

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 613**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/05** (2006.01)

**C07K 7/00** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

**A61K 38/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2015 PCT/US2015/032043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15179691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2015 E 15796259 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3149025**

54 Título: **Péptidos que penetran en las células y sus métodos de preparación y su uso**

30 Prioridad:

**21.05.2014 US 201462001535 P**  
**07.05.2015 US 201562158351 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.02.2020**

73 Titular/es:

**ENTRADA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**28 State Street, Suite 2303**  
**Boston, MA 02109, US**

72 Inventor/es:

**PEI, DEHUA y**  
**QIAN, ZIQING**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 739 613 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**

Péptidos que penetran en las células y sus métodos de preparación y su uso.

5 Antecedentes

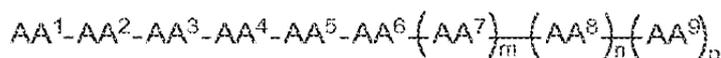
La membrana plasmática presenta un desafío importante en el descubrimiento de fármacos, especialmente para biología como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Una posible estrategia para subvertir la barrera de la membrana y suministrar las biología a las células consiste en unirlos a "péptidos que penetran en las células (CPP)". A pesar de tres décadas de investigación, la base fundamental para la actividad de CPP sigue siendo difícil de alcanzar. Los CPP que ingresan en las células a través de la endocitosis deben salir de las vesículas endocíticas para alcanzar el citosol. Desafortunadamente, la membrana endosomal ha demostrado ser una barrera significativa para el suministro citoplásmico por estos CPP; a menudo, una fracción insignificante de los péptidos se escapa al interior de la célula (El-Sayed, A et al. AAPSJ., 2009, 11,13-22; Varkouhi, AK et al. J. Controlled Release, 2011, 151, 220-228; Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830). Por lo tanto, lo que se necesita son nuevos péptidos que penetren en las células y composiciones que comprenden tales péptidos que pueden usarse para administrar agentes a diversos tipos de células. Las composiciones y métodos descritos en este documento abordan estas y otras necesidades.

20 Compendio

En el presente documento, se describen compuestos como los definidos en las reivindicaciones que tienen actividad como péptidos que penetran en las células. En algunos ejemplos, los compuestos pueden comprender una unidad estructural del péptido que penetra en la célula y una unidad estructural de carga. La unidad estructural de carga puede comprender una o más unidades estructurales detectables, una o más unidades estructurales terapéuticas, una o más unidades estructurales de direccionamiento, o cualquier combinación de ellas.

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica. En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula y la unidad estructural de carga juntas son cíclicas; esto se denomina aquí una configuración "endocíclica". En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica y la unidad estructural de carga está unida a la estructura cíclica de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula; esto se denomina aquí una configuración "exocíclica". En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga es cíclica y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y juntas forman un sistema bicíclico fusionado; esto se denomina en el presente documento una configuración "bicíclica".

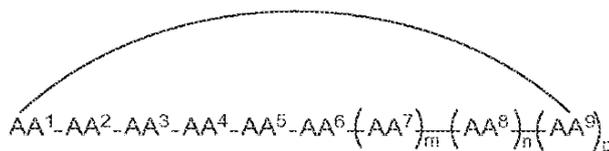
En algunos ejemplos, los compuestos pueden ser de la fórmula I:



I

en donde AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup>, AA<sup>3</sup>, AA<sup>4</sup>, AA<sup>5</sup>, AA<sup>6</sup>, AA<sup>7</sup>, AA<sup>8</sup> y AA<sup>9</sup> (es decir, AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>) son cada uno independientemente un aminoácido; y m, n y p se seleccionan independientemente de 0 y 1. En otros ejemplos, de la fórmula I, puede haber más de 9 aminoácidos, de modo que cuando m y p son 1, n es 2 o más. Estos péptidos más grandes se describen con cada una de las fórmulas de este documento, por ejemplo, IA, II, IIa, IIb y IIc. En algunos ejemplos, tres o más aminoácidos son arginina y uno o más son fenilalanina. En otros ejemplos, uno o más aminoácidos son naftilalanina o triptófano.

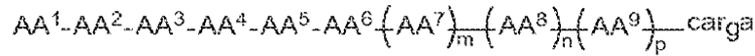
En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y los compuestos pueden ser de la fórmula Ia:



Ia

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I, y en donde la línea curva indica un enlace covalente.

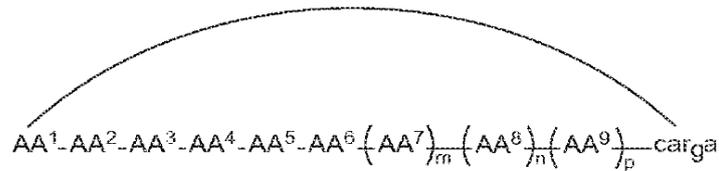
En algunos ejemplos, el compuesto comprende además una unidad estructural de carga, y los compuestos pueden ser de la fórmula II:



II

en donde la unidad estructural de carga puede comprender una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida, o una combinación de las mismas y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

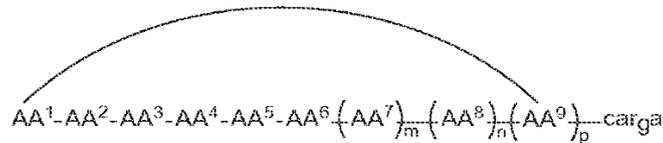
5 En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula y la unidad estructural de carga juntas son cíclicas, y los compuestos son de la fórmula IIa:



IIa

10 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

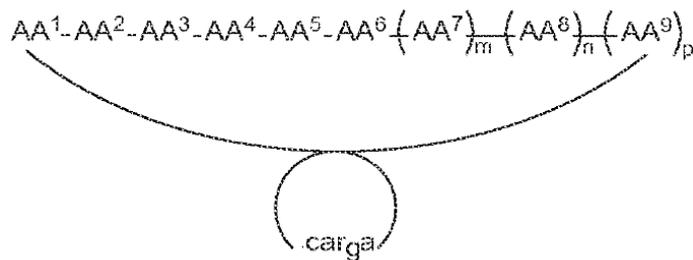
15 En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica y la unidad estructural de carga se adjunta a la estructura cíclica de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula, y los compuestos son de la fórmula IIb:



IIb

20 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga es cíclica y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y juntas forman un sistema bicíclico fusionado, y los compuestos son de la fórmula IIc:



IIc

25 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

Los aminoácidos se pueden acoplar mediante un enlace peptídico. Los aminoácidos se pueden acoplar a la unidad estructural de carga en el grupo amino, el grupo carboxilato o la cadena lateral.

30 En algunos ejemplos, al menos un aminoácido comprende naftilalanina o un análogo o derivado de la misma. En algunos ejemplos, al menos tres de los aminoácidos comprenden independientemente arginina o un análogo o derivado de la misma. En algunos ejemplos, al menos un aminoácido comprende fenilalanina o un análogo o derivado de la misma. En algunos ejemplos, al menos un aminoácido comprende glutamina o un análogo o derivado de la misma.

35 En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula puede por cualquiera de la SEQ ID

NO: 1 a la SEQ ID NO: 90. En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula puede ser una variante de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 90.

5 La unidad estructural de carga puede comprender cualquier carga de interés, por ejemplo, una unidad estructural enlazadora, una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida, y similares, o cualquier combinación de las mismas.

10 La unidad estructural de carga se puede unir a la unidad estructural del péptido que penetra en la célula en el grupo amino, el grupo carboxilato, o la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula (por ejemplo, en el grupo amino, el carboxilato grupo, o la cadena lateral o cualquiera de AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>).

15 En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica comprende una unidad estructural dirigida. La unidad estructural dirigida puede comprender, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que puede dirigirse a uno o más dominios enzimáticos. En algunos ejemplos, la unidad estructural dirigida puede comprender un inhibidor contra una proteína que puede desempeñar un papel importante en una enfermedad, como cáncer, fibrosis quística, diabetes, obesidad o combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Ras (por ejemplo, K-Ras), PTP1B, Pin1, Grb2 SH2, CAL PDZ, y similares, o combinaciones de los mismos.

20 En el presente documento, también se describen composiciones que comprenden los compuestos allí descritos. En el presente documento, también se describen sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos.

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

30 En este documento también se proporcionan métodos para tratar, prevenir o mejorar el cáncer en un sujeto. Los métodos incluyen administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones allí descritos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los métodos de tratamiento o prevención del cáncer descritos en el presente documento pueden incluir además el tratamiento con uno o más agentes adicionales (por ejemplo, un agente contra el cáncer o radiación ionizante).

35 En el presente documento, también se describen métodos para destruir una célula tumoral en un sujeto. El método incluye poner en contacto la célula tumoral con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe aquí, y opcionalmente incluye la etapa de irradiar la célula tumoral con una cantidad eficaz de radiación ionizante. Además, los métodos de radioterapia de tumores se proporcionan en el presente documento. Los métodos incluyen poner en contacto la célula tumoral con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe en este documento, e irradiar el tumor con una cantidad eficaz de radiación ionizante.

40 En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar un cáncer o un tumor en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Ras (por ejemplo, K-Ras), PTP1B, Pin1, Grb2 SH2, o combinaciones de los mismos.

45 El objeto descrito también se refiere a los métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno o afección metabólica. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en este documento se administra a un sujeto que tiene un trastorno metabólico y que necesita tratamiento para el mismo. En algunos ejemplos, el trastorno metabólico puede comprender diabetes de tipo II. En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar el trastorno metabólico en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra PTP1B.

50 El objeto descrito también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno o afección inmune. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en este documento se administra a un sujeto que tiene un trastorno inmune y que está en necesidad de tratamiento del mismo. En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar el trastorno inmune en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Pin1.

55 El objeto descrito también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que tiene fibrosis quística. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en el presente documento se administra a un sujeto que tiene fibrosis quística y que necesita el tratamiento de la misma. En algunos ejemplos de los métodos para tratar la fibrosis quística en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden

comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra CAL PDZ.

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

Descripción de las figuras

10 Las figuras adjuntas, que se incorporan y constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios aspectos que se describen a continuación.

La Figura 1 muestra las estructuras que exhiben el acoplamiento de carga durante el suministro endocíclico (A), exocíclico (B) y bicíclico (C) de cargas (mostradas en gris claro) por cF $\Phi$ R<sub>4</sub>.

15 La Figura 2 muestra las estructuras de algunos de los péptidos utilizados en este estudio.

La Figura 3 muestra un esquema que muestra la síntesis de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-S-S-GFP.

20 La Figura 4 muestra un esquema que muestra la síntesis de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PTP1B.

La Figura 5 muestra la unión de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, R<sub>g</sub> y Tat marcados con FITC a (A) SUV y (B) sulfato de heparina.

25 La Figura 6 muestra imágenes confocales representativas de células en vivo de células HEK293 tratadas durante 2 h con péptidos marcados con rodamina B y marcador de captación en fase líquida, dextran<sup>FITC</sup>. (A) Células tratadas con 5  $\mu$ M de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>5</sub> y dextran<sup>FITC</sup> en la misma sección Z. (B) Células tratadas con 5  $\mu$ M de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-R<sub>5</sub> y dextran<sup>FITC</sup> en la misma sección Z.

30 La Figura 7 muestra el efecto de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> en la endocitosis de dextran<sup>Alexa488</sup> por las células HeLa. Las células HeLa se trataron con DMEM transparente que no contenía suplemento, solo 1  $\mu$ M de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M de dextran<sup>Alexa488</sup> solo, o ambos 1  $\mu$ M de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> y 100  $\mu$ M de dextran<sup>Alexa488</sup>. MFI, intensidad de fluorescencia media.

35 La Figura 8 muestra el efecto del pH sobre la fluorescencia de CAP. cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP se desfosforiló con fosfatasa alcalina y se purificó por HPLC y se midió su fluorescencia a los pH indicados.

40 La Figura 9 muestra la internalización de péptidos que contienen pCAP en células cultivadas: I, PCP sin marcar; II, cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP; III, cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; IV, R<sub>g</sub>-PCP; V, Tat-PCP; y VI, Antp-PCP. (A) Imágenes confocales representativas de células en vivo de células HEK293 tratadas con 5  $\mu$ M de péptidos. Panel superior, tinción nuclear con DRAQ5; panel inferior, fluorescencia CAP en la misma sección Z. (B) Citometría de flujo de células HeLa tratadas con 0 o 10  $\mu$ M de péptidos. (C) Fluorescencia de CAP de (B) después de la sustracción de fluorescencia de fondo (células no tratadas). MFI, intensidad de fluorescencia media.

45 La Figura 10 muestra imágenes representativas microscópicas confocales de células en vivo de células HEK293 tratadas durante 2 h con péptidos marcados con rodamina B (5  $\mu$ M cada uno) y marcador de endocitosis en fase líquida, dextran<sup>FITC</sup> (0,5 mg/ml). La fluorescencia roja de la rodamina B y la fluorescencia verde de dextran<sup>FITC</sup> de la misma sección Z y su imagen combinada se muestran en cada panel. Las imágenes ampliadas de una o más células típicas se muestran en cada caso para indicar la distribución intracelular de los péptidos internalizados. (A) Células tratadas con biciclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>5</sub>)<sup>Rho</sup>; (B) monociclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>5</sub>)<sup>Rho</sup>; (C) biciclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>7</sub>)<sup>Rho</sup>; (D) monociclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>7</sub>)<sup>Rho</sup>; (E) biciclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-RARAR)<sup>Rho</sup>; y (F) biciclo(F $\Phi$ R<sub>4</sub>-DA-DAD)<sup>Rho</sup>.

50 La Figura 11 muestra (A) estructuras de conjugados CPP-S-S-GFP. (B) Imágenes confocales de células vivas de células de mamíferos después de 2 h de tratamiento con 1  $\mu$ M de GFP (I), Tat-S-S-GFP (II) o cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-S-S-GFP (III) y tinción nuclear DRAQ5. Todas las imágenes fueron grabadas en la misma sección Z.

