-728	Ac-LTF4F\$8AYWAQhL\$S-NH2	1563,85	782,93	782,36
SP-729	Ac-LTF4F\$8AYWAQChg\$S-NH2	1575,85	788,93	788,35
SP-730	Ac-ETF\$8EYVWVAL\$S-NH2	1576,82	789,41	788,79
SP-731	Ac-ETF\$8EHWAAL\$A-NH2	1506,79	754,40	754,8
SP-732	Ac-ITF\$8EYWAAL\$S-NH2	1532,83	767,42	767,75
SP-733	Ac-ITF\$8EHVVAL\$A-NH2	1518,86	760,43	760,81
SP-734	Ac-ITF\$8EHWAAL\$S-NH2	1506,82	754,41	754,8
SP-735	Pam-LTF\$8EYWAQL\$S-NH2	1786,07	894,04	894,48
SP-736	Pam-ETF\$8EYWAQL\$S-NH2	1802,03	902,02	902,34
SP-737	Ac-LTF\$8AYWLQL\$S-NH2	1573,89	787,95	787,39
SP-738	Ac-LTF\$8EYWLQL\$S-NH2	1631,90	816,95	817,33
SP-739	Ac-LTF\$8EHWLQL\$S-NH2	1605,89	803,95	804,29
SP-740	Ac-LTF\$8VYWAQL\$S-NH2	1559,88	780,94	781,34
SP-741	Ac-LTF\$8AYWSQL\$S-NH2	1547,84	774,92	775,33
SP-742	Ac-ETF\$8AYWAQL\$S-NH2	1547,80	774,90	775,7
SP-743	Ac-LTF\$8EYWAQL\$S-NH2	1589,85	795,93	796,33
SP-744	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHAm	1667,94	834,97	835,37
SP-745	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHiAm	1667,94	834,97	835,27
SP-746	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHnPr3Ph	1715,94	858,97	859,42
SP-747	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHnBu3,3Me	1681,96	841,98	842,67
SP-748	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHnBu	1653,93	827,97	828,24
SP-749	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHnPr	1639,91	820,96	821,31
SP-750	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHnEt2Ch	1707,98	854,99	855,35
SP-751	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHHex	1681,96	841,98	842,4
SP-752	Ac-LTF\$8AYWAQL\$S-NHmdPeg2	1633,91	817,96	855,35
SP-753	Ac-LTF\$8AYWAQL\$A-NHmdPeg2	1617,92	809,96	810,58
SP-754	Ac-LTF\$8AYWAAL\$S8S-NH2	1474,82	738,41	738,79
SP-755	Ac-LTF\$8AYWCouQL\$S-NH2	1705,88	853,94	854,61
SP-756	Ac-LTF\$8CouYWAQL\$S-NH2	1705,88	853,94	854,7
SP-757	Ac-CouTF\$8AYWAQL\$S-NH2	1663,83	832,92	833,33
SP-758	H-LTF\$8AYWAQL\$A-NH2	1473,84	737,92	737,29
SP-759	Ac-HHF\$8AYWAQL\$S-NH2	1591,83	796,92	797,72
SP-760	Ac-LT2NaI\$8AYWSQL\$S-NH2	1597,85	799,93	800,68
SP-761	Ac-LTF\$8HCouWAQL\$S-NH2	1679,87	840,94	841,38
SP-762	Ac-LTF\$8AYWCou2QL\$S-NH2	1789,94	895,97	896,51

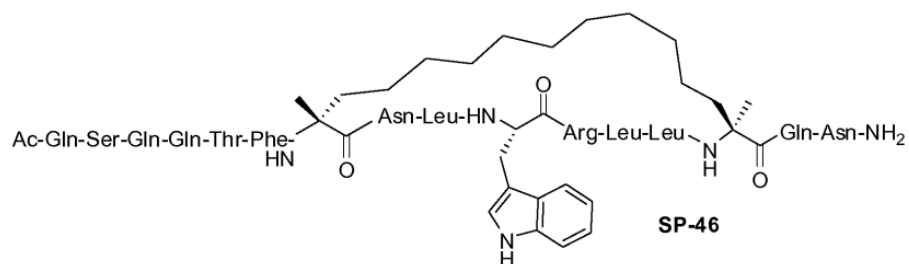
SP	Sec	Masa exacta	M+2	Masa observada (m/e)
SP-763	Ac-LTF\$r8Cou2YWAQL\$S-NH2	1789,94	895,97	896,5
SP-764	Ac-Cou2TF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1747,90	874,95	875,42
SP-765	Ac-LTF\$r8ACou2WAQL\$S-NH2	1697,92	849,96	850,82
SP-766	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1574,89	788,45	788,82
SP-767	Hexac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1587,91	794,96	795,11
SP-768	Napac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1657,89	829,95	830,36
SP-769	Pam-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1728,06	865,03	865,45
SP-770	Ac-LT2NaI\$r8HYAAQL\$S-NH2	1532,84	767,42	767,61
SP-771	Ac-LT2NaI\$r8HYWAQL\$/S-NH2	1675,91	838,96	839,1
SP-772	Ac-LT2NaI\$r8HYFAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,9
SP-773	Ac-LT2NaI\$r8HWAAQL\$S-NH2	1555,86	778,93	779,08
SP-774	Ac-LT2NaI\$r8HYAWQL\$S-NH2	1647,88	824,94	825,04
SP-775	Ac-LT2NaI\$r8HYAAQW\$S-NH2	1605,83	803,92	804,05
SP-776	Ac-LTW\$r8HYWAQL\$S-NH2	1636,88	819,44	819,95
SP-777	Ac-LT1NaI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1647,88	824,94	825,41

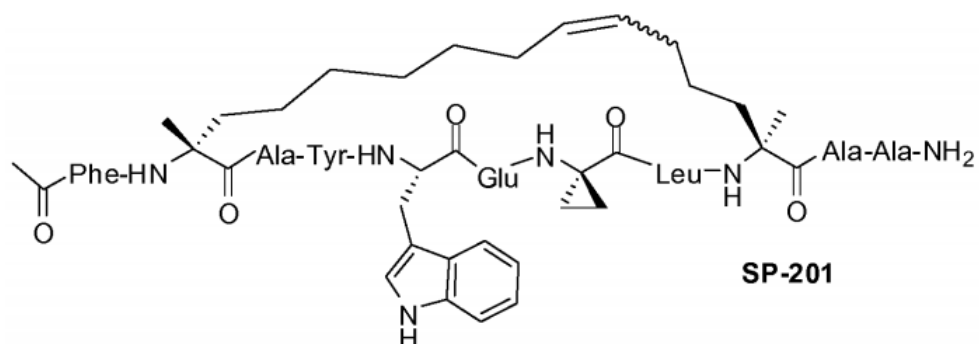
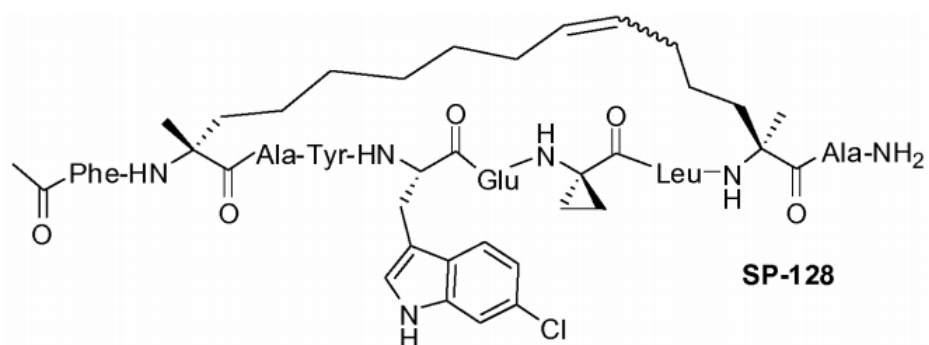
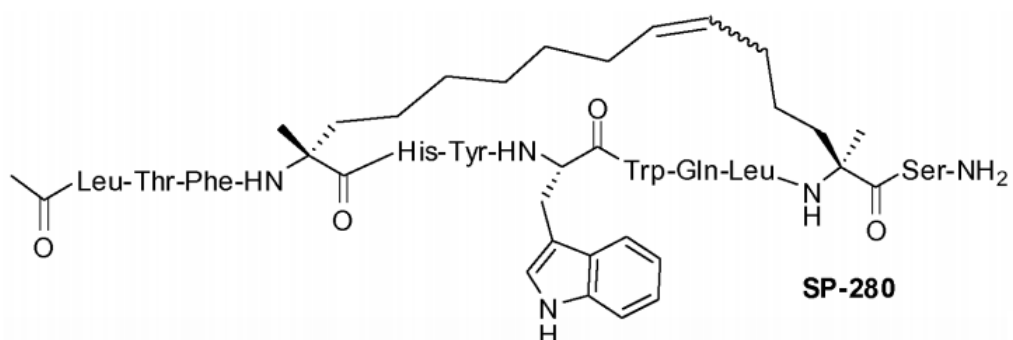
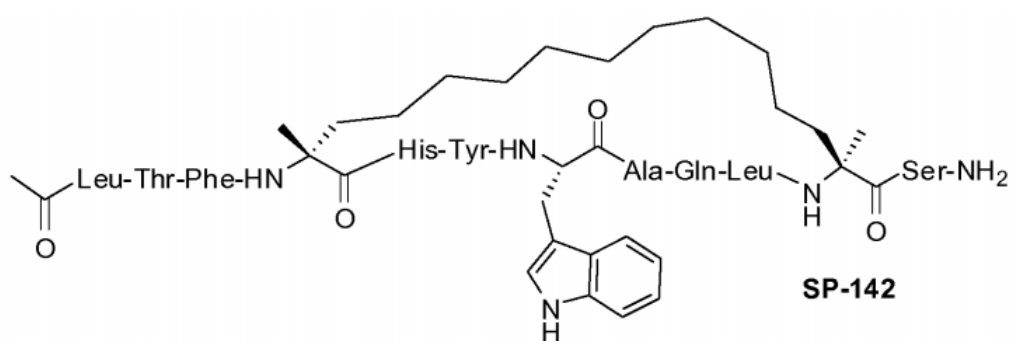
En las secuencias mostradas anteriormente y en otros lados, se usan las siguientes abreviaturas: "Nle" representa a la norleucina, "Aib" representa al ácido 2-aminoisobutírico, "Ac" representa al acetilo, y "Pr" representa al propionilo. Los aminoácidos representados como "\$" son aminoácidos alfa-Me S5-pentenil-alanina olefina conectados por un reticulador de todos los carbonos i a i+4 que comprende un enlace doble. Los aminoácidos representados como "\$r5" son aminoácidos alfa-Me R5-pentenil-alanina olefina conectados por un reticulador de todos los carbonos i a i+4 que comprende un enlace doble. Los aminoácidos representados como "\$s8" son aminoácidos alfa-Me S8-octenil-alanina olefina conectados por un reticulador de todos los carbonos i a i+7 que comprende un enlace doble. Los aminoácidos representados como "\$r8" son aminoácidos alfa-Me R8-octenil-alanina olefina conectados por un reticulador de todos los carbonos i a i+7 que comprende un enlace doble. "Ahx" representa un enlazador de aminociclohexilo. Los reticuladores son reticuladores de todos los carbonos lineales que comprenden ocho u once átomos de carbono entre los carbonos alfa de cada aminoácido. Los aminoácidos representados como "\$/" son aminoácidos alfa-Me S5-pentenil-alanina olefina que no están conectados por ningún reticulador. Los aminoácidos representados como "\$/r5" son aminoácidos alfa-Me R5-pentenil-alanina olefina que no están conectados por ningún reticulador. Los aminoácidos representados como "\$/s8" son aminoácidos alfa-Me S8-octenil-alanina olefina que no están conectados por ningún reticulador. Los aminoácidos representados como "\$/r8" son aminoácidos alfa-Me R8-octenil-alanina olefina que no están conectados por ningún reticulador. Los aminoácidos representados como "Amw" son aminoácidos alfa-Me triptófano. Los aminoácidos representados como "Aml" son aminoácidos alfa-Me leucina. Los aminoácidos representados como "2ff" son aminoácidos 2-fluoro-fenilalanina. Los aminoácidos representados como "3ff" son aminoácidos 3-fluoro-fenilalanina. Los aminoácidos representados como "St" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de pentenil-alanina olefina, cada una de las cuales está reticulada con otro aminoácido tal como se indica. Los aminoácidos representados como "St/" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de pentenil-alanina olefina que no están reticuladas. Los aminoácidos representados como "%St" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de pentenil-alanina olefina, cada una de las cuales está reticulada con otro aminoácido tal como se indica a través de reticulaciones de hidrocarburos completamente saturados.

