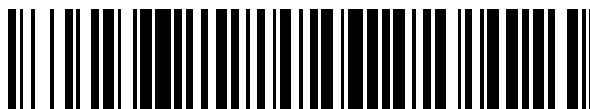


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 135**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015** **PCT/US2015/066272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100608**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015** **E 15820775 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 3233887**

54 Título: **Inmunomoduladores**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094281 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

SUN, LI-QIANG;
ZHAO, QIAN;
GILLIS, ERIC P.;
MILLER, MICHAEL MATTHEW;
ALLEN, MARTIN PATRICK;
MULL, ERIC y
SCOLA, PAUL MICHAEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 719 135 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

Inmunomoduladores

- 5 La presente divulgación proporciona nuevos péptidos macrocíclicos que inhiben la interacción proteína/proteína, PD-1/PD-L1 y CD80/PD-L1 y, por tanto, son útiles para la mejora de varias enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades infecciosas.

10 La proteína de la muerte programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. El PD-1 se expresa en células B activadas, linfocitos T y células mieloides (Agata et al., citado anteriormente; Okazaki et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 14:779-782 (2002); Bennett et al., *J. Immunol.*, 170:711-718 (2003)).

15 La proteína PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia del gen de Ig (Agata et al., *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)). PD-1 contiene un motivo inhibidor de la inmunorreceptor de tirosina proximal de la membrana (ITIM) y un motivo de conmutación basado en la tirosina distal de la membrana (ITSM) (Thomas, M.L., *J. Exp. Med.*, 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., *Immunol. En la actualidad*, 18:286-291 (1997)). Aunque estructuralmente similar a CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPPY que es crítico para la unión de CD80, CD86 (B7-2). Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (b7-DC). Se ha demostrado que
20 activación de linfocitos T que expresan PD-1 está regulada por disminución tras la interacción que expresan PD-L1 o PD-L2 (Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192:1027-1034 (2000); Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2:261-268 (2001); Carter et al., *Eur. J. Immunol.*, 32:634-643 (2002)). Tanto PD-L1 como PD-L2 son miembros de la familia de la proteína B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28. El ligando PD-L1 es abundante en diversos cánceres humanos (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). La interacción entre PD-1 y
25 PD-L1 da como resultado una disminución de linfocitos infiltrantes de tumores, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmune por las células cancerosas (Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004)). La supresión inmunitaria puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también se bloquea (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003)).
30

También se ha demostrado que PD-L1 interacciona con CD80 (Butte MJ et al, *Immunity*;27:111-122 (2007)). Se ha demostrado que la interacción de PD-L1/CD80 sobre la expresión de las células inmunitarias es inhibitoria. Se ha demostrado que el bloqueo de esta interacción anula esta interacción inhibitoria (Paterson AM, et al., *J Immunol.*,
35 187:1097-1105 (2011); Yang J, et al. *J Immunol* Aug 1; 187(3): 1113-9 (2011)).

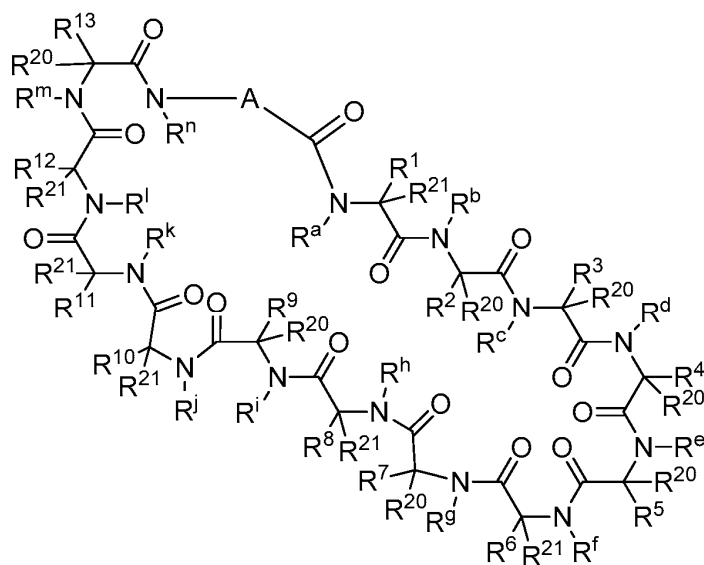
Cuando los linfocitos T que expresan PD-1, entran en contacto con células que expresan sus ligandos, se reducen las actividades funcionales en respuesta a estímulos antigénicos, incluyendo la proliferación, la secreción de citocinas y la citotoxicidad. Las interacciones de PD-1/ PD-L1 PD-L2 regulan a la baja las respuestas inmunitarias durante la resolución de una infección o tumor, o durante el desarrollo de la autotolerancia (Keir, M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26:Epub (2008)). La estimulación antigénica crónica, tal como la que se produce durante la enfermedad tumoral o infecciones crónicas, da como resultado linfocitos T que expresan niveles elevados de PD-1 y son disfuncionales con respecto a la actividad hacia el antígeno crónico (revisado en Kim et al., *Curr. Opin. Imm.* (2010)). Esto se denomina "agotamiento de linfocitos T". Los linfocitos B también muestran la supresión y el
45 "agotamiento" de PD-1/PD-ligando.

Se ha demostrado que el bloqueo del ligamiento PD-1/PD-L1 usando anticuerpos contra PD-L1 restaura y aumenta la activación de linfocitos T en muchos sistemas. Los pacientes con cáncer avanzado se benefician de la terapia con un anticuerpo monoclonal contra PD-L1 (Brahmer et al., *New Engl. J. Med.* (2012)). Modelos animales preclínicos de tumores e infecciones crónicas han demostrado que el bloqueo de la ruta PD-1/PD-L1 mediante anticuerpos monoclonales puede mejorar la respuesta inmunitaria y dar como resultado el rechazo del tumor o el control de la infección. La inmunoterapia antitumoral a través del bloqueo de PD-1/PD-L1 puede aumentar la respuesta inmune terapéutica a una serie de tumores histológicamente distintos (Dong, H. et al., "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity", *J. Mol. Med.*, 81 (5):281 -287 (2003); Dong, H. et al., "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion", *Nat. Med.*, 8(8):793-800 (2002)).
50
55

La interferencia con la interacción PD-1/PD-L1 produce un aumento de la actividad de los linfocitos T en sistemas con infección crónica. El bloqueo de PD-L1 produjo una mejora del aclaramiento vial y restauró la inmunidad en ratones con infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (Barber, D.L. et al., "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature*, 439(7077):682-687 (2006)). Los ratones humanizados infectados con VIH-1 muestran una protección mejorada contra la viremia y el agotamiento vírico de linfocitos T de CD4+ (Palmer et al, *J. Immunol.* (2013)). El bloqueo de PD-1/PD-L1 a través de anticuerpos monoclonales contra PD-L1 puede restaurar la funcionalidad específica de antígeno *in vitro* contra linfocitos T de pacientes con VIH (Day, *Nature* (2006); Petrovas, *J. Exp. Med.* (2006); Trautman, *Nature Med.* (2006); D'Souza, *J. Immunol.* (2007); Zhang, *Blood* (2007); Kaufmann, *Nature Imm.* (2007); Kasu, *J. Immunol.* (2010); Porichis, *Blood* (2011)), pacientes con VHC (Golden-Mason, *J. Virol.* (2007); Jeung, *J. Leuk. Biol.* (2007); Urbani, *J. Hepatol.* (2008); Nakamoto, *PLoS Path.*
60
65

(2009); Nakamoto, *Gastroenterology* (2008)) y pacientes con VHB (Boni, *J. Virol.* (2007); Fisicaro, *Gastro.* (2010); Fisicaro et al., *Gastroenterology* (2012); Boni et al., *Gastro.* (2012); Penna et al., *J. Hep.* (2012); Raziorrough, *Hepatology* (2009); Liang, *World J Gastro.* (2010); Zhang, *Gastro.* (2008)).

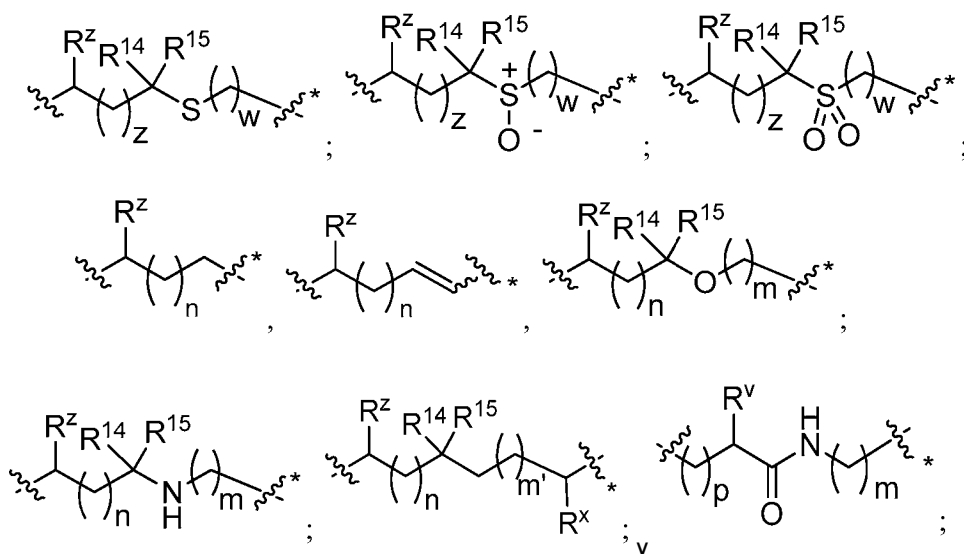
- 5 También se ha demostrado que el bloqueo de la interacción PD-L1/CD80 estimula la inmunidad (Yang J., et al., *J Immunol.* agosto de 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Se ha demostrado que la inmunoestimulación resultante del bloqueo de la interacción PD-L1/CD80 se potencia a través del bloqueo combinado de otras interacciones PD-1/PD-L1 o PD-1/PD-L2.
- 10 Se ha hipotetizado que las alteraciones en los fenotipos de las células inmunitarias son un factor importante en el choque séptico (Hotchkiss, et al., *Nat Rev Immunol* (2013)). Estos incluyen niveles incrementados de PD-1 y PD-L1 (Guignant, et al, *Crit. Care* (2011)), Las células de pacientes con choque séptico con niveles elevados de PD-1 y PD-L1 exhiben un nivel mayor de apoptosis de células T. Los anticuerpos dirigidos a PD-L1, pueden reducir el nivel de apoptosis de células inmunes (Zhang et al, *Crit. Care* (2011)). Asimismo, los ratones que carecen de expresión de PD-1 son más resistentes a los síntomas del choque séptico que los ratones salvajes. Yang J., et al. *J Immunol.* agosto de 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Los estudios han revelado que el bloqueo de las interacciones de los anticuerpos que usan PD-L1 puede suprimir las respuestas inmunitarias inapropiadas y mejorar los signos de la enfermedad.
- 15 Además de mejorar las respuestas inmunológicas a los antígenos crónicos, también se ha demostrado que el bloqueo de la ruta PD-1/PD-L1 mejora las respuestas a la vacunación, incluyendo la vacunación terapéutica en el contexto de la infección crónica (Ha, S.J. et al., "Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection", *J. Exp. Med.*, 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C. et al., "PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination", *J. Immunol.*, 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y. et al, "Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1", *J. Immunother.*, 34(3):297-306 (2011)).
- 20 El documento WO 2014/151634 desvela inhibidores macrocíclicos de la interacción proteína/proteína PD-1/PD-L1 y CD80/PD-L1 que pueden usarse contra el cáncer y las enfermedades infecciosas.
- 25 Las moléculas descritas en el presente documento demuestran la capacidad de bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1, en sistemas experimentales tanto bioquímicos como basados en células. Estos resultados son consistentes con un potencial para la administración terapéutica para mejorar la inmunidad en el cáncer o infección crónica, incluyendo la vacuna terapéutica.
- 30 Los péptidos macrocíclicos descritos en el presente documento son capaces de inhibir la interacción de PD-L1 con PD-1 y con CD80. Estos compuestos han demostrado una unión altamente eficaz a PD-L1, el bloqueo de la interacción de PD-L1 con PD-1 o CD80, y son capaces de promover una actividad funcional de células T mejorada, haciéndolos así candidatos para formulaciones parenteral, oral, pulmonar, nasal, bucal y de liberación sostenida.
- 35 En la presente divulgación se desvela un compuesto de fórmula (I)



(I),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A se selecciona entre un enlace,



en la que:

$\sim^*$ representa el punto de unión al grupo carbonilo y $\sim$ representa el punto de unión al átomo de nitrógeno;

z es 0, 1 o 2;

w es 1 o 2;

n es 0 o 1;

m es 1 o 2;

m' es 0 o 1;

p es 0, 1 o 2;

R^X se selecciona entre hidrógeno, amino, hidroxilo y metilo;

R^{14} y R^{15} se seleccionan independientemente entre hidrógeno y metilo; y

R^Z se selecciona entre hidrógeno y $-C(O)NHR^{16}$; en donde R^{16} se selecciona entre hidrógeno, $-CHR^{17}C(O)NH_2$, $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ y $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$; en los que R^{17} se selecciona entre hidrógeno y $-CH_2OH$ y en los que R^{18} se selecciona entre hidrógeno y metilo;

R^V es hidrógeno o una cadena lateral de aminoácidos naturales;

R^C , F^r , R^h , R^i y R^m son hidrógeno;

R^n es hidrógeno o metilo o R^v y R^n forman un anillo de pirrolidina;

R^a , R^e , R^j y R^k se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno y metilo;

cada R^{20} se selecciona independientemente entre hidrógeno y $-C_1$ -Alquilo;

cada R^{21} se selecciona independientemente entre hidrógeno y $-C_1$ -Alquilo;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural o cada uno puede formar independientemente un anillo carbocíclico de tres a seis miembros que contiene un átomo de oxígeno o nitrógeno con un correspondiente grupo R^{20} geminal, en la que el heterociclilo también está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre alcoxi C_1 - C_3 , alquilo C_1 - C_3 , alqueno C_2 - C_4 , halo, hidroxilo y amino, y en el que el anillo de cinco y seis miembros se fusiona opcionalmente con un anillo de fenilo; o

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} pueden cada una formar independientemente un anillo con el correspondiente grupo R vecino como se describe a continuación;

R^e y R^k pueden formar un anillo con el grupo R vecino correspondiente y los átomos a los que están unidos, seleccionados entre azetidina, pirrolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en la que cada anillo está opcionalmente sustituido con de uno o cuatro grupos seleccionados independientemente entre amino, ciano, metilo, halo e hidroxilo;

R^b es metilo o, R^b y R^2 , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado entre azetidina, pirrolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en la que cada anillo está opcionalmente sustituido con de uno o cuatro grupos seleccionados independientemente entre amino, ciano, metilo, halo e

hidroxi; o, cuando R^2 y el R^{20} germinal son ambos distintos de hidrógeno, R^b es hidrógeno;

R^L es hidrógeno o metilo o R^d y R^4 , junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado entre azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en la que cada anillo está opcionalmente sustituido con de uno o cuatro grupos seleccionados independientemente entre amino, ciano,

metilo, halo, hidroxi y fenilo;
 R^9 es hidrógeno o metilo o R^9 y R^7 , junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo seleccionado entre azetidina, pirolidina, morfolina, piperidina, piperazina y tetrahidrotiazol; en la que cada anillo está opcionalmente sustituido con de uno o cuatro grupos seleccionados independientemente entre amino, bencilo opcionalmente sustituido con un grupo halo, benciloxi, ciano, ciclohexilo, metilo, halo, hidroxi, isoquinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo metoxi, quinoliniloxi opcionalmente sustituido con un grupo halo y tetrazolilo; y en el que la pirrolidina y el anillo de piperidina se fusionan opcionalmente a un grupo ciclohexilo, fenilo o indol; y

R^1 es metilo, o R^1 y R^{12} , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo seleccionado entre azetidina y pirolidina, en el que cada anillo está opcionalmente sustituido con de uno a cuatro grupos seleccionados independientemente entre amino, ciano, metilo, halo e hidroxi; siempre que el compuesto de fórmula (I) contenga al menos un carbono en el esqueleto del anillo que tiene cuatro sustituyentes distintos del hidrógeno y no es un anillo alfa-metil sustituido.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto seleccionado de: El Ejemplo 1001, El Ejemplo 5001, El Ejemplo 9001, El Ejemplo 9002, El Ejemplo 9003, El Ejemplo 9004, El Ejemplo 9005, El Ejemplo 9006, El Ejemplo 9007, El Ejemplo 9008, El Ejemplo 9009, El Ejemplo 9011, El Ejemplo 9012, El Ejemplo 9013, El Ejemplo 9014, El Ejemplo 9015, El Ejemplo 9016, El Ejemplo 9017, El Ejemplo 9018, El Ejemplo 10001, El Ejemplo 10002, El Ejemplo 10003, El Ejemplo 10004, El Ejemplo 10005, El Ejemplo 10006, El Ejemplo 10007, El Ejemplo 10008, Ejemplo 10009 y Ejemplo 10010; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

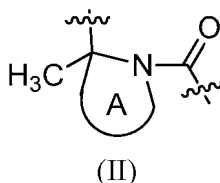
En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la invención o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para usar para potenciar, estimular y/o aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite. En otra realización, la invención comprende además administrar un agente adicional antes de, después, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el agente adicional es un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente citotóxico y/o un modificador de la respuesta inmunitaria. En otra realización, el agente adicional es un inhibidor de HDAC. En otra realización, el agente adicional es un agonista de TLR7 y/o TLR8.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la invención o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para usar para inhibir el crecimiento, proliferación o metástasis de células cancerosas en un sujeto que lo necesita. Debe entenderse que dicha inhibición puede ser directa o indirecta. En otra realización, el cáncer se selecciona entre melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no microcítico escamoso (CPNM), CPNM no escamoso, cáncer colorrectal, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de páncreas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas de Esófago, del tracto gastrointestinal y de mama, y neoplasia maligna hematológica.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la invención o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesite. En otra realización, la enfermedad infecciosa está causada por un virus. En otra realización, el compuesto se selecciona entre los virus VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, del herpes y de la gripe.

En otra realización, la presente invención proporciona uno o más compuestos de péptidos macrocíclicos de acuerdo con la invención o una sal terapéuticamente aceptable para uso en el tratamiento del choque séptico en un sujeto que lo necesite. También se describen uno o más compuestos péptidos macrocíclicos de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para su uso en el bloqueo de la interacción de PD-L1 con PD-1 y/o CD80 en un sujeto.

En compuestos de fórmula (I) en los que las cadenas laterales R son parte de un anillo que está sustituido con metilo, se entiende que el grupo metilo puede estar en cualquier átomo de carbono sustituible en el anillo, Incluyendo el carbono que forma parte de la estructura parental macrocíclica. En los compuestos de la presente divulgación, hay al menos un carbono en el esqueleto del anillo que tiene cuatro sustituyentes distintos del hidrógeno y no es un anillo alfa-metil sustituido de fórmula (II)



en la que A es un anillo como se describe en las reivindicaciones y en la que  indica los puntos de unión al resto de la estructura macrocíclica.

5 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R¹ preferentes son: fenilalanina, tirosina, 3-tien-2-ilo, 4-metilfenilalanina, 4-clorofenilalanina, 3-metoxifenilalanina, isotriptófano, 3-metilfenilalanina, 1-naftilalanina, 3,4-difluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina, 3,4-dimetoxifenilalanina, 3,4-diclorofenilalanina, 4-difluorometilfenilalanina, 2-metilfenilalanina, 2-naftilalanina, triptófano, 4-piridinilo, 4-bromofenilalanina, 3-piridinilo, 4-trifluorometilfenilalanina, 4-carboxifenilalanina, 4-metoxifenilalanina, bifenilalanina y 3-clorofenilalanina; y 2,4-diaminobutano.

10 En los compuestos de fórmula (I) en los que R² no es parte de un anillo, las cadenas laterales R² preferentes son: alanina, serina y glicina.

15 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R³ preferentes son: asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, serina, ornitina, lisina, histidina, treonina, leucina, alanina, 2,3-diaminopropano y 2,4-diaminobutano.

En los compuestos de fórmula (I) en los que R⁴ no es parte de un anillo, las cadenas laterales R⁴ preferentes son: valina, alanina, isoleucina y glicina.

20 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R⁵ preferentes son: aminometano, histidina, asparagina, 2,3-diaminopropano, serina, glicina, 2,4-diaminobutano, treonina, alanina, lisina, ácido aspártico, alanina y 3-tiazolilalanina.

25 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R⁶ preferentes son: leucina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, serina, lisina, 3-ciclohexano, treonina, ornitina, 2,4-diaminobutano, alanina, arginina y ornitina (COCH₃).

30 En los compuestos de fórmula (I) en los que R⁷ no es parte de un anillo, las cadenas laterales R⁷ preferentes son: glicina, 2,4-diaminobutano, serina, lisina, arginina, ornitina, histidina, asparagina, glutamina, alanina y 2,4-diaminobutano (C (O) ciclobutano).

En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R⁸ preferidas son triptófano y 1,2-bencisotiazolinilalanina.

35 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R⁹ preferidas son: serina, histidina, lisina, ornitina, 2,4-dibutilamina, treonina, lisina, glicina, ácido glutámico, valina, 2,3-diaminopropano, arginina, ácido aspártico y tirosina.

En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R¹⁰ preferidas son: triptófano opcionalmente sustituido, bencisotiazolilalanina, 1-naftilalanina y metionina.

40 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R¹¹ preferidas son: norleucina, leucina, asparagina, fenilalanina, metionina, etoximetano, alanina, triptófano, isoleucina, fenilpropano, ácido glutámico, hexano y heptano.

45 En los compuestos de fórmula (I) en los que R¹² no es parte de un anillo, las cadenas laterales R¹² preferentes son: norleucina, alanina, etoximetano, metionina, serina, fenilalanina, metoxietano, leucina, triptófano, isoleucina, ácido glutámico, hexano, heptano y glicina.

50 En los compuestos de fórmula (I), las cadenas laterales R¹³ preferidas son: arginina, ornitina, alanina, 2,4-diaminobutano, 2,3-diaminopropano, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, lisina, treonina, ciclopropilmetano, glicina, valina, isoleucina, histidina y 2-aminobutano.

55 De acuerdo con la presente divulgación, hemos descubierto péptidos que se unen específicamente a PD-L1 y son capaces de inhibir la interacción de PD-L1 con PD-1 y CD80. Estos péptidos macrocíclicos muestran una eficacia inmunomoduladora *in vitro*, lo que los convierte en candidatos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades, como el cáncer y las enfermedades infecciosas.

60 Los términos "unión específica" o "se une de forma específica" se refieren a la interacción entre una proteína y una molécula de unión, tal como un compuesto o ligando. La interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, un sitio de unión a la enzima, un determinante antigénico o epítopo) de la proteína que es reconocida por la molécula de unión. Por ejemplo, si un compuesto tiene un enlace específico para el sitio de unión a la proteína "A", la presencia del compuesto en una reacción que contiene una proteína que incluye el sitio de unión A y un péptido marcado que se une específicamente al sitio de unión A a la proteína reducirá la cantidad de péptido marcado unido a la proteína. En contraste, la unión no específica de un compuesto a la proteína no produce un desplazamiento dependiente de la concentración del péptido marcado de la proteína.

65 La presente divulgación pretende incluir todos los isótopos de átomos que se encuentran en los presentes

compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los compuestos marcados isotópicamente de la invención se pueden preparar generalmente por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o por procedimientos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado de otro modo. Dichos compuestos pueden tener diversos usos potenciales, por ejemplo, como patrones y reactivos para determinar la actividad biológica. En el caso de los isótopos estables, dichos compuestos pueden tener el potencial de modificar favorablemente las propiedades biológicas, farmacológicas o farmacocinéticas.

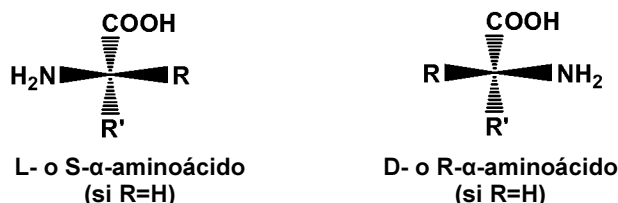
Un aspecto adicional de la materia descrita en el presente documento es el uso de los péptidos descritos como ligandos radiomarcados para el desarrollo de ensayos de unión de ligandos o para el control de la adsorción *in vivo*, metabolismo, distribución, unión u ocupación del receptor, o disposición del compuesto. Por ejemplo, un péptido macrocíclico descrito en el presente documento puede prepararse utilizando el isótopo radiactivo ^{125}I y el péptido marcado radiactivo resultante puede usarse para desarrollar un ensayo de unión o para estudios de metabolismo. Como alternativa y para el mismo fin, un péptido macrocíclico descrito en el presente documento puede convertirse en una forma radiomarcada mediante trituración catalítica utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación también se pueden usar como agentes de obtención de imágenes PET añadiendo un trazador radioactivo utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Los péptidos preferidos incluyen al menos uno de los péptidos macrocíclicos proporcionados en el presente documento y estos péptidos pueden incluirse en composiciones farmacéuticas y combinaciones.

Las definiciones proporcionadas en el presente documento se aplican, sin limitación, a los términos utilizados en esta memoria descriptiva, a no ser que se limite de otra forma en los casos específicos.

Los expertos en la técnica de la química de aminoácidos y péptidos son conscientes de que un aminoácido incluye un compuesto representado por la estructura general:



cuando R y R' son como se define en el presente documento.

A menos que se indique de otro modo, el término "aminoácido", tal como se usa en el presente documento, individualmente o como parte de otro grupo, incluye, sin limitación, un grupo amino y un grupo carboxilo unidos al mismo carbono, denominado carbono " α ", en el que R y/o R' pueden ser una cadena lateral natural o no natural, incluyendo hidrógeno. La configuración "S" absoluta en el carbono " α " se conoce habitualmente como la configuración "L" o "natural". En el caso de que tanto los sustituyentes "R" como los "R'" (prima) sean iguales a hidrógeno, el aminoácido es la glicina y no es quiral.