55 La Figura 12 muestra (A) el análisis de transferencia Western de los niveles de proteína pY global de células NIH 3T3 después del tratamiento con PTP1B o cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PTP1B 0-500 nM (IB: anticuerpo anti-pY 4G10). (B) Las mismas muestras que en (A) se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. M, marcadores de peso molecular.

60 La Figura 13 muestra la (A) comparación de la estabilidad sérica de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, Tat, R<sub>g</sub> y Antp. (B) Citotoxicidad de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>. Las líneas celulares indicadas se trataron con DMSO (control), 5  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> durante 24 h y el porcentaje de células vivas se determinó mediante un ensayo de MTT.

65 La Figura 14 muestra el ensayo de MTT de varias células de mamíferos después del tratamiento con cF $\Phi$ R<sub>4</sub> (5 o 50  $\mu$ M) durante (A) 48 h o (B) 72 h.

La Figura 15 muestra un diagrama que indica los puntos a lo largo de la ruta endocítica donde  $cF\Phi R_4$ ,  $R_9$  y Tat escapan en el citoplasma y donde se propone que funcionen inhibidores específicos.

5 La Figura 16 muestra un esquema que indica la estrategia de ciclación reversible para suministrar cargas de peptidilos lineales en células de mamíferos. GSH, glutatión.

10 La Figura 17 muestra la (A) síntesis de péptido ciclado con enlace disulfuro. (B) Síntesis del péptido ciclado con enlace tioéter. Reactivos y condiciones: (a) Química estándar de Fmoc/HATU; (b) piperidina/DMF; (c) ácido 3,3'-ditiiodipropiónico/DIC; (d)  $\beta$ -mercaptoetanol/DMF; (e) reactivo modificado K; (f) trituración; (g) DMSO/DPBS (pH 7,4). (h) ácido 4-bromobutírico/DIC; (i) 1% de TFA/DCM; (j) 1% de DIPEA/DMF; PG, grupo protector. Trt, tritilo; Mmt, metoxitritilo. (C) Estructuras de los péptidos 1 y 2 marcados con FITC. (D) Estructuras de pCAP (ácido fosfocoumaril aminopropiónico) que contienen los péptidos 1-PCP y 2-PCP. (E) Estructuras de Amc (7-amino-4-metilcourmarina) que contienen sustratos fluorogénicos de caspasa 3-7. (F) Estructuras de ligandos de dominio CAL-PDZ marcados con FITC 9-11.

15 La Figura 18 muestra (A) imágenes microscópicas confocales de células vivas de células HeLa tratadas con 5  $\mu$ M de péptidos marcados con FITC 1 (I) o 2 (II), marcador de endocitosis Dextran<sup>Rho</sup> (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) y tinción nuclear DFJQA5. Las imágenes en diferentes canales de fluorescencia se registraron en la misma sección Z. (B) Citometría de flujo de células HeLa tratadas con 5  $\mu$ M de péptidos 1, 2 marcados con FITC, o FITC solo.

20 La Figura 19 muestra (A) el análisis FACS de células HeLa tratadas con 0 o 5  $\mu$ M de péptidos 1-PCP, 2-PCP durante 2 h. (B) Fluorescencia de CAP de (A) después de la sustracción de fluorescencia de fondo (célula no tratada). MFI, intensidad de fluorescencia media.

25 La Figura 20 muestra una comparación de la estabilidad proteolítica de los péptidos 1 y 2.

La Figura 21 muestra la liberación dependiente del tiempo del producto de cumarina fluorogénico por las células Jurkat tratadas con los péptidos 3-7 (5  $\mu$ M) en ausencia y presencia de 100  $\mu$ M de inhibidor de caspasa Z-VAD(OMe)-FMK (FMK).

30 La Figura 22 muestra (A) la estructura del inhibidor de CAL-PDZ 8. (B) La unión del péptido 8 al dominio CAL-PDZ en presencia o ausencia de reactivo reductor. (C) Imágenes microscópicas de células vivas de células HeLa tratadas con péptido 8 (5  $\mu$ M) y DRAQ5 en la misma sección Z. I, fluorescencia verde del péptido internalizado 8; II, superposición de fluorescencia del péptido verde y tinción nuclear azul. (D) Tinción inmunofluorescente que muestra la distribución de CFTR en presencia o ausencia de Corr-4a (10  $\mu$ M) y péptido no marcado 8 (50  $\mu$ M). (E) Ensayos de SPQ que muestran un aumento de fluorescencia inducido por estimulación específica de CFTR en pendiente en ausencia o presencia de VX809 (20  $\mu$ M) y péptido 8 (50  $\mu$ M). Los valores de P se calcularon a partir de la prueba t de dos colas.

40 La Figura 23 muestra un esquema de la evolución de un inhibidor de PTP1B permeable a las células.

45 La Figura 24 muestra un esquema del diseño y síntesis de la biblioteca de péptidos cíclicos. Reactivos y condiciones: (a) química estándar de Fmoc/HBTU; (b) remojar en agua; (c) 0,1 equivalentes de Fmoc-Glu ( $\delta$ -NHS) - OAll, 0,4 equivalentes de Boc-Met-OH en Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) piperidina; (e) dividir en dos partes; (f) síntesis de dividir y reunir por química Fmoc/HATU; (g) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>; (h) PyBOP, HOBt; y (i) Reactivo K. X<sup>2</sup>, F<sub>2</sub>Pmp al 10% y Tyr al 90%; X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup>-X<sup>5</sup>, posiciones aleatorias;  $\Phi$ , L-2-naftilalanina; CPP, motivo de penetración celular F $\Phi$ P<sub>4</sub> o R<sub>4</sub> $\Phi$ F.

50 La Figura 25 muestra la inhibición competitiva de PTP1B por el inhibidor del péptido monocíclico 2. (A) Diagramas de Lineweaver-Burk para la hidrólisis catalizada por PTP1B de pNPP (0-24 mM) en presencia de concentraciones variables del inhibidor 2 (0, 22,5, 45 y 90 nM). (B) Diagrama secundario de la relación constante de Michaelis (K/K<sub>0</sub>) en función de [I].

55 La Figura 26 muestra las (a) imágenes microscópicas confocales de células vivas (la misma sección Z) de las células de cáncer de pulmón A549 después del tratamiento durante 2 h con 5  $\mu$ M de inhibidor marcado con FITC 2 (panel superior) o 4 (panel inferior) y marcador de endocitosis dextran<sup>Rho</sup> (1,0 mg/ml). (b) Gráfico de Lineweaver-Burk que muestra una inhibición competitiva de PTP1B por 0, 28, 56 y 112 nM de inhibidor 4. (c) Sensibilidad de varias PTP a inhibición por el inhibidor 4 (todas las actividades fueron relativas a la ausencia de inhibidor).

60 La Figura 27 muestra la síntesis en fase sólida del inhibidor 4. Reactivos y condiciones: a) química estándar de Fmoc; b) ácido trimésico, HBTU; c) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, N-metilalanina; d) PyBOP; e) TFA.

La Figura 28 muestra una comparación de la estabilidad sérica del inhibidor 2 monocíclico de PTP1B y el inhibidor 4 bicíclico.

65 La Figura 29 muestra los niveles globales de proteína pY en células A549 después del tratamiento con 0-5  $\mu$ M de inhibidor 4 durante 2 h. (b) El análisis de SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) de las mismas muestras de (a)

indica una carga uniforme de la muestra en todos los carriles, (c) Efecto del inhibidor 4 sobre la fosforilación del receptor de insulina en los sitios Tyr<sup>1162</sup> y Tyr<sup>1163</sup>. Las células HepG2 se trataron con las concentraciones indicadas de inhibidor 4 durante 2 h y luego se estimularon con insulina (100 nM) durante 5 min, seguido de SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-IRpY<sup>1162/pY<sup>1163</sup></sup>. (d) Cuantificación de los niveles de IRpY de (c) (los datos mostrados son la media ± DE de cinco experimentos independientes).

La Figura 30 muestra la conversión del inhibidor de Pin1 impermeable en un inhibidor bicíclico permeable a las células.

La Figura 31 muestra el análisis de FA de la unión del inhibidor 5-9 de Pin1 a Pinl.

La Figura 32 muestra la competencia para unirse a Pinl por los inhibidores 5 y 7. Cada reacción contenía 0,1 μM de inhibidor 5 marcado con FITC, 1 μM de Pinl, y 0-5 μM de inhibidor 5 no marcado (a) o inhibidor 7 (b) y el FA el valor fue medido y graficado contra la concentración del competidor.

La Figura 33 muestra la captación celular de los inhibidores de Pinl. (a, b) Imágenes microscópicas confocales de células vivas de células HEK293 tratadas con 5 μM de inhibidor de Pinl marcado con FITC 5 (a) o 7 (b) y 1 mg/ml de marcador de endocitosis dextran<sup>Rho</sup> durante 2 h. Todas las imágenes fueron grabadas en la misma sección Z. (c) Análisis de FACS de células HeLa después de un tratamiento de 2 h con DMSO o 5 μM de inhibidor de Pinl 5, 7, 8 o 9 marcado con FITC. MFI, intensidad de fluorescencia media. Procedimiento: las células HeLa se cultivaron en placas de seis pocillos (2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) durante 24 h. El día del experimento, las células se incubaron con 5 μM de péptido bicíclico marcado con FITC o péptido monocíclico de control en DMEM libre de rojo fenol suplementado con FBS al 1%. Después de 2 h, la solución peptídica se retiró y las células se lavaron con DPBS, se trataron con tripsina al 0,25% durante 5 minutos y se lavaron de nuevo con DPBS. Finalmente, las células se resuspendieron en el regulador de citometría de flujo y se analizaron mediante citometría de flujo (BD FACS Aria), con excitación a 535 nm.

La Figura 34 muestra el efecto de los inhibidores de Pinl 5, 7, 8 y 9 en la proliferación de células cancerosas. Se sembraron células HeLa (100 μL/cada pocillo, 5 x 10<sup>4</sup> células/ml) en una placa de cultivo de 96 pocillos y se dejó crecer durante la noche en DMEM complementado con FBS al 10%. Se agregaron concentraciones variables de inhibidor de Pinl (0-5 μM) a los pocillos y las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Después de eso, se agregaron 10 μL de una solución madre de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. La placa se incubó a 37°C durante 4 h y se añadieron a cada pocillo 100 μL de solución solubilizante de SDS-HCl, seguido de una mezcla completa. La placa se incubó a 37°C durante la noche y la absorbancia del producto de formazano se midió a 570 nm en un lector de placa Molecular Devices Spectramax M5. Cada experimento se realizó por triplicado y las células no tratadas con péptido se usaron como control.

La Figura 35 muestra imágenes confocales de células vivas de miocitos cardíacos ventriculares de ratón después del tratamiento durante 3 h con 5 μM de c(FΦRRRRQ)-K(FITC) (a) y c(fΦRrRrQ)-K(FITC) (b). (c) Etiquetado de calmodulina (T5C) con péptido que penetra en las células cíclicas mediante un enlace disulfuro, (d) Imágenes confocales de células vivas de miocitos cardíacos ventriculares de ratón después del tratamiento durante 3 h con 6 μM de calmodulina marcada con Cy3 conjugada con cFΦR<sub>4</sub>.

La Figura 36 muestra la evolución de los inhibidores de péptidos bicíclicos contra Pinl. Las unidades estructurales derivadas de la selección de bibliotecas se muestran en gris, mientras que los cambios realizados durante la optimización se muestran en gris claro.

La Figura 37 muestra la caracterización del péptido 37. (a) Unión al péptido 37 marcado con FITC a Pinl como se analiza mediante anisotropía fluorescente (FA). (b) Competición entre el péptido 37 y el péptido marcado con FITC (100 nM) para unirse a Pinl (400 nM) según lo monitoreado por FA. (c) Efecto del péptido 37 sobre la actividad isomerasa cis-trans de Pinl, Pin4, FKBP12 y ciclofilina A usando Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA como sustrato. (d) Comparación de la estabilidad sérica de los péptidos 1 y 37.

La Figura 38 muestra la actividad celular del péptido 37. (a) Captación celular de los péptidos 1, 37 y 46 (5 μM) por las células HeLa según se analizó mediante citometría de flujo. MFI, intensidad de fluorescencia media; ninguna, células no tratadas (sin péptido), (b) efecto antiproliferativo de los péptidos 37, 46 y 47 en células HeLa medido por el ensayo MTT, (c) transferencias Western que muestran el efecto de los péptidos 1, 37 y 47 en el nivel de proteína de PML en células HeLa. Se usó β-actina como control de carga. (d) Cuantificación de los resultados de la transferencia Western de (c). Los datos informados fueron posteriores a la sustracción de fondo y representan la media ± DE de 3 experimentos independientes.

#### Descripción detallada

Los compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de aspectos específicos de la materia descrita y los ejemplos y figuras incluidos en el mismo.

Antes de que se revelen y describan los presentes compuestos, composiciones y métodos, debe entenderse que los aspectos descritos a continuación no se limitan a métodos sintéticos específicos o reactivos específicos, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo aspectos particulares y no pretende ser limitante.

Además, a lo largo de esta memoria descriptiva, se hace referencia a varias publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan aquí como referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece el objeto descrito.

#### Definiciones generales

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán con los siguientes significados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra “comprender” y otras formas de la palabra, como “que comprende” y “comprende”, significa que incluye, pero no se limita y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Tal como se utiliza en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una composición” incluye mezclas de dos o más de tales composiciones, la referencia a “un agente” incluye mezclas de dos o más de dichos agentes, la referencia a “el componente” incluye mezclas de dos o más de tales componentes, y similares.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede o no puede ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que ocurre el evento o circunstancia y casos en los que no.