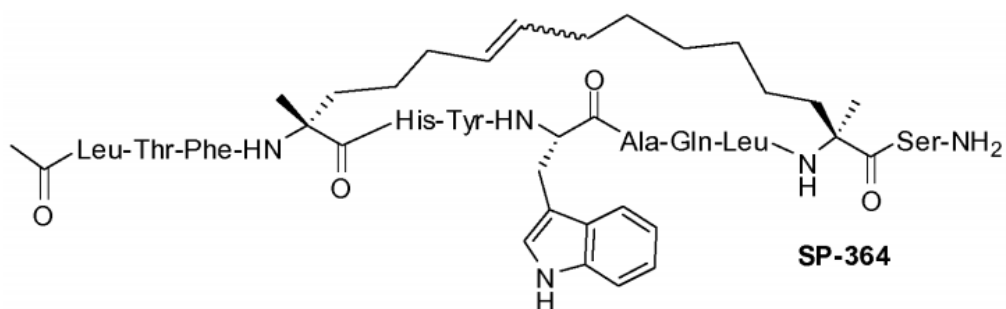
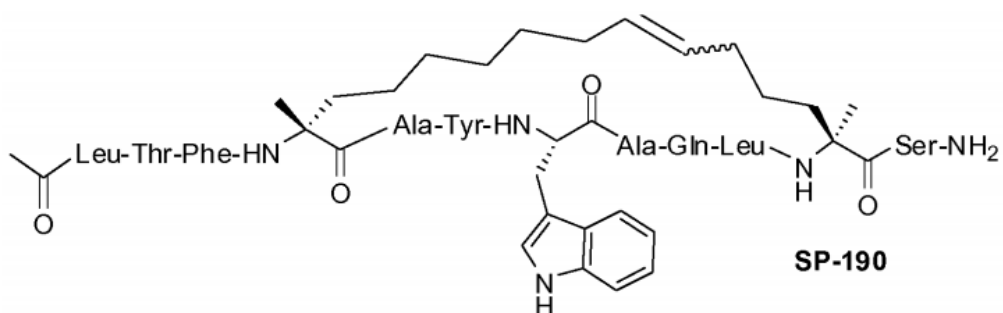
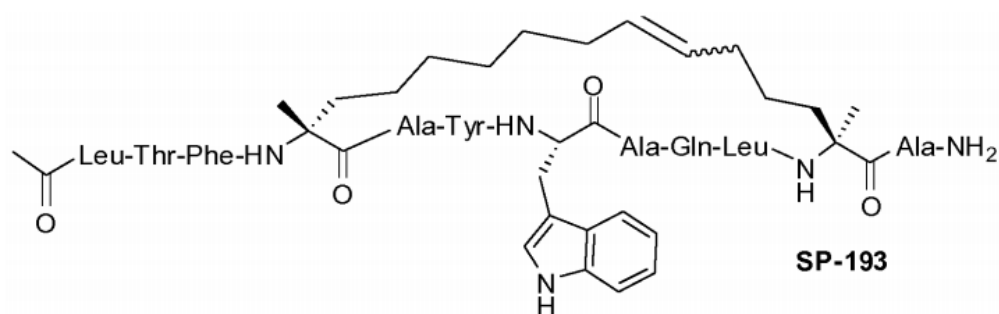
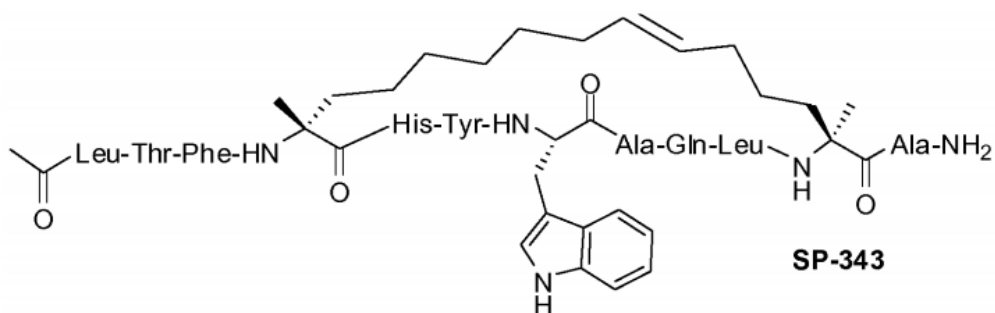
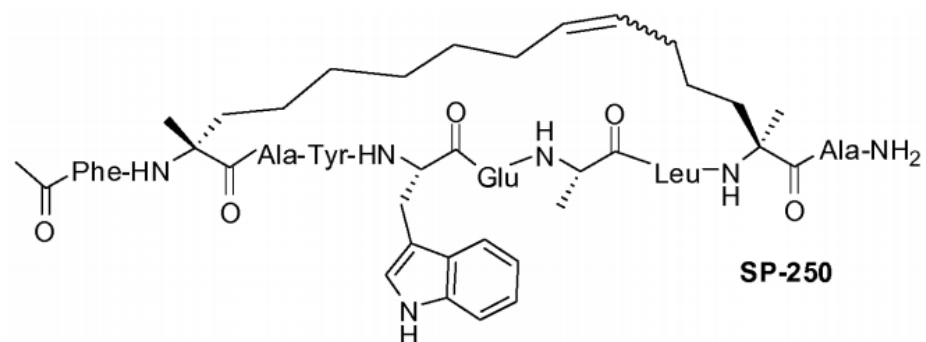
Por ejemplo, los compuestos representados como SP-72, SP-56 y SP-138 tienen las siguientes estructuras:



Por ejemplo, los compuestos adicionales tienen las siguientes estructuras:







La proteína p53-His6 (30 nM/pocillo) se recubre durante toda la noche a temperatura ambiente en los pocillos de una placa Immulon de 96 pocillos. El día del experimento, las placas se lavan con IX PBS-Tween 20 (al 0,05 %) usando un lavador automático de placas de ELISA, se bloquean con bloqueante de micropocillos de ELISA durante 30 minutos a temperatura ambiente; el exceso de agente bloquean se elimina por lavado lavando las placas con IX PBS-Tween 20 (0,05 %). Los péptidos se diluyen de soluciones madre de DMSO 10 mM a soluciones de trabajo de 500 µM en agua estéril, se prepararon diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener la concentración de DMSO constante a lo largo de las muestras. Los péptidos se añaden a los pocillos a las concentraciones deseadas a 2X en volúmenes de 50 µl, seguido por la adición de la proteína diluida GST-HDM2 o GST-HDMX (concentración final: 10 nM). Las muestras incuban a temperatura ambiente durante 2 minutos, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 (al 0,05 %) antes de añadir 100 µl de anticuerpo anti-GST conjugado con HRP [Hypromatrix, INC] diluido a 0,5 µg/ml en tampón de estabilización de HRP. Después de 30 min de incubación con anticuerpo de detección, las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl por pocillo de solución de TMB-Sustrato E hasta 30 minutos; las reacciones se detuvieron usando HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de microplaca. Los datos se analizaron usando el programa informático Graph Pad PRISM.

Las células SJSA1 se sembraron a una densidad de 5000 células/ 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo. El día del estudio, las células se lavan una vez con medio Opti-MEM y se añaden 90 µl de medio Opti-MEM a las células. Los péptidos se diluyen de soluciones madre de DMSO 10 mM a soluciones de trabajo de 500 µM en agua estéril, se prepararon diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener la concentración de DMSO constante a lo largo de las muestras. El intervalo en µM de la concentración final será de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,56, 0,8 y 0 µM en un volumen final de 100 µl por pocillo para los péptidos. La concentración final más alta de DMSO es del 0,5 % y se usará como control negativo. El (-)-Nutlin-3 (10 mM) del ensayo basado en células de Cayman Chemicals se usa como control positivo. El nutlin se diluyó usando el mismo esquema de dilución que los péptidos: se añadieron 10 µl de concentraciones deseadas a 10X al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales deseadas. Las células se incuban después con péptidos durante 20-24 h a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Tras el período de incubación, se midió la viabilidad celular usando reactivos Cell Titer-Glo de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células SJSa1 se sembraron a una densidad de 0,8 millones de células/ 2 ml/pocillo en placas de 6 pocillos un día antes del ensayo. El día del estudio, las células se lavan una vez con medio Opti-MEM y se añaden 1350 µl de medio Opti-MEM a las células. Los péptidos se diluyen de soluciones madre de DMSO 10 mM a soluciones de trabajo de 500 µM en agua estéril, se prepararon diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener la concentración de DMSO constante a lo largo de las muestras. La concentración final más alta de DMSO es del 0,5 % y se usa como control negativo. El (-)-Nutlin-3 (10 mM) del ensayo basado en células de Cayman Chemicals se usa como control positivo. El nutlin se diluye usando el mismo esquema de dilución que los péptidos: se añaden 150 µl de concentraciones deseadas a 10X al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales deseadas. Las células se incuban después con péptidos durante 18-20 h a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Tras el período de incubación, las células se recolectan, se lavan con IX PBS (sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) y se lisó en tampón de lisis celular IX (tampón a 10X de Cell Signaling technologies diluido a IX y suplementado con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa) en hielo durante 30 min. Los lisados se centrifugan a una velocidad de 13000 rpm en una microfuga a 40 °C durante 8 min; los sobrenadantes claros se recolectan y se almacenan a -80 °C hasta su posterior uso. Se mide el contenido total de proteínas de los lisados usando el kit de detección de proteína BC y los patrones de BSA de ThermoFisher. Se usaron 25 µg de la proteína total para el ensayo de ELISA de detección de p21. Cada condición se

establece por triplicado para la placa de ELISA. El protocolo de ensayo de ELISA se sigue como en las instrucciones del fabricante. Se usaron 25 µg de proteína total para cada pocillo y cada pocillo se configuró por triplicado. Los datos se analizaron usando el programa informático Graph Pad PRISM.