Las expresiones "cadena lateral de aminoácidos naturales" y "cadena lateral de aminoácidos de origen natural" como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos naturales (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, -histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) generalmente en la configuración S (es decir, el L-aminoácido).

Las expresiones "cadena lateral de aminoácido no natural" y "cadena lateral de aminoácido de origen no natural" como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena lateral de cualquier aminoácido de origen natural generalmente en la configuración R (es decir, el D-aminoácido) o a un grupo distinto de una cadena lateral de aminoácido de origen no natural en la configuración R o S (es decir, el D- o L-aminoácido, respectivamente) seleccionados entre:

alqueno C₂-C₇, alcoxi C₁-C₃alquilo C₁-C₃, alcoxycarbonil C₁-C₆alquilo C₁-C₃, alquilo C₁-C₇, alquil C₁-C₃sulfanilalquilo C₁-C₃, amidoalquilo C₁-C₃, aminoalquilo C₁-C₃, azaindolilalquilo C₁-C₃, benzotiazolilalquilo C₁-C₃, benzotienilalquilo C₁-C₃, benciloxialquilo C₁-C₃, carboxialquilo C₁-C₃, cicloalquil C₃-C₁₄alquilo C₁-C₃, difenilmetilo,

- furanilalquilo C₁-C₃, imidazolilalquilo C₁-C₃, naftilalquilo C₁-C₃, piridinilalquilo C₁-C₃, tiazolilalquilo C₁-C₃, tienilalquilo C₁-C₃;
 bifenilalquilo C₁-C₃, en el que el bifenilo está opcionalmente sustituido con un grupo metilo;
 heterociclilo opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos seleccionados
 5 independientemente entre alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, alquilsulfonilamino C₁-C₃, amido, amino, aminoalquilo C₁-C₃, aminosulfonilo, carboxi, ciano, halo, haloalquilo C₁-C₃, hidroxilo, -NC(NH₂)₂, nitro y -OP(O)(OH)₂;
 indolilalquilo C₁-C₃, en los que la parte de indolilo está opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo C₁-C₃, carboxialquilo C₁-C₃, halo, hidroxilo y fenilo, en la que el fenilo también está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre alcoxi C₁-C₃, alquilo C₁-C₃ y halo;
 10 NR^yR^{y'} (alquilo C₁-C₇), en la que R^y y R^{y'} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquenilo C₂-C₄-carbonilo, alquilo C₁-C₃, alquil C₁-C₃-carbonilo, cicloalquil C₃-C₁₄-carbonilo, furanilcarbonilo y fenilcarbonilo. Cuando el enlazador de alquilo contiene más de un carbono, un grupo NR^yR^{y'} adicional puede estar en la cadena. NR^qR^t carbonil alquilo C₁-C₃, en la que R^q y R^t se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₃ y trifenilmetilo;
 15 fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos seleccionados independientemente entre alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, alquilsulfonilamino C₁-C₃, amido, amino, aminoalquilo C₁-C₃, aminosulfonilo, carboxi, ciano, halo, haloalquilo C₁-C₃, hidroxilo, -NC(NH₂)₂, nitro y -OP(O)(OH)₂;
 NR^aR^b (alquilo C₁-C₇), en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquenilo C₂-C₄-carbonilo, alquilo C₁-C₃, alquil C₁-C₃-carbonilo, cicloalquil C₃-C₆-carbonilo, furanilcarbonilo y fenilcarbonilo. Cuando el enlazador de alquilo contiene más de un carbono, un grupo NR^a R^b adicional puede estar en la cadena.
 20 NR^cR^d carbonil alquilo C₁-C₃, en la que R^c y R^d se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₃ y trifenilmetilo;
 fenilalquilo C₁-C₃, en el que la parte de fenilo está opcionalmente sustituida con uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos seleccionados independientemente entre alcoxi C₁-C₄, alquilo C₁-C₄, alquilsulfonilamino C₁-C₃, amido, amino, aminoalquilo C₁-C₃, aminosulfonilo, carboxi, ciano, halo, haloalquilo C₁-C₃, hidroxilo, -NC(NH₂)₂, nitro y -OP(O)(OH)₂; y
 25 fenoxialquilo C₁-C₃, en el que el fenilo está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C₁-C₃.
- 30 El término "alquenilo C₂-C₄" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a cuatro átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.
- El término "alquenilo C₂-C₇" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena lineal o ramificada de dos a siete átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.
- 35 El término "alquenilo C₂-C₄", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquenilo C₂-C₄ unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.
- El término "alcoxi C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.
- 40 El término "alcoxi C₁-C₄", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₄ unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.
- 45 El término "alcoxi C₁-C₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₆ unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.
- El término "alcoxi C₁-C₃alquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alcoxi C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.
- 50 El término "alcoxycarbonilo C₁-C₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alcoxi C₁-C₆ unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.
- El término "alcoxi C₁-C₆carbonilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alcoxi C₁-C₆ carbonilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.
- 55 El término "alquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo obtenido a partir de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a tres átomos de carbono.
- 60 El término "alquilo C₁-C₄", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo obtenido a partir de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono.
- El término "alquilo C₁-C₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo obtenido a partir de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a seis átomos de carbono.
- 65 El término "alquilcarbonilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₃ unido

al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

El término "alquilsulfanilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un átomo azufre.

5 El término "alquil C₁-C₃sulfanilalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilsulfanilo C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

10 El término "alquilsulfonilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un grupo sulfonilo.

El término "alquilsulfonilamino C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilsulfonilo C₁-C₃ unido al resto molecular parental a través de un grupo amino.

15 El término "amido," como se usa en el presente documento, se refiere a -C(O)NH₂.

El término "amidoalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amido unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

20 El término "amino", como se usa en el presente documento, se refiere a -NH₂.

El término "aminoalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

25 El término "aminosulfonilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido al resto molecular parental a través de un grupo sulfonilo.

30 El término "azaindolilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo azaindolilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo azaindolilo se puede unir al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

35 El término "benzotiazolilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo benzotiazolilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo benzotiazolilo se puede unir al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "benzotienilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo benzotienilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo benzotienilo se puede unir al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

40 El término "benciloxi" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo bencilo unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.

45 El término "benciloxialquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo benciloxi unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "bifenilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo bifenilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo bifenilo se puede unir al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

50 El término "carbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a -C(O)-.

El término "carboxi", como se usa en el presente documento, se refiere a -CO₂H.

55 El término "carboxialquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carboxi unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "ciano", como se usa en el presente documento, se refiere a -CN.

60 El término "cicloalquilo C₃-C₁₄" como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillo hidrocarburo monocíclico, bicíclico o tricíclico saturado que tiene de tres a catorce átomos de carbono y cero heteroátomos. Los anillos bicíclicos y tricíclicos pueden ser condensados, espirocíclico o formando puentes. Los ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclopentilo, biciclo[3.1.1]heptilo y adamantilo.

65 El término "cicloalquil C₃-C₁₄alquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cicloalquilo C₃-C₁₄ unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "cicloalquil C₃-C₁₄ carbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cicloalquilo C₃-C₁₄ unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

El término "furanilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo furanilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo furanilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible en el grupo.

El término "furanilcarbonilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo furanilo unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

Los términos "halo" y "halógeno", como se usa en el presente documento, se refieren a F, Cl, Br o I.

El término "haloalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo C₁-C₃ sustituido con uno, dos o tres átomos de halógeno.

El término "halometilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo metilo sustituido con uno, dos o tres átomos de halógeno.

El término "heterociclilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo de cinco, seis o siete miembros que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de cinco miembros tiene de cero a dos dobles enlaces y los anillos de seis y siete miembros tienen de cero a tres dobles enlaces. El término "heterociclilo" también incluye grupos bicíclicos en los que el anillo heterociclilo está condensado a un anillo carbocíclico aromático o no aromático de cuatro a seis miembros u otro grupo heterociclilo monocíclico. Los grupos heterociclilo de la presente divulgación están unidos al resto molecular parental a través de un átomo de carbono en el grupo. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero sin limitación, benzotienilo, furilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxazolilo, piperazinilo, piperidinilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirrolopiridinilo, pirrolilo, tiazolilo, tienilo y tiomorfolinilo.

El término "hidroxi", como se usa en el presente documento, se refiere a -OH.

El término "imidazolilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo imidazolilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo imidazolilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo sustituible dentro del grupo.

El término "indolilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo indolilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo indolilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo de sustituible dentro del grupo.

El término "naftilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo naftilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo naftilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo de sustituible dentro del grupo.

El término "nitro", como se usa en el presente documento, se refiere a -NO₂.

El término "NR^aR^b", como se usa en el presente documento, se refiere a dos grupos, R^a y R^b, que están unidos al resto molecular parental a través de un átomo de nitrógeno. R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquenilo C₂-C₄-carbonilo, alquil C₁-C₃-carbonilo, cicloalquil C₃-C₆-carbonilo, furanilcarbonilo y fenilcarbonilo.

El término "NR^aR^balquil (C₁-C₃)", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo NR^aR^b unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "NR^cR^d", como se usa en el presente documento, se refiere a dos grupos, R^c y R^d, que están unidos al resto molecular parental a través de un átomo de nitrógeno. R^c y R^d se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₃ y trifenilmetilo.

El término "NR^cR^dcarbonilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo NR^cR^d unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

El término "NR^cR^dcarbonilalquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carbonilo NR^cR^d unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "fenoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo fenilo unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.

El término "fenoxialquilo C₁-C₃" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo fenoxi unido al resto

molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

El término "fenilalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo fenilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃.

5 El término "fenilcarbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo fenilo unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

10 El término "piridinilalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo piridinilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo piridinilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo de sustituible dentro del grupo.

El término "sulfanilo" como se usa en el presente documento, se refiere a -S-.

15 El término "sulfonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a -SO₂-.

El término "tiazolilalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo tiazolilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo tiazolilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo de sustituible dentro del grupo.

20 El término "tienilalquilo C₁-C₃", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo tienilo unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo C₁-C₃. El grupo tienilo puede unirse al resto alquilo a través de cualquier átomo de sustituible dentro del grupo.

25 El término "tratar" se refiere a: (i) prevenir que una enfermedad, trastorno o afección se produzca en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero al que aún no se le ha diagnosticado que la tenga; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección y/o síntomas asociados a la enfermedad, al trastorno y/o a la dolencia.

30 La unión de los péptidos macrocíclicos a PD-L1 puede medirse, por ejemplo, mediante métodos como la fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF), resonancia de plasmón superficial (SPR), calorimetría de valoración isotérmica (ITC), espectroscopia con resonancia magnética nuclear (NMR) y similares. Además, la unión de los péptidos macrocíclicos a PD-L1 expresada en la superficie de las células se puede medir como se describe en el presente documento en ensayos de unión celular.

35 La administración de un agente terapéutico descrito en el presente documento incluye, sin limitación, administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere, sin limitación, a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una afección tratable mediante la administración de una composición de inhibidores de la unión de PD-1/PD-L1 descritos en el presente documento. Esta cantidad es la cantidad suficiente para presentar un efecto terapéutico o preventivo o mejorador. El efecto puede incluir, por ejemplo y sin limitación, el tratamiento o la prevención de las dolencias relacionadas en el presente documento. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y la extensión de la dolencia que se está tratando, las recomendaciones del médico a cargo del tratamiento, y las terapéuticas o combinación de terapéuticas seleccionadas para la administración. Por tanto, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado.

40 En otro aspecto, la divulgación se refiere a los péptidos macrocíclicos de la presente invención para su uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto. Tal como se demuestra en el presente documento, os péptidos macrocíclicos de la presente divulgación se pueden unirse a PD-L1, interrumpir la interacción entre PD-L1 y PD-1, competir con la unión de PD-L1 con anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se sabe que bloquean la interacción con PD-1, mejorar la secreción de IFN γ en linfocitos T específicos de CMV, y mejorar la secreción de IFN γ por los linfocitos T específicos de VIH. Como resultado de ello, los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación son útiles para modificar una respuesta inmunitaria, tratar enfermedades como el cáncer o enfermedades infecciosas, estimular una respuesta autoinmune protectora o estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno (por ejemplo, mediante la administración conjunta de péptidos bloqueadores de PD-L1 con un antígeno de interés).

45 Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, se definen previamente determinados términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

50 Los términos "Ligando 1 de Muerte Programada", "Ligando 1 de Muerte Celular Programada", "Proteína PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-LI", "hPD-LI", "CD274" y "B7-H1" se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-L1 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-L1. La secuencia completa de PD-L1 humana puede encontrarse con el número de acceso GENBANK@NP_054862.

Los términos "Muerte programada 1", "Muerte celular programada 1", "Proteína PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-I" se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de PD-1 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-1. La secuencia completa de PD-1 humana puede encontrarse con el número de acceso GENBANK® U64863.

Los términos "antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico", "CTLA-4", "CTLA4", "antígeno CTLA-4" y "CD152" (véase, por ejemplo, Murata, *Am. J. Pathol.*, 155:453-460 (1999)) se usan de forma indistinta e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de CTLA-4 humana y análogos que tienen al menos un epítipo común con CTLA-4 (véase, por ejemplo, Balzano, *Int. J. Cancer Suppl.*, 7:28-32 (1992)). La secuencia completa de ácido nucleico de CTLA-4 puede encontrarse con el número de acceso GENBANK® L15006.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo péptidos macrocíclicos, citocinas y complemento) que da como resultado un daño selectivo sobre, la destrucción de o la eliminación en el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Un "acontecimiento adverso" (AA) como se usa en el presente documento es cualquier signo desfavorable y generalmente no intencionado, incluso indeseable (incluido un hallazgo de laboratorio anormal), síntoma o enfermedad asociada al uso de un tratamiento médico. Por ejemplo, un acontecimiento adverso puede estar asociado a la activación del sistema inmunitario o la expansión de las células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T) en respuesta a un tratamiento. Un tratamiento médico puede tener uno o más AA asociados y cada AA puede tener el mismo o diferente nivel de gravedad. La referencia a métodos capaces de "alterar acontecimientos adversos" significa un régimen de tratamiento que disminuye la incidencia y/o la gravedad de uno o más AA asociados al uso de un régimen de tratamiento diferente.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad hiperproliferativa" se refiere a las afecciones en las que el crecimiento celular aumenta con respecto a los niveles normales. Por ejemplo, las enfermedades o trastornos hiperproliferativos incluyen enfermedades malignas (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer biliar) y enfermedades no malignas (por ejemplo, aterosclerosis, hiperplasia benigna e hipertrofia prostática benigna).

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar uno o más de una desviación estándar según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar un intervalo un rango de hasta el 20 %. Asimismo, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces el valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, salvo que se indique otra cosa, el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" debe suponerse que está dentro de un rango de error aceptable para ese valor particular.

Como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique otra cosa.

Ensayo de competición

La presente divulgación también está dirigida a péptidos macrocíclicos que pueden competir por la unión de un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia (MDX-1105) en al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % y al menos aproximadamente al 100 %. Tales péptidos macrocíclicos pueden compartir homología estructural con uno o más péptidos macrocíclicos desvelados en el presente documento, incluyendo formas mutantes, de sustitución conservadora, de sustitución funcional y de delección, siempre que se unan específicamente a PD-L1. Por ejemplo, si un péptido macrocíclico se une sustancialmente a la misma región de PD-L1 como un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, el péptido macrocíclico debería unirse a un epítipo de PD-L1 que al menos se superpone con el epítipo de PD-L1 al que se une el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1. La región de solapamiento puede variar desde un resto de aminoácido hasta varios cientos de restos de aminoácidos. El péptido macrocíclico debe entonces competir con y/o bloquear la unión del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a PD-L1 y, por lo tanto, disminuir la unión del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a PD-L1, preferentemente en al menos aproximadamente un 50 % en un ensayo de competición.

Los anticuerpos anti-PD-L1 que pueden usarse como anticuerpos de referencia para fines de ensayos de competición

son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos anti-PD-L1 representativos: MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono), L1X3 (Serono), MSB-0010718C (Serono), y PD-L1 Probody (CytomX), y los anticuerpos frente a PD-L1 desvelados en el documento WO 2007/005874 de propiedad conjunta.

Los anticuerpos anti-PD-1 que pueden usarse como anticuerpos de referencia para fines de ensayos de competición son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos anti-PD-1 representativos: nivolumab (BMS); 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, cada uno desvelado en la patente de Estados Unidos N.º 8,008,449 (BMS) de propiedad conjunta, MK-3475 (Merck, desvelado en la patente de Estados Unidos n.º 8.168.757), y los anticuerpos desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.488.802.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de péptidos macrocíclicos de la presente divulgación, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de péptidos macrocíclicos (por ejemplo, dos o más diferentes) o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la presente divulgación. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación puede comprender una combinación de péptidos macrocíclicos (o inmunoconjugados o biespecíficas) que se unen a diferentes epítopos sobre el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un péptido macrocíclico combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección de usos de los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptables" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, un péptido macrocíclico, inmunoconjugado o molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal terapéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no produce ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977)). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica de la divulgación también pueden incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, citados anteriormente, y por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También

puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

- 5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios
- 10 en las composiciones.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de

15 dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición.

20 Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables, incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea

25 necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una

30 solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material transportador para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del

35 cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en

45 forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la presente divulgación está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y (b) de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

50

Para la administración del péptido macrocíclico, la dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más

55 generalmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o estar en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez al día, dos veces al día, quincenalmente, tres veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una

60 vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un péptido macrocíclico de la divulgación incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, con el macrociclo dado usando una de las siguientes pautas posológicas: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, una vez cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

65

En algunos métodos, dos o más péptidos macrocíclicos con diferentes especificidades de unión se administran

simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada compuesto administrado se encuentra dentro de los rangos indicados. Los compuestos normalmente se administran varias veces. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del péptido macrocíclico frente al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración en plasma de 1-1.000 µg/ml y en algunos procedimientos 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el péptido macrocíclico se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina y, preferentemente, hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleado, o el éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o los materiales usados en combinación con las composiciones en particular empleadas, la edad, del sexo, el peso, la afección, estado de salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un péptido macrocíclico de la divulgación produce preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y la duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debida a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores, una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente por al menos aproximadamente el 60 % y, aún más preferentemente, por al menos aproximadamente el 80 % con relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral y/o VIH se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos o la eficacia viral. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, disminuir la carga viral o, por otro lado, mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit farmacéutico de partes que comprende un péptido macrocíclico y otro inmodulador, como se describe en el presente documento. El kit también puede comprender además instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (tal como cáncer como se describe en el presente documento) y/o enfermedad antiviral.

Una composición de la presente divulgación se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de varios métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración preferidas para los péptidos macrocíclicos de la divulgación incluyen la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parentales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase "administrada parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

Como alternativa, un péptido macrocíclico de la divulgación se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, vaginal, por vía rectal, sublingual o tópica.

El compuesto activo puede prepararse con transportadores que protegerán al compuesto contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Biodegradable, pueden usarse polímeros biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la

preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Robinson, J. R., ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1978).

- 5 Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la divulgación se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos desvelados en las patentes de EE.UU. n.º 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: la patente de EE.UU. n.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada; la patente de EE.UU. n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa; la patente de EE.UU. n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE.UU. n.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración osmótica de fármaco que tiene compartimentos multicámara; y la patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración osmótica de fármaco. Estas patentes se incorporan en el presente documento por referencia. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.
- 10 En determinadas realizaciones, los péptidos macrocíclicos de la divulgación pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la divulgación atraviesan la BHM (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 4.522.811, 5.374.548 y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, por ejemplo, Ranade, V.V., *J. Clin. Pharmacol.*, 29:685 (1989)). Los grupos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.416.016 para Low y col.); manósidos (Umezawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153:1038 (1988)); péptidos macrocíclicos (Bloeman, P.G. et al., *FEBS Lett.*, 357:140 (1995); Owais, M. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:180 (1995)); receptor de proteína A del tensioactivo (Briscoe et al., *Am. J. Physiol.*, 1233:134 (1995)); p120 (Schreier et al., *J. Biol. Chem.*, 269:9090 (1994)); véase también Keinanen, K. et al., *FEBS Lett.*, 346:123 (1994); Killion, J.J. et al., *Immunomethods* 4:273 (1994).

Usos y procedimientos de la presente divulgación

- 35 Los péptidos macrocíclicos, las composiciones y los métodos de la presente divulgación tienen numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, la detección de PD-L1 o la mejora de la respuesta inmune por bloqueo de PD-L1. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en diversas situaciones. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona el péptido macrocíclico de la presente invención para uso en la modificación de una respuesta inmune en un sujeto. Preferentemente, la respuesta es mejorada, estimulada o regulada por aumento. En otros aspectos, el péptido macrocíclico puede tener actividad terapéutica y de unión anti-cyno, anti-ratón y/o anti-marmota.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, marmotas, anfibios y reptiles, aunque se prefieren los mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas y caballos. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan potenciar una respuesta inmune. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno que puede tratarse aumentando la respuesta inmune mediada por linfocitos T. En una realización particular, los métodos son adecuados para el tratamiento de las células cancerosas *in vivo*. Para lograr la mejora de inmunidad específica de antígeno, los péptidos macrocíclicos pueden administrarse junto con un antígeno de interés. Cuando los péptidos macrocíclicos a PD-L1 se administran junto con otro agente, los dos se puede administrar en cualquier orden o simultáneamente.
- 55 La divulgación proporciona además métodos para detectar la presencia de antígeno PD-L1 humano, de marmota, mono cinomolgo y/o de ratón en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno PD-L1 humano, de marmota, mono cinomolgo y/o de ratón, que comprende poner en contacto con la muestra, y una muestra de control, con un péptido macrocíclico de referencia que se une específicamente a PD-L1 humano, de marmota, mono cinomolgo y/o de ratón, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el macrociclo y el PD-L1 humano, de marmota, mono cinomolgo y/o de ratón. Entonces se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia de formación de complejos entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de PD-L1 humano, de marmota, mono cinomolgo y/o de ratón en la muestra.
- 60 Dada la unión específica de los péptidos macrocíclicos de la divulgación para PD-L1, en comparación con CD28, ICOS y CTLA-4, los péptidos macrocíclicos de la divulgación se pueden usar para detectar específicamente la

expresión de PD-L1 en la superficie de las células y, además, se puede utilizar para purificar PD-L1 mediante purificación por inmutofafinidad.

Cáncer

El bloqueo de PD-1 por los péptidos macrocíclicos puede mejorar la respuesta inmune a las células cancerosas en el paciente. El ligando para PD-1, PD-L1, también se expresa en células humanas normales, pero es abundante en diversos cánceres humanos (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución de linfocitos infiltrantes de tumores, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmune por las células cancerosas (Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004)). La supresión inmunitaria puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 a PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también se bloquea (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003)). Si bien estudios previos han demostrado que la proliferación de linfocitos T se puede restaurar al inhibir la interacción de PD-1 a PD-L1, no ha habido informes de un efecto directo sobre el crecimiento de tumores de cáncer *in vivo* al bloquear la interacción PD-1/PD-L1. En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido macrocíclico de acuerdo con la invención para uso *in vivo* de manera que se inhibe el crecimiento de tumores cancerosos. Un péptido macrocíclico se puede usar solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, un péptido macrocíclico se puede utilizar junto con otros agentes inmunogénicos, tratamientos estándar contra el cáncer, u otros péptidos macrocíclicos, como se describe más adelante.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un péptido macrocíclico de acuerdo con la invención para su uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto.

Cánceres preferidos cuyo crecimiento se puede inhibir usando los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación incluyen los cánceres normalmente respondedores a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, metastásico melanoma maligno), carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a la hormona y cáncer de próstata resistente a la castración), cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico escamoso y no escamoso). Adicionalmente, la divulgación incluye neoplasias refractarias o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir usando los péptidos macrocíclicos de la divulgación.

Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse usando los procedimientos de la divulgación incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago/gástrico, cáncer de testículos, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente divulgación también es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos, especialmente cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144 (2005)).

Opcionalmente, los péptidos macrocíclicos a PD-L1 se pueden combinar con un agente inmunógeno, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF.

En los seres humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunogénicos tales como melanomas. Se anticipa que al elevar el umbral de la activación de los linfocitos T por el bloqueo de PD-L1, los inventores pueden esperar activar las respuestas tumorales en el huésped.

Es probable que el bloqueo de PD-L1 sea más efectivo cuando se combina con un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., *ASCO Educational Book Spring*: 300-302 (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*: 414-428 (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*: 730-738 (2000); véase también Restifo, N. et al., *Cancer Vaccines*, Capítulo 61, pág. 3023-3043, en DeVita,

V. et al., eds., *Cáncer: Principles and Practice of Oncology*, Quinta Edición (1997)). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3539-3543 (1993)).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, S. A., *Immunity*, 10:281-287 (1999)). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos diferenciados expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Más importante aún, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el huésped. El bloqueo de PD-L1 puede usarse junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor con el fin de generar una respuesta inmune a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente vistas por el sistema inmunitario como antígenos propios y por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y en solo un número limitado de tejidos somáticos (Kim, N et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios). El antígeno tumoral también puede ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico del tumor que puede usarse junto con el bloqueo de PD-L1 son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en la administración a las células que presentan antígeno para provocar la inmunidad tumoral (Suot, R. et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Las células dendríticas (DC) son potentes células de presentación de antígeno que pueden usarse para preparar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse ex vivo y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como con extractos de células tumorales (Nestle, F. et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). Las DC también pueden ser transducidas por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente a células tumorales con el propósito de inmunización (Kugler, A. et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). Como método de vacunación, la inmunización DC puede combinarse eficazmente con el bloqueo de PD-L1 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de PD-L1 también puede combinarse con tratamientos estándar contra el cáncer. El bloqueo de PD-L1 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, M. et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Un ejemplo de dicha combinación es un péptido macrocíclico en combinación con dacarbazina para el tratamiento de melanoma. Otro ejemplo de dicha combinación es un péptido macrocíclico en combinación con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de melanoma. La razón científica detrás del uso combinado del bloqueo de PD-L1 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado la sinergia con el bloqueo de PD-L1 a través de la muerte celular son radiación, cirugía y privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con el bloqueo de PD-L1. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral en las rutas de presentación del antígeno huésped.