Los intervalos se pueden expresar en este documento a partir de “aproximadamente” un valor particular, y/o de “aproximadamente” otro valor particular. Por “aproximadamente” se entiende dentro del 5% del valor, por ejemplo, dentro de 4, 3, 2 o 1% del valor. Cuando se expresa tal intervalo, otro aspecto incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se comprenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

Como se usa en este documento, por “sujeto” se entiende un individuo. Por lo tanto, el “sujeto” puede incluir animales domesticados (por ejemplo, gatos, perros, etc.), ganado (por ejemplo, ganado, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, etc.), conejillo de Indias, etc.), y aves. “Sujeto” también puede incluir un mamífero, como un primate o un humano. Así, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario. El término “paciente” se refiere a un sujeto bajo el tratamiento de un clínico, por ejemplo, un médico.

El término “inhibir” se refiere a una disminución en una actividad, respuesta, condición, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir, pero no se limita a la ablación completa de la actividad, la respuesta, la afección o la enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10% en la actividad, respuesta, condición o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por lo tanto, la reducción puede ser de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, o cualquier cantidad de reducción intermedia en comparación con los niveles nativos o de control.

Por “reducir” u otras formas de la palabra, como “que reduce” o “reducción”, significa disminuir un evento o característica (por ejemplo, el crecimiento del tumor). Se entiende que esto es típicamente en relación con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, es relativo, pero que no siempre es necesario que se haga referencia al valor estándar o relativo. Por ejemplo, “reduce el crecimiento del tumor” significa que reduce la tasa de crecimiento de un tumor en relación con un estándar o un control.

Por “prevenir” u otras formas de la palabra, como “que previene” o “prevención”, significa detener un evento o característica en particular, para estabilizar o retrasar el desarrollo o la progresión de un evento o característica en particular, o para minimizar las posibilidades de que ocurra un evento o característica en particular. Prevención no requiere comparación con un control, ya que suele ser más absoluto que, por ejemplo, reducción. Tal como se usa en el presente documento, algo podría reducirse, pero no prevenirse, pero algo que se redujera también podría prevenirse. Del mismo modo, algo podría evitarse, pero no reducirse, pero también podría reducirse algo que se previene. Se entiende que cuando se usa reducir o prevenir, a menos que se indique específicamente lo contrario, el uso de la otra palabra también se describe expresamente. Por ejemplo, los términos “prevenir” o “suprimir” pueden referirse a un tratamiento que previene o frena la aparición de una enfermedad o afección o reduce la gravedad de la enfermedad o afección. Por lo tanto, si un tratamiento puede tratar una enfermedad en un sujeto que tiene síntomas de la enfermedad, también puede prevenir o suprimir esa enfermedad en un sujeto que aún no ha sufrido algunos o

todos los síntomas.

El término “tratamiento” se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Además, este término incluye tratamiento paliativo, es decir, tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la enfermedad, afección patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados.

El término “anticancerígeno” se refiere a la capacidad de tratar o controlar la proliferación celular y/o el crecimiento del tumor en cualquier concentración.

La expresión “terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de la composición utilizada que es suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente la eliminación.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son adecuados, dentro del alcance del buen juicio médico, para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones asociados con una relación razonable de riesgo/beneficio.

El término “portador” significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un compuesto o composición, ayuda o facilita la preparación, almacenamiento, administración, suministro, efectividad, selectividad o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o finalidad prevista. Por ejemplo, un portador puede seleccionarse para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

Los términos “péptido”, “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente para referirse a una molécula natural o sintética que comprende dos o más aminoácidos unidos por el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo amino alfa de otro.

A menos que se indique lo contrario, una fórmula con enlaces químicos mostrada solo como líneas continuas y no como cuñas o líneas de puntos contempla cada posible isómero, por ejemplo, cada enantiómero, diastereómero y compuesto meso, y una mezcla de isómeros, como una mezcla racémica o escalémica.

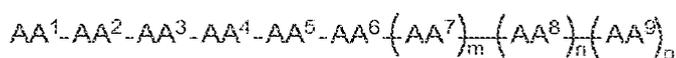
Ahora se hará referencia en detalle a aspectos específicos de los materiales, compuestos, composiciones, artículos y métodos descritos, cuyos ejemplos se ilustran en los Ejemplos y las Figuras adjuntos.

#### Compuestos

En el presente documento, se describen compuestos que tienen actividad como péptidos que penetran en las células. En algunos ejemplos, los compuestos pueden comprender una unidad estructural del péptido que penetra en la célula y una unidad estructural de carga. La unidad estructural de carga puede comprender uno o más unidades estructurales detectables, una o más unidades estructurales terapéuticas, una o más unidades estructurales dirigidas, o cualquier combinación de las mismas.

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica. En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula y la unidad estructural de carga juntas son cíclicas. En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica y la unidad estructural de carga se une a la estructura cíclica de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula. En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga es cíclica y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y juntas forman un sistema bicíclico fusionado.

La unidad estructural del péptido que penetra en la célula puede comprender cinco o más, más específicamente seis o más, por ejemplo, de seis a doce, o de seis a nueve aminoácidos. Cuando hay de seis a nueve aminoácidos, los compuestos pueden ser de la fórmula I:

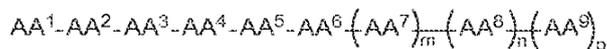


I

en donde AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup>, AA<sup>3</sup>, AA<sup>4</sup>, AA<sup>5</sup>, AA<sup>6</sup>, AA<sup>7</sup>, AA<sup>8</sup> y AA<sup>9</sup> (es decir, AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>) son cada uno independientemente un

aminoácido; y m, n y p se seleccionan independientemente de 0 y 1. Mientras que hay más de 9 aminoácidos, la fórmula I puede tener m y p cada uno es 1 y n puede ser 2 o más, por ejemplo, 2 a 10 o 2 a 5. En algunos ejemplos, tres o más aminoácidos son arginina y uno o más son fenilalanina. En otros ejemplos, uno o más aminoácidos es naftilalanina o triptófano.

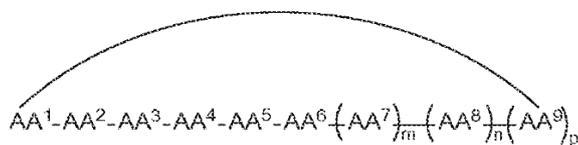
5 En algunos ejemplos, los compuestos pueden ser de la fórmula I:



I

10 en donde AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup>, AA<sup>3</sup>, AA<sup>4</sup>, AA<sup>5</sup>, AA<sup>6</sup>, AA<sup>7</sup>, AA<sup>8</sup> y AA<sup>9</sup> (es decir, AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>) son cada uno independientemente un aminoácido; y m, n y p se seleccionan independientemente de 0 y 1.

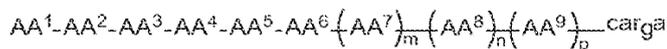
En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y los compuestos pueden ser de la fórmula Ia:



Ia

15 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I, y en donde la línea curva indica un enlace covalente. La línea curva puede ser un enlace covalente en el esqueleto del péptido (es decir, el ácido carboxílico de un AA que forma un enlace amida con la α-amina de otro AA), un enlace entre las cadenas laterales de dos AA, un enlace de una cadena lateral de un AA a la cadena principal de ácido carboxílico o α-amina de otro AA, o un enlace disulfuro entre dos AA.

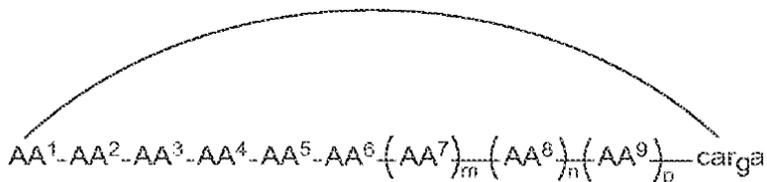
20 En algunos ejemplos, el compuesto comprende además una unidad estructural de carga, y los compuestos pueden ser de la fórmula II:



II

25 en donde la unidad estructural de carga puede comprender una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida, o una combinación de las mismas y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

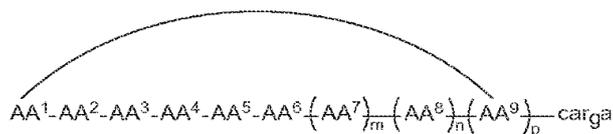
30 En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula y la unidad estructural de carga juntas son cíclicas, y los compuestos son de la fórmula IIa:



IIa

35 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

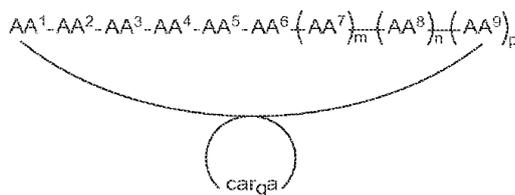
En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica y la unidad estructural de carga se adjunta a la estructura cíclica de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula, y los compuestos son de la fórmula IIb:



IIb

en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

5 En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga es cíclica y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y juntas forman un sistema bicíclico fusionado, y los compuestos son de la fórmula IIc:



IIc

10 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

Péptido que penetra en las células

15 La unidad estructural del péptido que penetra en la célula comprende al menos 5, más específicamente, al menos 6 aminoácidos, aún más específicamente de 6 a 12, de 6 a 9, de 6 a 7, de 7 a 8, de 8 a 9, y más específicamente 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. Para el motivo endocíclico, se pueden usar al menos 5 aminoácidos. También se describe en el presente documento que, para la estructura endocíclica, algunos aminoácidos en la unidad estructural peptídica penetrante también pueden formar parte de la unidad estructural de carga. Por ejemplo, se puede formar una unidad estructural penetrante de péptido FNaIRR cuando es de FNaI y una unidad estructural de carga con dos Arg. En este caso, los dos residuos Arg realizan funciones duales. Así, en algunos casos, la secuencia de la unidad estructural de carga se tiene en cuenta cuando se hace referencia a la unidad estructural que penetra en el péptido.

25 Para el motivo exocíclico, se pueden usar al menos 6 aminoácidos, por ejemplo, la glutamina que se usa para unir la carga.

30 Cada aminoácido puede ser un aminoácido natural o no natural. La expresión "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que es un congénere de un aminoácido natural en el sentido de que tiene una estructura similar a un aminoácido natural de manera que imita la estructura y la reactividad de un aminoácido natural. El aminoácido no natural puede ser un aminoácido modificado y/o un análogo de aminoácido, que no es uno de los 20 aminoácidos naturales comunes o los aminoácidos naturales raros selenocisteína o pirrolisina. Los aminoácidos no naturales también pueden ser el isómero D de los aminoácidos naturales. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a alanina, alosoleucina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, naftilalanina, fenilalanina, ácido piroglutámico, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, un derivado, o combinaciones de los mismos. Estos y otros, se enumeran en la Tabla 1 junto con sus abreviaturas utilizadas en este documento.

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos

| Aminoácido      | Abreviaturas* |
|-----------------|---------------|
| alanina         | Ala (A)       |
| alsoleucina     | Alle          |
| arginina        | Arg (R)       |
| asparagina      | Asn (N)       |
| ácido aspártico | Asp (D)       |

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| cisteína  | Cys (C)                          |
| ciclohexilalanina   | Cha                              |
| ácido 2,3-diaminopropiónico   | Dap                              |
| 4-fluorofenilalanina  | Fpa ( $\Sigma$ )                 |
| ácido glutámico   | Glu (E)                          |
| glutamina   | Gln (Q)                          |
| glicina   | Gly (G)                          |
| histidina   | His (H)                          |
| homoprolina   | Pip ( $\theta$ )                 |
| isoleucina  | Ile (I)                          |
| leucina   | Leu (L)                          |
| lisina  | Lys (K)                          |
| metionina   | Met (M)                          |
| naftilalanina   | Nal ( $\Phi$ )                   |
| norleucina  | Nle ( $\Omega$ )                 |
| fenilalanina  | Phe (F)                          |
| fenilglicina  | Phg ( $\psi$ )                   |
| 4-(fosfonodifluorometil)fenilalanina  | F <sub>2</sub> Pmp ( $\Lambda$ ) |
| ácido piperídico  | Pp ( $\vartheta$ )               |
| prolina   | Pro (P)                          |
| sarcosina   | Sar ( $\Xi$ )                    |
| selenocisteína  | Sec (U)                          |
| serina  | Ser (S)                          |
| treonina  | Thr (T)                          |
| tirosina  | Tyr (Y)                          |
| triptófano  | Trp (W)                          |
| valina  | Val (V)                          |
| * abreviaturas de una letra: cuando se muestran letras mayúsculas en este documento, indica la forma de L-aminoácido, cuando se muestra en minúsculas en el presente, indica la forma de D-aminoácido |                                  |

Los aminoácidos se pueden acoplar mediante un enlace peptídico. Los aminoácidos se pueden acoplar a la unidad estructural de carga en el grupo amino, el grupo carboxilato o la cadena lateral.

5 En algunos ejemplos de la fórmula I, al menos un aminoácido comprende naftilalanina o triptófano, o análogos o derivados de los mismos. En algunos ejemplos de la fórmula I, al menos tres de los aminoácidos comprenden independientemente arginina o un análogo o derivado de la misma. En algunos ejemplos de la fórmula I, al menos un aminoácido comprende fenilalanina, fenilglicina o histidina, o análogos o derivados de las mismas. En algunos ejemplos de la fórmula I, al menos un aminoácido comprende glutamina o un análogo o derivado de la misma.

10 En algunos ejemplos, la unidad estructural de péptido que penetra en la célula (CPP) puede ser cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 2. En algunos ejemplos, el péptido que penetra en la célula puede ser el inverso de cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 2. En algunos ejemplos, la secuencia peptídica que penetra en la célula puede ser una forma cíclica de cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 2.