5 Ejemplo 6: Ensayo de GRIP de p53

El ensayo de redistribución de p53-Hdm2 Biolmage de Thermo Scientific* controla la interacción de la proteína con Hdm2 y la translocación celular de p53 marcado con GFP en respuesta a los componentes del fármaco u otros estímulos. Las células recombinantes CHO-hIR expresan de manera estable p53 humana (1-312) fusionada al extremo C-terminal de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) y PDE4A4-Hdm2(1-124), una proteína de fusión entre PDE4A4 y Hdm2(1-124). Proporcionan un sistema de ensayo listo para usar para medir los efectos de las condiciones experimentales en la interacción de p53 y Hdm2. La obtención de imágenes y el análisis se realizó con un soporte de HCS.

Las células CHO-hIR se mantuvieron de forma regular en el medio F12 de Ham suplementado con Penicilina-Estreptomicina al 1 %, 0,5 mg/ml de geneticina, 1 mg/ml de zeocina y FBS al 10 %. Las células se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 7000 células/ 100 µl por pocillo 18-24 horas antes de poner en funcionamiento el ensayo usando el medio de cultivo. Al día siguiente, el medio se repone y se añade PD177 a las células a la concentración final de 3 µM para activar la formación de los focos. Los pocillos de control se mantienen sin la solución de PD-177. 24 horas después de la estimulación con PD177, las células se lavan una vez con medio Opti-MEM y se añaden a las células 50 µl de medio Opti-MEM suplementado con PD-177 (6 µM). Los péptidos se diluyen de soluciones madre de DMSO 10 mM a soluciones de trabajo de 500 µM en agua estéril, se prepararon diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener la concentración de DMSO constante a lo largo de las muestras. La concentración final más alta de DMSO es del 0,5 % y se usa como control negativo. El (-)-Nutlin-3 (10 mM) del ensayo basado en células de Cayman Chemicals se usa como control positivo. El nutlin se diluyó usando el mismo esquema de dilución que los péptidos: se añadieron 50 µl de concentraciones deseadas a 2X al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales deseadas. Las células se incuban después con péptidos durante 6 h a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Tras el período de incubación, las células se fijan suavemente aspirando el medio y añadiendo 150 µl de solución de fijación por pocillo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavan 4 veces con 200 µl de PBS por pocillo cada vez. Al final del último lavado, se añaden 100 µl de solución de tinción Hoechst 1 µM. Las placas selladas se incubaron durante al menos 30 min en la oscuridad, se lavaron con PBS para retirar el exceso de colorante y se añadió PBS a cada pocillo. Las placas se pueden almacenar a 4 °C en la oscuridad hasta 3 días. Se obtienen imágenes de la translocación de p53/HDM2 usando el módulo de translocación molecular en el instrumento Arrayscan de Cellomics usando un objetivo de 10x, conjuntos de filtros XF-100 para Hoechst y GFP. Los parámetros de salida fueron Media-CircRINGAveIntenRatio (la proporción de las intensidades de fluorescencia promedio del núcleo y del citoplasma, (promedio del pocillo)). El número mínimamente aceptable de células por pocillo usadas para el análisis de imágenes se estableció a 500 células.

Ejemplo 7: Ensayo de unión directa de hDM2 con polarización fluorescente (FP)

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir hDM2 (interno, 41 kD) en tampón de FP (tampón alto en sales -NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, a pH 7,5) para preparar una solución madre de trabajo de 10 µM.
2. Añadir 30 µl de solución madre de proteína 10 µM al pocillo A1 y B1 de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices).
3. Rellenar 30 µl de tampón de FP en la columna A2 a A12, B2 a B12, C1 a C12 y D1 a D12.
4. Dilución seriada de 2 o 3 veces de la solución madre de proteína de A1, B1 a A2, B2; A2, B2 a A3, B3; ... hasta alcanzar la concentración en nM de un solo dígito en el último punto de dilución.
5. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO a 100 µM (dilución de 1:10). Después, diluir de 100 µM a 10 µM con agua (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 10 µM a 40 nM (dilución a 1:250). Esta es la solución de trabajo que será una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución a 1:4). Mantener el péptido diluido y marcado con FAM en la oscuridad hasta su uso.
6. Añadir 10 µl de péptido marcado con FAM 10 nM a cada pocillo e incubar, y leer en diferentes puntos temporales. La K_d con 5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ es -13,38 nM.

Ejemplo 8: Ensayo de polarización fluorescente competitiva para hDM2

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir hDM2 (interno, 41 kD) en tampón de FP (tampón alto en sales -NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, a pH 7,5) para preparar una solución madre de trabajo de 84 nM (2X).
2. Añadir 20 µl de solución madre de proteína 84 nM (2X) a cada pocillo de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices)
3. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO a 100 µM (dilución de 1:10). Después, diluir de 100 µM a 10 µM con agua (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 10 µM a 40

nM (dilución a 1:250). Esta es la solución de trabajo que será una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución a 1:4). Mantener el péptido diluido y marcado con FAM en la oscuridad hasta su uso.

4. Preparar una placa de dosis de péptidos sin marcar con tampón de FP comenzando con 1 μ M (final) de péptido y haciendo diluciones seriadas de 5 veces para 6 puntos usando el siguiente esquema de dilución.

5. Diluir 10 mM (en DMSO al 100 %) con DMSO a 5 mM (dilución de 1:2). Después, diluir de 5 mM a 500 μ M con H₂O (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 500 μ M a 20 μ M (dilución a 1:25). Preparar diluciones seriadas de 5 veces a partir de 4 μ M (4X) para 6 puntos.

5. Transferir 10 μ l de péptidos no marcados diluidos de forma seriada a cada pocillo que está relleno con 20 μ l de 84 nM de proteína.

6. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM 10 nM (4X) a cada pocillo e incubar durante 3 horas para leer.

Los resultados de los Ejemplos 7 y 8 se proporcionan en los datos de HDM2 en las Figuras 7A-D.

Ejemplo 9: Ensayo de unión directa de hDMX con polarización fluorescente (FP)

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir hDMX (interno, 40 kD) en tampón de FP (tampón alto en sales -NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, a pH 7,5) para preparar una solución madre de trabajo de 10 μ M.

2. Añadir 30 μ l de solución madre de proteína 10 μ M al pocillo A1 y B1 de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices).

3. Rellenar 30 μ l de tampón de FP en la columna A2 a A12, B2 a B12, C1 a C12 y D1 a D12.

4. Dilución seriada de 2 o 3 veces de la solución madre de proteína de A1, B1 a A2, B2; A2, B2 a A3, B3; ... hasta alcanzar la concentración en nM de un solo dígito en el último punto de dilución.

5. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO a 100 μ M (dilución de 1:10). Después, diluir de 100 μ M a 10 μ M con agua (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 10 μ M a 40 nM (dilución a 1:250). Esta es la solución de trabajo que será una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución a 1:4). Mantener el péptido diluido y marcado con FAM en la oscuridad hasta su uso.

6. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM 10 nM a cada pocillo e incubar, y leer en diferentes puntos temporales.

La Kd con 5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ es ~ 51 nM.

Ejemplo 10: Ensayo de polarización fluorescente competitiva para hDMX

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir hDMX (interno, 40 kD) en tampón de FP (tampón alto en sales -NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, a pH 7,5) para preparar una solución madre de trabajo de 300 nM (2X).

2. Añadir 20 μ l de solución madre de proteína 300 nM (2X) a cada pocillo de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices).

3. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO a 100 μ M (dilución de 1:10). Después, diluir de 100 μ M a 10 μ M con agua (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 10 μ M a 40 nM (dilución a 1:250). Esta es la solución de trabajo que será una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución a 1:4). Mantener el péptido diluido y marcado con FAM en la oscuridad hasta su uso.

4. Preparar una placa de dosis de péptidos sin marcar con tampón de FP comenzando con 5 μ M (final) de péptido y haciendo diluciones seriadas de 5 veces para 6 puntos usando el siguiente esquema de dilución.

5. Diluir 10 mM (en DMSO al 100 %) con DMSO a 5 mM (dilución de 1:2). Después, diluir de 5 mM a 500 μ M con H₂O (dilución de 1:10) y después diluir con tampón de FP de 500 μ M a 20 μ M (dilución a 1:25). Preparar diluciones seriadas de 5 veces a partir de 20 μ M (4X) para 6 puntos.

6. Transferir 10 μ l de péptidos no marcados diluidos de forma seriada a cada pocillo que está relleno con 20 μ l de 300 nM de proteína.

7. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM 10 nM (4X) a cada pocillo e incubar durante 3 horas para leer.

Los resultados de los Ejemplos 9 y 10 se proporcionan en los datos de HDMX en las Figuras 7A-D.

Ejemplo 11: Ensayo de viabilidad celular

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Colocación en placas de las células: Tripsinizar, contar y sembrar las células en las densidades predeterminadas en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo. Las siguientes densidades celulares se usan para cada línea celular en uso:

- SJSA-1: 7500 células/ pocillo

- RKO: 5000 células/pocillo

- RKO-E6: 5000 células/ pocillo
- HCT-116: 5000 células/ pocillo
- 5 • SW-480: 2000 células/ pocillo
- MCF-7: 5000 células/ pocillo

El día del estudio, reemplazar el medio con medio reciente con FBS al 11 % (medio del ensayo) a temperatura ambiente. Añadir 180 µl del medio de ensayo por pocillo. Los pocillos de control sin células, reciben 200 µl de medio.

Dilución del péptido: todas las diluciones se hacen a temperatura ambiente y se añaden a las células a temperatura ambiente.