Los péptidos macrocíclicos bloqueantes de PD-L1 también pueden usarse en combinación con péptidos macrocíclicos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan receptores Fc alfa o Fc gamma a células tumorales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU n.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar péptidos macrocíclicos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. Por ejemplo, se han usado péptidos macrocíclicos biespecíficos del receptor anti-Fc/antígeno anti-tumor (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas tumorales específicas. El brazo de linfocitos T de estas respuestas se aumentará mediante el uso del bloqueo de PD-L1. Como alternativa, el antígeno puede administrarse directamente a las DC mediante el uso de péptidos macrocíclicos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de células dendríticas.

Los tumores evaden la vigilancia inmune del huésped por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estos incluyen, entre otros, TGF-beta (Kehrl, J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., *Immunology Today*, 13: 198-200 (1992)), y ligando de Fas (Hahne, M. et al., *Science*, 274:1363-

1365 (1996)). Los péptidos macrocíclicos de cada una de estas entidades pueden usarse en combinación con anti-PD-L1 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias del tumor por parte del huésped.

- 5 Otros péptidos macrocíclicos que se pueden usar para activar la capacidad de respuesta inmune del huésped se pueden usar en combinación con anti-PD-L1. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los péptidos macrocíclicos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad auxiliar de los linfocitos T (Ridge, J. *et al.*, *Nature*, 393:474-478 (1998)) y se puede utilizar junto con los anticuerpos PD-1 (Ito, N. *et al.*, *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Los péptidos macrocíclicos
- 10 activadores de moléculas coestimuladoras de linfocitos T, como CTLA-4(por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.811.097), OX-40 (Weinberg, A. *et al.*, *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. *et al.*, *Nat. Med.*, 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. *et al.*, *Nature*, 397:262-266 (1999)) también pueden proporcionar niveles aumentados de activación de linfocitos T.
- 15 El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Mientras que la enfermedad del injerto contra huésped es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas de injerto frente a tumor. El bloqueo de PD-L1 puede usarse para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados donantes.
- 20 También hay varios protocolos de tratamiento experimental que involucran la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor (Greenberg, R. *et al.*, *Science*, 285:546-551 (1999)). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos como el CMV. Puede esperarse que la activación *ex vivo* en presencia de péptidos macrocíclicos aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos
- 25 T transferidos adoptivamente.

Enfermedades infecciosas

- 30 Otros métodos de la divulgación se usan para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona un péptido macrocíclico de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- Similar a su aplicación a los tumores como se ha analizado anteriormente, el bloqueo de PD-L1 puede usarse en solitario o como un adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmune a patógenos, toxinas y auto-antígenos. Los ejemplos de agentes patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que actualmente no existe una vacuna eficaz, o patógenos para los cuales las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Estos incluyen, pero sin limitación, VIH, hepatitis (A, B, y C), gripe, herpes, Giardia, paludismo (Butler, N.S. *et al.*, *Nature Immunology* 13, 188-195 (2012); Hafalla, J.C.R., *et al.* *PLOS Pathogens*; February 2, 2012)), Leishmania, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*
- 35 *Aeruginosa*. El bloqueo de PD-L1 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes tales como el VIH que presentan antígenos alterados durante el transcurso de las infecciones. Estos nuevos epítomos se reconocen como extraños en el momento de la administración de PD-L1 anti-humano, provocando así una fuerte respuesta de linfocitos T que no se amortigua por las señales negativas a través de PD-L1.
- 45 Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones tratables mediante métodos de la divulgación incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), herpes virus (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, y CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis
- 50 arboviral.
- Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la divulgación incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.
- 55 Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones tratables mediante los procedimientos de la divulgación incluyen Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, etc.), Genus Mucorales (mucor, absidia, rhizophus), Sporothrix schenckii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum.
- 60 Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones tratables mediante los procedimientos de la divulgación incluyen Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lamblia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi, y Nippostrongylus brasiliensis.
- 65

En todos los métodos anteriores, el bloqueo de PD-L1 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como tratamiento con citocinas (por ejemplo, interferones, agentes dirigidos a la actividad de VEGF o receptores de VEGF, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia de anticuerpos biespecíficos, que proporciona una presentación de antígenos tumorales mejorada (véase, por ejemplo, Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak, *Sinycin re*, 2:1121-1123 (1994)).

Reacciones autoinmunes

Los péptidos macrocíclicos pueden provocar y amplificar respuestas autoinmunes. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales usando vacunas de células tumorales y péptidos revela que muchas respuestas antitumorales implican anti-reactividades (despigmentación observada en el melanoma B16 modificado con anti-CTLA-4+GM-CSF en van Elsas et al. anteriormente; despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk, W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 2982-2987 (1999)); prostatitis autoinmune evocada por vacunas de células tumorales TRAMP (Hurwitz, A., *citado anteriormente* (2000)), la vacunación con antígenos de péptidos de melanoma y el vitiligo observado en ensayos clínicos en seres humanos (Rosenberg, S.A. et al., *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19(1):81-84 (1996)).

Por lo tanto, es posible considerar el uso del bloqueo anti-PD-L1 junto con diversas autoproteínas para diseñar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunes contra estas autoproteínas para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica una acumulación inapropiada de péptido A.beta. en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide son capaces de eliminar estos depósitos amiloides (Schenk et al., *Nature*, 400:173-177 (1999)).

Otras autoproteínas también pueden usarse como dianas tales como IgE para el tratamiento de alergia y asma, y TNF.alfa. para la artritis reumatoide. Por último, pueden inducirse respuestas de anticuerpos a diversas hormonas mediante el uso de los macrociclos desvelados en el presente documento. Para la anticoncepción se pueden utilizar respuestas de anticuerpos neutralizantes a hormonas reproductivas. La respuesta de anticuerpos neutralizantes a hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares también pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

Pueden usarse métodos análogos como se ha descrito anteriormente para el uso de los macrociclos anti-PD-1 para la inducción de respuestas terapéuticas autoinmunes para tratar pacientes que tienen una acumulación inapropiada de otros auto-antígenos, tales como depósitos amiloides, incluyendo A-beta en la enfermedad de Alzheimer, citocinas tales como TNF.alfa., e IgE.

Vacunas

Los péptidos macrocíclicos se pueden usar para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno por coadministración de un macrociclo anti-PD-1 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmunológica a un antígeno en un sujeto, que comprende la administración al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un macrociclo anti-PD-1 de forma que se mejora una respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Los ejemplos no limitativos de tales antígenos incluyen los analizados en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas tumorales) analizados anteriormente, o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Las vías adecuadas para administrar las composiciones (por ejemplo, péptidos macrocíclicos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas e inmunoconjugados) de la presente divulgación in vivo o in vitro son bien conocidas en la técnica y los expertos en la técnica las pueden seleccionar. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar mediante inyección (subcutánea o intravenosa). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición.

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos macrocíclicos de la divulgación se pueden coadministrar con uno u otro agente más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El péptido se puede unir al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración separada), el péptido puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino bleomicina sulfato, carmustina, clorambucilo, descarbazina y ciclofosfamida hidroxiaurea que, por sí solos, son solamente eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/dosis una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan a través de diferentes mecanismos que dan un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas

debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las hará no reactivas con los péptidos.

También están dentro del alcance de la presente divulgación los kits que comprenden las composiciones de la divulgación (por ejemplo, péptidos macrocíclicos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más péptidos macrocíclicos adicionales de la divulgación (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno PD-L1 distinto del macrociclo). Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

Terapia de combinación

La combinación de los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación con otro antagonista de PD-L1 y/u otro inmunomodulador es útil para potenciar una respuesta inmune contra una enfermedad hiperproliferativa. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo* o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en diversas situaciones. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un péptido macrocíclico de acuerdo con la invención para su uso en la modificación de una respuesta inmune en un sujeto. Preferentemente, la respuesta es mejorada, estimulada o regulada por aumento. En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para alterar los acontecimientos adversos asociados al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente terapéutico inmunoestimulador, que comprende administrar un péptido macrocíclico de la presente divulgación y una dosis terapéutica de otro inmunomodulador a un sujeto.

El bloqueo de PD-L1 por los péptidos macrocíclicos puede mejorar la respuesta inmune a las células cancerosas en el paciente. Cánceres cuyo crecimiento se puede inhibir usando los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los cánceres normalmente respondedores a inmunoterapia. Los ejemplos representativos de cánceres para el tratamiento con la terapia de combinación de la presente divulgación incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de hígado. Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse usando los usos de la presente divulgación incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos ambientalmente incluyendo aquellos inducidos por amianto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente divulgación también es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos.

En determinadas realizaciones, la combinación de agentes terapéuticos que contienen al menos un péptido macrocíclico analizado en el presente documento puede administrarse simultáneamente como una composición única en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o concurrentemente como composiciones separadas en las que cada agente puede administrarse secuencialmente. Por ejemplo, un segundo inmunomodulador y un péptido macrocíclico de la presente divulgación pueden administrarse secuencialmente, tal como el segundo inmunomodulador administrado primero y el péptido macrocíclico segundo, o el péptido macrocíclico administrado primero y el segundo inmunomodulador segundo. Asimismo, si más de una dosis de la terapia de combinación se administra secuencialmente, el orden de la administración secuencial se puede invertir o mantener en el mismo orden en cada momento de administración, las administraciones secuenciales pueden combinarse con administraciones concurrentes, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de un segundo inmunomodulador y el péptido macrocíclico pueden ser concurrentes, la segunda administración puede ser secuencial con el segundo inmunomodulador primero y el péptido macrocíclico segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el primer péptido macrocíclico y el segundo inmunomodulador segundo, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que sea secuencial con el péptido macrocíclico primero y el segundo inmunomodulador segundo, y las administraciones posteriores pueden ser concurrentes.

Opcionalmente, la combinación del péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador puede combinarse adicionalmente con un agente inmunogénico, tales como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimulantes (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como

péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF.

- Un péptido macrocíclico PD-L1 combinado y un segundo inmunomodulador pueden combinarse además con un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., *ASCO Educational Book Spring*: 300-302 (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*: 414-428 (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*: 730-738 (2000); véase también Restifo et al., *Cancer Vaccines*, Capítulo 61, pág. 3023-3043 en DeVita et al, eds., *Cáncer: Principles and Practice of Oncology*, Quinta Edición (1997)). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que el GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación de tumores (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543 (1993)).
- El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, *Immunity*, 10:281-287 (1999)). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Más importante aún, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el huésped. En determinadas realizaciones, un péptido macrocíclico PD-L1 combinado y un segundo inmunomodulador pueden usarse junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor con el fin de generar una respuesta inmune a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente vistas por el sistema inmunitario como autoantígenos propios y, por lo tanto, tolerantes a ellos. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y en solo un número limitado de tejidos somáticos (Kim, et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Estos tejidos somáticos pueden protegerse de ataques inmunes por varios medios). El antígeno tumoral también puede ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de la proteína o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia) o idiotipo de tumores de linfocitos B.
- Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del herpes sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico del tumor que puede usarse junto con el bloqueo del péptido macrocíclico PD-L1 son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en la administración a las células que presentan antígeno para provocar la inmunidad tumoral (Suot et al, *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura et al, *Science*, 278:117-120 (1997)).
- Las células dendríticas (DC) son potentes células de presentación de antígeno que pueden usarse para preparar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como con extractos de células tumorales (Nestle et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). Las DC también pueden ser transducidas por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente a células tumorales con el propósito de inmunización (Kugler et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). Como método de vacunación, la inmunización con DC se puede combinar de manera efectiva con un péptido macrocíclico anti-PD-L1 y un segundo inmunomodulador para activar respuestas antitumorales más potentes.
- Un péptido macrocíclico anti-PD-L1 combinado y un inmunomodulador adicional también se pueden combinar con tratamientos estándar contra el cáncer. Por ejemplo, una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, como se observa con la combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador, puede ser posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la presente divulgación (Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Un ejemplo de dicha combinación es una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador en combinación adicional con dacarbazina para el tratamiento de melanoma. Otro ejemplo es una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo agente inmunomodulador en combinación adicional con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de melanoma. La razón científica detrás del uso combinado del péptido macrocíclico PD-L1 y otro inmunomodulador con quimioterapia es que una muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles aumentados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias de combinación que pueden resultar en sinergia con un péptido macrocíclico anti-PD-L1 combinado e inmunomodulador adicional a través de la muerte celular incluyen radiación, cirugía o privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con un PD-L1 combinado y un segundo inmunomodulador. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales, que también puede ser una fuente de antígeno tumoral para alimentar las vías de presentación del antígeno del huésped.

Una combinación de PD-L1 y otro inmunomodulador también se pueden usar en combinación con péptidos macrocíclicos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan receptores Fc alfa o Fc gamma a células tumorales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar péptidos macrocíclicos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. Por ejemplo, se han usado péptidos macrocíclicos biespecíficos del receptor anti-Fc/antígeno anti-tumor (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas tumorales específicas. El brazo de linfocitos T de estas respuestas se aumentará mediante el uso de PD-L1 combinado y un segundo inmunomodulador. Como alternativa, el antígeno puede administrarse directamente a las DC mediante el uso de péptidos macrocíclicos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico de células dendríticas.

En otro ejemplo, se puede usar una combinación de un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador junto con agentes macrocíclicos antineoplásicos, tales como RITUXAN® (rituximab), HERCEPTIN® (trastuzumab), BEXXAR® (tositumomab), ZEVALIN® (ibritumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), Lymphocide (eptuzumab), AVASTIN® (bevacizumab) y TARCEVA® (erlotinib), y similares. A modo de ejemplo y sin desear quedar ligados a teoría alguna, el tratamiento con un anticuerpo contra el cáncer o un anticuerpo contra el cáncer conjugado con una toxina puede conducir a la muerte de las células cancerosas (por ejemplo, células tumorales) que podrían potenciar una respuesta inmune mediada por el segundo objetivo inmunomodulador o PD-L1. En una realización ilustrativa, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo contra el cáncer en combinación con un péptido macrocíclico y un segundo inmunomodulador concurrente o secuencialmente o cualquier combinación de los mismos, que puede potenciar una respuesta inmune antitumoral por el huésped.

Los tumores evaden la vigilancia inmune del huésped por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas, que son expresados por los tumores y que son inmunosupresores. Estos incluyen, entre otros, TGF- β (Kehrl, J. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. *et al.*, *Immunology Today*, 13: 198-200 (1992)), y ligando de Fas (Hahne, M. *et al.*, *Science*, 274:1363-1365 (1996)). En otro ejemplo, los anticuerpos frente a cada una de estas entidades pueden combinarse con un péptido macrocíclico y otro inmunomodulador para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias del tumor por parte del huésped.

Otros agentes que pueden usarse para activar la capacidad de respuesta inmune del huésped pueden usarse adicionalmente en combinación con un péptido macrocíclico de la presente divulgación. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los péptidos macrocíclicos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad auxiliar de los linfocitos T (Ridge, J. *et al.*, *Nature*, 393: 474-478 (1998)) y puede usarse junto con los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación, ya sea solos o en combinación con una combinación anti-CTLA-4 (Ito, N. *et al.*, *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). La activación de péptidos macrocíclicos en moléculas coestimuladoras de linfocitos T, tales como OX-40 (Weinberg, A. *et al.*, *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. *et al.*, *Nat. Med.*, 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. *et al.*, *Nature*, 397:262-266 (1999)) también pueden proporcionar niveles aumentados de activación de linfocitos T.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. Mientras que la enfermedad del injerto contra huésped es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio terapéutico puede obtenerse a partir de respuestas de injerto frente a tumor. Un péptido macrocíclico de la presente divulgación, tanto solo como combinado con otro inmunomodulador, puede usarse para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados de donantes.

También hay varios protocolos de tratamiento experimental que involucran la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores para linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor (Greenberg, R. *et al.*, *Science*, 285:546-551 (1999)). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos como el CMV. La activación *ex vivo* en presencia de un péptido macrocíclico de la presente divulgación, tanto solo como combinado con otro inmunomodulador, puede esperarse que aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos adoptivamente.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para alterar un acontecimiento adverso asociado al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un péptido macrocíclico de la presente divulgación en combinación con una dosis terapéutica de otro inmunomodulador a un sujeto. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación proporcionan un método para reducir la incidencia de colitis inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes o diarrea mediante la administración al paciente de un esteroide no absorbible. Debido a que cualquier paciente que reciba un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador tiene riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho tratamiento, toda esta población de pacientes es adecuada para la terapia de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y prevenir las exacerbaciones de la EII, no se han utilizado para prevenir (disminuir la incidencia de) EII en pacientes que no han sido diagnosticados con EII. Los efectos secundarios significativos asociados a los esteroides, incluso los esteroides no

absorbibles, han desalentado su uso profiláctico.

En otras realizaciones, un péptido macrocíclico de la presente divulgación, tanto solo como combinado con otro inmunomodulador, se puede combinar adicionalmente con el uso de cualquier esteroide no absorbible. Como se usa en el presente documento, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que exhibe un metabolismo extenso de primer paso tal que, tras el metabolismo hepático, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, inferior a aproximadamente un 20 %. En una realización de la divulgación, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticosteroide de acción local, que es ampliamente metabolizada, principalmente por el hígado, tras la administración oral. ENTOCORT® EC (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida que depende del pH y del tiempo desarrollada para optimizar la administración del fármaco al íleon y en todo el colon. ENTOCORT® EC para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada que afecta el íleon y/o el colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT® EC para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT® EC se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana mucosa intestinal, ENTOCORT® EC es metabolizado ampliamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado a metabolitos con una actividad glucocorticoide insignificante. Por lo tanto, la biodisponibilidad es baja (alrededor del 10 %). La baja biodisponibilidad de la budesonida da como resultado una mejor relación terapéutica en comparación con otros glucocorticoides con un metabolismo de primer paso menos extenso. La budesonida produce menos efectos adversos, incluyendo menos supresión hipotálamica-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT® EC puede producir efectos glucocorticoides sistémicos, como hipercorticismismo y supresión suprarrenal. Véase *Physicians' Desk Reference Supplement*, 58ª edición, 608-610 (2004).

En otras realizaciones adicionales, una combinación PD-L1 y otro inmunomodulador junto con un esteroide no absorbible pueden combinarse además con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & Upjohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Forma de dosificación y formulación

Un péptido adecuado de Fórmula I, o más específicamente un péptido macrocíclico descrito en el presente documento, puede administrarse a pacientes para tratar la diabetes y otras enfermedades relacionadas como el compuesto solo o mezclado con un vehículo aceptable en forma de formulaciones farmacéuticas. Los expertos en la técnica del tratamiento de la diabetes pueden determinar fácilmente la dosis y la vía de administración del compuesto a los mamíferos, incluyendo los seres humanos, que necesitan el tratamiento. La vías de administración puede incluir, pero no se limitan a, administración oral, intraoral, rectal, transdérmica, bucal, intranasal, pulmonar, subcutánea, intramuscular, intradérmica, sublingual, intracolónica, intraocular, intravenosa o intestinal. El compuesto se formula de acuerdo con la vía de administración basada en la práctica farmacéutica aceptable (Fingl et al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Capítulo 1, pág. 1 (1975); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Las composiciones peptídicas farmacéuticamente aceptables descritas en el presente documento pueden administrarse en múltiples formas de dosificación, tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las que incluye formulaciones de liberación sostenida o de liberación programada), píldoras, polvos, gránulos, elixires, geles *in situ*, microesferas, complejos cristalinos, liposomas, microemulsiones, tinturas, suspensiones, jarabes, pulverizadores de aerosol y emulsiones. las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, intravenosa (bola o infusión), intraperitoneal, subcutánea, forma transdérmica o intramuscular, usando todas formas farmacéuticas bien conocidas por los expertos en la materia farmacéutica. Las composiciones pueden administrarse en solitario, pero generalmente se administrarán con un transportador seleccionado dependiendo de la ruta de administración escogida y a la práctica farmacéutica normalizada.

El régimen de dosificación para las composiciones descritas en el presente documento, por supuesto, variará dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; especie, la edad, del sexo, salud, estado médico y peso del destinatario; la naturaleza y el alcance de los síntomas; la clase de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; la vía de administración, la función renal y hepática del paciente y el efecto deseado. Un médico o un veterinario pueden determinar y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener la evolución del trastorno.

A modo de guía general, la dosificación oral diaria de cada principio activo, cuando se usan para los efectos indicados, estará comprendida de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal al día, y con máxima preferencia de aproximadamente 0,6 a 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, La dosis diaria del principio activo cuando se usa para los efectos indicados oscilará entre 0,001 ng y 100,0 ng por minuto/por kg de peso corporal durante una infusión a velocidad constante. Dicha infusión intravenosa constante se puede administrar preferentemente a una velocidad de 0,01 ng a 50 ng por minuto por kg de peso corporal y, lo más preferentemente, de 0,01 ng a 10,0 mg por minuto por kg de peso corporal.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en una única dosis diaria o la dosis diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones descritas en el presente documento también pueden administrarse mediante una formulación de depósito que permitirá la liberación sostenida del fármaco durante un periodo de días/semanas/meses, según se desee.

Las composiciones descritas en la presente invención pueden administrarse de forma intranasal a través del uso tópico de vehículos intranasales adecuados o a través de vías transdérmicas, usando parches cutáneos transdérmicos. Cuando se administra en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosis será, por supuesto, continua en lugar de intermitente para todo el régimen de dosificación.

Las composiciones se administran normalmente mezclados con diluyentes farmacéuticos adecuados, excipientes o vehículos farmacéuticamente adecuados (denominados colectivamente en el presente documento como transportadores farmacéuticos) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración prevista, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, aerosoles generados con o sin propelente y jarabes, y compatibles con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un transportador inerte oral, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, vehículo inerte, tales como, pero sin limitaciones, lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol y sorbitol; para la administración oral en forma líquida, los componentes de fármacos orales pueden combinarse con cualquier vehículo inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como, pero sin limitación, etanol, glicerol y agua. Adicionalmente, cuando se desee o sea necesario, se pueden incorporar también aglutinantes, lubricantes, disgregantes y agentes colorantes adecuados en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como, pero sin limitación, glucosa o betalactosa, edulcorantes com, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio. Los disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita y goma xantana.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden administrarse en forma de sistemas de administración mixtos micelares o de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Se pueden añadir potenciadores de la permeación para mejorar la absorción del fármaco.

Como se sabe que los profármacos potencian numerosas calidades deseables de los compuestos farmacéuticos (es decir, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar en forma de profármaco.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos farmacológicos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida fenol, polihidroxietilaspirtamidafenol u óxido de polietileno-polilisina sustituido con restos palmitoilo. Asimismo, las composiciones descritas en el presente documento pueden combinarse con una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, polioctoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

Las formas farmacéuticas (composiciones farmacéuticas) adecuadas para la administración pueden contener de aproximadamente 0,01 miligramo a aproximadamente 500 miligramos de principio activo por unidad de dosificación. En estas composiciones farmacéuticas el principio activo estará habitualmente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5-95 % en peso basado en el peso total de la composición.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el principio activo y transportadores en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio y ácido esteárico. Para elaborar comprimidos compactados pueden usarse diluyentes similares. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de la medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar o recubiertos de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmósfera, o pueden estar recubiertos de forma gastrorresistente para la desintegración selectiva en el tracto intestinal.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

En general, agua, un aceite adecuado, solución salina, solución acuosa de dextrosa (glucosa), y soluciones de

azúcares relacionados y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son vehículos adecuados para las soluciones parenterales. La solución para administración parenteral contiene, preferentemente, una sal soluble en agua del principio activo, agentes estabilizantes adecuados y, si es necesario, sustancias tamponantes. Los agentes antioxidantes tales como el bisulfito de sodio, el sulfito de sodio o el ácido ascórbico, bien solos o combinados, son

agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales, y EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propilpabareno y clorobutanol. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Decimonovena edición, Mack Publishing Company (1995), un texto de referencia estándar en este campo.

Cápsulas

Se puede preparar una gran cantidad de cápsulas unitarias llenando cápsulas de gelatina dura de dos piezas estándar con 100 miligramos de principio activo en polvo, 150 miligramos de lactosa, 50 miligramos de celulosa y 6 miligramos de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

Una mezcla de principio activo en un aceite digerible como el aceite de soja, aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva, e inyectar por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina, para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 miligramos de principio activo. Las cápsulas se lavarán y secarán.

Comprimidos

Los comprimidos pueden prepararse mediante procedimientos convencionales de modo que la unidad de dosificación, por ejemplo, sea de 100 miligramos de principio activo, 0,2 miligramos de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 miligramos de celulosa microcristalina, 11 miligramos de almidón y 98,8 miligramos de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos adecuados para incrementar la palatabilidad o retrasar la absorción.

Inyectables

Una formulación inyectable de una composición peptídica descrita en el presente documento puede o no requerir el uso de excipientes como los que han sido aprobados por organismos reguladores. Estos excipientes incluyen, pero sin limitación, disolventes y codisolventes, solubilizante, agentes emulsionantes o espesantes, agentes quelantes, antioxidantes y agentes reductores, los conservantes antimicrobianos, tampones y agentes de ajuste del pH, agentes de carga, protectores y ajustadores de la tonicidad y aditivos especiales. Una formulación inyectable tiene que ser estéril, apirógena y, en el caso de las soluciones, libre de partículas.