15

## ES 2 739 613 T3

Tabla 2. Secuencias de CPP - lineales o cíclicas

| SEQ ID NO   | Secuencia de CPP | Nº de AA | Nº de residuos R |
|---|------------------|----------|------------------|
| 1   | FΦRRRQ           | 6        | 3                |
| 2   | FΦRRRC           | 6        | 3                |
| 3   | FΦRRRU           | 6        | 3                |
| 4   | RRRΦFQ           | 6        | 3                |
| 5   | RRRRΦF           | 6        | 4                |
| 6   | FΦRRRR           | 6        | 4                |
| 7   | FφrRrRq          | 7        | 3                |
| 8   | FφrRrRQ          | 7        | 3                |
| 9   | FΦRRRRQ          | 7        | 4                |
| 10  | fΦRrRrQ          | 7        | 4                |
| 11  | RRFRΦRQ          | 7        | 4                |
| 12  | FRRRRΦQ          | 7        | 4                |
| 13  | rRFRΦRQ          | 7        | 4                |
| 14  | RRΦFRRQ          | 7        | 4                |
| 15  | CRRRRFWQ         | 7        | 4                |
| 16  | FfΦDRrRrQ        | 8        | 4                |
| 17  | FFΦRRRRQ         | 8        | 4                |
| 18  | RFRFRΦRQ         | 8        | 4                |
| 19  | URRRRFWQ         | 8        | 4                |
| 20  | CRRRRFWQ         | 8        | 4                |
| 21  | FΦRRRRQK         | 8        | 4                |
| 22  | FΦRRRRQC         | 8        | 4                |
| 23  | fΦRrRrRQ         | 8        | 5                |
| 24  | FΦRRRRRQ         | 8        | 5                |
| 25  | RRRRΦFDQC        | 9        | 4                |
| 26  | FΦRRR            | 5        | 3                |
| 27  | FWRRR            | 5        | 3                |
| 28  | RRRΦF            | 5        | 3                |
| 29  | RRRWF            | 5        | 3                |
| Φ = L-naftilalanina; φ) = D-naftilalanina; Q = L-norleucina |                  |          |                  |

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula puede ser cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 29. En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula puede ser una variante de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 29. Las variantes peptídicas son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden implicar modificaciones en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos por lo general se dividen en una o más de tres clases: variantes de sustitución, de inserción o de delección. Las inserciones incluyen fusiones de terminales amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Por lo general, las inserciones serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones con terminales amino o carboxilo, por ejemplo, del orden de 1 a 3 residuos. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia peptídica. Típicamente, no se eliminan más de 1 a 3 residuos en cualquier sitio dentro del péptido. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos únicos, pero pueden ocurrir en varias ubicaciones diferentes a la vez; las inserciones generalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 3 residuos de

aminoácidos; y las deleciones oscilarán entre 1 y 3 residuos. Las deleciones o inserciones se realizan preferiblemente en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 residuos o una inserción de 2 residuos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a un constructo final. Las variantes de sustitución son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se hacen de acuerdo con la siguiente Tabla 3 y se denominan sustituciones conservadoras.

Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos

| Sustituciones conservadoras de ejemplo |  |
|--|--|
| Ala reemplazado por ser                | Leu reemplazado por ile o val            |
| Arg reemplazado por lys o gln          | Lys reemplazado por arg o gin            |
| Asn reemplazado por gln o his          | Met reemplazado por leu o ile            |
| Asp reemplazado por glu                | Phe reemplazado por met, leu, tyr, o fpa |
| Cys reemplazado por ser                | Ser reemplazado por thr                  |
| Gln reemplazado por asn o lys          | Thr reemplazado por ser                  |
| Glu reemplazado por asp                | Trp reemplazado por tyr                  |
| Gly reemplazado por pro                | Tyr reemplazado por trp o phe            |
| His reemplazado por asn o gln          | Val reemplazado por ile o leu            |
| Ile reemplazado por leu o val          | Nal reemplazado por Trp o Phe            |

Se realizan cambios sustanciales en la función seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las de la Tabla 3, es decir, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de las proteínas serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye con (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye con (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, argininilo o histidilo, se sustituye con (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye con (o por) una que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) al aumentar el número de sitios para la sulfatación y/o glicosilación.

Por ejemplo, el reemplazo de un residuo de aminoácido con otro que es biológica y/o químicamente similar es conocido por los expertos en la técnica como una sustitución conservadora. Por ejemplo, una sustitución conservadora sería reemplazar un residuo hidrófobo por otro, o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Dichas variaciones sustituidas de modo conservador de cada secuencia descrita explícitamente se incluyen dentro de los péptidos proporcionados en este documento.

Se entiende que una forma de definir las variantes de las unidades estructurales de péptidos que penetran en las células es a través de la definición de las variantes en términos de homología/identidad con secuencias conocidas específicas. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 29 establece cada una de ellas una secuencia particular. Se describen específicamente las variantes de estos péptidos que tienen al menos un 85%, 90%, 95% o 97% de homología con la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 29. Los expertos en la técnica comprenden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología se puede calcular después de alinear las dos secuencias para que la homología esté en su nivel más alto.

Además de las variantes de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 29 son derivados de estos péptidos que también funcionan en los métodos y composiciones descritos. Los derivados se forman reemplazando uno o más residuos con un residuo modificado, donde se ha modificado la cadena lateral del residuo. Los ejemplos adicionales se muestran en las Tablas 6 y 18 e incluyen variantes de los mismos.

#### Unidad de carga

La unidad estructural de carga puede comprender cualquier carga de interés, por ejemplo, una unidad estructural enlazadora, una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida, y similares, o cualquier combinación de las mismas. En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga puede

comprender uno o más aminoácidos adicionales (por ejemplo, K, UK, TRV); un enlazador (por ejemplo, enlazador bifuncional LC-SMCC); coenzima A; ácido fosfocumarilaminopropiónico (pCAP); ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (miniPEG); ácido L-2,3-diaminopropiónico (Dap o J); L-β-naftilalanina; ácido L-pipecólico (Pip); sarcosina; ácido trimésico; 7-amino-4-metilcoumarina (Amc); isotiocianato de fluoresceína (FITC); L-2-naftilalanina; norleucina; ácido 2-aminobutírico; rodamina B (Rho); dexametasona (DEX); o combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga puede comprender cualquiera de las enumeradas en la Tabla 4, o derivados o combinaciones de las mismas.

Tabla 4. Ejemplo de unidades estructurales de carga

| SEQ ID NO  | Abreviatura    | Secuencia* |
|--|----------------|------------|
| 30   | R <sub>5</sub> | RRRRR      |
| 31   | A <sub>5</sub> | AAAAA      |
| 32   | F <sub>4</sub> | FFFF       |
| 33   | PCP            | DE(pCAP)LI |
| 34   | A <sub>7</sub> | AAAAAAA    |
| 35   |                | RARAR      |
| 36   |                | DADAD      |
| 37   |                | DΩUD       |
| 38   |                | UTRV       |
| *pCAP, ácido fosfocumarilaminopropiónico; Ω, norleucina; U, ácido 2-aminobutírico. |                |            |

#### Unidad estructural detectable

La unidad estructural detectable puede comprender cualquier marca detectable. Los ejemplos de marcas detectables adecuadas incluyen, pero no se limitan a una marca UV-Vis, una marca de infrarrojo cercano, un grupo luminiscente, un grupo fosforescente, una marca de resonancia de espín magnético, un fotosensibilizador, un grupo fotoescindible, un centro quelante, un átomo pesado, un isótopo radiactivo, una marca de resonancia de espín detectable por isótopos, una unidad estructural paramagnética, un cromóforo o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la marca es detectable sin la adición de reactivos adicionales.

En algunas realizaciones, la unidad estructural detectable es una unidad estructural detectable biocompatible, de modo que los compuestos pueden ser adecuados para su uso en una variedad de aplicaciones biológicas. "Biocompatible" y "biológicamente compatible", como se usan en este documento, generalmente se refieren a compuestos que son, junto con cualquier metabolito o producto de degradación de los mismos, en general no tóxicos para las células y tejidos, y que no causan ningún efecto adverso significativo para las células y tejidos cuando las células y los tejidos se incuban (por ejemplo, se cultivan) en su presencia.

La unidad estructural detectable puede contener un luminóforo, como una marca fluorescente o una marca de infrarrojo cercano. Los ejemplos de luminóforos adecuados incluyen, pero no se limitan a porfirinas metálicas; benzoporfirinas; azabenzoporfirina; naptoporfirina; falocianina; hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como perileno, perilendiimina, pirenos; tintes azoicos; tintes de xanteno; dipiorometeno de boro, dipiorometeno de aza-boro, tintes de cianina, complejos de metal-ligando tales como bipyridina, bipyridilos, fenantrolina, coumarina y acetilacetatos de rutenio e iridio; acridina, derivados de oxazina tales como benzofenoxazina; aza-anuleno, escuaraina; 8-hidroxiquinolina, polimetinos, nanopartículas luminiscentes, tales como puntos cuánticos, nanocristales; carboestirilo; complejo de terbio; fósforo inorgánico; ionóforos tales como los éteres de corona afiliados o tintes derivados; o combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de luminóforos adecuados incluyen, pero no se limitan a octaetilporfirina de Pd (II); octaetilporfirina de Pt (II); tetrafenilporfirina de Pd (II); tetrafenilporfirina de Pt (II); meso-tetrafenilporfirina tetrabenzoporfina de Pd (II); meso-tetrafenilmethylbenzoporfirina de Pt (II); octaetilporfirina cetona de Pd (II); octaetilporfirina cetona de Pt (II); meso-tetra(pentafluorofenil)porfirina de Pd (II); meso-tetra(pentafluorofenil)porfirina de Pt (II); tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) de Ru (II) (Ru(dpp)<sub>3</sub>); tris(1,10-fenantrolina) de Ru (II) (Ru(phen)<sub>3</sub>), cloruro de tris(2,2'-bipiridin)rutenio (II) hexahidrato (Ru(bpy)<sub>3</sub>); eritrosina B; fluoresceína; isotiocianato de fluoresceína (FITC); eosina; ((N-metil-bencimidazol-2-il)-7-(dietilamino)-coumarina) de iridio (III); ((benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-coumarin)-2-(acetilacetato) de indio (III); tintes Lumogen; rojo fluorescente Macroflex; amarillo fluorescente Macrolex; rojo tejano; rodamina B; rodamina 6G; rodamina de azufre; m-cresol; azul timeno; azul xilenol; rojo cresol; azul clorofenol; verde bromocresol; rojo bromocresol; azul bromotimeno; Cy2; Cy3; Cy5; Cy5.5; Cy7; 4-nitrofenol; alizarina; fenolftaleína; o-cresolftaleína; rojo clorofenol;

calmagita; bromo-xilenol; rojo fenol; rojo neutro; nitrazina; 3,4,5,6-tetrabromofenolftaleína; rojo del Congo; fluoresceína; eosina; 2',7'-diclorofluoresceína; 5(6)-carboxi-fluoresceína; carboxinaftofluoresceína; ácido 8-hidroxipiren-1,3,6-trisulfónico; seminaftorodafuor; seminaftofluoresceína; dicloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) de rutenio (II); (4,7-difenil-1,10-fenantrolin)rutenio (II) tetrafenilboro; octaetilporfirina de platino (II); dialquilcarbocianina; dioctadecilcicloxacarbocianina; cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo; 7-amino-4-metilcoumarina (Amc); proteína fluorescente verde (GFP); y derivados o combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos, la unidad estructural detectable puede comprender rodamina B (Rho), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 7-amino-4-metilcoumarina (Amc), proteína fluorescente verde (GFP) o derivados o combinaciones de los mismos.

La unidad estructural detectable se puede unir a la unidad estructural del péptido que penetra en la célula en el grupo amino, el grupo carboxilato, o la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula (por ejemplo, en el grupo amino, el grupo carboxilato, o la cadena lateral o cualquiera de AA<sup>1</sup>-AA<sup>X</sup>).

#### Unidad estructural terapéutica

Los compuestos descritos también pueden comprender una unidad estructural terapéutica. En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural terapéutica. La unidad estructural detectable se puede unir a una unidad estructural terapéutica o la unidad estructural detectable también puede servir como la unidad estructural terapéutica. La unidad estructural terapéutica se refiere a un grupo que, cuando se administra a un sujeto, reducirá uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno.

La unidad estructural terapéutica puede comprender una amplia variedad de fármacos, incluidos los antagonistas, por ejemplo, inhibidores de enzimas, y los agonistas, por ejemplo, un factor de transcripción que produce un aumento en la expresión de un producto génico deseable (aunque como se apreciará por los expertos en la técnica, también se pueden usar factores de transcripción antagonistas) están todos incluidos. Además, la unidad estructural terapéutica incluye aquellos agentes capaces de dirigir la toxicidad y/o capaces de inducir la toxicidad hacia células sanas y/o no sanas en el organismo. Además, la unidad estructural terapéutica puede ser capaz de inducir y/o cebar el sistema inmune contra patógenos potenciales.

La unidad estructural terapéutica puede comprender, por ejemplo, un agente contra el cáncer, agente antiviral, agente antimicrobiano, agente antiinflamatorio, agente inmunosupresor, anestésicos, o cualquier combinación de los mismos.