- 15 • Preparar soluciones madre 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir de forma seriada la solución madre usando un esquema de dilución de 1:3 para obtener soluciones de 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM usando DMSO como diluyente. Diluir los péptidos diluidos de forma seriada en DMSO 33,3 veces usando agua estéril. Esto da un intervalo de 10X soluciones de trabajo. Preparar también la mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO al 3 %) para los pocillos de control.
- 20 • Por lo tanto, el intervalo de concentración en µM de las soluciones de trabajo será de 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM. Mezclar bien en cada etapa de dilución usando la pipeta multicanal.
- La fila H tiene controles. H1 - H3 recibirán 20 µl de medio de ensayo. H4-H9 recibirán 20 µl de vehículo de DMSO al 3 %-agua. H10-H12 solo tendrá medio de control sin células.
- 25 • Control positivo: El inhibidor de molécula pequeña de HDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usó como control positivo. Se diluyó el Nutlin usando el mismo esquema de dilución como péptidos.

Adición de soluciones madre de trabajo a las células:

- 30 • Añadir 20 µl de la concentración deseada a 10X al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 200 µl en el pocillo. (20 µl de péptido 300 µM + 180 µl de células en el medio = concentración final de 30 µM en un volumen de 200 µl en los pocillos). Mezclar suavemente unas pocas veces usando la pipeta. Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será de 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 y 0 µM (para los péptidos potentes se incluyen diluciones adicionales).
- 35 • Los controles incluyen pocillos que no reciben péptidos pero contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen los péptidos y los pocillos SIN CÉLULAS.
- Incubar durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.
- La viabilidad de las células se determina usando el reactivo MTT de Promega. La viabilidad de las células SJSA-1, RKO, RKO-E6, HCT-116 se determina el día 3, la de las células MCF-7 el día 5 y la de las células SW-480 el día 6. Al final del tiempo de incubación designado, permitir que las placas alcancen la temperatura ambiente. Extraer 80 µl de medio de ensayo de cada pocillo. Añadir 15 µl de reactivo MTT descongelado a cada pocillo.
- 40 • Permitir que las placas se incuben durante 2 horas a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % y añadir 100 µl de reactivo de solubilización como en el protocolo del fabricante. Incubar con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 570 nM en lector multiplaca Synergy Biotek.
- 45 • Analizar la viabilidad celular frente a los controles de DMSO usando las herramientas de análisis GraphPad PRISM.

Reactivos:

- Medio de cultivo celular de Invitrogen
- Placas transparentes tratadas de cultivo celular de 96 pocillos de Falcon (Nunc 353072)
- 50 • DMSO (Sigma D 2650)
- RPMI 1640 (Invitrogen 72400)
- MTT (Promega G4000)

Instrumentos: Lector de multiplaca para la lectura de absorbancia (Synergy 2)

Los resultados del Ejemplo 11 se proporcionan en los datos de CE50 de SJSA-1 en las Figuras 7A-D.

Ejemplo 12. Ensayo de ELISA de P21

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Colocación en placas de las células:

- 65 • Tripsinizar, contar y sembrar células SJSA1 a la densidad de 7500 células/ 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo.
- El día del estudio, reemplazar el medio con RPMI-FBS al 11 % (medio de ensayo). Añadir 90 µl del medio de

ensayo por pocillo. Los pocillos de control sin células, reciben 100 µl de medio.

Dilución del péptido:

- 5 • Preparar soluciones madre 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir de forma seriada la solución madre usando un esquema de dilución de 1:3 para obtener soluciones de 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM usando DMSO como diluyente. Diluir los péptidos diluidos de forma seriada en DMSO 33,3 veces usando agua estéril. Esto da un intervalo de 10X soluciones de trabajo. Preparar también la mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO al 3 %) para los pocillos de control.
- 10 • Por lo tanto, el intervalo de concentración en µM de las soluciones de trabajo será de 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM. Mezclar bien en cada etapa de dilución usando la pipeta multicanal.
- La fila H tiene controles. H1 - H3 recibirán 10 µl de medio de ensayo. H4-H9 recibirán 10 µl de vehículo de DMSO al 3 %-agua. H10-H12 solo tendrá medio de control sin células.
- 15 • Control positivo: El inhibidor de molécula pequeña de HDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usó como control positivo. Se diluyó el Nutlin usando el mismo esquema de dilución como péptidos.

Adición de soluciones madre de trabajo a las células:

- 20 • Añadir 10 µl de la concentración deseada a 10X al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 100 µl en el pocillo. (10 µl de péptido 300 µM + 90 µl de células en el medio = concentración final de 30 µM en un volumen de 100 µl en los pocillos). Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM.
- Los controles incluirán pocillos que no reciben péptidos pero contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen los péptidos y los pocillos SIN CÉLULAS.
- 25 • 20 horas después de la incubación, aspirar el medio; lavar las células con PBS a 1X (sin Ca²⁺/Mg²⁺) y lisar en 60 µl de tampón de lisis celular a 1X (tampón a 10X de Cell Signaling technologies diluido a 1X y suplementado con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa) en hielo durante 30 minutos.
- Centrifugar las placas a una velocidad de 5000 rpm a 4 °C durante 8 minutos; recolectar los sobrenadantes claros y congelarlos a -80 °C hasta su uso.

Estimación de proteínas:

- Se mide el contenido total de proteínas de los lisados usando el kit de detección de proteína BC y los patrones de BSA de Thermofisher. Normalmente se espera 6-7 µg de proteína por pocillo.
- 35 • Usar 50 µl del lisado por pocillo para configurar el ELISA de p21.

ELISA de p21 total de humano: El protocolo de ensayo de ELISA se sigue como en las instrucciones del fabricante. Se usaron 50 µl de lisado para cada pocillo y cada pocillo se configuró por triplicado.

Reactivos:

- (-)-Nutlin-3 (10 mM) de ensayo basado en células: Cayman Chemicals, n.º de catálogo 600034
- OptiMEM, n.º de catálogo 51985, de Invitrogen
- Tampón de lisis de Cell Signaling (10X), Cell signaling Technology, n.º de catálogo 9803
- 45 • Comprimidos(mini) de mezcla de inhibidores de proteasa, Roche Chemicals, n.º de catálogo 04693124001
- Comprimido de mezcla de inhibidores de fosfatasa, Roche Chemicals, n.º de catálogo 04906837001
- - kit ELISA de p21 total de humano, R&D Systems, DYC1047-5
- Solución de parada (HCL 1M), Cell Signaling Technologies, n.º de catálogo 7002

Instrumentos: Microcentrífuga de Eppendorf 5415D y lector de multiplaca para la lectura de absorbancia (Synergy 2)

Los resultados del Ejemplo 12 se proporcionan en los datos de p21 en las Figuras 7A-D.

Ejemplo 13: Ensayo de detección de caspasa 3:

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Colocación en placas de las células: Tripsinizar, contar y sembrar células SJSA1 a la densidad de 7500 células/ 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo. El día del estudio, reemplazar el medio con RPMI-FBS al 11 % (medio de ensayo). Añadir 180 µl del medio de ensayo por pocillo. Los pocillos de control sin células, reciben 200 µl de medio.

Dilución del péptido:

- 65 • Preparar soluciones madre 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir de forma seriada la solución madre usando un esquema de dilución de 1:3 para obtener soluciones de 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM usando DMSO

como diluyente. Diluir los péptidos diluidos de forma seriada en DMSO 33,3 veces usando agua estéril. Esto da un intervalo de 10X soluciones de trabajo. Preparar también la mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO al 3 %) para los pocillos de control.

- Por lo tanto, el intervalo de concentración en μM de las soluciones de trabajo será de 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 μM . Mezclar bien en cada etapa de dilución usando la pipeta multicanal. Añadir 20 μl de soluciones madre de trabajo a 10X a los pocillos apropiados.
- La fila H tiene controles. H1 - H3 recibirán 20 μl de medio de ensayo. H4-H9 recibirán 20 μl de vehículo de DMSO al 3 %-agua. H10-H12 solo tendrá medio de control sin células.
- Control positivo: El inhibidor de molécula pequeña de HDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usó como control positivo. Se diluyó el Nutlin usando el mismo esquema de dilución como péptidos.

Adición de soluciones madre de trabajo a las células:

- **Añadir 10 μl de la concentración deseada a 10X** al pocillo apropiado **para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 100 μl en el pocillo.** (10 μl de péptido 300 μM + 90 μl de células en el medio = concentración final de 30 μM en un volumen de 100 μl en los pocillos). Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 μM .
- Los controles incluirán pocillos que no reciben péptidos pero contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen los péptidos y los pocillos SIN CÉLULAS.
- 48 horas después de la incubación, aspirar 80 μl de medio de cada pocillo; añadir 100 μl de reactivo de ensayo Caspasa 3/7Glo (sistema de ensayo de Caspasa 3/7 glo de Promega, G8092) por pocillo, incubar con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Leer la luminiscencia en el lector de multiplaca Synergy Biotek.
- Los datos se analizan como activación de Caspasa 3 sobre células tratadas con DMSO.

Los resultados del Ejemplo 13 se proporcionan en los datos de p21 en las Figuras 7A-D.

REIVINDICACIONES

1. Un macrociclo peptidomimético que interfiere con la unión entre p53 y HDM2 o HDMX, y que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 60 % idéntica a:
5 Leu Thr Phe \$₁ Glu Tyr Trp Ala Gln Leu \$₂ Ala;
en donde \$₁, es un aminoácido α,α-disustituido en la configuración R, en donde un sustituyente es un grupo metilo y el otro sustituyente es un grupo enlazador a \$₂; y en donde \$₂ es un aminoácido α,α-disustituido en la configuración S, en donde un sustituyente es un grupo metilo y el otro sustituyente es el grupo enlazador a \$₁; y en donde el grupo enlazador, comenzando desde \$₁ es -(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-.
10
2. Una composición farmacéutica que comprende el macrociclo peptidomimético tal como se reivindica en la reivindicación 1.
3. Un macrociclo peptidomimético tal como se reivindica en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.
15
4. Una composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