Una composición parenteral adecuada para la administración por inyección se puede preparar agitando, por ejemplo, 1,5 % en peso de principio activo en un tampón farmacéuticamente aceptable que puede o no contener un codisolvente u otro excipiente. La solución se convertirá en isotónica con cloruro sódico y se esterilizará.

Suspensión

Se puede preparar una suspensión acuosa para administración oral y/o parenteral de modo que, por ejemplo, cada 5 ml contenga 100 mg de principio activo finamente dividido, 20 mg de carboximetilcelulosa sódica, 5 mg de benzoato de sodio, 1,0 g de solución de sorbitol, U.S.P. y 0,025 ml de vainillina u otro saborizante aceptable.

Micropartículas biodegradables

Puede prepararse una composición parenteral de liberación sostenida adecuada para administración por inyección, por ejemplo, disolviendo un polímero biodegradable adecuado en un disolvente, añadiendo a la solución de polímero el agente activo a incorporar, y eliminando el disolvente de la matriz, formando así la matriz del polímero con el agente activo distribuido por toda la matriz.

Síntesis de péptidos

La descripción de la presente divulgación del presente documento debe interpretarse de manera coherente con las leyes y principios de la unión química. Debe entenderse que los compuestos abarcados por la presente divulgación son aquellos que son estables de forma adecuada para su uso como agente farmacéutico. Un experto en la técnica sabrá qué compuestos serían y no serían estables basándose en los principios generales de la unión y estabilidad química.

La síntesis química de un péptido macrocíclico de la presente divulgación puede llevarse a cabo utilizando diversos métodos reconocidos en la técnica, incluyendo síntesis en fase sólida escalonada, semi-síntesis a través de la religadura conformacional asistida de fragmentos de péptidos, ligadura enzimática de segmentos de péptidos clonados o sintéticos, y ligadura química. Un método preferido para sintetizar los péptidos macrocíclicos y sus análogos descritos en el presente documento es la síntesis química utilizando diversas técnicas en fase sólida, como las que se describen en Chan, W.C. et al., eds., *Fmoc Solid Phase Synthesis*, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pág. 3-284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, Nueva York (1980); y en Stewart, J.M. et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 2.^a edición, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). La estrategia preferida se basa en el grupo Fmoc (9-fluorenilmetilmetiloxycarbonilo) para la protección temporal del grupo α -amino, en combinación con el grupo *tert*-butilo para la protección temporal de las cadenas laterales de aminoácidos (véase, por ejemplo, Atherton, E. et al., "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pág. 1-38, Undenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego (1987).

Los péptidos se pueden sintetizar de manera gradual en un soporte de polímero insoluble (también denominado "resina") a partir del extremo C del péptido. Se comienza una síntesis añadiendo el aminoácido C-terminal del péptido a la resina a través de la formación de un enlace amida o éster. Esto permite la liberación final del péptido resultante como una amida C-terminal o ácido carboxílico, respectivamente.

Se requiere que el aminoácido C-terminal y todos los demás aminoácidos utilizados en la síntesis tengan sus grupos α -amino y funcionalidades de cadena lateral (si están presentes) protegidas diferencialmente de modo que el grupo protector de α -amino pueda eliminarse selectivamente durante la síntesis. El acoplamiento de un aminoácido se realiza mediante la activación de su grupo carboxilo como un éster activo y la reacción del mismo con el grupo α -amino no bloqueado del aminoácido N-terminal unido a la resina. La secuencia de desprotección y acoplamiento del grupo α -amino se repite hasta que se ensambla la secuencia peptídica completa. El péptido se libera de la resina con la desprotección concomitante de las funcionalidades de la cadena lateral, por lo general, en presencia de eliminadores apropiados para limitar las reacciones secundarias. El péptido resultante se purifica finalmente por HPLC de fase inversa.

La síntesis de las resinas de peptidilo requeridas como precursores de los péptidos finales utiliza resinas de polímero de poliestireno reticulado disponibles comercialmente (Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA). Los soportes sólidos preferidos son: resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetil-p-metilbenzhdridilamina (resina de amida Rink MB HA); resina 9-Fmoc-amino-xanten-3-iloxi-Merrifield (resina de amida Sieber); resina 4-(9-Fmoc)aminometil-3,5-dimetoxifenoxi valeril-aminometil-Merrifield (resina PAL), para carboxamidas C-terminales. El acoplamiento de los primeros y posteriores aminoácidos se puede lograr usando HOBt, 6-CI-HOBt o ésteres activos de HOAt producidos a partir de DIC/HOBt, HBTU/HOBt, BOP, PyBOP o de DIC/6-CI-HOBt, HCTU, DIC/HOAt o HATU, respectivamente. Los soportes sólidos preferidos son: resina de cloruro de 2-clorotritilo y resina de 9-Fmoc-amino-xanten-3-iloxi-Merrifield (resina de amida de Sieber) para fragmentos de péptidos protegidos. La carga del primer aminoácido en la resina de cloruro de 2-clorotritilo se logra mejor haciendo reaccionar el aminoácido protegido por Fmoc con la resina en diclorometano y DIEA. Si es necesario, se puede añadir una pequeña cantidad de DMF para facilitar la disolución del aminoácido.

Las síntesis de los análogos de péptidos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo utilizando un sintetizador de péptidos monocanal o multicanal, como un sintetizador de microondas CEM Liberty, o un sintetizador Protein Technologies, Inc. Prelude (6 canales) o Symphony (12 canales).

Los precursores de peptidil-resina para sus respectivos péptidos pueden ser escindidos y desprotegidos usando cualquier procedimiento estándar (véase, por ejemplo, King, D.S. et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990)). Un método deseado es el uso de TFA en presencia de agua y TIS como eliminadores. Habitualmente, la resina de peptidilo se agita en TFA/agua/TIS (94:3:3, v:v:v; 1 ml/100 mg de resina de peptidilo) durante 2-6 horas a temperatura ambiente. La resina gastada se separa por filtración y la solución de TFA se concentra o se seca a presión reducida. El péptido crudo resultante se precipita y se lava con Et₂O o se redisuelve directamente en DMSO o ácido acético acuoso al 50 % para purificación por HPLC preparativa.

Los péptidos con la pureza deseada pueden obtenerse por purificación usando HPLC preparativa, por ejemplo, en un cromatograma de líquidos Waters modelo 4000 o Shimadzu LC-8A. La solución de péptido en bruto se inyecta en una columna YMC S5 ODS (20X 100 mm) y se eluye con un gradiente lineal de MeCN en agua, ambos tamponados con 0,1 % de TFA, utilizando un caudal de 14-20 ml/min con monitorización de efluentes por absorbancia UV a 220 nm. Las estructuras de los péptidos purificados se pueden confirmar mediante análisis electro-pulverización MS.

Ejemplos

Las abreviaturas utilizadas en la presente solicitud, incluidas particularmente en los esquemas y ejemplos ilustrativos que siguen, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Algunas de las abreviaturas utilizadas son las siguientes: HOBt para 1-hidroxibenzotriazol; HBTU para hexafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-

- 5 tetrametiluronio; BOP para Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio; PyBOP para (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio); HCTU para hexafluorofosfato de O-(6-Cl-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; TFA para ácido trifluoroacético; TIS para triisopropilsilano; DMSO para dimetilsulfóxido; MeCN o ACN para acetonitrilo; DCM para 1,1-diclorometano; DIEA o DIPEA para diisopropiletilamina; Fmoc para 9-fluorenilmetiloxycarbonilo; NMM para N-metilmorfolina; NMP para N-metilpirrolidina; Ac para acetilo; y Et para etilo.

Datos analíticos:

- 10 Espectrometría de masas: "ESI-MS (+)" significa la espectrometría de masas de ionización por electropulverización realizada en modo de ion positivo; "ESI-MS (-)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización realizada en modo de ion negativo; "ESI-HRMS (+)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización de alta resolución realizada en modo de ion positivo; "ESI-HRMS (-)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización de alta resolución realizada en modo de ion negativo. Las masas detectadas se informan después de la designación de la unidad "m/z". Los compuestos con masas exactas superiores a 1000 se detectaron a menudo como iones de doble carga o de triple carga.

Análisis LCMS Condición A:

- 20 Columna: BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: agua con 0,05 % de TFA; Fase móvil B: acetonitrilo con 0,05 % de TFA; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 2 % de B a 98 % de B durante 2 minutos, después una retención de 0,5 minutos a 98 % de B; Caudal: 0,8 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición B:

- 25 Columna: BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: acetonitrilo:agua 5:95 con TFA al 0,05 %; Fase móvil B: acetonitrilo:agua 95:5 con TFA al 0,05 %; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,75 minutos al 100 % de B; Caudal: 1,11 ml/min.

30 *Análisis LCMS, Condición C:*

- Columna: BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: agua con 0,2 % de ácido fórmico y 0,01 % de TFA; Fase móvil B: acetonitrilo con 0,2 % de ácido fórmico y 0,01 % de TFA; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 2 % de B a 80 % de B durante 2 minutos, 80 % de B a 98 % de B durante 0,1 minutos, luego retención durante 0,5 minutos a 98 % de B; Caudal: 0,8 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición D:

- 40 Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,75 minutos al 100 % de B; Caudal: 1,11 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición E:

- 45 Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,75 minutos al 100 % de B; Caudal: 1,11 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición F:

- 50 Columna: Waters Xbridge C18, 2,1 x 50 mm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 35 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 4 minutos, después una parada de 1 minutos al 100 % de B; Caudal: 4 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición G:

- 60 Espectrómetro de masas Finnigan LTQ; columna: Phenomenex Jupiter C4, 1 x 50 mm; Fase móvil A: ácido fórmico al 1 % en agua; Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo; Temperatura: 30 °C; Gradiente: 1 % de B, 1 min de retención; 1-95 % de B durante 3 minutos, después una retención de 3 minutos a 95 % de B; Caudal: 0,15 ml/min.

Análisis LCMS, Condición H:

- 65 Columna: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C;

Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,5 minutos al 100 % de B; Caudal: 1,0 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis LCMS, Condición I:

5 Columna: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,5 minutos al 100 % de B; Caudal: 0,5 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis HPLC, Condición A:

10 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 35 % de B a 80 % de B durante 25 min; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición B:

20 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 25 % de B a 75 % de B durante 25 min; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición C:

25 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 20 % de B a 70 % de B durante 25 min; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición D:

30 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 15 % de B a 65 % de B durante 25 min; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición E:

35 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 25 % de B a 60 % de B durante 20 min; Caudal: 1,25 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición F:

40 Columna: YMC Pack ODS-AQ 3µm 150x4,6 mm Fase móvil A: agua con 0,1 % de TFA; Fase móvil B: Acetonitrilo con TFA al 0,1%; Temperatura: 60 °C; Gradiente: de 25 % de B a 65 % de B durante 20 min; Caudal: 1,25 ml/min; Detección: UV a 217 nm.

Análisis HPLC, Condición G

50 Columna: Sunfire C18 3,5 µm, 3,0x150 mm; Fase móvil A: 5:95 acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético; temperatura: 50 °C; Gradiente: 10-100 % de B durante 12 minutos, después una parada de 3 minutos al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis HPLC, Condición H

55 Columna: Xbridge Phenyl 3,5x150µm, Fase móvil A: 5:95 acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 acetonitrilo: agua con 0,05 % de ácido trifluoroacético; temperatura: 50 °C; Gradiente: 10-100 % de B durante 12 minutos, después una parada de 3 minutos al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Análisis HPLC, Condición I:

60 Columna: Phenomenex Luna 5u C18(2) 150 x 4,6 mm; fase móvil A: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético, fase móvil B: acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético, Gradiente 5-100 % de B durante 20 min, después, una retención de 5 minutos a 100 % de B; caudal 1 ml/min, Detección: UV a 220

65

Análisis HPLC, Condición J:

Columna: Phenomenex Luna 5u C18(2) 150 x 4,6 mm; fase móvil A: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético, fase móvil B: acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético, Gradiente 10-100 % de B durante 20 min, después, una retención de 5 minutos a 100 % de B; caudal 1 ml/min, Detección: UV a 220

*Procedimientos generales:**Método Prelude A:*

Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 o 45 ml equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos Prelude a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Los reactivos restantes se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para contactar la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 30 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. DMF = dimetilformamida; DIC = N,N'-diisopropilcarbodiimida; HOAt = 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método Prelude A" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 140 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de los aminoácidos Fmoc-N-metilo y el acoplamiento a un extremo N de amina secundaria utilizaron el "Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria" que se describe a continuación. El acoplamiento del grupo cloroacetilo al extremo N del péptido se describe mediante el "Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo" o el "Procedimiento de acoplamiento de ácido cloroacético" detallados a continuación.

Procedimiento de expansión de la resina:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 40 ml se añadió Merrifield: resina Sieber (140 mg, 0,100 mmol). La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (5,0 ml) y DCM (5,0 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución del aminoácido y HOAt (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), luego DIC (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq). La mezcla se agitó rápidamente durante 60 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la

siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

- 5 Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
- 10 periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución del aminoácido y HOAt (0,2M en DMF, 5,0 ml, 5 eq), luego DIC (0,2M en DMF, 5,0 ml, 5 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante 300 min, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la
- 20 siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo:

- 25 Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadieron 3,0 ml de una solución de DIPEA (4,0 mmol, 0,699 ml, 40 eq) y cloruro de cloroacetilo (2,0 mmol, 0,160 ml, 20 eq) en DMF. La mezcla se agitó periódicamente durante de 12 a 18 horas, a continuación, la solución se drenó. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DCM (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución.
- 35

Método B Prelude:

- 40 Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). Todos los procedimientos se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 o 45 ml equipado con una frita inferior. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Los reactivos restantes se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para contactar la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 30 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH;
- 50 Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.
- 55

- Los procedimientos del "Método Prelude B" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a
- 60 aproximadamente 140 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos al extremo N de una amina secundaria utilizó el "Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria" descrito a continuación. El acoplamiento del grupo cloroacetilo al extremo N del
- 65

péptido se describe mediante el "Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo" o el "Procedimiento de acoplamiento de ácido cloroacético" detallados a continuación.

Procedimiento de expansión de la resina:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 40 ml se añadió Merrifield: resina Sieber (140 mg, 0,100 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió DMF (5,0 ml) y DCM (5,0 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), luego HCTU (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 2,5 ml, 20 eq). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de doble acoplamiento:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), luego HCTU (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 2,5 ml, 20 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces con DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), luego HCTU (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 2,5 ml, 20 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 10 eq), luego HCTU (0,2M en DMF, 2,5 ml, 10 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,5 ml, 12 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante 12 horas, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento A de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo:

Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La

mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadieron 3,0 ml de una solución de DIPEA (4,0 mmol, 0,699 ml, 40 eq) y cloruro de cloroacetilo (2,0 mmol, 0,160 ml, 20 eq) en DMF. La mezcla se agitó periódicamente durante de 12 a 18 horas, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió CH₂Cl₂ (2,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita.

Procedimiento B de acoplamiento de ácido cloroacético:

Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió DMF (2,0 ml), ácido cloroacético (1,2 mmol, 113 mg, 12 eq) y N, N'-diisopropilcarbodiimida (1,2 mmol, 0,187 ml, 12 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante de 12 a 18 horas, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió CH₂Cl₂ (2,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita.

Método C de Prelude:

Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 o 45 ml equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos Prelude a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Los reactivos restantes se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para contactar la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 30 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. La solución HATU se usó dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método Prelude C" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 140 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos al extremo N de una amina secundaria utilizó el "Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria" descrito a continuación. El lavado final de la resina utilizó el "procedimiento de lavado final" que se describe a continuación.

Procedimiento de expansión de la resina:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 40 ml se añadió Merrifield: resina Sieber (140 mg, 0,100 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió

DMF (5,0 ml) y DCM (5,0 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

5 Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para
10 cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 5,0 ml, 10 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 2,5 ml, 20 eq). La mezcla se agitó durante 60 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió
15 DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
20 periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

25 Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
30 periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 1,5 ml, 12 eq). La mezcla se agitó durante 300 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
35 periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 1,5 ml, 12 eq). La mezcla se agitó durante 300 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
40 periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento adaptado de acoplamiento de aminoácidos:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de
50 reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se le añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 0,5 a 2,5 ml, 1 a 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 0,5 a 2,5 ml, 1 a 5 eq), y
55 finalmente DIPEA (0,8 M en DMF, 0,5 a 1,5 ml, 4 a 12 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante 60 minutos a 600 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a
60 continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de lavado final:

La resina se lavó sucesivamente dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DCM (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de ácido cloroacético:

Obsérvese la etapa Manual. Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó hasta la temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se drenó la solución a través de una frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió DMF (2,0 ml), ácido cloroacético (1,2 mmol, 113 mg, 12 eq) y N, N'-diisopropilcarbodiimida (1,2 mmol, 0,187 ml, 12 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante de 12 a 18 horas, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió CH₂Cl₂ (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita.

Método D de Prelude:

Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 o 45 ml equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos Prelude a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Los reactivos restantes se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para contactar la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 30 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. La solución HATU se usó dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método Prelude D" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 140 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos al extremo N de una amina secundaria utilizó el "Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria" descrito a continuación. El lavado final de la resina utilizó el "procedimiento de lavado final" que se describe a continuación.

Procedimiento de expansión de la resina:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 40 ml se añadió Merrifield: resina Sieber (140 mg, 0,100 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió DMF (5,0 ml) y DCM (5,0 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,75 ml, 5 eq). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 15 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,75 ml, 5 eq). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se le añadió el amino (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 2,5 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,75 ml, 5 eq). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 15 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 15 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de lavado final:

La resina se lavó sucesivamente dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DCM (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de ácido cloroacético:

Obsérvese la etapa Manual. Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó hasta la temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se drenó la solución a través de una frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió DMF (2,0 ml), ácido cloroacético (1,2 mmol, 113 mg, 12 eq) y N, N'-diisopropilcarbodiimida (1,2 mmol, 0,187 ml, 12 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante de 12 a 18 horas, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó

sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió CH_2Cl_2 (4,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita.

5 *Método A de CEM:*

Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos de microondas CEM Liberty (CEM Corporation). Todos los procedimientos, a menos que se indique otra cosa, se realizaron en un tubo de polipropileno de 30 o 125 ml equipado con una frita inferior para una unidad de microondas CEM Discovery. El tubo se conecta al sintetizador CEM Liberty a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior e inferior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Todas las soluciones se eliminan a través de la parte inferior del tubo, excepto durante la transferencia de resina desde la parte superior. El "burbujeo periódico" describe un breve burbujeo de gas N_2 a través de la frita inferior. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. La solución HATU se usó dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Otras resinas comunes, como Rink, clorotritilo, u otros enlazadores sensibles al ácido pueden emplearse en la síntesis. Se utiliza resina de amida Sieber a menos que se indique lo contrario en ejemplos específicos. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Orn(Boc)-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método A CEM" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 140 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos al extremo N de una amina secundaria utilizó el "Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria" descrito a continuación. El acoplamiento del grupo cloroacetilo al extremo N del péptido se describe mediante el "Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo" o el "Procedimiento de acoplamiento de ácido cloroacético" detallados anteriormente.

40 *Procedimiento de expansión de la resina:*

A 50 ml de tubo cónico de polipropileno se añadió resina Merrifield:Sieber (140 mg, 0,100 mmol). A continuación se añadió DCM (7 ml) al tubo, seguido de MeOH (7 ml). La resina se transfirió luego al recipiente de reacción desde la parte superior del recipiente. El procedimiento se repite adicionalmente dos veces. se añadió DMF (7 ml), seguido de DCM (7 ml). La resina se dejó expandir con burbujeo de N_2 desde el fondo del recipiente de reacción durante 15 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita.

50 *Procedimiento de acoplamiento estándar:*

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se le añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), HATU (0,5M en DMF, 1,0 ml, 5 eq) y DIPEA (2M en NMP, 0,5 ml, 10 eq). La mezcla se mezcló mediante burbujeo de N_2 durante 5 minutos a 75 °C para todos los aminoácidos, excepto Fmoc-Cys (Trt) -OH y Fmoc-His (Trt) -OH que se acoplan a 50 °C, la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se burbujó periódicamente durante 2 minutos a 65 °C, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de doble pareja:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se le añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), HATU (0,5M en DMF, 1,0 ml, 5 eq) y DIPEA (2M en NMP, 0,5 ml, 10 eq). La mezcla se mezcló mediante burbujeo de N₂ durante 5 minutos a 75 °C para todos los aminoácidos, excepto Fmoc-Cys (Trt) -OH y Fmoc-His (Trt) -OH que se acoplan a 50 °C, la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se le añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), HATU (0,5M en DMF, 1,0 ml, 5 eq) y DIPEA (2M en NMP, 0,5 ml, 10 eq). La mezcla se mezcló mediante burbujeo de N₂ durante 5 minutos a 75 °C para todos los aminoácidos, excepto Fmoc-Cys (Trt) -OH y Fmoc-His (Trt) -OH que se acoplan a 50 °C, la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se burbujeó periódicamente durante 2 minutos a 65 °C, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

Al recipiente de reacción que contenía la resina de la etapa anterior se añadió una solución de piperazina al 5 % y HOBt 0,1 M en DMF (7 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos a 75 °C y luego la solución se drenó. Este procedimiento se repitió una vez más. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se le añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), HCTU (0,5M en DMF, 1,0 ml, 5 eq) y DIPEA (2M en NMP, 0,5 ml, 10 eq). La mezcla se mezcló mediante burbujeo de N₂ durante 5 minutos a 75 °C para todos los aminoácidos (50 °C para Fmoc-Cys (Trt)-OH y Fmoc-His (Trt)-OH), seguido de 6 horas sin calentamiento. Después de drenar, la resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se burbujeó periódicamente durante 2 minutos a 65 °C, a continuación, la solución se drenó. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento adaptado de acoplamiento de aminoácidos:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió una solución de piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se añadió la solución de aminoácidos (1,25 ml a 5 ml, 2,5 eq a 10 eq) que contenía HATU (2,5 eq a 10 eq), y finalmente DIPEA (2M en NMP, 0,5 ml a 1 ml, 20 eq). La mezcla se mezcló mediante burbujeo de N₂ durante 5 minutos a 2 horas a una temperatura de 25 °C a 75 °C, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. Al recipiente de reacción se añadió una solución de anhídrido acético:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5,0 ml). La mezcla se burbujeó periódicamente durante 2 minutos a 65 °C, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: Lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior, seguido de lavado con DMF (7 ml) desde la parte inferior y finalmente con lavado con DMF (7 ml) desde la parte superior. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Método A Symphony:

Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Symphony (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de

polipropileno Symphony equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos Symphony a través de la parte inferior y superior del tubo. Todos los disolventes, DMF, DCM, los aminoácidos y los reactivos se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para entrar en contacto con la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 15 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. La solución HATU se usó dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; NMM = n-metil morfolina; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Otras resinas sensibles a los ácidos comunes también se pueden usar en la síntesis, como resinas Rink o de cloro tritilo funcionalizadas. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método A Symphony" describen un experimento realizado en una escala de 0,050 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 70 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,050 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrito a continuación como "procedimiento de expansión". El acoplamiento de aminoácidos a un extremo N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento estándar" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos a un extremo N de amina secundaria utilizó el "doble acoplamiento", los aminoácidos adaptados se acoplan mediante una adición en blanco manual del aminoácido "acoplamiento en blanco" que se describe a continuación.

Procedimiento de expansión:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno Symphony se añadió resina Merrifield:Sieber (70 mg, 0,050 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento estándar:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como

sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

5 Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml). después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 300 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 300 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

25 Procedimiento adaptado de acoplamiento de aminoácidos:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml). después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La síntesis se detuvo mediante el software Symphony para añadir al recipiente de reacción manualmente el aminoácido adaptado (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego se reinició la automatización: para añadir HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 300 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó seis veces de la manera siguiente y se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió la mezcla AC2O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2,5 ml) periódicamente agitada durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Método B Symphony:

45 Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Symphony (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de polipropileno Symphony equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos Symphony a través de la parte inferior y superior del tubo. Todos los disolventes, DMF, DCM, los aminoácidos y los reactivos se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para entrar en contacto con la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 15 segundos. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. La solución HATU se usó dentro de los 5 días de preparación. DMF = dimetilformamida; HCTU tetrafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; NMM = n-metil morfolina; DIPEA = diisopropiletilamina; Sieber = Fmoc-amino-xanten-3-iloxi, donde "3-iloxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un conector Sieber (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,71 mmol/g. Otras resinas sensibles a los ácidos comunes también se pueden usar en la síntesis, como resinas Rink o de cloro tritilo funcionalizadas. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método B Symphony" describen un experimento realizado en una escala de 0,050 mmol,

donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 70 mg de la resina Sieber-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,050 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrito a continuación como "procedimiento de expansión". El acoplamiento de aminoácidos a un extremo N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento estándar" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos al extremo N de una amina secundaria usó el "*Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria 5*". Los aminoácidos adaptados se acoplan a través de una adición en blanco manual del aminoácido "*Procedimiento adaptado de acoplamiento de aminoácidos*" que se describe a continuación, y el anhídrido de cloroacetilo se agrega a la posición final de la secuencia utilizando el "*procedimiento de protección final*" que se describe a continuación.

Procedimiento de expansión:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno Symphony se añadió resina Merrifield:Sieber (70 mg, 0,050 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento estándar:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió la mezcla AC2O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2,5 ml) periódicamente agitada durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como

sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió la mezcla AC20/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 ml) periódicamente agitada durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento adaptado de acoplamiento de aminoácidos:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml). después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. El sistema se detuvo mediante el sistema para la adición manual del aminoácido adaptado al recipiente de reacción (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), luego se reinició la automatización para añadir a la vesícula de reacción HATU (0,2M en DMF, 1,25 ml, 5 eq), y finalmente NMM (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió la mezcla AC20/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 ml) periódicamente agitada durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de protección final:

La resina se lavó tres veces del siguiente modo: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,5 ml). después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente con burbujeo de N₂ desde el fondo del recipiente de reacción durante 30 segundos antes de drenar el disolvente a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,5 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 2,5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió NMM (0,8 M en DMF, 1,25 ml, 10 eq) seguido de la adición del anhídrido cloroacético (0,4 M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó con DMF (6,25 ml) agregada a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió NMM (0,8 M en DMF, 1,25 ml, 10 eq) seguido de la adición del anhídrido cloroacético (0,4 M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó 6 veces del siguiente modo: se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió la mezcla AC20/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 ml) periódicamente agitada durante 10 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DCM (2,5 ml) a través del fondo del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se secó luego con una corriente de nitrógeno durante 10 minutos.