La unidad estructural terapéutica puede comprender un agente anticancerígeno. Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen Ácido 13-cis-retinoico, 2-Amino-6-Mercaptopurina, 2-CdA, 2-Clorodesoxiadenosina, 5-fluorouracilo, 6-Tioguanina, 6-Mercaptopurina, Accutane, Actinomicina-D, Adriamicina, Adrucil, Agrilina, Ala-Cort, Aldesleuquina, Alemtuzumab, Alitretinoína, Alkaban-AQ, Alkeran, Ácido All-transretinoico, Alfa-interferón, Altretamina, Ametopterina, Amifostina, Aminoglutetimida, Anagrelida, Anandron, Anastrozol, Arabinosilcitosina, Aranesp, Aredia, Arimidex, Aromasina, Trióxido arsénico, Asparaginasa, AT-RA, Avastina, BCG, BCNU, Bevacizumab, Bexarotene, Bicalutamida, BiCNU, Blenoxano, Bleomicina, Bortezomib, Busulfano, Busulfex, C225, Leucovorina de calcio, Campath, Camptosar, Camptotecina-11, Capecitabina, Carac, Carboplatino, Carmustina, Oblea de carmustina, Casodex, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidina, Cetuximab, Clorambucilo, Cisplatino, Factor de citrovorum, Cladribina, Cortisona, Cosmegen, CPT-11, Ciclofosfamida, Citadreno, Citarabina, Citarabina liposomal, Citosar-U, Citoxano, Dacarbazina, Dactinomicina, Darbeopetina alfa, Daunomicina, Daunorrubicina, Hidróxido de daunorrubicina, Daunorrubicina liposomal, DaunoXome, Decadrón, Delta-Cortef, Deltasona, Denileuquina difitox, DepoCyt, Dexametasona, Acetato de dexametasona, Fosfato sódico de dexametasona, Dexasona, Dexrazoxana, DHAD, DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil, Doxorubicina, Doxorubicina liposomal, Droxia, DTIC, DTIC-Dome, Duralone, Efudex, Eligard, Ellence, Eloxatin, Elspar, Emcyt, Epirubicina, Epoetina alfa, Erbitux, Erwinia L-asparaginasa, Estramustina, Etiol, Etopofos, Etopósido, Fosfato de etopósido, Eulexina, Evista, Exemestane, Fareston, Faslodex, Femara, Filgrastim, Floxuridina, Fludara, Fludarabina, Fluoroplex, Fluorouracil, Fluorouracil (crema), Flouximesterona, Flutamida, Ácido folínico, FUDR, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, Gemcitabina, Gemtuzumabozogamicina, Gemzar, Gleevec, Lupron, Lupron Depot, Matulane, Maxidex, Mecloretamina, -Mecloretamina Hidrocloro, Medralone, Medrol, Megace, Megestrol, Acetato de megestrol, Melfalano, Mercaptopurina, Mesna, Mesnex, Metotrexato, Metotrexato sódico, Metilprednisolona, Mylocel, Letrozol, Neosar, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilandron, Nilutamida, mostaza nitrogenada, Novaldex, Novantrona, Octreotide, Acetato de Octreotide, Oncospar, Oncovina, Ontak, Onxal, Oprevelkin, Orapred, Orasone, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Panretina, Paraplatino, Pediapred, PEG Interferón, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, PEG-INTRON, PEG-L-asparaginasa, Mostaza de fenilalanina, Platinol, Platinol-AQ, Prednisolona, Prednisona, Preloxa, Procarbazina, PROCRT, Proleuquina, Prolifeprospar 20 con implante de Carmustina, Purinetol, Raloxifene, Rheumatex, Rituxan, Rituximab, Roveron-A (interferón alfa-2a), Rubex, Clorhidrato de rubidomicina, Sandostatina, Sandostatina LAR, Sargramostim, Solu-Cortef, Solu-Medrol, STI-571, Estreptozocina, Tamoxifeno, Targretin, Taxol, Taxotere, Temodar, Temozolomida, Tenipósido, TESP, Thalidomide, Thalomid, TheraCys, Tioguanina, Tioguanina Tabloide, Tiofosfoamida, Thioplex, Thiotepa, TICE, Toposar, Topotecan, Toremifene, Trastuzumab, Tretinoína, Trexall,

Trisenox, TSPA, VCR, Velban, Velcade, VePesid, Vesanoide, Viadur, Vinblastina, Sulfato de Vinblastina, Vincasar Pfs, Vincristina, Vinorelbina, Tartrato de Vinorelbina, VLB, VP-16, Vumon, Xeloda, Zanosar, Zevalin, Zinecard, Zoladex, Ácido zoledrónico, Zometa, Oblea de Gliadel, Glivec, GM-CSF, Goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, Halotestina, Herceptina, Hexadrol, Hexalen, Hexametilmelamina, HMM, Hicantina, Hydrea, Acetato de Hydrocort, Hidrocortisona, Fosfato sódico de hidrocortisona, Succinato sódico de hidrocortisona, Fosfato de hidrocortona, Hidroxiurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetan, Idamicina, Idarrubicina, Ifex, IFN-alfa, Ifosfamida, IL2, IL-11, Mesilato de Imatinib, Imidazol carboxamida, Interferón alfa, Interferón Alfa-2b (conjugado de PEG), Interleuquina 2, Interleuquina-11, Intrón A (interferón alfa-2b), Leucovorina, Leukeran, Leuquina, Leuprolide, Leurocristina, Leustatina, Ara-C liposomal, Liquid Pred, Lomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Meticorten, Mitomicina, Mitomicina-C, Mitoxantrona, M-Prednisol, MTC, MTX, Mustargen, Mustina, Mutamicina, Myleran, Iressa, Irinotecan, Isotretinoína, Kidrolase, Lanacort, L-asparaginasa y LCR. La unidad estructural terapéutica también puede comprender un producto biofarmacéutico como, por ejemplo, un anticuerpo.

En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender un agente antiviral, como ganciclovir, azidotimidina (AZT), lamivudina (3TC), etc.

En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender un agente antibacteriano tales como acedapsona; acetosulfona sódica; alamecina; alexidina; amdinocilina; amdinocilina pivoxil; ampicilina; amifloxacina; mesilato de amifloxacina; amikacina; sulfato de amikacina; ácido aminosalicílico; aminosalicilato de sodio; amoxicilina; anfomicina; ampicilina; ampicilina sódica; apalcilina sódica; apramicina; aspartocina; sulfato de astromicina; avilamicina; avoparcina; azitromicina; azlocilina; azlocilina sódica; clorhidrato de bacampicilina; bacitracina; metilendisalicilato de bacitracina; bacitracina zinc; bambemicinas; benzoilpas calcio; beritromicina; sulfato de betamicina; biapenem; biniramicina; clorhidrato de bifenamina; bispiritiona magsulfex; butikacina; sulfato de butirosina; sulfato de capreomicina; carbadox; carbenicilina disodio; carbenicilinindanilo sodio; carbenicilinfenil sodio; carbenicilina potasio; carumonam sodio; cefaclor; cefadroxil; cefamandol; nafato de cefamandol; cefamandol sodio; cefaparol; cefatrizina; cefazaflur sodio; cefazolina; cefazolina sodio; cefbuperazona; cefdinir; cefepime; clorhidrato de cefepime; cefetecol; cefixime; clorhidrato de cefmenoxime; cefmetazol; cefmetazol sodio; cefonicida monosodio; cefonicida sodio; cefoperazona sodio; ceforanida; cefotaxime sodio; cefotetan; cefotetan disodio; clorhidrato de cefotiam; cefoxitin; cefoxitin sodio; ceftazidime; ceftazidime sodio; ceftazidime sodio; ceftibuten; ceftizoxime sodio; ceftriaxona sodio; cefuroxime; cefuroxime axetil; cefuroxime pivoxetil; cefuroxime sodio; cefacetil sodio; cefalexina; clorhidrato de cefalexina; cefaloglicina; cefaloridina; cefalotina sodio; cefapirina sodio; cefradina; clorhidrato de cetociclina; cetofenicol; cloranfenicol; palmitato de cloranfenicol; complejo de pantotenato de cloranfenicol; succinato sódico de cloranfenicol; fosfanilato de clorhexidina; cloroxilenol; bisulfato de clortetraciclina; clorhidrato de clortetraciclina; cinoxacina; ciprofloxacina; clorhidrato de ciprofloxacina; cirolemicina; claritromicina; clorhidrato de clinafloxacin; clindamicina; clorhidrato de clindamicina; palmitato de clindamicina clorhidrato; fosfato de clindamicina; clofazimina; cloxacilina benzatina; cloxacilina sodio; cloxiquin; colistimetato sodio; sulfato de colistina; coumermicina; coumermicina sodio; ciclacilina; cicloserina; dalfopristina; dapsona; daptomicina; demeclociclina; clorhidrato de demeclociclina; demeciclina; denofungina; diaveridina; dicloxacilina; dicloxacilina sodio; sulfato de dihidrostreptomina; dipiritiona; diritromicina; doxiciclina; doxiciclina calcio; doxiciclina fosfatex; hclato de doxiciclina; droxacina sodio; enoxacina; epicilina; clorhidrato de epitetraciclina; eritromicina; acistrato de eritromicina; estolato de eritromicina; etilsuccinato de eritromicina; gluceptato de eritromicina; lactobionato de eritromicina; propionato de eritromicina; estearato de eritromicina; clorhidrato de etambutol; etionamida; feroxacina; floxacilina; fludalanina; flumequina; fosfomicina; fosfomicinatrometamina; fumoxicilina; cloruro de furazolio; tartrato de furazolio; fusidato sodio; ácido fusídico; sulfato de gentamicina; gloximonam; gramicidina; haloprogina; hetacilina; hetacilina potasio; hexedina; ibafloxacin; imipenem; isoconazol; isepamicina; isoniazida; josamicina; sulfato de kanamicina; kitasamicina; levofuraltadona; levopropilicina potasio; lexitromicina; lincomicina; clorhidrato de lincomicina; lomefloxacina; clorhidrato de lomefloxacina; mesilato de lomefloxacina; loracarbef; mafenida; meclociclina; sulfosalicilato de meclociclina; fosfato potásico de megalomicina; mequidox; meropenem; metaciclina; clorhidrato de metaciclina; metenamina; hipurato de metenamina; mandelato de metenamina; meticilina sodio; metioprím; clorhidrato de metronidazol; fosfato de metronidazol; mezlocilina; mezlocilina sodio; minociclina; clorhidrato de minociclina; clorhidrato de mirincamicina; monensina; monensina sodio; nafcilina sodio; nalidixato sodio; ácido nalidíxico; naitainicina; nebramicina; palmitato de neomicina; sulfato de neomicina; undecilenato de neomicina; sulfato de netilmicina; neutramicina; nifuradeno; nifuraldeazona; nifuratel; nifuratróna; nifurdazil; nifurimida; nifupirínol; nifurquinazol; nifurtiazol; nitrociclina; nitrofurantoína; nitromida; norfloxacina; novobiocina sodio; ofloxacina; onnetoprim; oxacilina; oxacilina sodio; oximonam; oximonam sodio; ácido oxolínico; oxitetraciclina; oxitetraciclina calcio; clorhidrato de oxitetraciclina; paldamicina; paraclorofenol; paulomicina; pefloxacina; mesilato de pefloxacina; penamecilina; penicilina G benzatina; penicilina G potasio; penicilina G procaína; penicilina G sodio; penicilina V; penicilina V benzatina; penicilina V hidrabamina; penicilina V potasio; pentizidona sodio; aminosalicilato de fenilo; piperacilina sodio; pirbenicilina sodio; piridicilina sodio; clorhidrato de pirlimicina; clorhidrato de pivampicilina; pamoato de pivampicilina; probenato de pivampicilina; sulfato de polimixina B; porfomicina; propikacina; pirazinamida; piritona zinc; acetato de quindecamina; quinupristina; racefenicol; ramoplanina; ranimicina; relomicina; repromicina; rifabutina; rifameton; rifamexil; rifamida; rifampina; rifapentina; rifaximina; rolitetraciclina; nitrato de rolitetraciclina; rosaramicina; butirato de rosaramicina; propionato de rosaramicina; fosfato sódico de rosaramicina; estearato de rosaramicina; rosoxacina; roxarsona; roxitromicina; sanciclina; sanfetrimem sodio; sarmoxicilina; sarcipilina; escopafungina; sisomicina; sulfato de sisomicina; esparfloxacina; clorhidrato de

5 espectinomicina; espiramicina; clorhidrato de estalimicina; steffimicina; sulfato de estreptomina; estreptonicozida; sulfabenz; sulfabenzamida; sulfacetamida; sulfacetamida sodio; sulfacitina; sulfadiazina; sulfadiazina sodio; sulfadoxina; sulfaleno; sulfamerazina; sulfameter; sulfametazina; sulfametizol; sulfametoxazol; sulfamonometoxina; sulfamoxol; sulfanilato zinc; sulfanitran; sulfasalazina; sulfasomizol; sulfatiazol; sulfazamet; sulfisoxazol; sulfisoxazol  
 10 acetilo; sulfisboxazoldiolamina; sulfomixina; sulopenem; sultamricilina; suncilina sodio; clorhidrato de talampicilina; teicoplanina; clorhidrato de temafloxacina; temocilina; tetraciclina; clorhidrato de tetraciclina; complejo de fosfato de tetraciclina; tetroxoprim; tianfenicol; tiphencilina potasio; ticarcilina cresil sodio; ticarcilina disodio; ticarcilina monosodio; ticlatona; cloruro de tiodonio; tobramicina; sulfato de tobramicina; tosufloxacina; trimetoprim; sulfato de trimetoprim; trisulfapirimidinas; troleandomicina; sulfato de trospectomicina; tirotricina; vancomicina; clorhidrato de vancomicina; virginiamicina; orzorbamicina.

En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender un agente antiinflamatorio.

15 En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender dexametasona (Dex).

En otros ejemplos, la unidad estructural terapéutica comprende una proteína terapéutica. Por ejemplo, algunas personas tienen defectos en ciertas enzimas (por ejemplo, enfermedad de almacenamiento lisosomal). En el presente documento, se describe la administración de dichas enzimas/proteínas a células humanas mediante la unión a la enzima/proteína a uno de los péptidos que penetran en la célula descritos. Los péptidos que penetran en  
 20 la célula descritos se han probado con proteínas (por ejemplo, GFP, PTP1B, actina, calmodulina, troponina C) y se ha demostrado que funcionan.