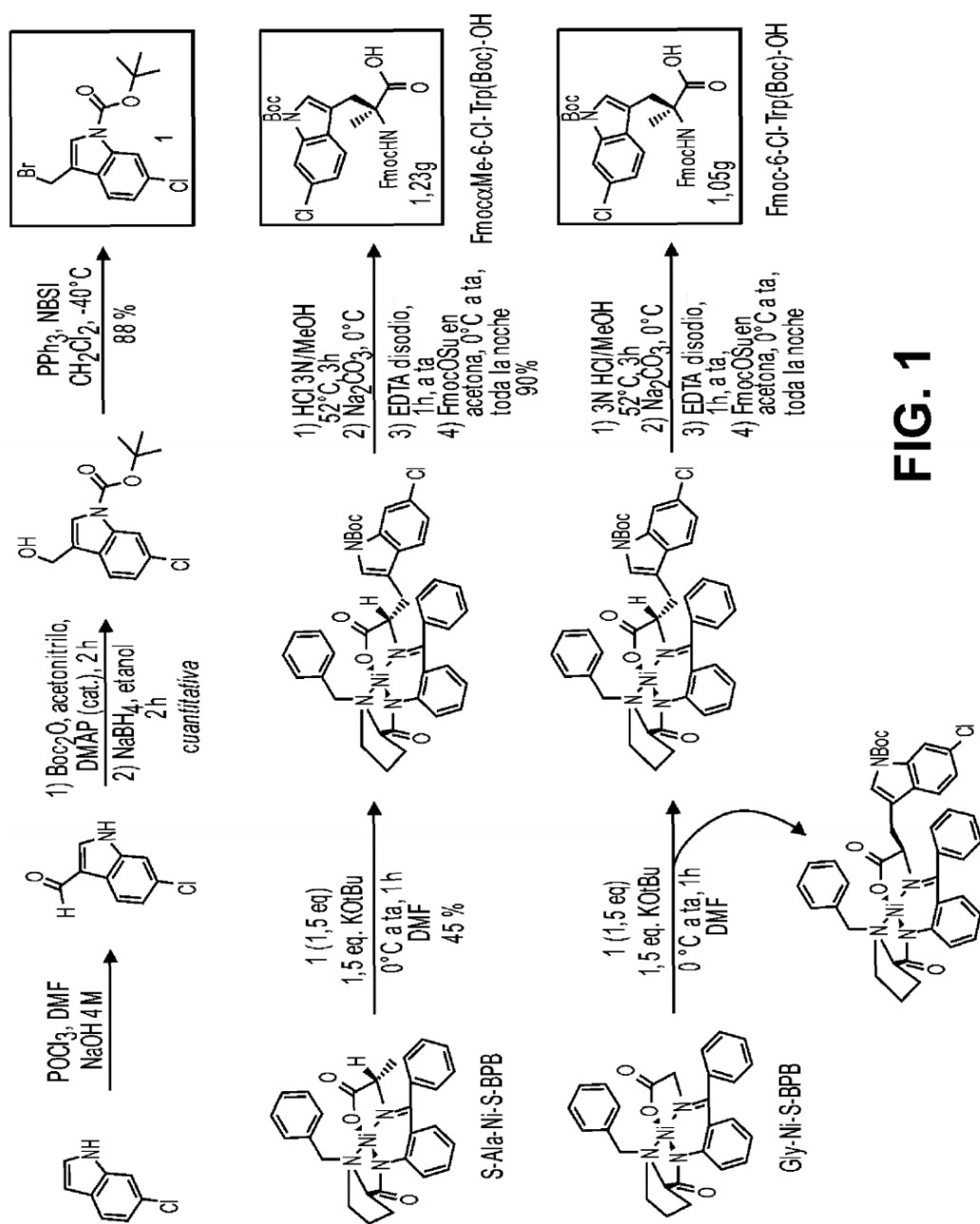
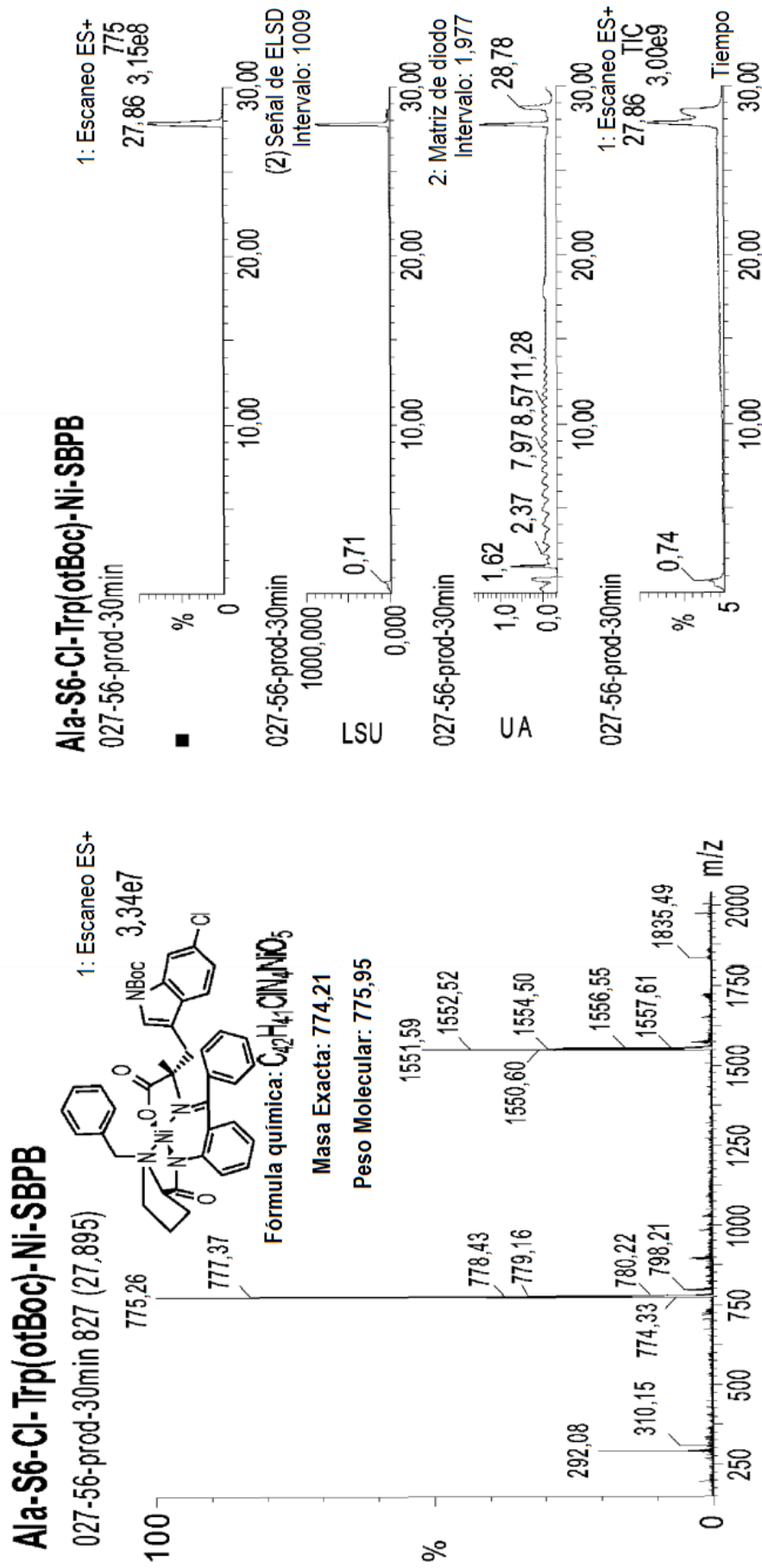
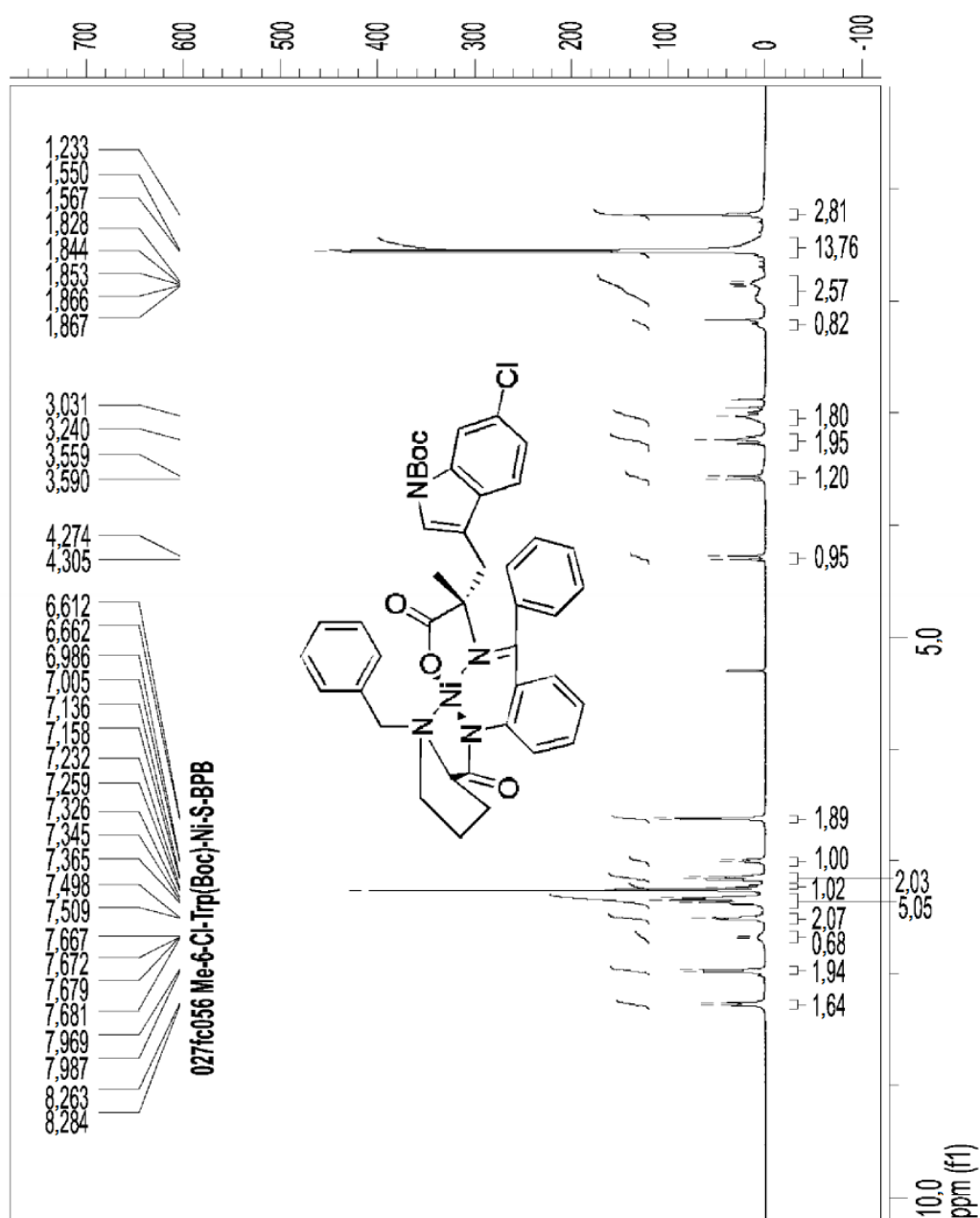


FIG. 1

FIG. 2





Fmoc-SMeTrp(6-Cl)(NtBoc)-OH
027-58-prod 115 (3,879)