Método de desprotección global A:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método de desprotección global A" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético:agua: triisopropilsilano:ditiotretol (92,5:2.5:2.5:2,5 v:v:v:p). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a una jeringa de 25 ml equipada con una frita. A la jeringa se añadió la "solución de desprotección" (5,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 85 minutos. La solución se filtró, se concentró y se diluyó en éter dietílico (30 ml). El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío.

El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de desprotección global B:

- 5 Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método de desprotección global B" describe un experimento realizado en una escala de 0,04 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,04 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético: triisopropilsilano (96:4; v/v). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a una jeringa de 10 ml equipada con una frita. A la jeringa se añadió la "solución de desprotección" (2,0-3,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 1 hora o 1.5 horas. La solución se filtró, se lavó con solución de desprotección (0,5 ml), se concentró y se diluyó en éter dietílico (30 ml). El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío. El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de desprotección global C:

- 20 Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de desprotección global C" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético: triisopropilsilano: ditiotretol (95:2,5:2,5 v:v:p). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un tubo Bio-Rad. Al tubo Bio-Rad se añadió la "solución de desprotección" (4,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 60 minutos. La solución se filtró y se diluyó en éter dietílico (30 ml). El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío. El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de desprotección global D:

- 35 Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método de desprotección global B" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético: triisopropilsilano: ditiotretol (94:3:3 v:v:p). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a una jeringa de 25 ml equipada con una frita. A la jeringa se añadió la "solución de desprotección" (5,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 5 minutos. La solución se filtró y se diluyó en éter dietílico (30 ml). El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío. El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de desprotección global E:

- 50 Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de desprotección global E" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Fmoc Gly-CITrt unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético: triisopropilsilano: ditiotretol (95:2,5:2,5 v:v:p). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un tubo Bio-Rad. Al tubo Bio-Rad se añadió la "solución de desprotección" (2,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 3 minutos. La solución se filtró y se recogió en un tubo de centrifuga. Al tubo Bio-Rad se añadió la "solución de desprotección" (2,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 3 minutos. La solución se filtró y se recogió en un tubo de centrifuga. La solución en el tubo de centrifuga se dejó sedimentar durante 60 minutos. La solución recogida se diluyó luego con éter dietílico (30 ml) y se formó un precipitado. El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío. El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de desprotección global F:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de desprotección global F" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Rink unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" utilizando ácido trifluoroacético:triisopropilsilano:ditiotretol (95:2,5:2,5 v:v:p). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un tubo Bio-Rad de 6 ml. Al Bio-Rad se añadió la "solución de desprotección" (4,0 ml). La mezcla se mezcló en un agitador durante 90 minutos. La solución se filtró y se diluyó en éter dietílico (30 ml). El sólido precipitado se centrifugó durante 3 minutos. La solución sobrenadante se decantó y el sólido se resuspendió con éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se suspendió en éter dietílico (25 ml). La suspensión se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido restante se secó a alto vacío. El péptido en bruto se obtuvo como un sólido blanco a blanquecino.

Método de ciclización A

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique lo contrario. El procedimiento del "Método de ciclización A" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos peptídicos crudos se disolvieron en una solución de acetonitrilo:guanidina 8 M acuosa/TRIS 50 mM (1:3) (pH 8,6) (7 ml:18 ml o una proporción similar), y la solución se ajustó a pH = 8,5-9,0 usando NaOH ac. (1,0M), si es necesario. La solución se mezcló después usando un agitador durante de 12 a 18 horas. Después, la solución de reacción se concentró y el residuo se disolvió después en acetonitrilo:agua. Esta solución se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

Método de ciclización C:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de ciclización C" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos peptídicos crudos se disolvieron en una solución de acetonitrilo:tampón de bicarbonato amónico acuoso 0,1M (11 ml:24 ml o una proporción similar), y la solución se ajustó cuidadosamente a pH = 8,5-9,0 usando NaOH ac. (1,0M). La solución se mezcló después usando un agitador durante de 12 a 18 horas. Después, la solución de reacción se concentró y el residuo se disolvió después en acetonitrilo:agua. Esta solución se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

Métodos D de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de ciclización D" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos peptídicos crudos se disolvieron en una solución de acetonitrilo:tampón bicarbonato de amonio 0,1 M acuoso (11 ml: 24 ml), y la solución se ajustó luego cuidadosamente a pH = 8,5-9,0 utilizando NaOH ac. (1,0M). La solución se mezcló luego con agitación durante 12 a 18 horas. Después, la solución de reacción se concentró y el residuo se disolvió después en acetonitrilo:agua. Esta solución se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

Métodos E de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de ciclización E" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos peptídicos crudos se disolvieron en una solución de tampón de HCl guanidina 6 M acuoso (15 ml), luego la solución se mezcló con agitación durante 12 a 18 horas. La solución de reacción se concentró y se añadieron 15 ml de DMSO al residuo dando una suspensión espesa que se filtró. Esta solución filtrada se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

Procedimiento de acoplamiento manual A:

Al recipiente de reacción Bio-Rad que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 5 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cinco veces de la siguiente manera: para cada lavado, Se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (1,2-10 equivalentes) típico (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), luego HATU (1,210 equivalentes) típico (0,2M en DMF, 2,5 ml, 5 eq), y finalmente DIPEA (2,4-20 equivalentes) típico (0,8M en DMF, 1,25 ml, 10 eq). Se agitó la mezcla durante 60 minutos a 18 horas, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, Se añadió DMF (4,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó durante 60 segundos antes de drenar la solución a través de la frita.

Método A de N-metilación en resina. (Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. H. *J. Org. Lett.* 2013, 15(19), 5012-5015):

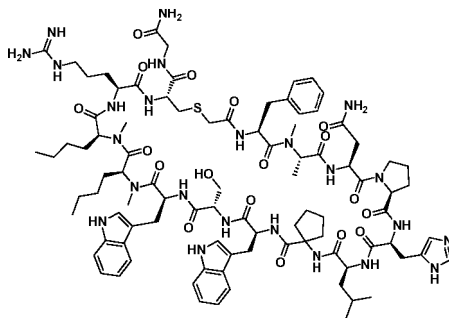
Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método A de N-metilación en resina" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Sieber unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala.

La resina se transfirió a una jeringa fritada de 25 ml. A la resina se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 5,0 ml). La mezcla se agitó durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó 3 veces con DMF (4,0 ml). Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 4,0 ml). La mezcla se agitó durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces con DMF (4,0 ml) y tres veces con DCM (4,0 ml). La resina se suspendió en DMF (2,0 ml) y TRIFLUOROACETATO DE ETILO (0,119 ml, 1,00 mmol), 1,8-DIAZABICICLO[5.4.0]UNDEC-7-ENO (0,181 ml, 1,20 mmol). La mezcla se puso en un agitador durante 60 minutos. La solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces con DMF (4,0 ml) y tres veces con DCM (4,0 ml).

La resina se lavó tres veces con THF seco (2,0 ml) para eliminar el agua residual. En un horno seco, se añadió un vial de 4,0 ml de THF (1,0 ml) y TRIPHENILFOSFINA (131 mg, 0,500 mmol) en tamices moleculares secos de 4 Å (20 mg). La solución se transfirió a la resina y lentamente se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,097 ml, 0,5 mmol). La resina se agitó durante 15 minutos. La solución se drenó a través de la frita y la resina se lavó tres veces con THF seco (2,0 ml) para eliminar el agua residual. En un horno seco se añadió un vial de 4,0 ml de THF (1,0 ml), TRIFENILFOSFINA (131 mg, 0,500 mmol) en tamices moleculares secos de 4 Å (20 mg). La solución se transfirió a la resina y lentamente se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,097 ml, 0,5 mmol). La resina se agitó durante 15 minutos. La solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces con DMF (4,0 ml) y tres veces con DCM (4,0 ml). La resina se suspendió en etanol (1,0 ml) y THF (1,0 ml), y se añadió BOROHIDRURO DE SODIO (37,8 mg, 1,000 mmol). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó sucesivamente tres veces con DMF (4,0 ml) y tres veces con DCM (4,0 ml).

Microcleavage A:

A una pequeña muestra de resina de <10 mg se añaden 2 gotas de TIS y 1 ml de ácido trifluoroacético, se agita a temperatura ambiente. Después de 1 hora, se retira una pequeña alícuota y se diluye con 0,5 ml de acetonitrilo, se filtra y se obtiene análisis por LC-MS.

Preparación del ejemplo 1001

El Ejemplo 1001 se preparó en Resina Rink siguiendo los procedimientos sintéticos generales:

Fmoc-Gly-OH se siguió el "Método B Symphony: Procedimiento de expansión de resina "

Fmoc-Cys (Trt) -OH se siguió el "Método B Symphony: procedimiento de acoplamiento estándar "

Fmoc-Arg (Pbf) -OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

5 Fmoc-nMetil-Nle-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

Fmoc-nMetil-Nle-OH se siguió el "Método B Symphony: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*"

10 Fmoc-Trp (Boc)-OH se siguió el "Método B Symphony: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*"

Fmoc-Ser(tBu)-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

Fmoc-Trp (Boc)-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

15 Fmoc-Ciclopentil-Gly-OH se siguió el "Procedimiento de acoplamiento manual A"

Fmoc-Leu-OH se siguió el "Método B Symphony: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*"

20 Fmoc-His (Trt)-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

Fmoc-Pro-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

Fmoc-Asn (Trt) -OH se siguió el "Método B Symphony: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*"

25 Fmoc-nMetil- Ala-OH se siguió el "Método B Symphony: *procedimiento de acoplamiento estándar*"

Fmoc-Leu-OH se siguió el "Método B Symphony: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*"

30 Se siguió el Método B Symphony: *procedimiento de protección final*"

Se siguió el "Método de desprotección global F"

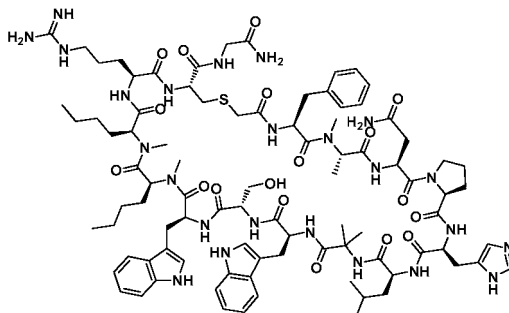
Se siguió el "Método de ciclización D"

35 El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: Waters XBridge C18, 19 x 250 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Gradiente: 15-65 % de B durante 25 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del
40 producto fue de 6,4 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %.

Análisis LCMS, Condición D: Tiempo de retención = 1,67 min; ESI-MS(+) *m/z* 947,2 (M+2H).

Análisis LCMS, Condición E: Tiempo de retención = 1,57 min; ESI-MS(+) *m/z* 946,7 (M+2H).

45 Preparación del Ejemplo de referencia 1002



50 El Ejemplo 1002 se preparó en Resina Rink siguiendo la secuencia sintética general descrita para la preparación del Ejemplo 1001, compuesto por los siguientes procedimientos generales: "Método Symphony B: *Procedimiento de expansión de la resina*", "Método Symphony B: *Procedimiento de acoplamiento estándar*", "Método Symphony B: *Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria*", "Procedimiento de acoplamiento manual A", "Método Symphony B: *Procedimiento de protección final*", "Método de desprotección global F" y "Método de ciclización D".

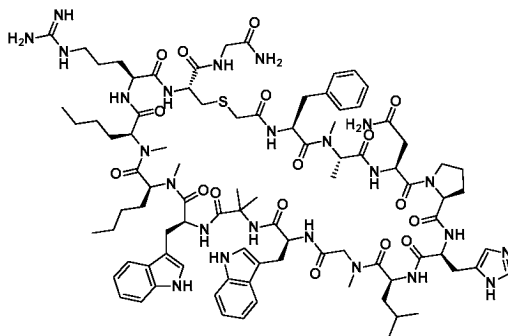
55 El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: Waters XBridge

C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 15-65 % de B durante 25 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 6,0 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %.

Análisis LCMS, Condición D: Tiempo de retención = 1,60 min; ESI-MS(+) m/z 934,0 (M+2H).

Análisis LCMS, Condición E: Tiempo de retención = 1,52 min; ESI-MS(+) m/z 933,9 (M+2H).

10 Preparación del Ejemplo de referencia 1003



El Ejemplo 1003 se preparó en Resina Rink siguiendo la secuencia sintética general descrita para la preparación del Ejemplo 1001, compuesto por los siguientes procedimientos generales: "Método Symphony B: Procedimiento de expansión de la resina", "Método Symphony B: Procedimiento de acoplamiento estándar", "Método Symphony B: Procedimiento de acoplamiento de amina secundaria", "Procedimiento de acoplamiento manual A", "Método Symphony B:

20 *Procedimiento de protección final*", "Método de desprotección global F" y "Método de ciclización D".

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: Waters XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 15-65 % de B durante 25 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 2,2 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %.

Análisis LCMS, Condición D: Tiempo de retención = 1,58 min; ESI-MS(+) m/z 926,7 (M+2H).

Análisis LCMS, Condición E: Tiempo de retención = 1,51 min; ESI-MS(+) m/z 926,2 (M+2H).

Datos analíticos del compuesto 5001:

Espectrometría de masas: "ESI-MS (+)" significa la espectrometría de masas de ionización por electropulverización realizada en modo de ion positivo; "ESI-MS (-)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización realizada en modo de ion negativo; "ESI-HRMS (+)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización de alta resolución realizada en modo de ion positivo; "ESI-HRMS (-)" significa espectrometría de masas de ionización por electropulverización de alta resolución realizada en modo de ion negativo. Las masas detectadas se informan después de la designación de la unidad "m/z". Los compuestos con masas exactas superiores a 1000 se detectaron a menudo como iones de doble carga o de triple carga.

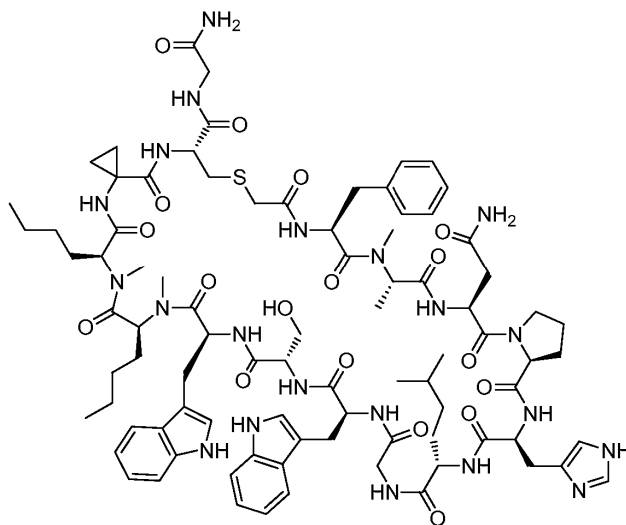
Condición A del análisis del Compuesto 5001:

Columna: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0 % de B, 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,5 minutos al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Condición B de análisis del compuesto 5001:

Columna: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol:agua con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol:agua con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0 % de B, 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,5 minutos al 100 % de B; Caudal: 0,5 ml/min; Detección: UV a 220 nm.

Preparación del ejemplo 5001



- 5 El ejemplo 5001 se prepara del siguiente modo. A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 10 ml se le añadió resina Rink-Merrifield (178 mg, 0,100 mmol) y el recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Prelude. Se siguió el "Método A Prelude: Procedimiento de expansión de resina". Luego, se realizó una serie de acoplamientos de aminoácidos en el Prelude siguiendo el "Método A Prelude: Procedimiento de acoplamiento simple" si el extremo N del péptido unido a la resina era una amina primaria o "Método Prelude A: Procedimiento de doble acoplamiento" si el extremo N del péptido unido a la resina era una amina secundaria. Se siguió el "Método Prelude A: procedimiento de acoplamiento del cloruro de cloroacetilo; luego se siguió el "Método de desprotección global A"; luego se siguió el "Método de ciclización A". Como se indica, En la síntesis se utilizó ácido 1-((((9H-fluoren-9-il) metoxi)carbonil)amino)ciclopropanocarboxílico (Fmoc-AcPc-OH). El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5
- 10
- 15 μm ; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 10-50 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 14,1 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 95 %.

20

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 2,10 min; ESI m/z 888,3 (M-2H).

Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,85 min; ESI-MS(+) m/z 890,5 (M+2H).

25 Todos los ejemplos ejemplificados a continuación se prepararon siguiendo la "Secuencia sintética general A"

25

Secuencia de síntesis general A:

- La "secuencia de síntesis general A" describe una secuencia general de procedimientos que se utilizaron para producir los péptidos cíclicos descritos en el presente documento. Para los fines de este procedimiento general, los procedimientos del "Método A Symphony" son intercambiables con los del "Método A Prelude". A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 10 ml se le añadió resina Rink-Merrifield (178 mg, 0,100 mmol) y el recipiente de reacción se colocó en el sintetizador de péptidos Prelude. Se siguió el "Método A Prelude: Procedimiento de expansión de resina ". Luego, se realizó una serie de acoplamientos de aminoácidos en el Prelude siguiendo el "Método A Prelude: Procedimiento de acoplamiento simple" si el extremo N del péptido unido a la resina era una amina primaria o "Método Prelude A: Procedimiento de doble acoplamiento" si el extremo N del péptido unido a la resina era una amina secundaria. "Método A Prelude: Se siguió el procedimiento de acoplamiento del cloruro de cloroacetilo; luego se siguió el "Método de desprotección global A"; luego se siguió el "Método de ciclización A".
- 30
- 35

40 *Procedimientos generales:*

Método Prelude A:

- Todas las manipulaciones se realizaron bajo automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). Todos los procedimientos, a menos que se indique lo contrario, se realizaron en un tubo de polipropileno de 10 ml equipado con una frita inferior; cuando la escala de la reacción superó los 0,100 mmol, se usó un tubo de polipropileno de 40 ml equipado con una frita inferior. El tubo se conecta al sintetizador de péptidos
- 45

Prelude a través de la parte inferior y superior del tubo. Se pueden añadir DMF y DCM a través de la parte superior del tubo, que lava por igual los lados del tubo. Los reactivos restantes se añaden a través de la parte inferior del tubo y pasan a través de la frita para contactar la resina. Todas las soluciones se eliminan a través del fondo del tubo. "Agitación periódica" describe un breve pulso de gas N₂ a través de la frita inferior; el pulso dura aproximadamente 5 segundos y ocurre cada 30 segundos. Las soluciones de cloruro de cloroacetilo en DMF se utilizaron dentro de las 24 horas de la preparación. Las soluciones de aminoácidos generalmente no se utilizaron más allá de tres semanas desde la preparación. Las soluciones HATU se usaron dentro de los 5 DÍAS de preparación. DMF = dimetilformamida; HATU= hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; DIPEA = diisopropiletilamina; Rink = (2,4-dimetoxifenil)(4-alcóxifenil)metanamina, cuando "4-alcóxi" describe la posición y el tipo de conectividad a la resina de poliestireno. La resina utilizada es el polímero Merrifield (poliestireno) con un enlazador Rink (Fmoc protegido en nitrógeno); malla 100-200, 1 % de DVB, Carga de 0,56 mmol/g. Los aminoácidos comunes utilizados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadena lateral indicados entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Los procedimientos del "Método Prelude A" describen un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Rink unido a la resina. Esta escala corresponde a aproximadamente 178 mg de la resina Rink-Merrifield descrita anteriormente. Todos los procedimientos se pueden escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de expansión de la resina, descrita a continuación como "Procedimiento de expansión de la resina". El acoplamiento de aminoácidos a un término N de amina primaria usó el "procedimiento de acoplamiento único" que se describe a continuación. El acoplamiento de aminoácidos a un extremo N de amina secundaria usó el "procedimiento de doble acoplamiento" que se describe a continuación. El acoplamiento del cloruro de cloroacetilo al extremo N del péptido se describe en el "Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo" que se detalla a continuación.

Procedimiento de expansión de la resina:

A un recipiente de reacción en fase sólida de polipropileno de 10 ml se añadió resina Merrifield:Rink (178 mg, 0,100 mmol). La resina se lavó (expandió) tres veces de la siguiente manera: al recipiente de reacción se añadió DMF (2,0 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente durante 10 minutos antes de drenar el disolvente a través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento simple:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,5 ml, 4 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió anhídrido acético (2,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de doble acoplamiento:

Al recipiente de reacción que contenía resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,5 ml, 4 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a

través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió el aminoácido (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), luego HATU (0,2M en DMF, 1,0 ml, 2 eq), y finalmente DIPEA (0,8M en DMF, 0,5 ml, 4 eq). La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó dos veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó
 5 periódicamente durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió anhídrido acético (2,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90
 10 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo:

Al recipiente de reacción que contiene la resina de la etapa anterior se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La
 15 mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió piperidina:DMF (20:80 v/v, 2,0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 3 minutos y luego la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente seis veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a través de la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente
 20 durante 30 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. Al recipiente de reacción se añadió DIPEA (0,8 M en DMF, 3,0 ml, 24 eq), luego cloruro de cloroacetilo (0,8M en DMF, 1,65 ml, 13,2 eq). La mezcla se agitó durante 30 minutos, a continuación, la solución se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente tres veces como sigue: para cada lavado, se añadió DMF (2,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina se lavó
 25 sucesivamente cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se añadió CH_2Cl_2 (2,0 ml) a la parte superior del recipiente y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 90 segundos antes de drenar la solución a través de la frita. La resina resultante se colocó bajo una corriente de N_2 durante 15 minutos.

Método A Symphony:

30 Esta colección de procedimientos es idéntica a la del "Método Prelude A", excepto cuando se indica. Para todos los procedimientos se usó un sintetizador de péptidos Symphony X (Protein Technologies) en lugar de un sintetizador de péptidos Prelude y todos los reactivos se añadieron a través de la parte superior del recipiente de reacción.

Procedimiento de expansión de la resina:

35 Este procedimiento es idéntico al "Método Prelude A: Procedimiento de expansión de resina".

Procedimiento de acoplamiento simple:

40 Este procedimiento es idéntico al "Método Prelude A: Procedimiento de acoplamiento simple" excepto que la concentración de la solución DIPEA fue de 0,4 M y se administró a la reacción 1,0 ml de esta solución.

Procedimiento de doble acoplamiento:

45 Este procedimiento es idéntico al "Método Prelude A: Procedimiento de doble acoplamiento" excepto que la concentración de la solución DIPEA fue de 0,4 M y se administró a la reacción 1,0 ml de esta solución.

Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo:

50 Este procedimiento es idéntico al "Método Prelude A: Procedimiento de acoplamiento de cloruro de cloroacetilo".

Método de desprotección global A:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de
 55 desprotección global A" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Rink unido a la resina. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Se preparó una "solución de desprotección" combinando en un vial de vidrio de 40 ml de ácido trifluoroacético (22 ml), fenol (1,325 g), agua (1,25 ml) y triisopropilsilano (0,5 ml). La resina se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un vial de vidrio de 4 ml.
 60 Al vial se añadió la "solución de desprotección" (2,0 ml). La mezcla se mezcló enérgicamente en un agitador (1.000 RPM durante 1 minuto, luego 500 RPM durante 1-2 h). La mezcla se filtró a través de una jeringa de 0,2 micrómetros y los sólidos se extrajeron con la "solución de desprotección" (1,0 ml) o TFA (1,0 ml). A un tubo de ensayo de 24 ml cargado con los filtrados combinados se añadió Et_2O (15 ml). La mezcla se mezcló enérgicamente sobre la cual precipitó una cantidad significativa de un sólido blanco. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos, luego, la solución se decantó de los sólidos y se desechó. Los sólidos se suspendieron en Et_2O (20 ml); después la mezcla se
 65 centrifugó durante 5 minutos; y la solución se decantó de los sólidos y se desechó. Por última vez, los sólidos se

suspendieron en Et₂O (20 ml); la mezcla se centrifugó durante 5 minutos; y la solución se decantó de los sólidos y se desechó para proporcionar el péptido en bruto como un sólido blanco a blanquecino.