En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica comprende una unidad estructural dirigida. La unidad estructural dirigida puede comprender, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que puede dirigirse a uno o más dominios enzimáticos. En algunos ejemplos, la unidad estructural dirigida puede comprender un inhibidor contra una enzima que puede desempeñar un papel importante en una enfermedad, como cáncer, fibrosis quística, diabetes, obesidad o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la unidad estructural dirigida puede comprender cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 5.

30

ES 2 739 613 T3

Tabla 5. Ejemplo de unidades estructurales dirigidas

| SEQ ID NO | Abreviatura* | Secuencia   |
|-----------|--------------|---|
| 39        | PΘGΛYR       | Pro-Pip-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-                 |
| 40        | SΘIΔΔR       | Ser-Pip-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-F <sub>2</sub> Pmp-  |
| 41        | IHIΔIR       | Ile-His-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-                 |
| 42        | AalΔΘR       | Ala-(D-Ala)-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-             |
| 43        | ΣSΘΔvR       | Fpa-Ser-Pip-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Val)-             |
| 44        | ΘnPΔAR       | Pip-(D-Asn)-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-             |
| 45        | TΨAΔGR       | Tyr-Phg-Ala-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-                 |
| 46        | AHIAaR       | Ala-His-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Ala)-             |
| 47        | GnGΔpR       | Gly-(D-Asn)-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Pro)-         |
| 48        | fQΘΔIR       | (D-Phe)-Gln-Pip-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-             |
| 49        | SPGΔHR       | Ser-Pro-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-His-                 |
| 50        | ΘYIΔHR       | Pip-Tyr-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-His-                 |
| 51        | SvPΔHR       | Ser-(D-Val)-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-His-             |
| 52        | AIPΔnR       | Ala-Ile-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Asn)-             |
| 53        | ΣSIΔQF       | Fpa-Ser-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Gln-                 |
| 54        | AaΨΔfR       | Ala-(D-Ala)-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Phe)-         |
| 55        | ntΨΔΨR       | (D-Asn)-(D-Thr)-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Phg-         |
| 56        | IPΨΔΩP       | Ile-Pro-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-                 |
| 57        | QΘΣAΘR       | Gln-Pip-Fpa-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-                 |
| 58        | ηAΣΔGR       | (D-Asn)-Ala-Fpa-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-             |
| 59        | ntYΔAR       | (D-Asn)-(D-Thr)-Tyr-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-         |
| 60        | eAΨΔvR       | (D-Glu)-Ala-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Val)-         |
| 61        | lvΨΔAR       | Ile-(D-Val)-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-             |
| 62        | YtΨΔAR       | Tyr-(D-Thr)-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-             |
| 63        | nΘΨΔIR       | (D-Asn)-Pip-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-             |
| 64        | ΘnWΔHR       | Pip-(D-Asn)-Trp-F <sub>2</sub> Pmp-His-             |
| 65        | YΘvΔIR       | Tyr-Pip-(D-Val)-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-             |
| 66        | nSAΔGR       | (D-Asn)-Ser-(D-Ala)-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-         |
| 67        | trvΔaR       | (D-Thr)-(D-Asn)-(D-Val)-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Ala)- |
| 68        | ntvAtR       | (D-Asn)-(D-Thr)-(D-Val)-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Thr)- |
| 69        | SIΔYR        | Ser-Ile-(D-Thr)-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-             |

|    |                   |   |
|----|-------------------|---|
| 70 | nΣnΛIR            | (D-Asn)-Fpa-(D-Asn)-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Leu)-         |
| 71 | YnnΛΩR            | Tyr-(D-Asn)-(D-Asn)-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-             |
| 72 | nYnΛGR            | (D-Asn)-Tyr-(D-Asn)-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-             |
| 73 | AWnΛAR            | Ala-Trp-(D-Asn)-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-                 |
| 74 | vtHΛYR            | (D-Val)-(D-Thr)-His-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-             |
| 75 | PΨHΛΘR            | Pro-Phg-His-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-                     |
| 76 | nΨHΛGR            | (D-Asn)-Phg-His-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-                 |
| 77 | PAHΛGR            | Pro-Ala-His-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-                     |
| 78 | AYHΛIR            | Ala-Tyr-His-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-                     |
| 79 | nΘeΛYR            | (D-Asn)-Pip-(D-Glu)-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-             |
| 80 | vSSAtR            | (D-Val)-Ser-Ser-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Thr)-             |
| 81 | aΞt'ϑΦ'YNK        | ((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Tyr-Gln)-Lys               |
| 82 | Tm(aΞt'ϑΦ'RA)Dap  | Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala)-Dap             |
| 83 | Tm(aΞt'ϑΦ'RAa)Dap | Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap     |
| 84 | Tm(aΞtϑΦ'RAa)Dap  | Tm((D-Ala)-Sar-(D-Thr)-Pp-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap      |
| 85 | Tm(aΞtaΦ'RAa)Dap  | Tm((D-Ala)-Sar-(D-Thr)-(D-Ala)-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap |

\*Fpa, Σ: L-4-fluorofenilalanina; Pip, Θ: L-homoprolina; Nle, Ω: L-norleucina; Phg, ψ L-fenilglicina; F<sub>2</sub>Pmp, Λ: L-4-(fosfonodifluorometil)fenilalanina; Dap, ácido L-2,3-diaminopropiónico; Nal, Φ': L-β-naftilalanina; Pp, ϑ: ácido L-pipecólico; Sar, Ξ: sarcosina; Tm, ácido trimésico.

5 La unidad estructural dirigida y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula pueden superponerse, es decir, los residuos que forman la unidad estructural del péptido que penetra en la célula también pueden formar parte de la secuencia que forma la unidad estructural dirigida, y viceversa.

10 La unidad estructural terapéutica se puede unir a la unidad estructural del péptido que penetra en la célula en el grupo amino, el grupo carboxilato, o la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula (por ejemplo, en el grupo amino, el grupo carboxilato o la cadena lateral o cualquiera de AA<sup>1</sup>-AA<sup>X</sup>). En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede unirse a la unidad estructural detectable.

15 En algunos ejemplos, la unidad estructural terapéutica puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Ras (por ejemplo, K-Ras), PTP1B, Pin1, Grb2 SH2, CAL PDZ y similares, o combinaciones de los mismos.

20 Ras es una proteína que en los humanos está codificada por el gen RAS. La proteína Ras normal desempeña una función esencial en la señalización del tejido normal, y la mutación de un gen Ras está implicada en el desarrollo de muchos cánceres. Ras puede actuar como un interruptor de encendido/apagado molecular, una vez que se enciende, Ras recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación del factor de crecimiento y la señal de otros receptores. Las formas mutadas de Ras han sido implicadas en varios cánceres, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y diversas leucemias.

25 La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) es un miembro prototípico de la superfamilia PTP y desempeña numerosas funciones durante la señalización de células eucarióticas. PTP1B es un regulador negativo de la vía de señalización de la insulina, y se considera un prometedor objetivo terapéutico potencial, en particular para el tratamiento de la diabetes de tipo II. PIP1B también se ha implicado en el desarrollo del cáncer de mama.

30 Pin1 es una enzima que se une a un subconjunto de proteínas y desempeña un papel importante como un control

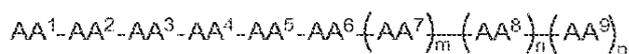
posterior a la fosforilación en la regulación de la función de las proteínas. La actividad de Pin1 puede regular el resultado de la señalización de la quinasa dirigida por la prolina y, en consecuencia, puede regular la proliferación celular y la supervivencia celular. La desregulación de Pin1 puede desempeñar un papel en varias enfermedades. La regulación positiva del Pin1 puede estar implicada en ciertos cánceres, y la regulación descendente de Pin1 puede estar implicada en la enfermedad de Alzheimer. Los inhibidores de Pin1 pueden tener implicaciones terapéuticas para el cáncer y los trastornos inmunitarios.

Grb2 es una proteína adaptadora involucrada en la transducción de señales y la comunicación celular. La proteína Grb2 contiene un dominio SH2, que puede unirse a secuencias fosforiladas de tirosina. Grb2 se expresa ampliamente y es esencial para múltiples funciones celulares. La inhibición de la función de Grb2 puede perjudicar los procesos de desarrollo y puede bloquear la transformación y proliferación de varios tipos de células.

Recientemente se informó que la actividad del regulador de conductancia de la membrana de la fibrosis quística (CFTR), una proteína del canal de iones cloruro mutada en pacientes con fibrosis quística (CF), está regulada negativamente por el ligando asociado a CFTR (CAL) a través de su dominio PDZ (CAL-PDZ) (Wolde, M et al., J. Biol. Chem. 2007, 282, 8099). Se demostró que la inhibición de la interacción CFTR/CAL-PDZ mejora la actividad de ΔPhe508-CFTR, la forma más común de mutación de CFTR (Cheng, SH et al. Cell 1990, 63, 827; Kerem, BS et al. Science 1989, 245, 1073), al reducir su degradación mediada por proteasoma (Cushing, PR et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9907). Por lo tanto, en el presente documento, se describe un método para tratar a un sujeto que tiene fibrosis quística mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto o composición allí descritos. El compuesto o composición administrados al sujeto puede comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra CAL PDZ. Además, los compuestos o composiciones descritos en este documento pueden administrarse con una molécula que corrige la función de CFTR.

Ejemplos específicos

En algunos ejemplos, los compuestos pueden ser de la fórmula I:



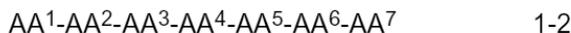
en donde AA<sup>1</sup>, AA<sup>2</sup>, AA<sup>3</sup>, AA<sup>4</sup>, AA<sup>5</sup>, AA<sup>6</sup>, AA<sup>7</sup>, AA<sup>8</sup> y AA<sup>9</sup> (es decir, AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>) son cada uno independientemente un aminoácido; y m, n y p se seleccionan independientemente de 0 y 1.

En algunos ejemplos de la fórmula I, m, n y p son 0 y los compuestos son de la fórmula I-1:



en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula I, m es 1 y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula I-2:



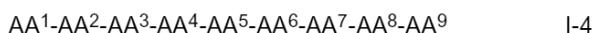
en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula I, m y n son 1, p es 0, y los compuestos son de la fórmula I-3:



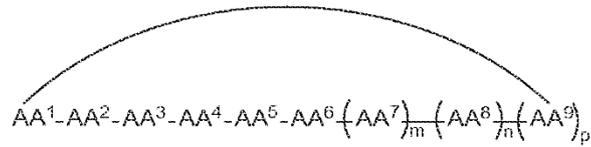
en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula I, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula I-4:



en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y los compuestos pueden ser de la fórmula la:

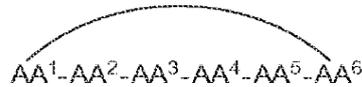


Ia

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I, y en donde la línea curva indica un enlace covalente.

5

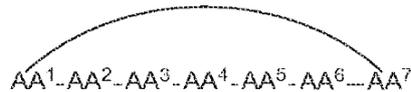
En algunos ejemplos de la fórmula Ia, m, n y p son 0 y los compuestos son de la fórmula Ia-1:



Ia-1

10 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I.

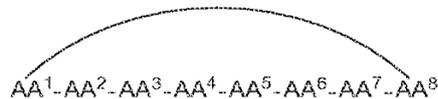
En algunos ejemplos de la fórmula Ia, m es 1, y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula Ia-2:



Ia-2

15 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula Ia, m y n son 1, p es 0, y los compuestos son de la fórmula Ia-3:

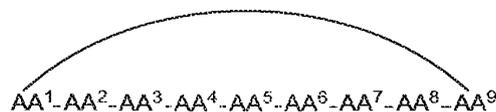


Ia-3

20 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula Ia, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula Ia-4:

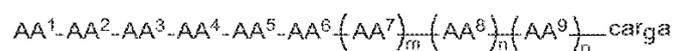
25



Ia-4

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I.

30 En algunos ejemplos, el compuesto comprende además una unidad estructural de carga, y los compuestos pueden ser de la fórmula II:



II

en el que la unidad estructural de carga puede comprender una unidad estructural detectable, una unidad estructural

terapéutica, una unidad estructural dirigida, o una combinación de las mismas y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

En algunos ejemplos de la fórmula II, m, n y p son 0 y los compuestos son de la fórmula II-1:



5

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

En algunos ejemplos de la fórmula II, m es 1, y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula II-2:



10

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

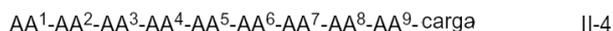
En algunos ejemplos de la fórmula II, m y n son 1, p es 0, y los compuestos son de la fórmula II-3:



15

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

En algunos ejemplos de la fórmula II, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula II-4:

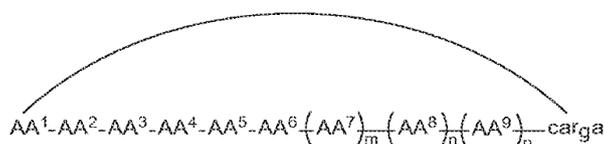


20

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula y la unidad estructural de carga juntas son cíclicas, y los compuestos son de la fórmula IIa:

25

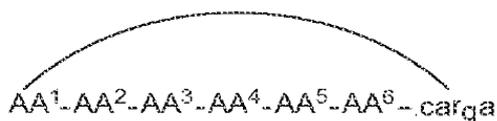


IIa

en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

30

En algunos ejemplos de la fórmula IIa, m, n y p son 0 y los compuestos son de la fórmula IIa-1:

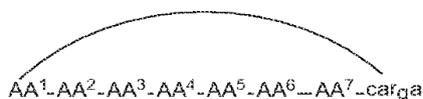


IIa-1

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II. En el presente documento, también se describe la fórmula IIa-1, en la que uno de AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> está ausente (es decir, 5 aminoácidos en la estructura endocíclica).