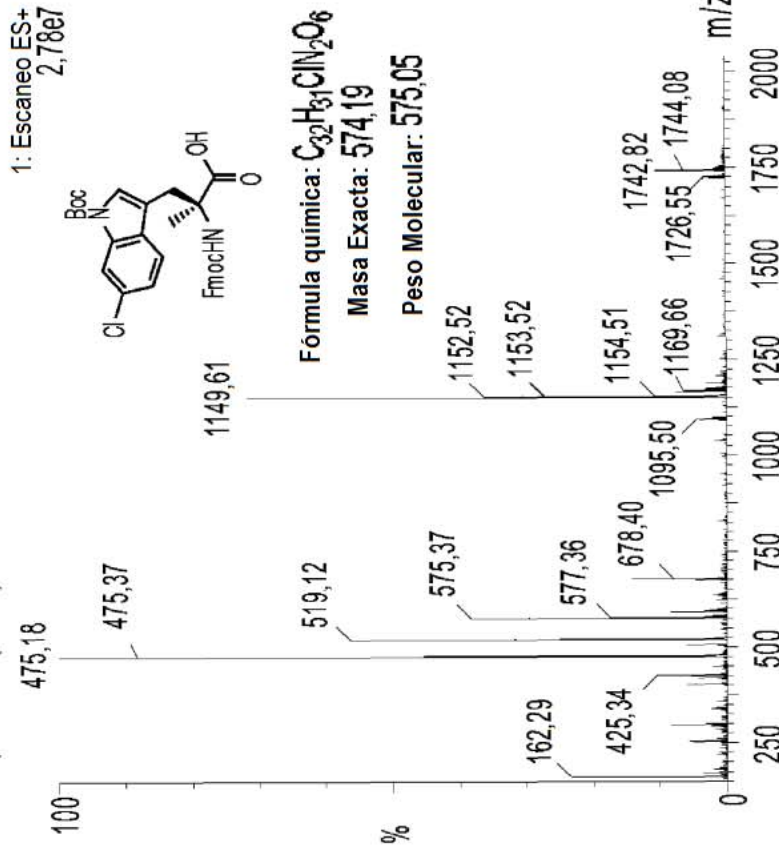


FIG. 5

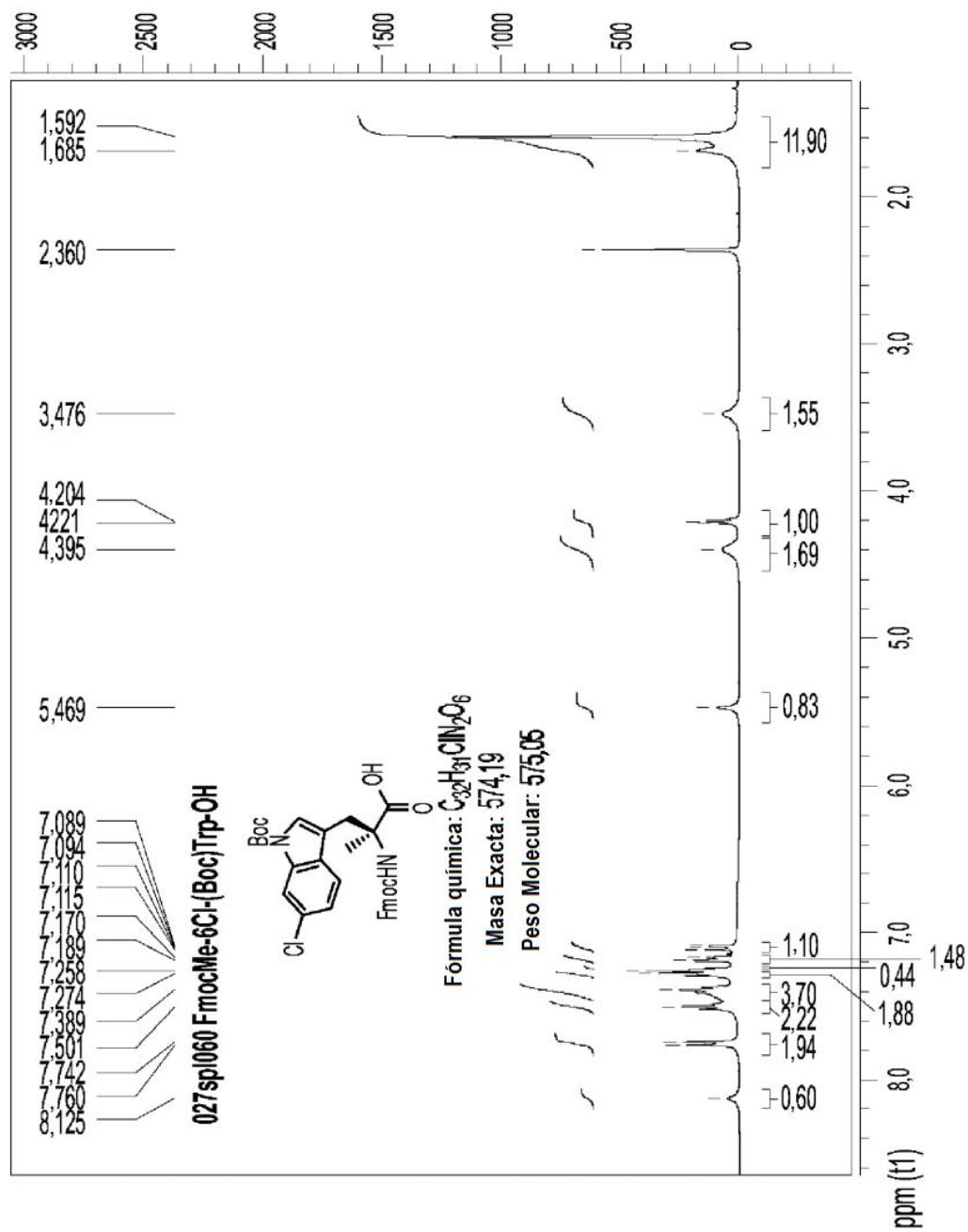


FIG. 6A

N.º de SP	PM	Secuencia	Viabilidad de células SJS-A-1 CE50 (µM) sin suero		ELISA de competición		Translocación nuclear de p53 (ensayo GRIP)	Selección por afinidad - EM		ELISA de activación de p21		CI50 de unión competitiva en FP (nM)		% de helicidad por DC	
			24h	72h	GST- hDM2	GST- hDMX		GST- hDM2	GST- hDMX	20µM	10µM	1µM	HDM2	HDMX	0% TFE
SP-1	2069,40	Ac-LSQETFS8DLWKL\$EN-NH2	>50												
SP-2	2067,43	Ac-LSQETFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
SP-3	2094,46	Ac-LSQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	17,6; 10,3		13,4										
SP-4	2081,42	Ac-QSQQTFS8NLWKL\$ON-NH2	36,8; 21,2												
			22,6; 16,5; 18,4; 18,4;	12,0	2,7; 5,4	67; 56	14,3								
			17,1; 17,9	>25	>1000	>1000	>50								
SP-5	2109,4	Ac-QSQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
SP-6	2033,33	Ac-QSQQTAS8NLWRL\$ON-NH2	19,9; 14,3; 10,3												
SP-7	2107,46	Ac-QAbbQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
SP-8	2001,21	Ac-QSQQTFSNLWRLPON-NH2	>50												
SP-9	2137,48	Ac-QSQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
SP-10	2066,40	Ac-QSQAbbTF8NLWRL\$ON-NH2	7,3		>1000	>1000	>50								
			11,4		26,6										
SP-11	2052,38	Ac-QSQQTFS8NLWRL\$AN-NH2	13,0		15,9;										
SP-12	2052,38	Ac-ASQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	10,0		17,4										
SP-13	2066,40	Ac-QSQQTFS8ALWRL\$ON-NH2	13,7												
SP-14	2110,41	Ac-QSQETFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
SP-15	2137,49	Ac-RSQQTFS8NLWRL\$ON-NH2	5,6		42,3;	199;	13,45								
SP-16	2138,47	Ac-RSQQTFS8NLWRL\$EN-NH2	10,3		13,5										
SP-17	1961,17	Ac-LSQETFSDLWKL\$EN-NH2	>50												
SP-18	2009,31	Ac-QSQQTFS\$NLWRLPON-NH2	>50												
SP-19	2037,28	Ac-QSQQSF\$NLWRLPON-NH2	>50												
SP-20	1918,16	Ac-QSQQT\$SNL\$RLPON-NH2	>50												
SP-21	2008,28	Ac-QSQQT\$NLW\$LLPON-NH2	>50												
SP-22	2311,64	Ac-RTQATFS8NQVAIDANIG\$TNAIDTR-NH2	35,2												
SP-23	2137,49	Ac-QSQQTFS8NLWRL\$RN-NH2	>50												
SP-24	2137,49	Ac-QSQRTFS8NLWRL\$ON-NH2	>50												
			</												

74,8	76,5	100
------	------	-----

5	34
55	98

62,3	94,6
------	------

FIG. 6B

N.º de SP	PM	Secuencia	Viabilidad de células SJS-A-1		ELISA de competición			Translocación nuclear de p53 (ensayo GRIP)			Selección por afinidad - EM			ELISA de activación de p21			CI50 de unión competitiva en FP (nM)			% de helicidad por DC		
			24h	72h	GST-	GST-	hDMX	GST-	GST-	hDMX	GST-	GST-	hDMX	20µM	10µM	1µM	hDM2	hDMX	0% TFE	50% TFE		
SP-25	2109,43	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2																				
SP-26	2109,43	Ac-QSQQTFS8NLWRRLSQ-NH2	14,8; 6,2; 11,8; 19,7				64			26,8				62,6	1,1	0,9						
SP-27	2109,43	Ac-QSQQTFS8NLWRRLSQ-NH2	14,8																			
SP-28	2125,43	Ac-QSQQTFS8NLWRRLSQ-NH2	>50																			
SP-29	2135,51	Ac-RAHQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	5,4; 9,1; 11,5; 19,5																			
SP-30	1599,83	Ac-MPRRMIDYEWGLN-NH2																				
SP-31	2192,57	Ac-RSQQRF88NLWRLLSQ-NH2	8,6																			
SP-32	2164,51	Ac-QSQQRF88NLWRLLSQ-NH2	15,5; 16,9																			
SP-33	2190,59	Ac-RAHQQRF88NLWRLLSQ-NH2	7,6																			
SP-34	2226,58	Ac-RSQQRF88NLWRLLSQ-NH2	5,2; 4,8																			
SP-35	2242,58	Ac-RSQQRF88NLWRLLSQ-NH2																				
SP-36	2109,43	Ac-RSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2																				
SP-37	2095,40	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	5,3; 5,7; 11,4																			
SP-38	2123,46	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	41,9																			
SP-39	1871,14	Ac-NlepRFS8DYEWGLSQ-NH2	9,1																			
SP-40	1953,33	Ac-NlepRFS8DYEWGLSQ-NH2	>50																			
SP-41	1578,94	Ac-RFS8NLWRLLSQ-NH2	5,2; 5,9																			
SP-42	2161,44	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	>50																			
SP-43	2161,44	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	14,5																			
SP-44	2081,38	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	18,3																			
SP-45	2061,39	Ac-RSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	14																			
SP-46	2111,45	Ac-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	32,85																			
SP-47	2062,33	Hep-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	6,8																			
SP-48	2160,56	Hep-QSQQTFS8NLWRLLSQ-NH2	>50																			