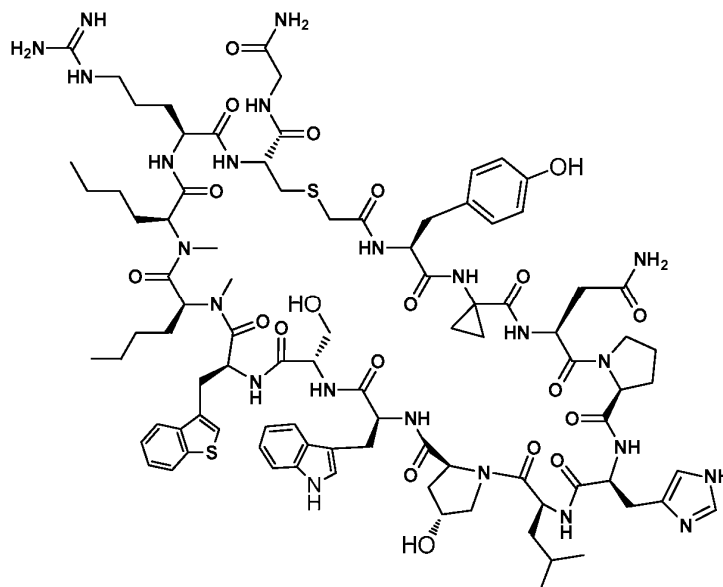
Método de ciclización A:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de ciclización A" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Rink unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos de péptido en bruto se disolvieron en MeCN:NH₄OAc ac. 0,1 M (30 ml:30 ml), y luego la solución se ajustó cuidadosamente a pH = 8,5-9,0 utilizando NaOH ac. (1,0 M). La solución se dejó reposar sin agitación durante 12-18 horas. La solución de reacción se concentró y el residuo se disolvió luego en DMSO:MeOH. Esta solución se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

Método B de ciclización:

Todas las manipulaciones se realizaron manualmente a menos que se indique. El procedimiento del "Método de ciclización B" describe un experimento realizado en una escala de 0,100 mmol, donde la escala está determinada por la cantidad de enlazador Rink unido a la resina que se utilizó para generar el péptido. Esta escala no se basa en una determinación directa de la cantidad de péptido utilizado en el procedimiento. El procedimiento se puede escalar más allá de la escala de 0,100 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Los sólidos peptídicos brutos se disolvieron en MeCN:NH₄OAc 0,1 M (1:1) hasta un volumen total de 18-22 ml, y la solución se ajustó cuidadosamente a pH = 8,5-9,0 utilizando NaOH ac. (1,0M). La solución se dejó reposar sin agitación durante 12-18 horas. La solución de reacción se concentró y el residuo se disolvió luego en DMSO:MeOH. Esta solución se sometió a purificación por HPLC de fase inversa para proporcionar el péptido cíclico deseado.

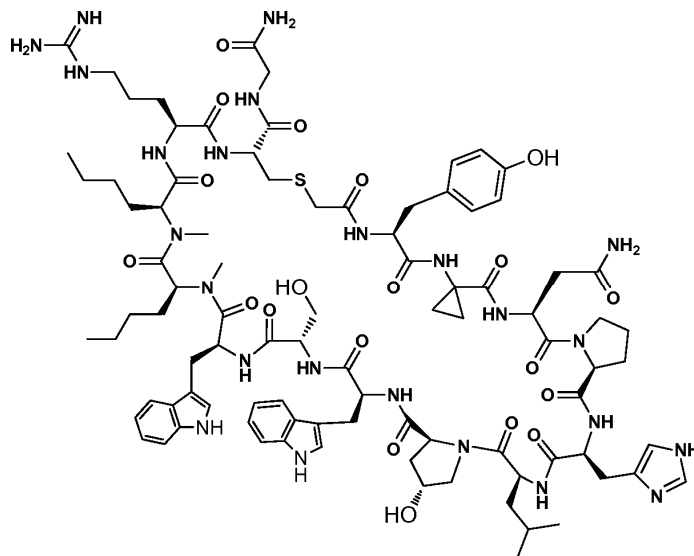
Preparación del ejemplo 9001



Ejemplo 9001

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 19,4 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,62 min; ESI-MS(+) *m/z* 963,4 (M+2H). Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,84 min; ESI-MS(+) *m/z* 963,8 (M+2H).

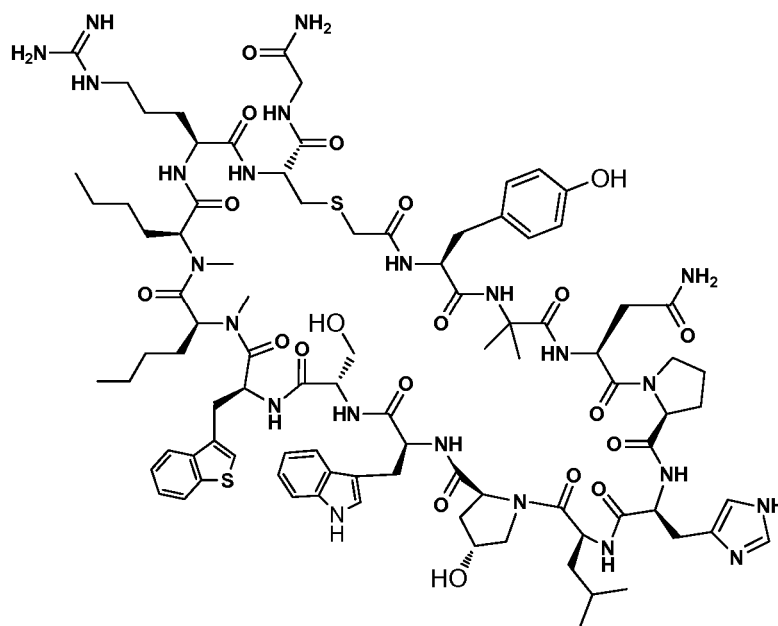
Preparación del ejemplo 9002



5 Ejemplo 9002

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 40-80 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 24,0 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,63 min; ESI-MS(+) m/z 954,75 (M+2H). Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 3,11 min; ESI-MS(+) m/z 954,25 (M+2H).

Preparación del ejemplo 9003

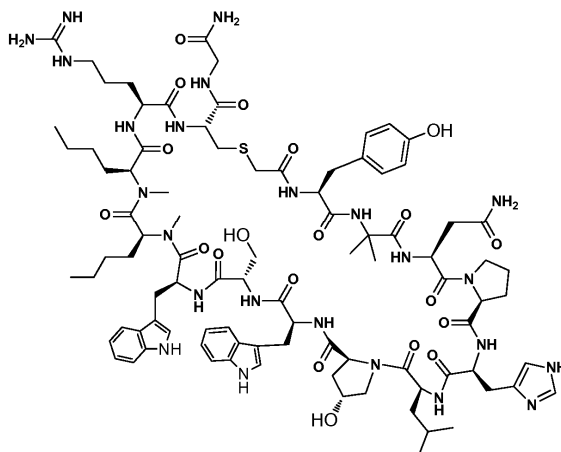


20 Ejemplo 9003

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 15-55 % de B durante 30 minutos, después

una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 35,5 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 97 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,61 min; ESI-MS(+) m/z 964,3 (M+2H). Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,84 min; ESI-MS(+) m/z 964,1 (M+2H).

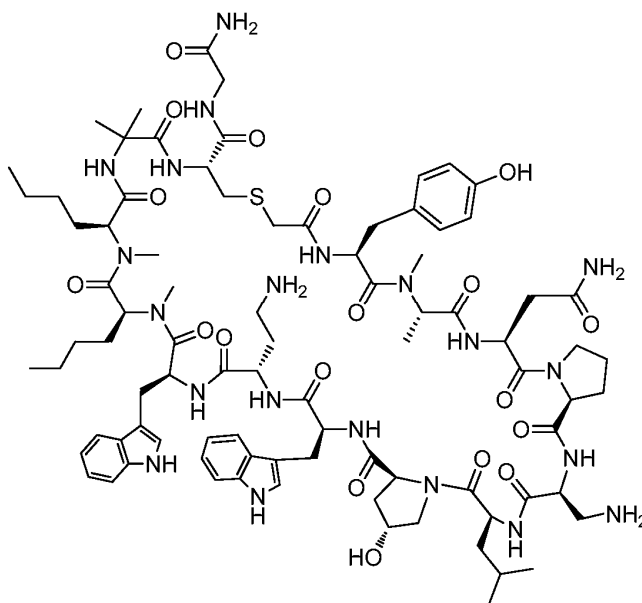
Preparación del ejemplo 9004



Ejemplo 9004

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 45-85 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 23,9 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 99 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,48 min; ESI-MS(+) *m/z* 956,0 (M+2H). Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,67 min; ESI-MS(+) *m/z* 955,7 (M+2H).

Preparación del ejemplo 9005



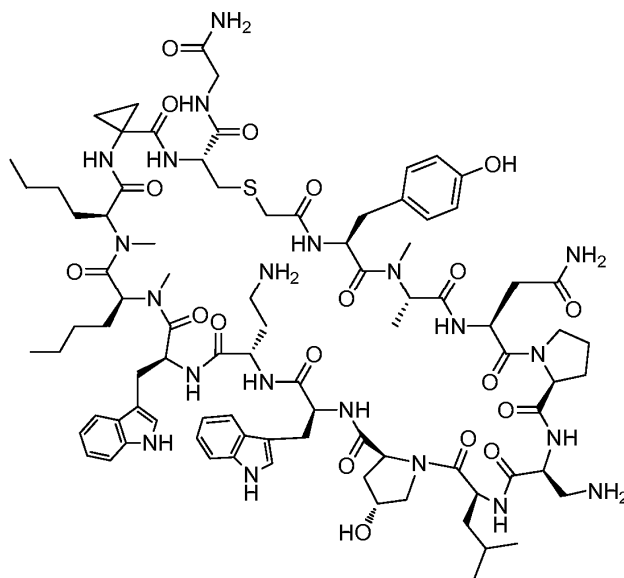
Ejemplo 9005

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18,

19 x mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 40-80 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 18,8 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 99 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,64 min; ESI-MS(+) m/z 901,6 (M+2H).

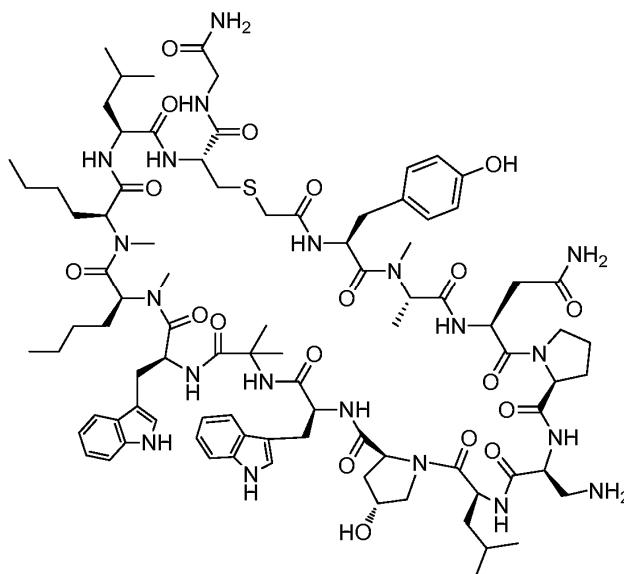
Preparación del ejemplo 9006



Ejemplo 9006

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 50-90 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 40,5 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 100 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,59 min; ESI-MS(+) m/z 900,3 (M+2H).

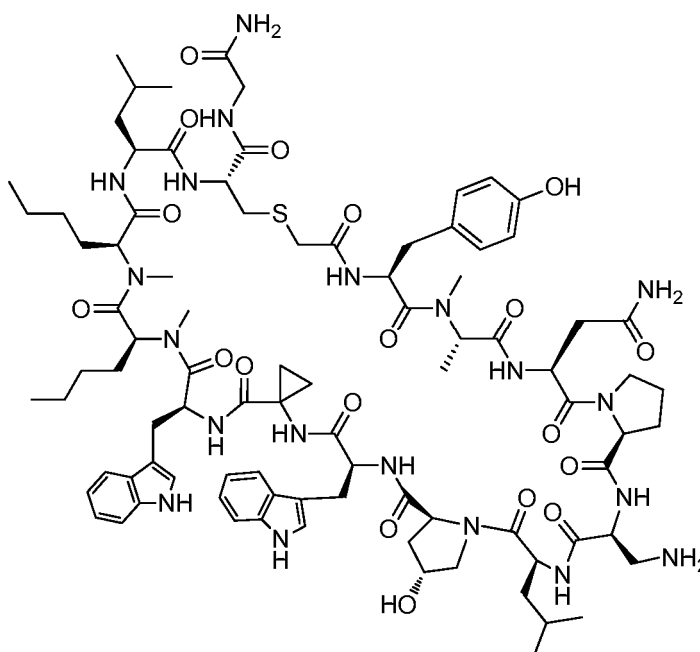
Preparación del ejemplo 9007



Ejemplo 9007

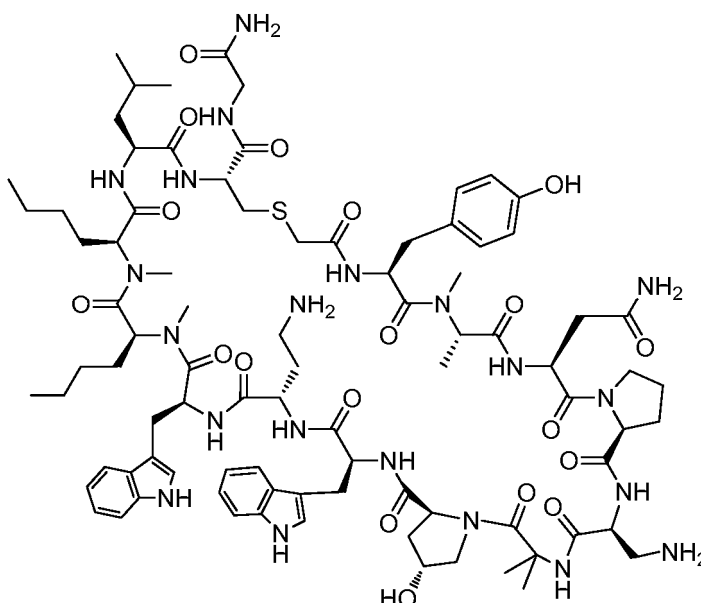
El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 45-90 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El material se purificó adicionalmente mediante CL/EM preparativa con las condiciones siguientes: Columna: Waters BEH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 5-45 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 19,3 mg y su pureza estimada por análisis LCMS fue del 100 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,95 min; ESI-MS(+) m/z 907,8 (M+2H).

Preparación del ejemplo 9008



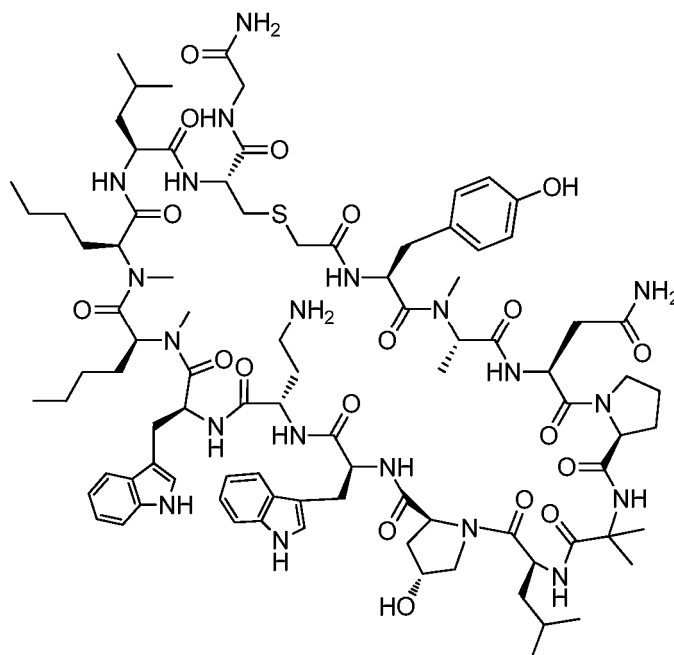
Ejemplo 9008

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 45-85 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 14,1 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 98 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,90 min; ESI-MS(+) m/z 906,6 (M+2H).



El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 40-80 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El material se purificó adicionalmente mediante CL/EM preparativa con las condiciones siguientes: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 5-45 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 2,2 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 91 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,73 min; ESI-MS(+) m/z 901,4 (M+2H).

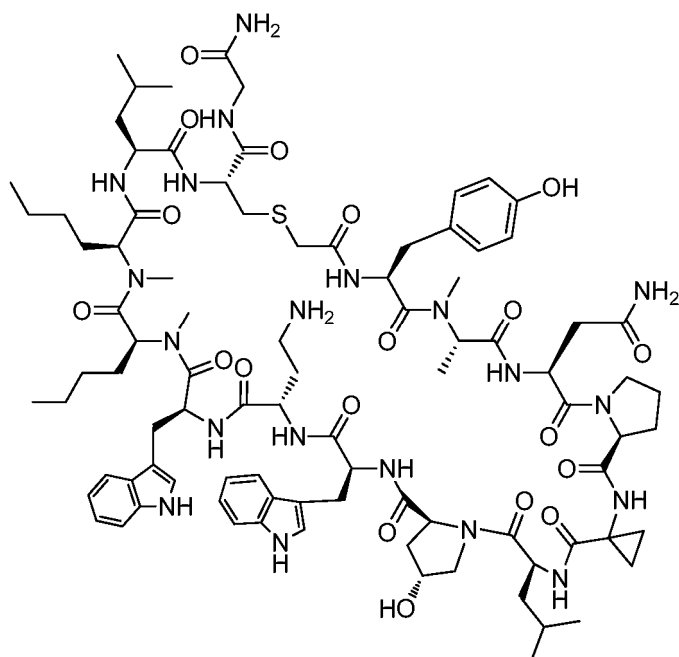
20



Ejemplo 9011

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 40-85 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 29,2 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 98 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,81 min; ESI-MS(+) m/z 914,8 (M+2H).

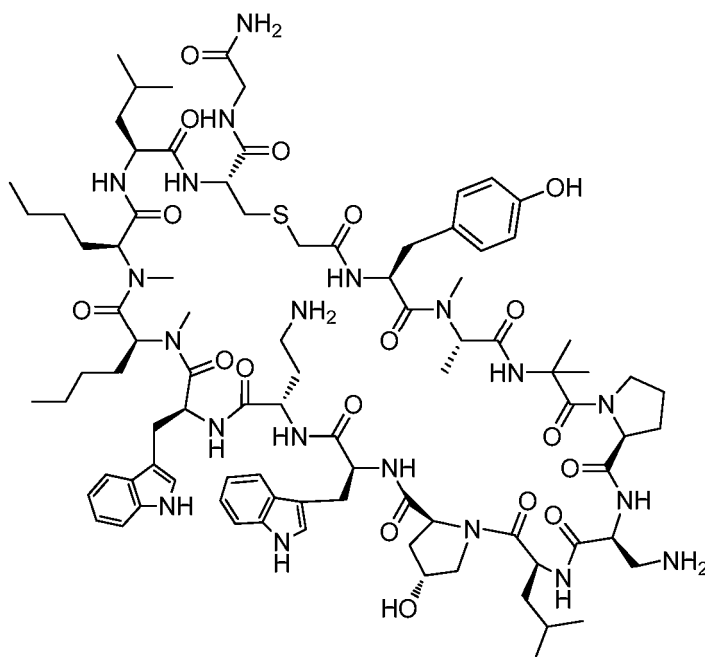
Preparación del ejemplo 9012



Ejemplo 9012

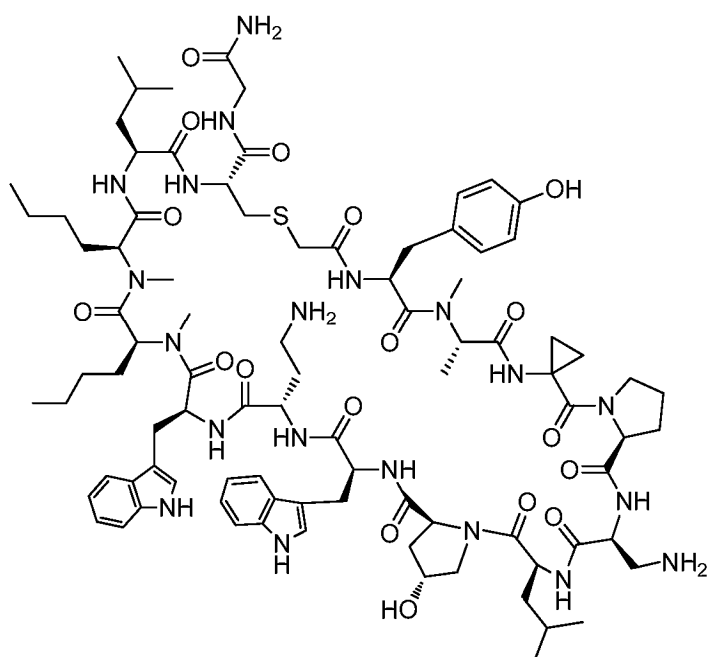
El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 40-85 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El material se purificó adicionalmente mediante CL/EM preparativa con las condiciones siguientes: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 15-55 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 16,4 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 96 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,97 min; ESI-MS(+) m/z 914,3 (M+2H).

Preparación del ejemplo 9013



5 Ejemplo 9013

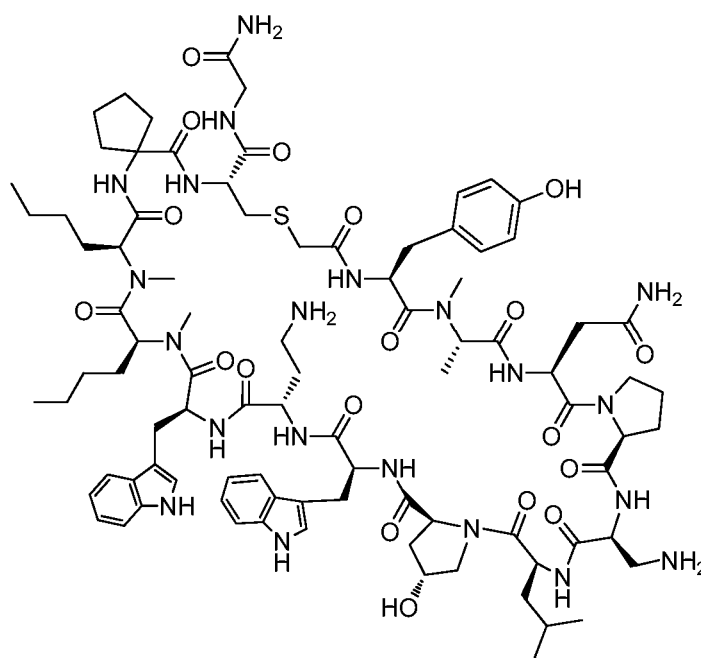
El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 45-85 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 21,9 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 97 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,78 min; ESI-MS(+) *m/z* 901,4 (M+2H).

15 *Preparación del ejemplo 9014*

Ejemplo 9014

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de metanol: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 50-90 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 35,3 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 97 %.

- 10 Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,76 min; ESI-MS(+) m/z 900,2 (M+2H).

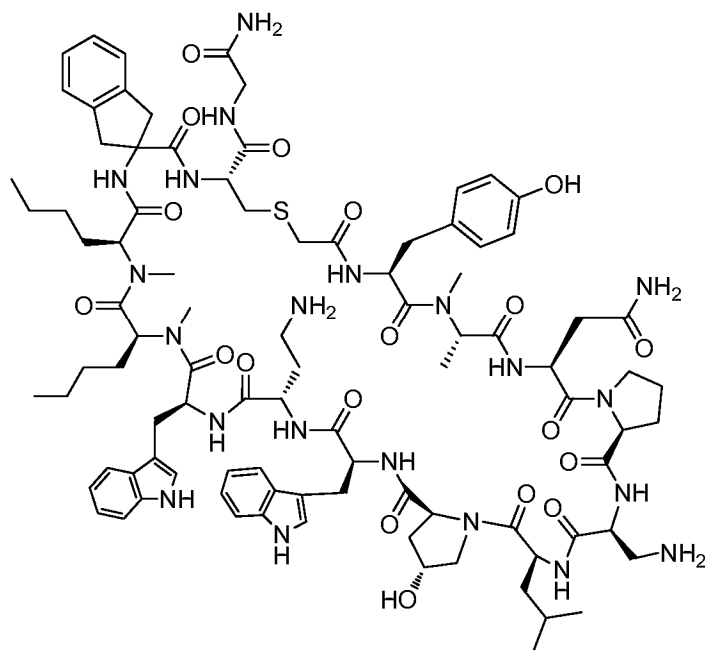
Preparación del ejemplo 9015

- 15 Ejemplo 9015

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 15-55 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 15,8 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 99 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,56 min; ESI-MS(+) m/z 914,3 (M+2H).

25

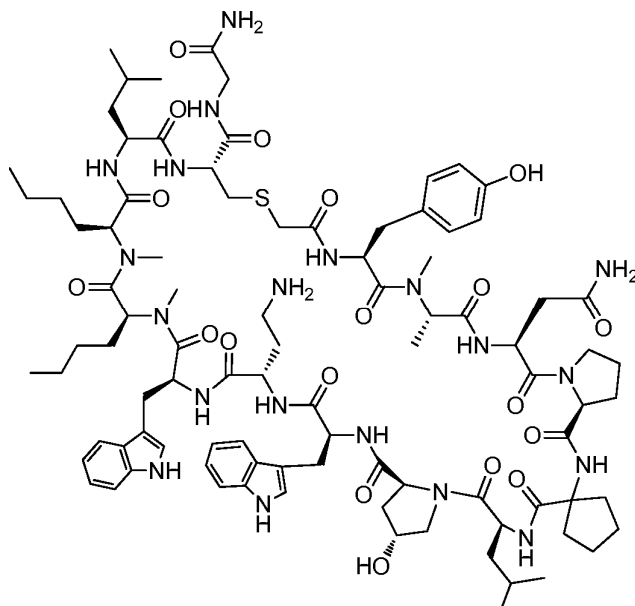
Preparación del ejemplo 9016



5 Ejemplo 9016

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: waters CSH c-18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Gradiente: 15-55 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 17,1 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 94 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,65 min; ESI-MS(+) m/z 938,1 (M+2H).