35

En algunos ejemplos de la fórmula IIa, m es 1 y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula IIa-2:



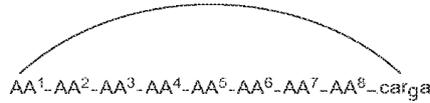
IIa-2

40

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

## ES 2 739 613 T3

En algunos ejemplos de la fórmula IIa, m y n son 1, p es 0, y los compuestos son de la fórmula IIa-3:

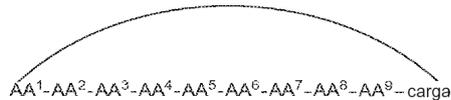


IIa-3

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

5

En algunos ejemplos de la fórmula IIa, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula IIa-4:

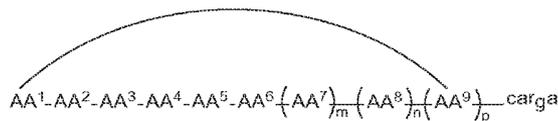


IIa-4

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

10

En algunos ejemplos, la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica y la unidad estructural de carga se adjunta a la estructura cíclica de la unidad estructural del péptido que penetra en la célula, y los compuestos son de la fórmula IIb:

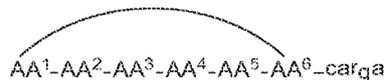


IIb

en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

15

En algunos ejemplos de la fórmula IIb, m, n y p son 0 y los compuestos son de la fórmula IIb-1:

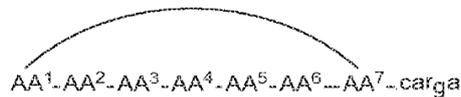


IIb-1

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

20

En algunos ejemplos de la fórmula IIb, m es 1, y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula IIb-2:

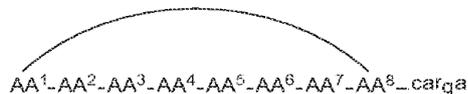


IIb-2

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

25

En algunos ejemplos de la fórmula IIb, m es 1, y n y p son 0, y los compuestos son de la fórmula IIb-3:

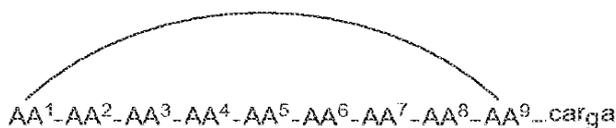


IIb-3

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

30

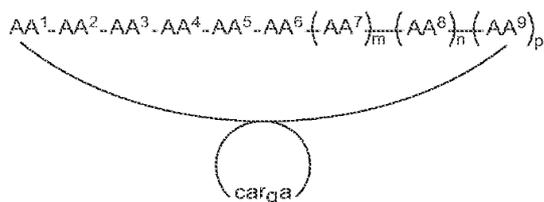
En algunos ejemplos de la fórmula IIb, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula IIb-4:



IIb-4

en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

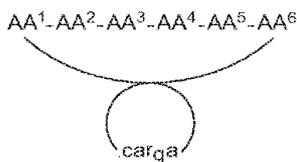
- 5 En algunos ejemplos, la unidad estructural de carga es cíclica y la unidad estructural del péptido que penetra en la célula es cíclica, y juntas forman un sistema bicíclico fusionado, y los compuestos son de la fórmula IIc:



IIc

- 10 en donde la unidad estructural de carga es como se define en la fórmula II y AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup>, m, n y p son como se definen en la fórmula I.

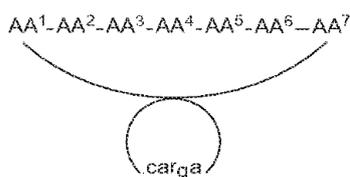
En algunos ejemplos de fórmula IIc, m, n y p son 0 y los compuestos son de fórmula IIc-1:



IIc -1

- 15 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>6</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

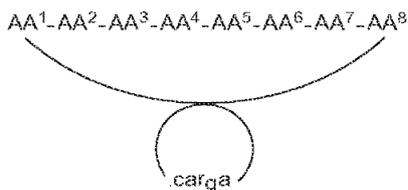
En algunos ejemplos de fórmula IIc, m es 1, y n y p son 0, y los compuestos son de fórmula IIc-2:



IIc -2

- 20 en donde en el AA<sup>1</sup>-AA<sup>7</sup> se definen como en la fórmula I y la carga se define en la fórmula II.

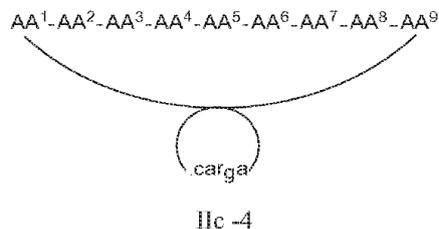
En algunos ejemplos de fórmula IIc, m y n son 1, p es 0, y los compuestos son de fórmula IIc-3:



IIc -3

- 25 en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>8</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

En algunos ejemplos de la fórmula IIc, m, n y p son 1, y los compuestos son de la fórmula IIc-4:



en donde AA<sup>1</sup>-AA<sup>9</sup> son como se definen en la fórmula I y la carga es como se define en la fórmula II.

5 En algunos ejemplos, los compuestos pueden comprender cualquiera de los compuestos en la Tabla 6. Otros ejemplos se muestran en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 6. Compuestos de ejemplo

| SEQ ID NO | Abreviatura   | Secuencia                           |
|-----------|---|-------------------------------------|
| 86        | cFΦR <sub>4</sub> <sup>Rho</sup>                              | ciclo (FΦRRRRQ)-K(Rho)              |
| 87        | cFΦR <sub>4</sub> <sup>Dex</sup>                              | ciclo (FΦRRRRQ)-K(Dex)              |
| 88        | Tat <sup>Dex</sup>  | K(Dex)-GRKKRRQRRRPPQY               |
| 89        | cFΦR <sub>4</sub> <sup>FITC</sup>                             | ciclo (FΦRRRRQ)-K(FITC)             |
| 90        | cFΦR <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>                             | ciclo (FΦRRRRQ)-RRRRR-K(Rho)        |
| 91        | cFΦR <sub>4</sub> -A <sub>5</sub>                             | ciclo (FΦRRRRQ)-AAAAA-K(Rho)        |
| 92        | cFΦR <sub>4</sub> -F <sub>4</sub>                             | ciclo (FΦRRRRQ)-FFFF-K(Rho)         |
| 93        | cF(ΦR <sub>4</sub> -PCP                                       | ciclo (FΦRRRRQ)-miniPEG-DE(pCAP)LI  |
| 94        | R <sub>9</sub> -PCP   | RRRRRRRRR-miniPEG-DE(pCAP)LI        |
| 95        | Tat-PCP   | RKKRRQRRR-miniPEG-DE(pCAP)LI        |
| 96        | Antp-PCP  | RQIKIWFQNRRMKWKK-miniPEG-DE(pCAP)LI |
| 97        | biciclo(FΦR <sub>4</sub> -A <sub>5</sub> ) <sup>Rho</sup>     | [Tm(AAAAA)K(RRRRΦF)J]-K(Rho)        |
| 98        | biciclo(FΦR <sub>4</sub> -A <sub>7</sub> ) <sup>Rho</sup>     | [Tm(AAAAAAA)K(RRRRΦF)J]-K(Rho)      |
| 99        | biciclo(FΦR <sub>4</sub> -RARAR) <sup>Rho</sup>               | [Tm(RARAR)K(RRRRΦF)J]-K(Rho)        |
| 100       | biciclo(FΦR <sub>4</sub> -DADAD) <sup>Rho</sup>               | [Tm(DADAD)K(RRRRΦF)J]-K(Rho)        |
| 101       | mono ciclo (FΦR <sub>4</sub> -A <sub>5</sub> ) <sup>Rho</sup> | ciclo (AAAAARRRRΦF)-K(Rho)          |
| 102       | mono ciclo (FΦR <sub>4</sub> -A <sub>7</sub> ) <sup>Rho</sup> | ciclo (AAAAAARRRRΦF)-K(Rho)         |
| 103       |   |                                     |

ES 2 739 613 T3

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 104 |  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-FΦRRRRUK(FITC)             |
| 105 |  | DΩUD-Amc  |
| 106 |  |   |
| 107 |  |   |
| 108 |  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-RRRRΦFDΩUD-A <sup>mc</sup> |
| 109 |  | RRRRRRRRDΩUC-Amc  |
| 110 |  |   |
| 111 |  | FITC URRRRFW <sub>Q</sub> UTRV  |
| 112 |  |   |
| 113 | cFΦR <sub>4</sub> -PTP1 B  |   |
| 114 | cFΦR <sub>4</sub> -PCP   |   |
| 115 | ciclo((D-Thr)-(D-Asn)-(D-Val)-F <sub>2</sub> Pmp-(D-Ala)-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)          | ciclo(tnvΛaRRRRΦ'FQ)  |
| 116 | ciclo(Scr-(D-Val)-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)                      | ciclo(SvPΛHRRRR Φ'FQ)   |
| 117 | ciclo(Ile-Pro-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Nic-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)                          | ciclo(IPΨΛΩRRRRΦ'FQ)  |
| 118 | ciclo((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Tyr-Gln)-Lys   | ciclo(aΞt'9Φ'YQ)-K  |
| 119 | biciclo[Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys         | biciclo[Tm(aΞt'9Φ'RA)J(FΦ'RRRRJ)]-K   |
| 120 | biciclo[Tm((D-Ala)-Sar-(D-pThr)-Pp-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | biciclo[Tm(aΞt'9Φ'RAa)J(FNΦ'RRRRJ)]-K   |
| 121 | biciclo[Tm((D-Ala)-Sar-(D-Thr)-Pp-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys  | biciclo[Tm(aΞt9Φ'RAa)J(FΦ'RRRRJ)]-K   |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 122 | biciclo[Tm((D-Ala)-Sar-(D-Thr)-(D-Ala)-Nal-Arg-Ala-(D-Ala))-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | biciclo[Tm(aεtaΦ'RAa)J(FΦ'RRRRJ)]-K  |
| 123 | Péptido 1  | $\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{CO-F}\Phi\text{RRRRCK(FITC)-NH}_2 \end{array}$                                  |
| 124 | Péptido 2  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-FΦRRRRUK(FITC)-NH <sub>2</sub>  |
| 125 | Péptido 3  | Ac-DMUD-Amc  |
| 126 | Péptido 4  | $\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^-\text{RRRR}\Phi\text{FD}\Omega\text{CD}^-\text{A}^{\text{mc}} \end{array}$ |
| 127 | Péptido 5  | $\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^-\text{RRRR}\Phi\text{FD}\Omega\text{CD}^-\text{A}^{\text{mc}} \end{array}$ |
| 128 | Péptido 6  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-RRRRΦFDΩUD-A <sup>mc</sup>  |
| 129 | Péptido 7  | AC-RRRRRRRRRDΩUD-A <sup>mc</sup>   |
| 130 | Péptido 8  | $\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{FITC-CRRRRFWQ}^-\text{TRV-OH} \end{array}$   |
| 131 | Péptido 9  | FITC-URRRRFWQUTRV-OH   |
| 132 | Péptido 11   | $\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{FITC-CRRRRFWQ}^-\text{TRV-NH}_2 \end{array}$   |
| 178 | Inhibidor monocíclico 1  | ciclo (D-Thr-D-Asn-D-Val-F <sub>2</sub> Pmp-D-Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)   |
| 179 | Inhibidor monocíclico 2  | ciclo (Ser-D-Val-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)   |
| 180 | Inhibidor monocíclico 3  | ciclo (Ile-Pro-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)   |
| 181 | Inhibidor 5 de Pin1  | ciclo (D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Tyr-Gln)-Lys-NH <sub>2</sub>   |
| 182 | Inhibidor 6 de Pin1  | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Arg-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>  |
| 183 | Inhibidor 7 de Pin1  | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>  |
| 184 | Inhibidor 8 de Pin1  | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>   |
| 185 | Inhibidor 9 de Pin1  | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-Thr-D-Ala-  |
|     |  | Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>  |

\*Fpa,  $\Sigma$ : L-4-fluorofenilalanina; Pip,  $\Theta$  L-homoprolina; Nle,  $\Omega$ : L-norleucina; Phg,  $\psi$  L-fenilglicina; F<sub>2</sub>Pmp,  $\Lambda$ : L-4-(fosfonodifluorometil)fenilalanina; Dap, J: ácido L-2,3-diaminopropiónico; Nal,  $\Phi'$ : L- $\beta$ -naftilalanina; Pp,  $\mathcal{G}$ : ácido L-pipecólico; Sar,  $\Xi$ : sarcosina; Tm, ácido trimésico;  $\Phi$ , L-2-naftilalanina; Rho, rodamina B; Dex, dexametasona; FITC, isotiocianato de fluoresceína; miniPEG, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico; pCAP, ácido fosfocoumarilaminopropiónico; Amc, 7-amino-4-metilcoumarina; FITC, isotiocianato de fluoresceína; U, ácido 2-aminobutírico.

Tabla 7. Péptidos que penetran en las células previamente informados

| SEQ ID NO | Abreviatura    | Secuencia        |
|-----------|----------------|------------------|
| 133       | R <sub>g</sub> | RRRRRRRRR        |
| 134       | Tat            | YGRKKRRQRRR      |
| 135       | Antp           | RQIKIWFQNRRMKWKK |

5

También se describen en el presente documento composiciones que comprenden los compuestos allí descritos.