7,5 58,2

62,6 90,6

50,5 94,8

64,3, 85 88,5, 121

Figura 6c

Nº de SP	PMI	Secuencia	Vitalidad de células SLSA-1 CE90 [µM] en suero	ELISA de competición C8D (nM)	Translocación nuclear co pB3 (anayo GPRP)	Selección por afinidad - E _d Kd (nM) GST- GST+ HDM2 hDMX	ELISA de activación de p21 20 µM 10 µM 1 µM	CBD de unión competitiva en FP (nM)	HDM2 HDMx	% de helicidad por DC 0% TFE 50% TFE
SP-49	2143.87	Ac-QSQQTFSf6NLGcWRLLSQN-NH2	24h 15.94	GST- GST+	11.25	-	-	-	-	60.9 82.4
SP-50	2157.90	Ac-QSQQTFSf6NLMecchWRLLSQQN-NH2	>50	GST- GST+	>50	-	-	-	-	-0.5 61.6
SP-51	1536.68	Ac-LTFEYWAQLTS-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-52	1586.83	Ac-LTFSHYWSQSLTS-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-53	1521.75	Ac-LTFESFYWASLTS-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-54	1598.88	Ac-LTFSf6HWQAQLSzS-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-55	1683.99	Ac-LTFSf6HWYRQSLS-NH2	16.3	-	19.3	-	25.2 15.1	-	-	95.6 96.6
SP-56	2146.53	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLSgEQN-NH2	12.8	GST- GST+	>50	-	1 1	-	-	59.5 84.2
SP-57	1925.11	Ac-QSQQTASNLWRLLPQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	98.9 109 110 124
SP-58	2061.39	Ac-QSQQTAFSf6NLWRLLS/QIN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-59	2080.43	Ac-A3SQQTFSf6NLWRLLS/QIN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-60	2010.30	Ac-S\$SQQSFSNLWRLLaIQN-NH2	>50	-	383	-	-	-	-	-
SP-61	2024.32	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	35.76	-	-	-	-	-	-	-
SP-62	2025.27	Ac-QSQQSFSNSWRLLaIQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-63	1996.27	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-64	2012.27	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-65	1941.19	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaSN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-66	2038.35	Ac-\$SQQSFSf6NLWRLLaIQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-67	2052.38	Ac-QSSf6ITF\$6NLWRLLaIQN-NH2	16.57	-	-	-	-	-	-	-
SP-68	2053.32	Ac-QSQQSf6SNSWRLLaIQN-NH2	36.94	-	-	-	-	-	-	-
SP-69	2024.32	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	>50	-	-	-	-	-	-	-
SP-70	1997.30	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	36.08	-	-	-	-	-	-	-
SP-71	2025.35	Ac-QSQQTFSf6NLWRLLaIQN-NH2	30.36	-	-	-	-	-	-	-
SP-72	2202.64	Ac-OSSf6ITF\$6NLWRLLSf6EQN-NH2	5.1	>1000	10.68	-	-	-	-	99 108

FIG. 6D

N.º de SP	PM	Secuencia	Viabilidad de células SUSA-1 CE50 (µM) sin suero		ELISA de competición CI50 (nM)		Translocación nuclear de p53 (ensayo GRIP)	Selección por afinidad - EM Kd (nM)		ELISA de activación de p21			CI50 de unión competitiva en FP (nM)		% de helicidad por DC	
			24h	72h	GST- hDM2	GST- hDMX		GST- hDM2	GST- hDMX	20µM	10µM	1µM	HDM2	HDMx	0% TFE	50% TFE
SP-73	2039,38	Ac-Sr8SQQTFSrLWRLLaibQN-NH2	14,01	y 26,91												
SP-74	1997,30	Ac-QSQ8r8TFSNLWSrLaibQN-NH2	>50 (ambos)													
SP-75	2025,35	Ac-QSQQTFSr8LWRLLaSN-NH2	>50													
SP-76	2033,37	Ac-QSQr8QTFSNLWSrLaibQN-NH2	>50													
SP-77	2067,43	Ac-Sr8SQQTFSrLWRLLaibQN-NH2														
SP-78	2025,35	Ac-QSQ8r8TFSNLWSrLaibQN-NH2														
SP-79	2053,41	Ac-QSQQTFSr8LWRLLaSN-NH2														
SP-80	2089,48	Ac-QSQr8QTFSLNLWSrLaibQN-NH2														
SP-81	1989,19	Ac-QSQQTFSNLWRLLaibQN-NH2														
SP-82	2216,67	HepQSQ8r8TFSr8NLWRLLaSN-NH2														
SP-83	2052,38	Ac-ASQQTFSr8NLWRLLaSN-NH2														
SP-84	2023,38	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaSN-NH2														
SP-85	1995,33	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaSN-NH2	9,35													
SP-86	1516,79	Ac-AAARAASr8AAARAASr8AA-NH2														
SP-87	1607,76	Ac-LTFHYWAQLTSA-NH2														
SP-88	1693,96	Ac-LTF8HYWAQLSSA-NH2														
SP-89	1944,15	Ac-ASQQTFSNLWRLLaSN-NH2														
SP-90	2033,37	Ac-QSQQTFSNLWSrLaibQN-NH2														
SP-91	1987,22	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaibQN-NH2														
SP-92	2043,33	Ac-QSQQTFSNLWRLLaSN-NH2														
SP-93	2083,39	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaibQN-NH2														
SP-94	2111,45	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaSN-NH2														
SP-95	2041,31	Ac-QSQQTFSr8NLWRLLaSN-NH2														
SP-96	2069,37	Ac-QSQQTFSNLWRLLaSN-NH2														

77.8	95.7
131	143

80.8	81.8
------	------

0	58
---	----

77,8	95,7
131	143

80,8	81,8
------	------

12,1

>50
20,7

6,5

FIG. 6E

Nº de SP	PM	Secuencia	Viabilidad de células SJS-A-1 CE50 (µM) sin suero	72h	ELISA de competición CI50 (nM)	Translocación nuclear de p53 (ensayo GRIP)	Selección por afinidad - EM Kd (nM)	ELISA de activación de p21	CI50 de unión competitiva en FP (nM)	% de helicidad por DC
SP-97	2145,89	Ac-QSQQTFS8NL6GL6aWRNleL%QN-NH2	24h		GST- hDMX	GST- hDM2	hDMX	20µM	1µM	0% TFE
SP-98	2159,92	Ac-QSQQTFS8NL6GL6aWRNleL%QN-NH2								50% TFE
SP-101	1161,39	Ac-FNleSYMSYWEEL-NH2								62,4
SP-102	1345,53	Ac-FS8AYWEYWEELSA-NH2								71,1
SP-103	1344,64	Ac-FS8AYWEYWEELSA-NH2								
SP-104	1926,26	Ac-NlePRFS8NY8NYWELLSQN-NH2								
SP-105	1954,32	Ac-NlePRFS8DY8DYWRLLSQN-NH2								
SP-106	1839,23	Ac-NlePRFS8NY8NYWRLLSQ-NH2								
SP-107	1711,10	Ac-NlePRFS8NY8NYWRLLS-NH2								
SP-108	2110,41	Ac-QSQQTFS8DL8DLWRLLSQN-NH2								
SP-109	2110,41	Ac-QSQQTFS8NL8NLWRLLSEN-NH2								
SP-110	2110,41	Ac-QSQQTFS8NL8NLWRLLSQD-NH2								
SP-111	1954,27	Ac-QSQQTFS8NL8NLWRLLSS-NH2								
SP-112	2110,41	Ac-QSQQTFS8NL8NLWRLLSQN-NH2								
SP-113	1637,02	Ac-LTFS8NL8NLWRLLWRNleL%QN-NH2								
SP-114	1692,10	Ac-LRFS8NL8NLWRLLWRNleL%QN-NH2								
SP-115	2182,48	Ac-QSQQTFS8NW8NWWRNleL%QN-NH2								
SP-116	1995,33	Ac-QSQQTFS8NL8NLWRNleL%QN-NH2								
SP-117	1768,09	Ac-QTFS8NL8NLWRNleL%QN-NH2								
SP-118	1976,37	Ac-NlePRFS8NW8NWWRLLSQN-NH2								
SP-119	1805,22	Ac-NlePRFS8NW8NWWRLLSA-NH2								
SP-120	1468,61	Ac-TS8EYWEYWNLLSP-NH2								
SP-121	1652,89	Ac-QTFS8HW8HWWSQLS-NH2								
SP-122	1179,43	Ac-FMSYMSYWEEL-NH2								
SP-123	1602,75	Ac-QTFEHW8HWWSQLS-NH2								
										6,8
										21,6
										88,2
										21,6
										87,6

4,1

Figura 6f

N.º de SP	PM	Secuencia	Viabilidad de células SISA-1 CE90 (µM) sin suero		ELISA de competición C150 (nM)			Translocación nuclear de p53 (ensayo GRIP)			Selección por afinidad 2 EM (nM)			ELISA de activación de p21			C150 de unión competitiva en FP (nM)		% de helicidad por DC	
			24h	72h	GST-	GST-	hDMX				GST-	GST-	hDMX	20 µM	10 µM	1 µM	HDM2	HDMX	0% TFE	50% TFE
SP-124	2123.46	Ac-QSQQTf8r8NLAmlwRLNle\$QN-NH2																	-3,6	16,3
SP-125	1131.73	Ac-FMAIbY6ciWEAc3cl-NH2																	4,6 y 2,3	58,1
SP-126	1195.84	Ac-FNle\$Y6ciWESL-NH2																		
SP-127	1278.92	Ac-Fszr8AY6ciWEAc3cl.s2-NH2																		
SP-128	1350.00	Ac-F\$8AY6ciWEAc3cl.sA-NH2																		
SP-129	1987.78	Ac-NlePRF\$8NY6ciWRLl\$QN-NH2																		
SP-130	1224.49	Ac-AF\$8AAWALA\$A-NH2																		
SP-131	1386.68	Ac-TF\$8AAWRLASQ-NH2																		
SP-132	1410.70	Pc-TF\$8AAWRLASQ-NH2																		
SP-133	2111.45	Ac-QSQQTf8r8NLAmlwRLNle\$QN-NH2																		
SP-134	1671.98	Ac-LTF8r8HYWAQL\$SA-NH2																	84,7	110,8
SP-135	1955.35	Ac-NlePRF8r8NYWRLl\$QN-NH2																	78,4	82
SP-136	1989.80	Ac-NlePRF8r8NYWRLl\$QN-NH2	2,6																61,6	84,8
SP-137	1635.34	Ac-LTF8r8HYWAQL\$S-NH2	2																69,5	78,6
SP-138	2150.56	Ac-QSQQTf8r8NLAmlwRLl\$QN-NH2																	96	101,3
SP-139	1720.45	Ac-LTF8r8HYWAQL\$S-NH2																	74,2	84,2
SP-140	2145.89	Ac-QSQQTf8r8NLAmlwRLl\$QN-NH2																	92,4	120,8
SP-141	2041.40	Ac-%8SQQTf8r8NLAmlwRLl\$QN-NH2																	68,7	106,6
SP-142	1600.90	Ac-LTF8r8HYWAQL\$S-NH2	0,65																45,2	44,7
SP-143	1603.90	Ac-TSF8r8QYWNLL\$P-NH2																	2,6	26,5