15 Preparación del ejemplo 9017

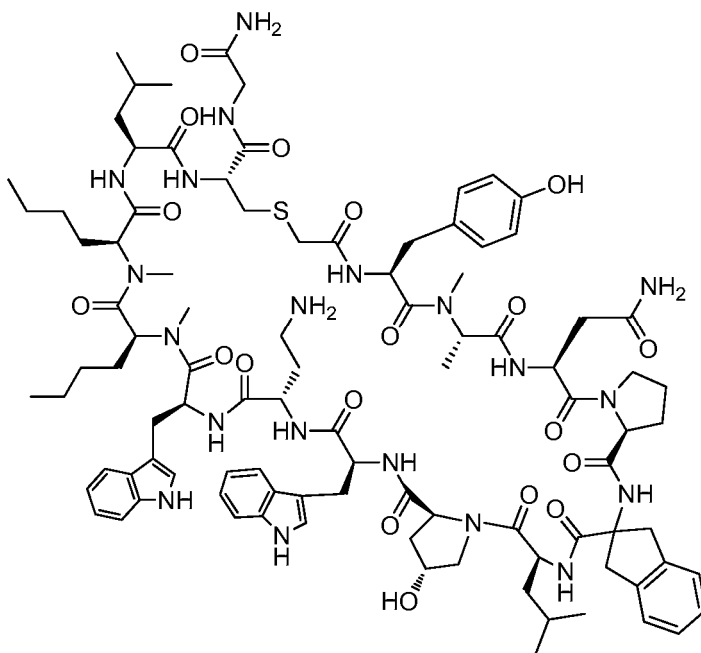


Ejemplo 9017

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil

B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El material se purificó adicionalmente mediante CL/EM preparativa con las condiciones siguientes: Columna: Waters BEH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 25-65 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 20,3 mg y su pureza estimada por análisis LCMS fue del 97 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,76 min; ESI-MS(+) m/z 927,9 (M+2H).

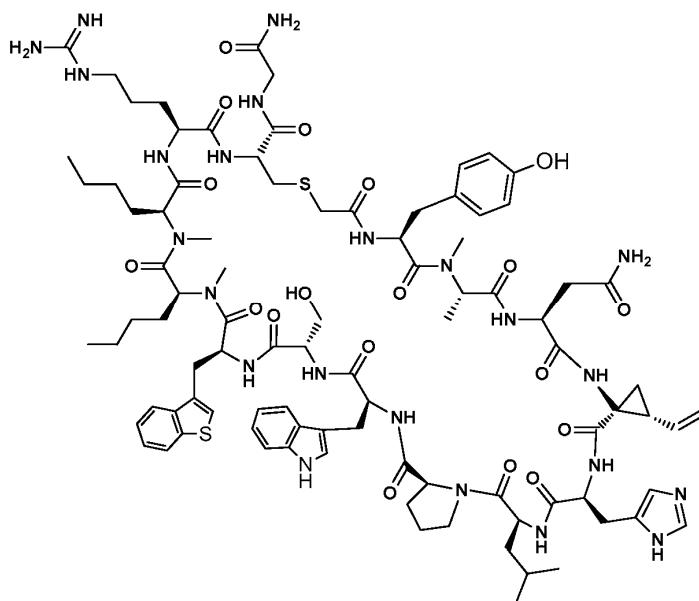
Preparación del ejemplo 9018



Ejemplo 9018

El material bruto se purificó a través de CL/EM preparativa con las siguientes condiciones: Columna: waters CSH c-18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético; Gradiente: 20-60 % de B durante 30 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 4,8 mg y su pureza estimada mediante análisis LCMS fue del 96 %. Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 184 min; ESI-MS(+) m/z 951,9 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10001



5 Ejemplo 10001

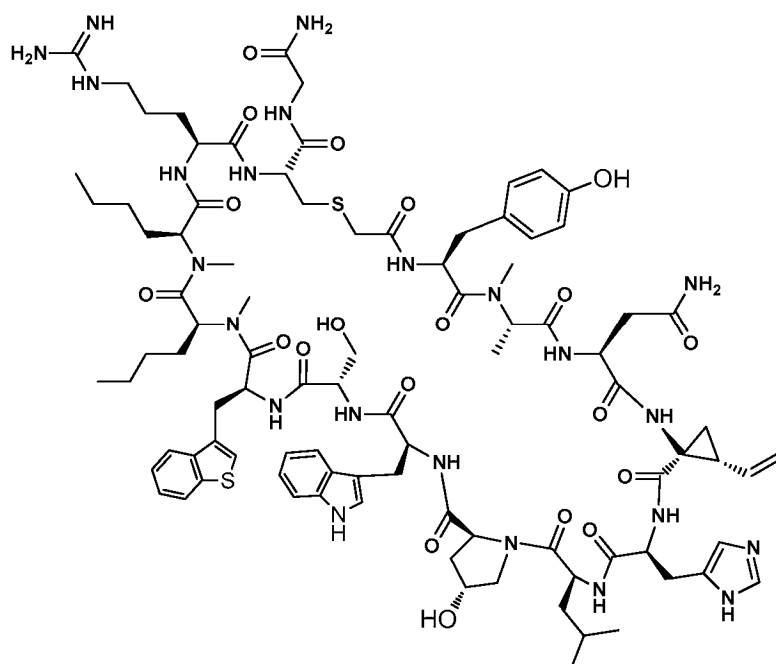
El material bruto del ejemplo 10001 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

10 contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 16,5 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 95 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,82 min; ESI-MS(+) m/z 962,8 (M+2H).

15 Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,98 min; ESI-MS(+) m/z 962,8 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10002

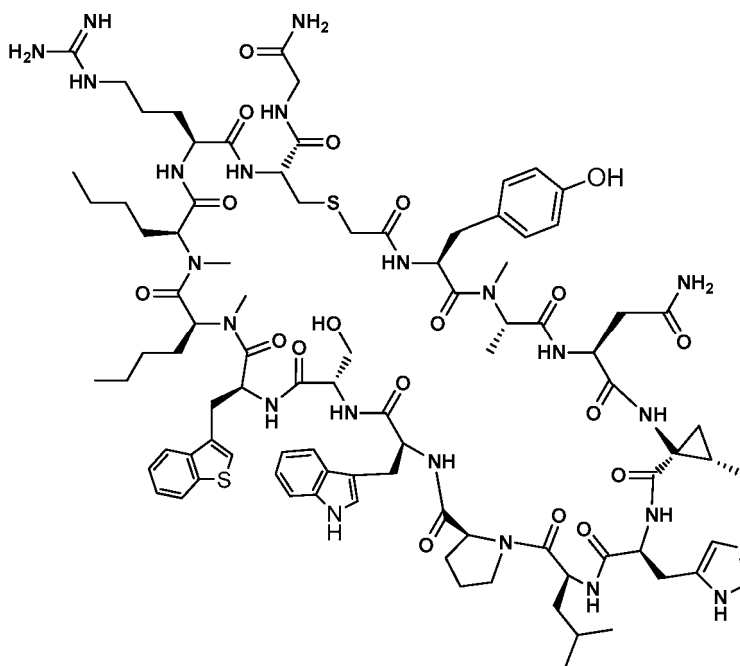


Ejemplo 10002

El material bruto del ejemplo 10002 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 3,9 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

- 10 Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,81 min; ESI-MS(+) m/z 970,9 (M+2H).
Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,98 min; ESI-MS(+) m/z 970,8 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10003

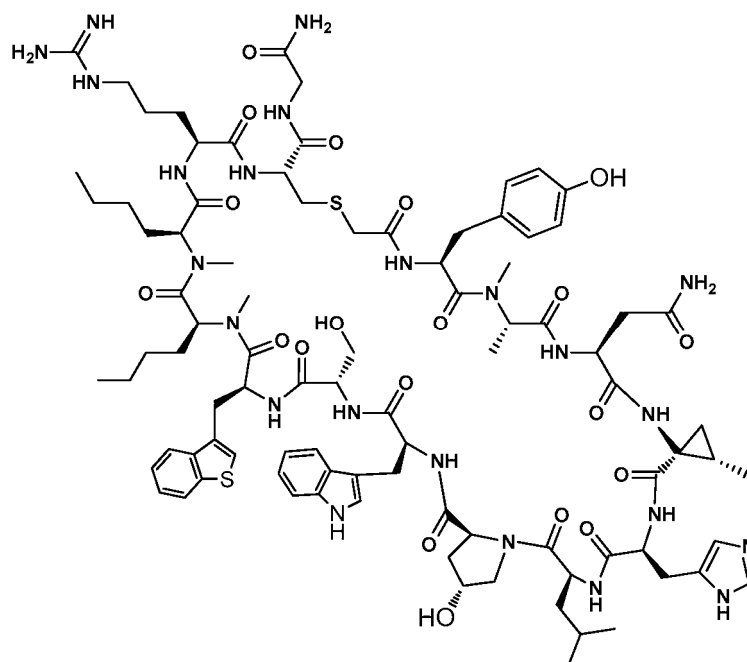


Ejemplo 10003

El material bruto del ejemplo 10003 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 33,4 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 97 %.

- Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,76 min; ESI-MS(+) m/z 957,0 (M+2H).
Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,97 min; ESI-MS(+) m/z 956,8 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z :
Calculado: 955,9633 (M+2H); Observado: 955,9610 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10004



5 Ejemplo 10004

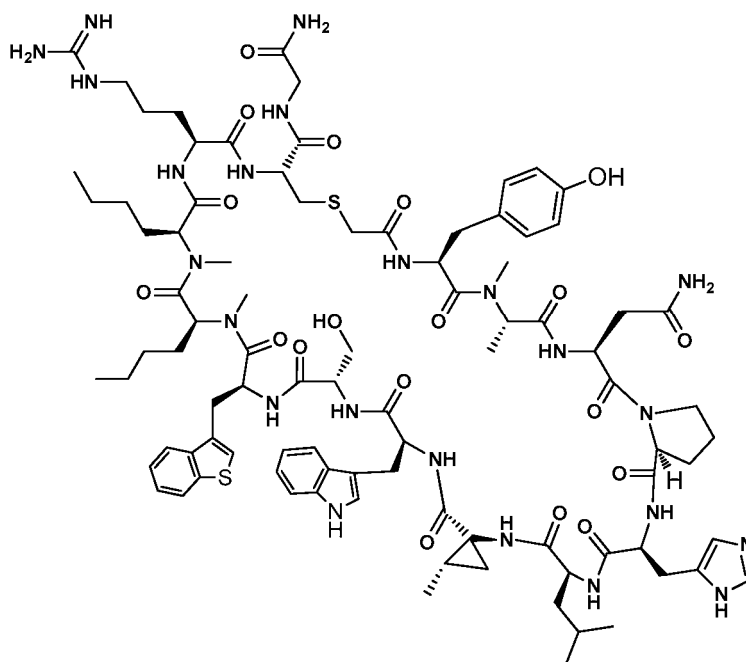
El material bruto del ejemplo 10004 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

10 contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 17,2 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,72 min; ESI-MS(+) m/z 964,8 (M+2H).

15 Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,97 min; ESI-MS(+) m/z 964,7 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z : Calculado: 963,9607 (M+2H); Observado: 963,9581 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10005



5 Ejemplo 10005

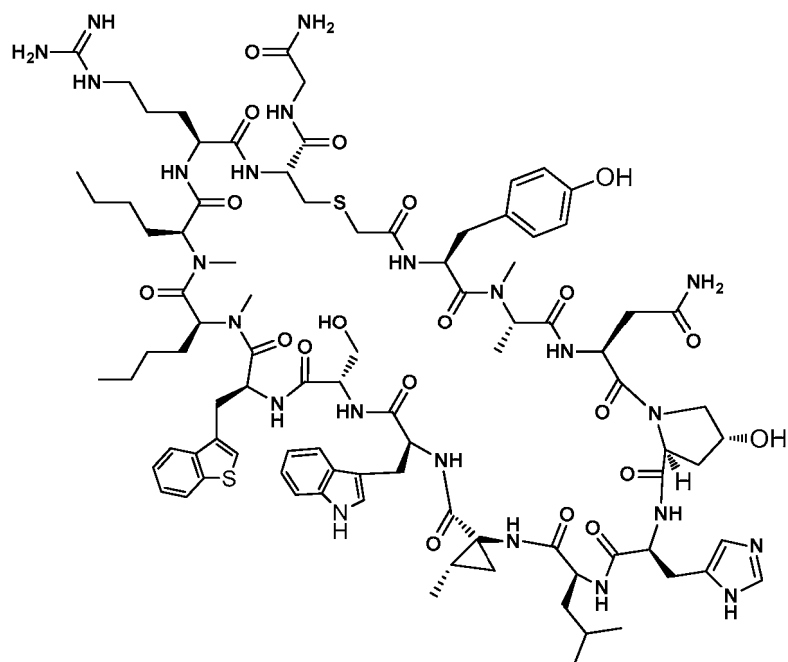
El material bruto del ejemplo 10005 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

10 contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 10,0 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,65 min; ESI-MS(+) m/z 956,6 (M+2H).

15 Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,87 min; ESI-MS(+) m/z 956,7 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z : Calculado: 955,9633 (M+2H); Observado: 955,9601 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10006



5 Ejemplo 10006

El material bruto del ejemplo 10006 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

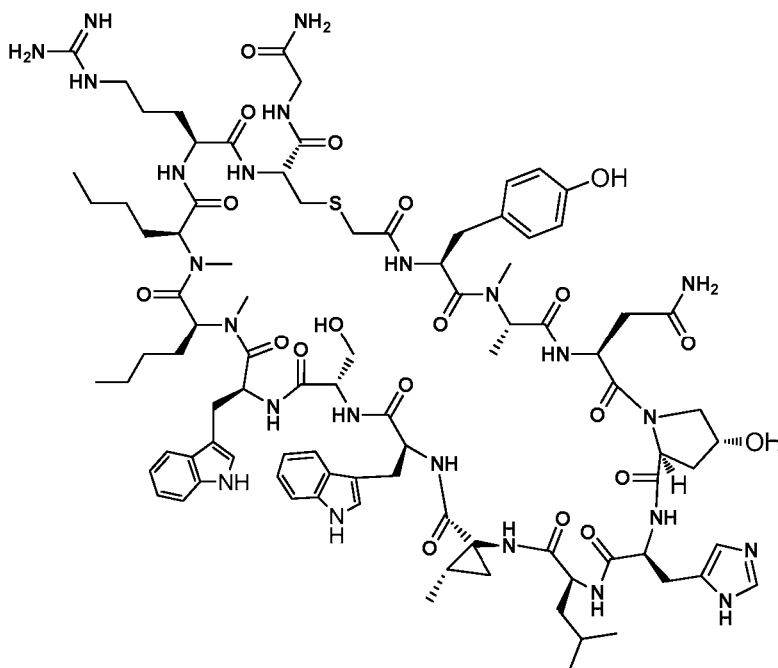
10

contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 12,1 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

15

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,61 min; ESI-MS(+) m/z 965,1 (M+2H).
Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,85 min; ESI-MS(+) m/z 965,0 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z :
Calculado: 963,9580 (M+2H); Observado: 963,9607 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10007



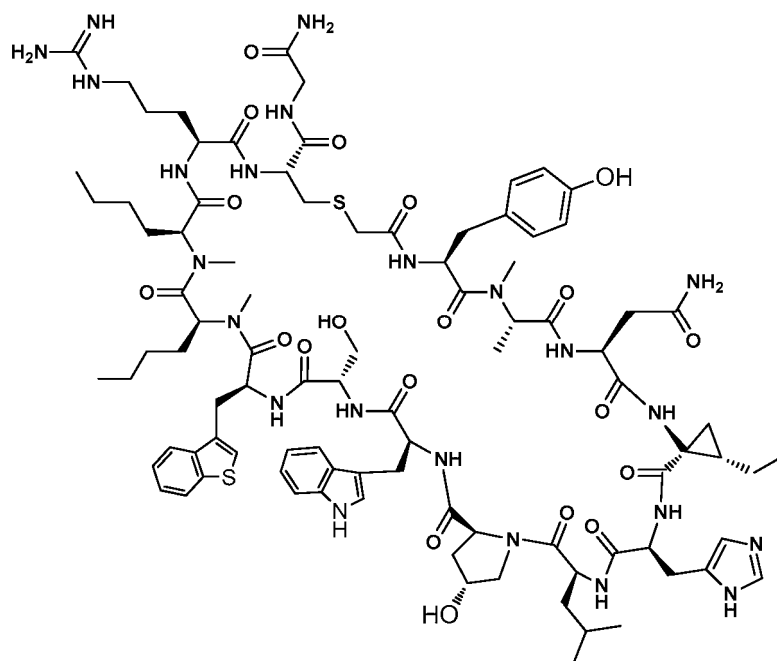
5 Ejemplo 10007

El material bruto del ejemplo 10007 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 13,3 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,51 min; ESI-MS(+) m/z 956,7 (M+2H).

Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,66 min; ESI-MS(+) m/z 956,3 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z : Calculado: 955,4801 (M+2H); Observado: 955,4766 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10008



5 Ejemplo 10008

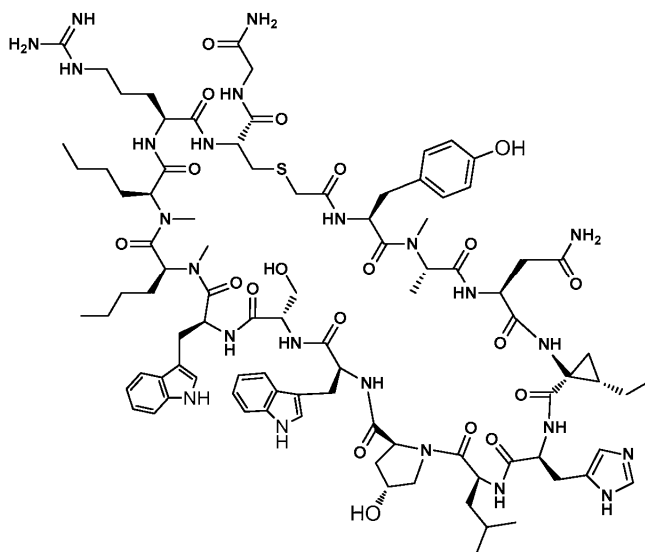
El material bruto del ejemplo 10008 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

10 contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 16,1 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 100 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,73 min; ESI-MS(+) m/z 971,8 (M+2H).

15 Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,96 min; ESI-MS(+) m/z 971,7 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z : Calculado: 970,9686 (M+2H); Observado: 970,9667 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10009



5 Ejemplo 10009

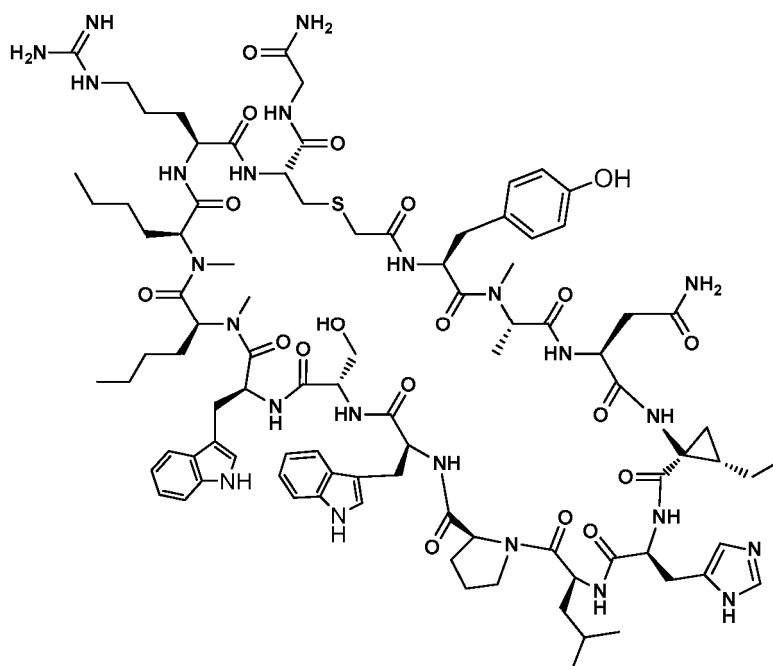
El material bruto del ejemplo 10009 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 μ m; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que

10 contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 44,3 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 97 %.

Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,67 min; ESI-MS(+) m/z 963,2 (M+2H).

15 Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,86 min; ESI-MS(+) m/z 963,3 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z : Calculado: 962,4880 (M+2H); Observado: 962,4857 (M+2H).

Preparación del ejemplo 10010



Ejemplo 10010

El material bruto del ejemplo 10010 se purificó a través de LC/MS preparativa con las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: 5:95 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Fase móvil B: 95:5 de acetonitrilo: agua con acetato de amonio 10 mM; Gradiente: 20-60 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a través de evaporación por centrifugación. El rendimiento del producto fue de 31,1 mg y su pureza estimada mediante análisis FCMS fue del 99 %.

- 10 Condiciones del análisis A: Tiempo de retención = 1,71 min; ESI-MS(+) m/z 955,2 (M+2H).
Condiciones del análisis B: Tiempo de retención = 2,89 min; ESI-MS(+) m/z 955,4 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z :
Calculado: 954,4905 (M+2H); Observado: 954,4881 (M+2H).

15 MÉTODOS PARA PROBAR LA CAPACIDAD DE LOS PÉPTIDOS MACROCÍCLICOS PARA COMPETIR LA UNIÓN DE PD-1 A PD-L1 UTILIZANDO ENSAYOS DE UNIÓN HOMÓGENO DE FLUORESCENCIA RESUELTA POR TIEMPO (HTRF)

La capacidad de los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación para unirse a PD-L1 se investigó usando un ensayo de unión de fluorescencia en tiempo resuelto homogéneo (HTRF) de PD-1/PD-L1.

20 *Métodos*

Ensayos homogéneos de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF) de unión de PD-1 soluble a PD-L1 soluble. El PD-1 soluble y el PD-L1 soluble se refieren a proteínas con truncamientos en el extremo carboxilo que eliminan las regiones que se extienden transmembrana y se fusionan con secuencias heterólogas, específicamente la porción Fc de la secuencia G de inmunoglobulina (Ig) humana o la etiqueta del epítipo de hexahistidina (His). Todos los estudios de unión se realizaron en un tampón de ensayo de HTRF que consistía en dPBS suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1 % (p/v) y Tween-20 al 0,05 % (v/v). Para el ensayo de unión de PD-1-Ig/PD-L1-His, los inhibidores se preincubaron con PD-L1-His (final 10 nM) durante 15 m en 4 µl de tampón de ensayo, seguido de la adición de PD-1-Ig (final 20 nM) en 1 µl de tampón de ensayo y una incubación adicional durante 15 m. Se utilizaron las proteínas de fusión de PD-L1 de seres humanos, macacos cynomologos, ratón u otras especies. La detección de HTRF se realizó usando anticuerpo monoclonal anti-Ig marcado con cripto de europio (final 1 nM) y anticuerpo monoclonal anti-His marcado con alofocianina (APC) (final 20 nM). Los anticuerpos se diluyeron en tampón de detección de HTRF y se dispensaron 5 µl por encima de la reacción de unión. La reacción se dejó equilibrar durante 30 minutos y se obtuvo una señal (relación 665 nm/620 nm) usando un fluorómetro EnVision. Los ensayos de unión adicionales se establecieron entre PD-1-Ig/PD-L2-His (20 y 5 nM, respectivamente), CD80-His/PD-L1-Ig (100 y 10 nM, respectivamente) y CD80-His/CTLA4-Ig (10 y 5 nM, respectivamente). Los estudios de unión/competición entre el compuesto n.º71 biotinilado y la PD-L1-His humano se realizaron como se indica a continuación. Los inhibidores de péptidos macrocíclicos se preincubaron con PD-L1-His (final 10 nM) durante 60 m en 4 µl de tampón de ensayo seguido de la adición del compuesto n.º 71 biotinilado (final 0,5 nM) en 1 µl de tampón de ensayo. Se dejó que la unión se equilibrara durante 30 minutos seguido de la adición de estreptavidina marcada con cripto de europio (final 2,5 pM) y anti-His marcado con APC (final 20 nM) en 5 µl de tampón HTRF. La reacción se dejó equilibrar durante 30 m y se obtuvo una señal (relación 665 nm/620 nm) usando un fluorómetro EnVision.

- 45 Proteínas recombinantes. El PD-1 humano truncado en el carboxilo (aminoácidos 25-167) con un marcador del epítipo de la Ig humana C-terminal [hPD-1 (25-167) -3S-IG] y el PD-L1 humano (18-239) con un marcador del epítipo His en C-terminal [hPD-L1 (19-239)-sitio de escisión para la proteasa del virus del moteado de la vena del tabaco (TVMV)-His] se expresaron en células HEK293T y se purificaron secuencialmente mediante cromatografía de afinidad con Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. PD-L2-His humano (Sino Biologicals), CD80-His (Sino Biologicals), CTLA4-Ig (RnD Systems) se obtuvieron a través de fuentes comerciales.

Secuencia de PD-1-Ig humano recombinante
hPD1(25-167)-3S-IG

1	LDSPDRPWNP	PTFSPALLVV	TEGDNATFTC	SFSNTSESFV	LNWYRMSPSN
51	QTDKLAAPFE	DRSQPGQDCR	FRVTQLPNGR	DFHMSVVRAR	RNSDGYLTCG
101	AISLAPKAQI	KESLRaelRV	TERRAEVPTA	HPSPSPRPAG	QFQSGPGGGG
151	GREPKSSDKT	HTSPSPPAPE	LLGGSSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
201	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
251	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
301	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
351	KSRWQQGNVF	SCSVMEALH	NHYTQKSLSL	SPGK	

55

(SEQ ID NO: 1)

Secuencia de PD-LI-TVMV-His Humano Recombinante (PD-LI-His)
hPDL1(19-239)-TVMV-His

1 FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
 51 HGEEDLKVQH SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
 101 GGADYKRITV KVNAPYNKIN QRILVVDPT SEHELTCAE GYPKAEVIWT
 151 SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTNEIFY CTFRRLDPEE
 201 NHTAELVIPE LPLAHPPNER TGSSETVRFQ GHHHHHHH

5

(SEQ ID NO:2)

10 Los resultados se muestran en la Tabla 1. Tal como se muestra, los péptidos macrocíclicos de la presente divulgación demostraron una potente inhibición de la actividad de unión de PD-1-Ig a PD-LI-TVMV-His (PD-LI-His). Los intervalos son los siguientes: A = 0,10-10 μ M; B = 0,01-0,099 μ M; C = 0,004-0,0099 μ M.