2

[illegible]

Figura 7B

Activación de caspasa en relación con DMSO en FBS al 10 % a las 48 h																									Variabilidad celular (FBS al 10 %) CE50 (µM)					% de helicidad a 222 NM frente a la sec. parent		
N° de SP	SECUENCIA															MCF-7 97500 células/pocillo 5 días					SW-480 26pocillo, Gd		RKO-ES (72h)		0% TFE	50% TFE						
	Ac-	Q	S	Q	Q	T	F	\$r8	N	L	W	R	L	L	\$	Q	\$	A	-NH2	30µM	10µM	3µM	1µM	RKO (72h)			5k HCT-116pocillo (72h)	CE50	SW-480 26pocillo, Gd	RKO-ES (72h)		
Nutlin 3a																								6,7±2,5	8,9±4,9	5±1,9	>30	>30				
SP-5						Ac-	F	\$r8	A	Y	6cIW	E	Ac3	L	\$	A	-NH2			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	74%	100%		
SP-128																				29,6	9,1	2,0	1,0	20,8±10,5	>30	10,7±0,4	>30	>30	10%	188%		
SP-142						Ac-	L	\$r8	H	Y	W	A	Q	L	%	S	-NH2			30,0	2,0	1,7	1,0	12,6±1,6	24,1±4,3	ND	26,7	>30	94%	94%		
SP-190						Ac-	L	\$r8	A	Y	W	A	Q	L	\$e	S	-NH2			34,5	5,1	1,8	1,0	10,6±3,8	11,1±2,4	6,4±1,2	>30	>30	4%	151%		
SP-193						Ac-	L	\$r8	A	Y	W	A	Q	L	\$e	A	-NH2			32,6	5,8	2,2	1,0	ND	11,2±8,5	4±0,4	>30	>30	5%	143%		
SP-343						Ac-	L	\$r8	H	Y	W	A	Q	L	\$e	A	-NH2			38,8	5,3	1,6	1,0	15,3±5,1	11,3±3,7	10,2±1,6	>30	>30	140%	140%		
SP-266						Ac-	L	\$r8	V	Y	W	A	Q	L	\$	S	-NH2			30±0	12±11	1±0	1,0	16±2	7,5±0,85	ND	19,2±2,7	>30	2%	142%		
SP-267						Ac-	L	\$r8	F	Y	W	A	Q	L	\$	S	-NH2			29±4	15±8	1±0	1,0	9,5±2,5	5,5±0,5	ND	17,5±7,8	>29µM	1%	120%		
SP-360						Ac-	L	\$r8	A	Y	W	S	Q	L	\$	S	-NH2			30±4	11±8	2±1	1,0	5,5±0,7	6,6	ND	>30	>30	8%	119%		
SP-512						Ac-	L	\$r8	E	Y	W	A	Q	L	\$	S	-NH2			24±6	11±2	3±0	1,0	>30	ND	ND	>30	>30	2%	131%		
SP-508						Ac-	E	\$r8	A	Y	W	A	Q	L	\$	A	-NH2			19±6	8±4	4±2	1,0	>30	>30	ND	>30	>30	8%	126%		
SP-522						Ac-	F	\$r8	A	Y	6cIW	E	A	L	\$	A	-NH2			27±1,7	17±2,2	5±1	1,0	>30	27,1±5,1	ND	>30	>30	5%	127%		
SP-580					mip EG3-	L	T	\$r8	A	Y	W	A	Q	L	\$	S	-NH2			16±2,4	8±0,1	11±0,5	1,0	11,7±1	13±5,9	ND	>30	>30	5%	134%		
SP-523						Ac-	F	\$r8	A	Y	d6br W	E	A	L	\$	A	-NH2			19±1	4±0,5	1±0,1	1,0	>30	26,3±1,7	ND	>30	>30	ND	ND		
SP-573						Ac-	F	\$r8	A	Y	6cIW	E	A	L	\$	A	-NH2			23±1,2	16±1,8	6±2	1,0	25±8,6	>30	ND	>30	>30	ND	ND		
SP-256				Ac-	W	T	F	\$r8	H	Y	W	A	Q	L	\$	S	-NH2			36±2	4±5	1±0	1,0	22,5µM±7,7	15,8µM±8,2	ND	26,4µM±4,8	>30	ND	ND		
SP-351				Ac-	L	T	F	\$r8	A	Y	W	A	A	L	\$	S	-NH2			31	29	15±5,5	2	1,73	1,11	ND	4,46	9,07	ND	ND		
SP-641						Ac-	F	\$r8	A	Y	6cIW	Q	A	L	\$	A	-NH2			20	13	6±1,8	1	25,49	28,25±12,52	ND	>30	>30	ND	ND		

FIG. 7C

FIG. 7C

N.º de SP	SECUENCIA														Ensayo de unión competitiva en FP				Viabilidad de células SJAS-1 a 72 h (FBS a 10%) CE50 (uM)		Niveles de p21 a las 21 h (FBS al 10 %) (pg/ml)				
	SP-684	SP-681	SP-686	SP-688	SP-671	SP-485	SP-604	SP-685	SP-698	SP-586	SP-585	SP-623	SP-673	SP-714	SP-352	SP-709	SP-643	SP-566	SP-696	CE50 de AVE (uM)	DT	30uM	10uM	3uM	1uM
	Ac-L	Ac-L	Ac-F	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	Ac-L	2.7	0.00	1687	563	51	25
	T	T	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	2.8	0.14	1983	368 ± 290	57	76
	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	Sr8	3.6	0.63	1798	196	0	DLD
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	3.6	2.26	1282	398	6	DLD
	H	H	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	3.7	0.69	1398	372	86	11
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	3.9	0.50	1604	1125	208	88
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	3.9	0.97	2183	254	-6	BDLE
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	4.0	2.68	1442	225	12	18
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	4.4	0.90	1574	530	88	42
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4.7	1.53	2259	516	0	DLD
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	5.0	1.63	2112	739 ± 305	32	51
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5.1	1.23	2343	1701 ± 667	41	0
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	6.5	0.59	1693	606	80	0
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5.5	1.44	2064 ± 24	1284 ± 155	249 ± 46	15 ± 21
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	5.8	2.58	1535 ± 143	1028 ± 439	56 ± 37	0 ± 0
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5.8	3.05	1574 ± 47	787 ± 149	278 ± 27	56 ± 37
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	6.0	0.20	2137 ± 287	1343 ± 303	51 ± 44	6 ± 8
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6.1	1.35	2243 ± 84	1111 ± 29	24 ± 3	4 ± 6
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	6.2	0.45	2177 ± 162	247 ± 365	0 ± 0	0 ± 0

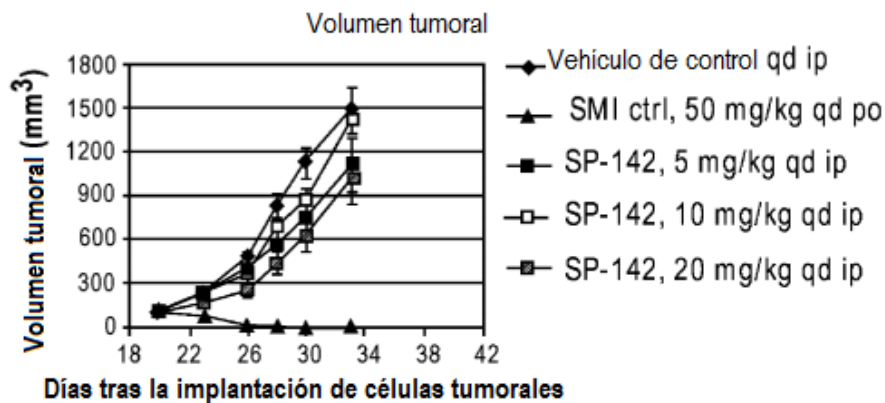
FIG. 7D

FIG. 7D

N.º de SP	SECUENCIA																Activación de caspasa en relación con DMSO en FBS al 10 % en 48 h				Viabilidad celular (FBS al 10 % CE50 (uM)				% de helicidad a 222 nM frente a sec parent																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

FIG. 8A

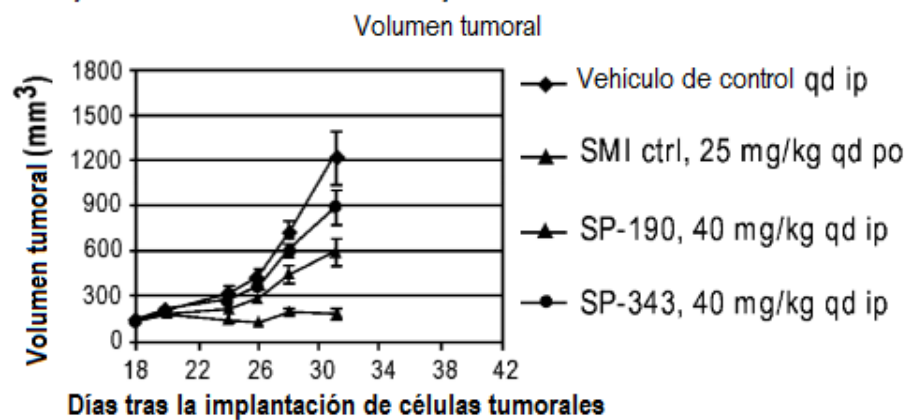
SP-142 en el modelo de xenoinjerto de SJSA-1 en ratones desnudos:



N.º de grupo	Tratamiento	Cantidad/dosis (mg/kg)	Pauta	VDA	TGI (%) tras 13 días de dosis
1	Vehículo de control	-	qd	ip	-
2	Control de inhibidor de molécula pequeña	50	qd	po	> 100%
3	SP-142	5	qd	ip	27%
4	SP-142	10	qd	ip	4.5%
5	SP-142	20	qd	ip	34%

FIG. 8B

SP-190 y SP343 en el modelo de xenoinjerto de SJSA-1 en ratones desnudos:



N.º de grupo	Tratamiento	Cantidad/dosis (mg/kg)	Pauta	VDA	TGI (%) tras 13 días de dosis
1	Vehículo de control	-	qd	ip	-
2	Control de inhibidor de molécula pequeña	25	qd	po	97%
3	SP-190	40	qd	ip	58%
4	SP-343	40	qd	ip	30%