Tabla 1

Número de ejemplo	HTRF CI50 (μ M)
Ejemplo 9001	C
Ejemplo 9002	4,13E-03
Ejemplo 9003	B
Ejemplo 9004	B
Ejemplo 9013	A
Ejemplo 9014	A
Ejemplo 10001	A
Ejemplo 10002	0,20
Ejemplo 10003	A
Ejemplo 10004	B
Ejemplo 10008	B
Ejemplo 10009	A
Ejemplo 10010	A
Ejemplo 9011	0,02
Ejemplo 9012	B
Ejemplo 9017	B
Ejemplo 9018	B
Ejemplo 9009	A
Ejemplo 1001*	A
Ejemplo 1002	A
Ejemplo 10005	1,00
Ejemplo 10006	A
Ejemplo 10007*	A

Ejemplo 1003	A
Ejemplo 9007	A
Ejemplo 9008	3,62
Ejemplo 5001	A
Ejemplo 9005	A
Ejemplo 9006	0,04
Ejemplo 9015	B
Ejemplo 9016	B
*el ejemplo no forma parte de la invención	

Será evidente para un experto en la materia que la presente divulgación no se limita a los ejemplos ilustrativos anteriores y que puede realizarse de otras maneras específicas sin apartarse de los atributos esenciales de la misma. Por lo tanto, se desea que los ejemplos se consideren a todos los efectos ilustrativos y no restrictivos, haciendo referencia a las reivindicaciones adjuntas, en lugar de a los ejemplos anteriores.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Bristol-Myers Squibb Company
 <120> INMUNOMODULADORES
 <130> 12408-WO-PCT
 15 <150> US 62/094,281
 <151> 2014-12-19
 <160> 2
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 384
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

ES 2 719 135 T3

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
 20 25 30
 Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
 35 40 45
 Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
 50 55 60
 Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
 65 70 75 80
 Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
 85 90 95
 Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
 100 105 110
 Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
 115 120 125
 Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Gly
 130 135 140
 Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 145 150 155 160
 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser

ES 2 719 135 T3

165										170					175						
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg						
			180					185					190								
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro						
		195					200					205									
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala						
	210					215					220										
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val						
225					230					235					240						
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr						
				245					250					255							
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr						
			260					265					270								
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu						
		275					280					285									
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys						
	290					295					300										
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser						
305					310					315					320						
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp						
				325					330					335							
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser						
			340					345					350								
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala						
		355					360					365									
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	370					375					380										

<210> 2
<211> 237
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 719 135 T3

<400> 2

```

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1           5           10           15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
          20           25           30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
          35           40           45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
          50           55           60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
          65           70           75           80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
          85           90           95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
          100          105          110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
          115          120          125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
          130          135          140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
          145          150          155          160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
          165          170          175

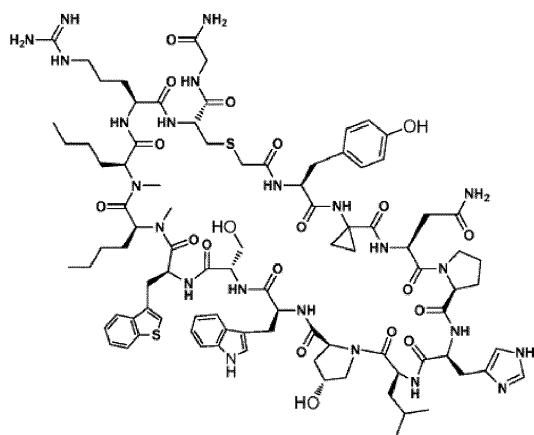
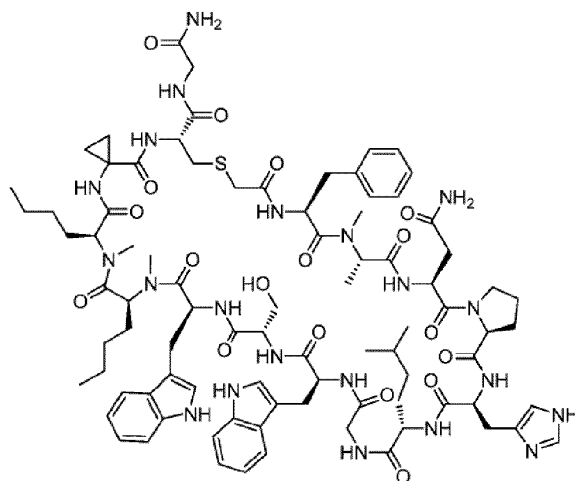
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
          180          185          190

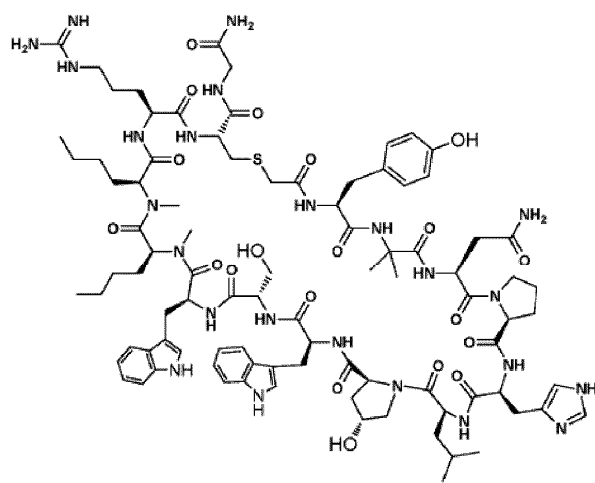
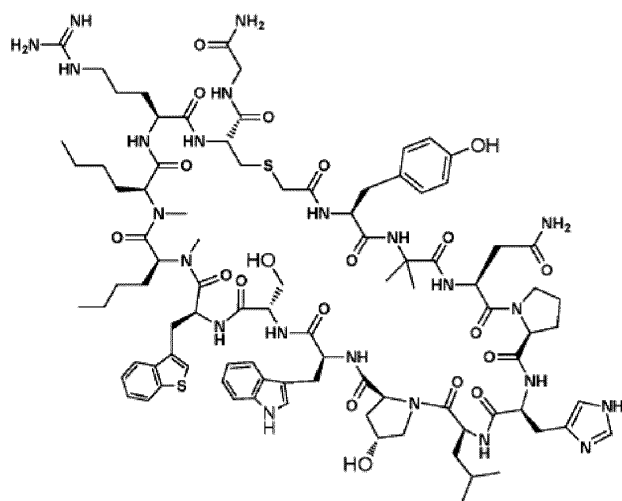
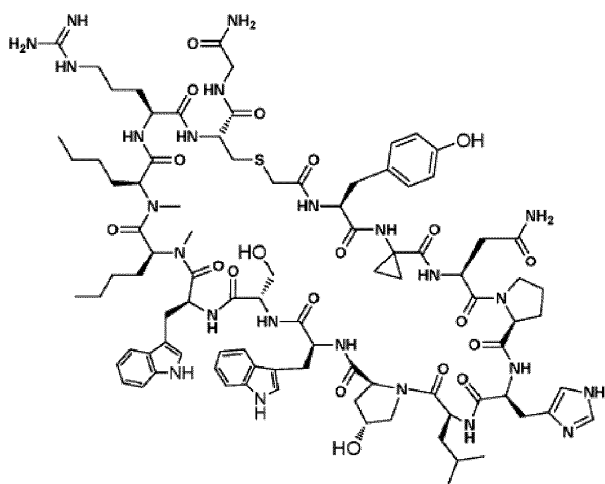
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
          195          200          205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Gly Ser Ser
          210          215          220

Glu Thr Val Arg Phe Gln Gly His His His His His His
          225          230          235

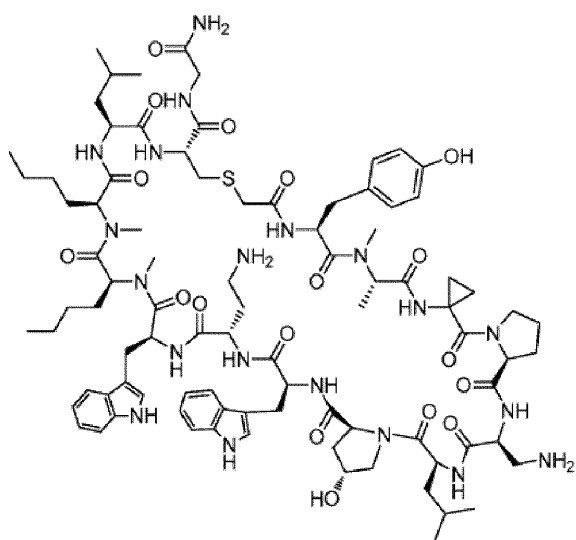
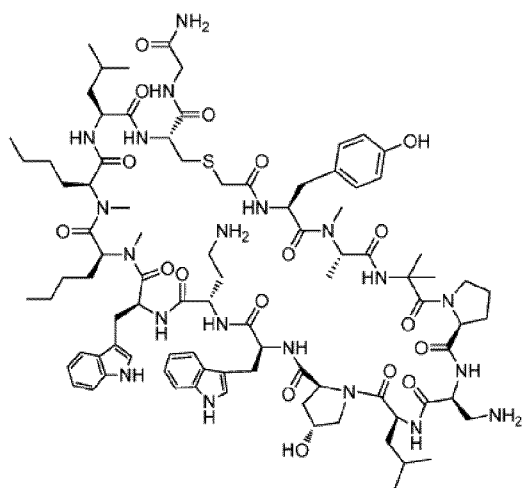
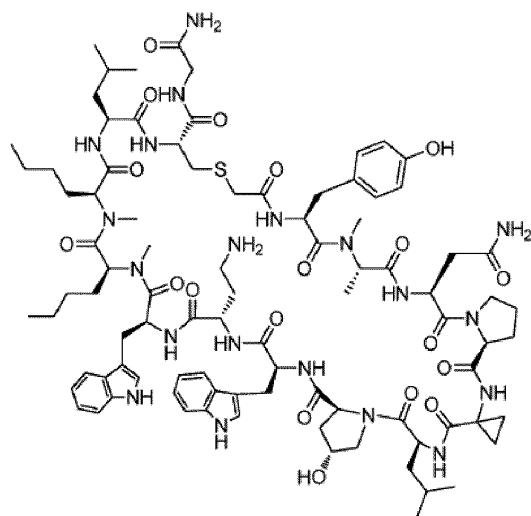
```

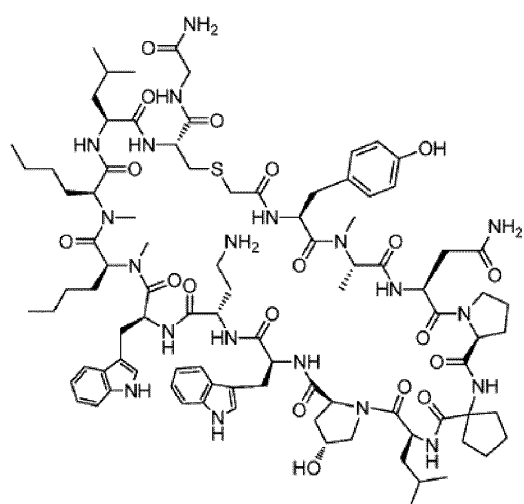
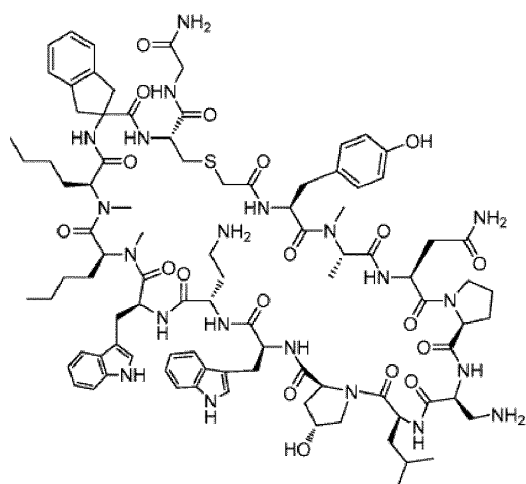
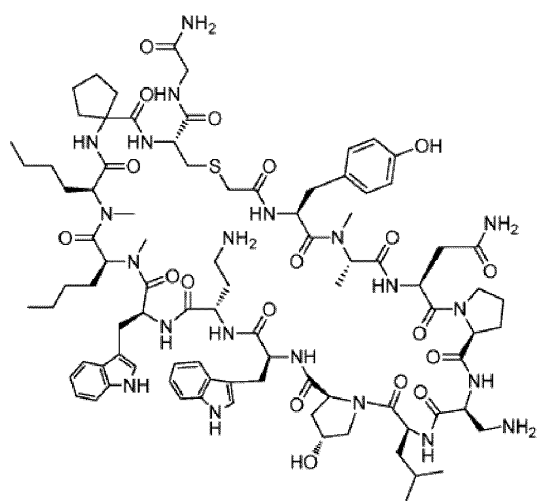


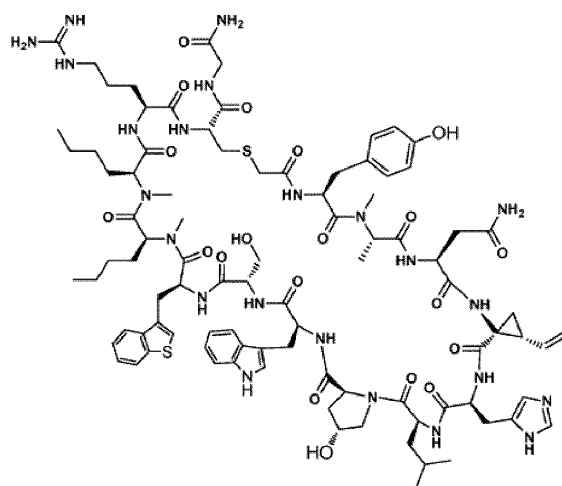
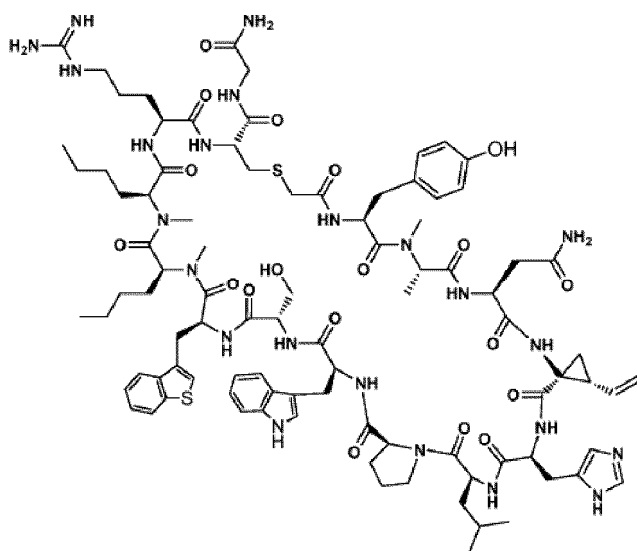
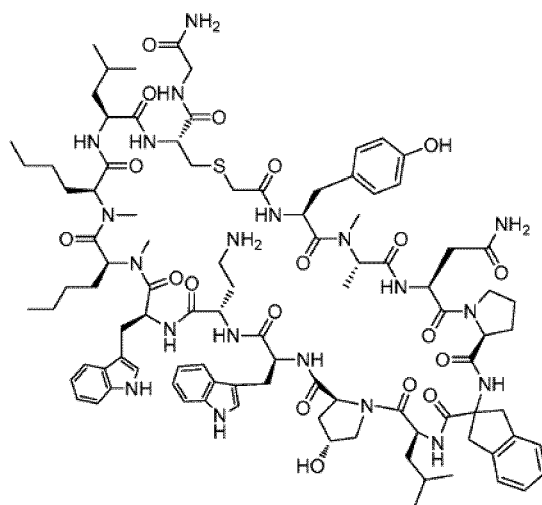


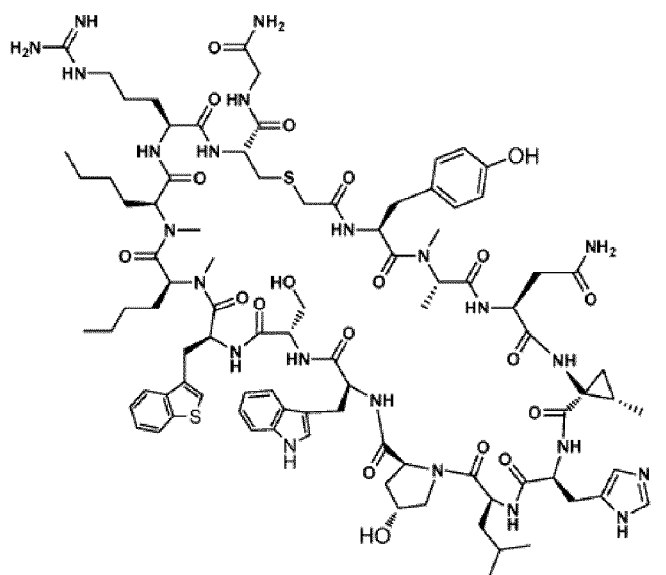
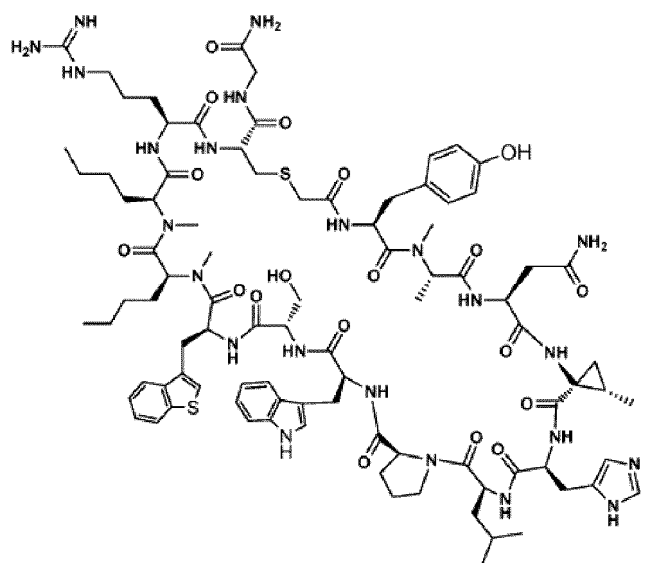


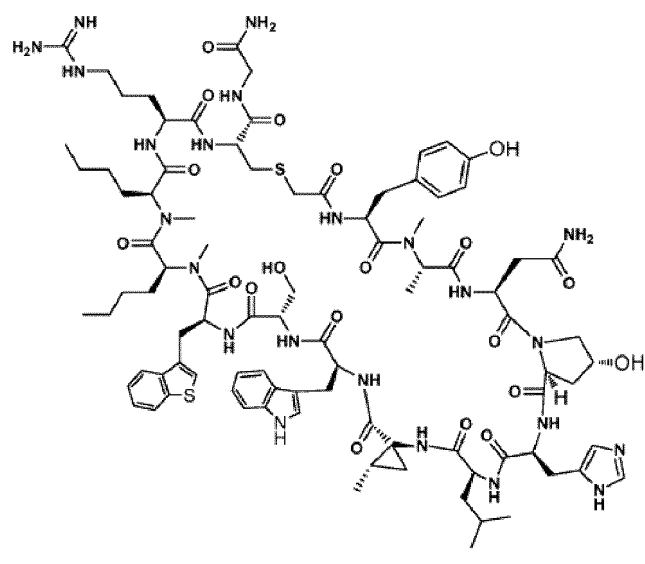
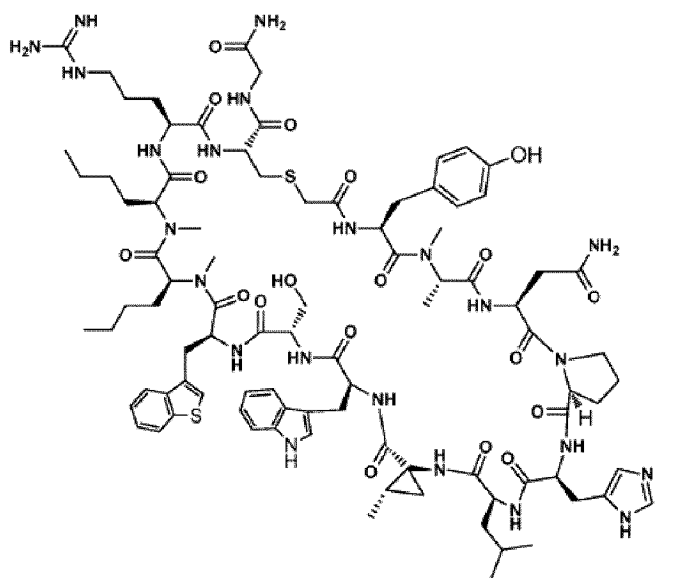


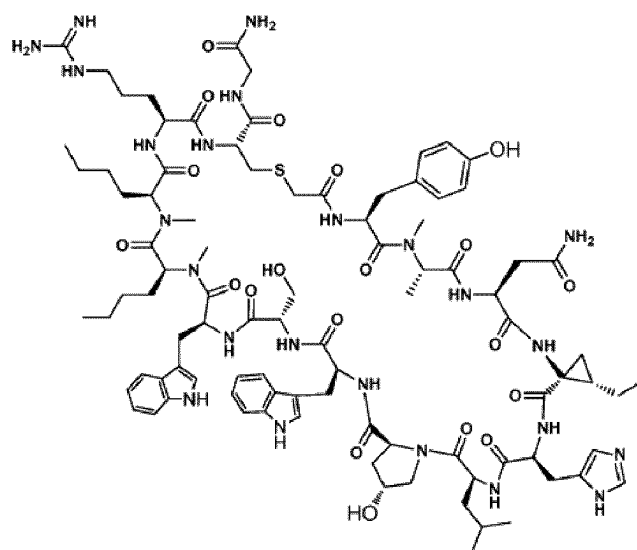
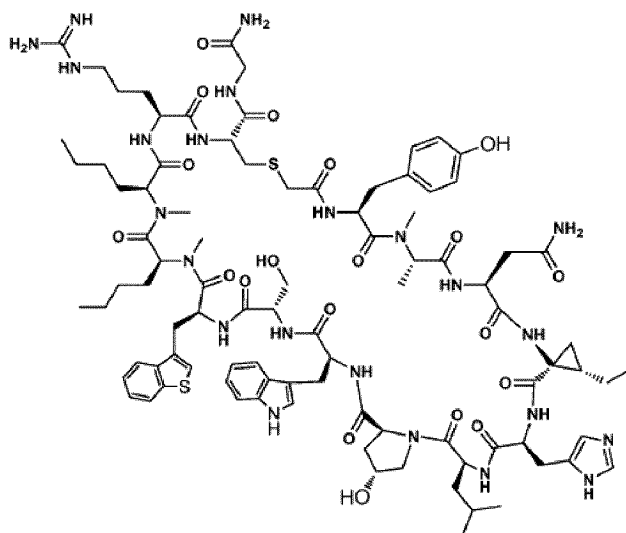
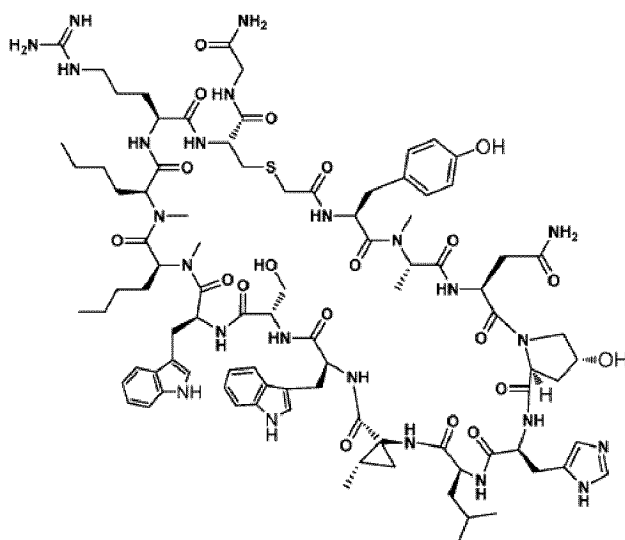




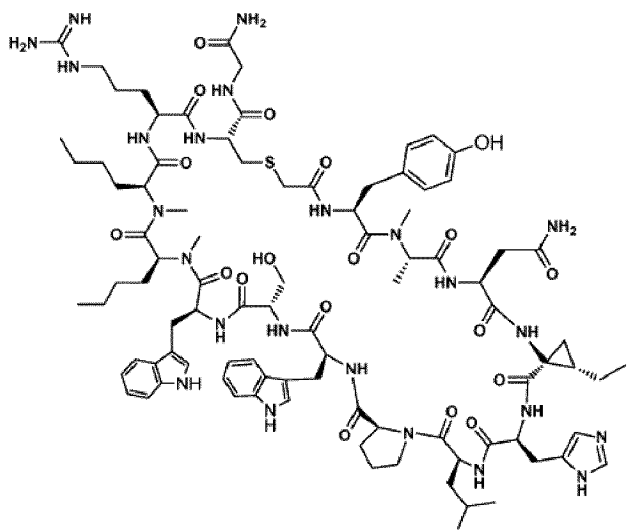








y



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar para potenciar, estimular y/o aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite.
- 10 3. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además administrar un agente adicional antes, después o simultáneamente con el compuesto de la reivindicación 1, o una sal terapéuticamente aceptable del mismo.
- 15 4. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente adicional es un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente citotóxico y/o un modificador de la respuesta inmunitaria.
- 20 5. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente adicional es un inhibidor de HDAC.
6. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente adicional es un agonista de TLR7 y/o TLR8.
- 25 7. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inhibición del crecimiento, la proliferación o la metástasis de células cancerosas en un sujeto que lo necesita.
8. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona entre melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) escamoso, CPNM no escamoso, cáncer colorrectal, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de páncreas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas de esófago, del tracto gastrointestinal y de mama, y neoplasias malignas hematológicas.
- 30 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesite.
- 35 10. El compuesto o una sal terapéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la enfermedad infecciosa está causada por un virus.
- 40 11. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el virus se selecciona entre los virus HIV, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, herpes y gripe.
12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del choque séptico en un sujeto que lo necesite.
- 45 13. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para usar en medicina.