En el presente documento, también se describen sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de los compuestos descritos que se preparan con ácidos o bases, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos. En condiciones en las que los compuestos descritos en el presente documento son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Los ejemplos de sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio o magnesio. Los ejemplos de sales por adición de ácidos fisiológicamente aceptables incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, fosfórico, carbónico, sulfúrico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, benzoico, succínico, fumárico, mandélico, oxálico, cítrico, tartárico, malónico, ascórbico, alfa-cetoglutarico, alfa-glicofosfórico, maleico, tosílico, metansulfónico, y similares. Por lo tanto, aquí se describen sales de clorhidrato, nitrato, fosfato, carbonato, bicarbonato, sulfato, acetato, propionato, benzoato, succinato, fumarato, mandelato, oxalato, citrato, tartrato, malonato, ascorbato, alfa-cetoglutarato, alfa-glicofosfato, maleato, tosilato y mesilato. Las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que produce un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio).

25

#### Métodos de preparación

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

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

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

50

el presente documento se pueden obtener de fuentes comerciales.

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

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

Métodos de uso

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

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

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

Por ejemplo, los compuestos o composiciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describen en el presente documento pueden combinarse en una composición farmacéutica con un agente anticancerígeno adicional, tales como ácido 13-cis-Retinoico, 2-Amino-6-Mercaptopurina, 2-CdA, 2-Clorodesoxiadenosina, 5-fluorouracilo, 6-Tioguanina, 6-Mercaptopurina, Accutane, Actinomicina-D, Adriamicina, Aducril, Agrilina, Ala-Cort, Aldesleuquina, Alemtuzumab, Alitretinoína, Alkaban-AQ, Alkeran, Ácido All-transretinoico, Alfa interferón, Altretramina, Ametopterina, Amifostina, Aminoglutetimida, Anagrelide, Anandron, Anastrozol, Arabinosilcitosina, Aranesp, Aredia, Arimidex, Aromasian, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, AT-RA, Avastin, BCG, BCNU, Bevacizumab, Bexaroteno, Bicalutamida, BiCNU, Blenoxano, Bleomicina, Bortezomib, Busulfano, Busulfex, C225, Leucovorina de calcio, Campath, Camptosar, Camptotecina-11, Capecitabina, Carac, Carboplatino, Carmustina, Oblea de Carmustina, Casodex, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidina, Cetuximab, Clorambucilo, Cisplatino, Factor de Citrovorum, Cladribina, Cortisona, Cosmegen, CPT-11, Ciclofosfamida, Cytadren, Citarabina, Citarabina liposomal, Cytosar-U, Cytosan, Dacarbazina, Dactinomicina, Darbepoetina alfa, Daunomicina, Daunorubicina, Clorhidrato de daunorubicina, Daunorubicina liposomal, DaunoXome, Decadrón, Delta-Cortef, Deltasona, Denileuquina diftitox, DepoCyt, Dexametasona, Acetato de dexametasona, Fosfato sódico de dexametasona, Dexasona, Dexrazoxana, DHAD, DIC, Diodes, Docetaxel, Doxil, Doxorubicina, Doxorubicina liposomal, Droxia, DTIC, DTIC-Dome, Duralone, Efudex, Eligard, Ellence, Eloxatina, Elspar, Emcyt, Epirubicina, Epoetina alfa, Erbitux, Erwinia L-asparaginasa, Estramustina, Etiol, Etopofos, Etopósido, Fosfato de etopósido, Eulexina, Evista, Exemestano, Fareston, Faslodex, Femara, Filgrastim, Floxuridina, Fludara, Fludarabina, Fluoroplex, Fluorouracilo, Fluorouracilo (crema), Fluoximesterona, Flutamida, Ácido fólico, FUDR, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, Gemcitabina, Gemtuzumabozogamicina, Gemzar, Gleevec, Lupron, Lupron Depot, Matulane, Maxidex, Mecloretamina, -Mecloretamina Hidrocloro, Medralona, Medrol, Megace, Megestrol, Acetato de Megestrol, Melfalano, Mercaptopurina, Mesna, Mesnex, Metotrexato, Metotrexato sodio, Metilprednisolona, Mylocel, Letrozol, Neosar, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilandron, Nilutamida, Mostaza Nitrogenada, Novaldex, Novantrona, Octreotide, Acetato de Octreotide, Oncospar, Oncovin, Ontak, Onxal, Oprevelkin, Orapred, Orasone, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pamidronato, Panretina, Paraplatino, Pediapred, PEG Interferón, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, PEG-INTRON, PEG-L-asparaginasa, Mostaza de fenilalanina, Platinol, Platinol-AQ, Prednisolona, Prednisona, Prelona, Procarbazina, PROCROT, Proleuquina, Prolifeprospar 20 con mplant de Carmustina, Purinetol, Raloxifene, Rheumatrex, Rituxan, Rituximab, Roveron-A (interferón alfa-2a), Rubex, Clorhidrato de rubidomicina, Sandostatina, Sandostatina LAR, Sargramostim, Solu-Cortef, Solu-Medrol, STI-571, Estreptozocina, Tamoxifeno, Targretina, Taxol, Taxotere, Temodar, Temozolomida, Tenipósido, TESP, Thalidomide, Thalomid, TheraCys, Tioguanina, Tioguanina Tabloide,

Tiofosfamida, Thioplex, Thiotepa, TICE, Toposar, Topotecano, Toremifene, Trastuzumab, Tretinoína, Trexall, Trisenox, TSPA, VCR, Velban, Velcade, VePesid, Vesanoïd, Viadur, Vinblastina, Sulfato de Vinblastina, Vincasar Pfs, Vincristina, Vinorelbina, Tartrato de Vinorelbina, VLB, VP-16, Vumon, Xeloda, Zanosar, Zevalina, Zinecard, Zoladex, Ácido Zoledrónico, Zometa, Oblea de Gliadel, Glivec, GM-CSF, Goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, Halotestina, Herceptina, Hexadrol, Hexaleno, Hexametilmelamina, HMM, Hycamtin, Hydrea, Acetato de Hydrocort, Hidrocortisona, Fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, Fosfato de hidrocortona, Hidroxiurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetan, Idamicina, Idarrubicina, Ifex, IFN-alfa, Ifosfamida, IL2, IL-11, Mesilato de Imatinib, Imidazol Carboxamida, Interferón alfa, Interferón Alfa-2b (conjugado de PEG), Interleuquina 2, Interleuquina-11, Intrón A (interferón alfa-2b), Leucovorina, Leukeran, Leuquina, Leuprolide, Leurocristina, Leustatina, Liposomal Ara-C, Liquid Pred, Lomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Meticorten, Mitomicina, Mitomicina-C, Mitoxantrona, M-Prednisol, MTC, MTX, Mustargen, Mustina, Mutamicina, Myleran, Iressa, Irinotecan, Isotretinoína, Kidrolase, Lanacort, L-asparaginasa y LCR. El agente anticancerígeno adicional también puede incluir productos biofarmacéuticos tales como, por ejemplo, anticuerpos.

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

En el presente documento, también se describen métodos para destruir una célula tumoral en un sujeto. El método incluye poner en contacto la célula tumoral con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe aquí, y opcionalmente incluye la etapa de irradiar la célula tumoral con una cantidad eficaz de radiación ionizante. Además, los métodos de radioterapia de tumores se proporcionan en el presente documento. Los métodos incluyen poner en contacto la célula tumoral con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe en este documento, e irradiar el tumor con una cantidad eficaz de radiación ionizante. Como se usa en el presente documento, la expresión "radiación ionizante" se refiere a la radiación que comprende partículas o fotones que tienen suficiente energía o pueden producir suficiente energía a través de interacciones nucleares para producir la ionización. Un ejemplo de radiación ionizante es la radiación X. Una cantidad eficaz de radiación ionizante se refiere a una dosis de radiación ionizante que produce un aumento en el daño celular o la muerte cuando se administra en combinación con los compuestos descritos en este documento. La radiación ionizante puede administrarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, incluyendo la administración de anticuerpos y radioisótopos radiomarcados.

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

En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar un cáncer o un tumor en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Ras (por ejemplo, K-Ras), PTP1B, Pin1, Grb2 SH2, o combinaciones de los mismos.

El tema divulgado también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno o afección metabólica. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en este documento se administra a un sujeto que tiene un trastorno metabólico y que necesita tratamiento para el mismo. En algunos ejemplos, el trastorno metabólico puede comprender diabetes de tipo II. En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar el trastorno metabólico en un sujeto, el compuesto o composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra PTP1B. En un ejemplo particular de este método, el sujeto es obeso y el método comprende tratar al sujeto por obesidad administrando una composición como se describe en el presente documento.

El objeto descrito también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno o afección inmune. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en este documento se administra a un sujeto que tiene un trastorno inmune y que está en necesidad de tratamiento del mismo. En algunos ejemplos de los métodos para tratar, prevenir o mejorar el trastorno inmune en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra Pin1.

El tema divulgado también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que tiene fibrosis quística. En una realización, una cantidad eficaz de uno o más compuestos o composiciones descritos en el presente documento se administra a un sujeto que tiene fibrosis quística y que necesita de tratamiento de la misma. En algunos ejemplos de los métodos para tratar la fibrosis quística en un sujeto, el compuesto o la composición administrados al sujeto pueden comprender una unidad estructural terapéutica que puede comprender una unidad estructural dirigida que puede actuar como un inhibidor contra CAL PDZ.

#### 15 Composiciones, formulaciones y métodos de administración

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

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

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones se describen en detalle en una serie de fuentes que son bien conocidas y están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science por E.W. Martin (1995) describe formulaciones que se pueden usar en relación con los métodos descritos. En general, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse de manera que una cantidad eficaz del compuesto se combine con un vehículo adecuado para facilitar la administración eficaz del compuesto. Las composiciones utilizadas también pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones líquidas, supositorios, soluciones inyectables e infusibles y aerosoles. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones también incluyen preferiblemente vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales que son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de vehículos o diluyentes para uso con los compuestos incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, alúmina, almidón, solución salina y vehículos y diluyentes equivalentes. Para proporcionar la administración de tales dosis para el tratamiento terapéutico deseado, las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender de modo ventajoso entre aproximadamente el 0,1% y el 100% en peso del total de uno o más de los compuestos en cuestión en base al peso de la composición total, incluido el vehículo o diluyente.

Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen, por ejemplo, soluciones de inyección estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere solo el estado del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, previo a su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvo, gránulos, comprimidos, etc. estériles. Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

Los compuestos descritos en el presente documento, y las composiciones que los comprenden, pueden administrarse a una célula mediante contacto directo con la célula o mediante un medio portador. Los medios portadores para administrar compuestos y composiciones a células son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, encapsular la composición en una unidad estructural de liposoma. Otro medio para el suministro de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento a una célula comprende unir los compuestos a una proteína o ácido nucleico que se dirige a la célula diana. La patente US N° 6.960.648 y las publicaciones de solicitudes US Nros. 20030032594 y 20020120100 describen secuencias de aminoácidos que pueden acoplarse a

otra composición y que permiten la translocación de la composición a través de membranas biológicas. La publicación de solicitud US N° 20020035243 también describe composiciones para transportar unidades estructurales biológicas a través de membranas celulares para administración intracelular. Los compuestos también pueden incorporarse en polímeros, cuyos ejemplos incluyen polímeros de poli(D-L-láctida-co-glicólido) para tumores intracraneales; poli[bis(p-carboxifenoxi)propano:ácido sebácico] en una proporción molar de 20:80 (como se usa en GLIADEL); condroitina; quitina; y quitosano.

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

En ciertos ejemplos, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse localmente en uno o más sitios anatómicos, tales como sitios de crecimiento celular no deseado (como un sitio de tumor o crecimiento de piel benigno, por ejemplo, inyectados o aplicados tópicamente al tumor o crecimiento de la piel), opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte. Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse sistémicamente, tal como por vía intravenosa u oral, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte, o un vehículo comestible asimilable para administración oral. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en tabletas o se pueden incorporar directamente a los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, aerosoles, y similares.

Las composiciones descritas son biodisponibles y pueden administrarse por vía oral. Las composiciones orales pueden ser comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares, y también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un agente edulcorante como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saborizante como menta, aceite de gaulteria o sabor de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, laca o azúcar, y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil- y propilparabenos como conservantes, un tinte y saborizante como el sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

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

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo, que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La última forma de dosificación debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de preparación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un medio de dispersión disolvente o líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. Opcionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios otros agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos,

será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

10  
15 Para la administración tópica, los compuestos y agentes descritos en el presente documento se pueden aplicar en forma líquida o sólida. Sin embargo, en general será deseable administrarlos tópicamente a la piel como composiciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Los compuestos y agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden aplicarse tópicamente a la piel de un sujeto para reducir el tamaño (y pueden incluir la eliminación completa) de tumores malignos o benignos, o para tratar un sitio de infección. Los compuestos y agentes descritos en este documento pueden aplicarse directamente al sitio de crecimiento o infección. Preferiblemente, los compuestos y agentes se aplican al sitio de crecimiento o infección en una formulación tal como una pomada, crema, loción, solución, tintura o similares.

20  
25 Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina, y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes y mezclas de glicoles de agua/alcohol/glicol, en los cuales los compuestos pueden disolverse o dispersarse a niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar desde almohadillas absorbentes, se pueden usar para impregnar vendajes y otros apósitos, o se pueden rociar sobre el área afectada utilizando pulverizadores de tipo bomba o aerosoles, por ejemplo.

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

35 Las dosis útiles de los compuestos y agentes y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden determinarse comparando su actividad in vitro y la actividad in vivo en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosis eficaces en ratones y otros animales a seres humanos son conocidos en la técnica.

40 Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se ven afectados los síntomas o trastornos. La dosis no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. En general, la dosis variará con la edad, el estado, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por un experto en la técnica. El médico individual puede ajustar la dosis en caso de contraindicaciones. La dosis puede variar y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

45  
50 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto descrito en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral, tópica o parenteral, que comprenden una cantidad de un compuesto constituyen un aspecto preferido. La dosis administrada a un paciente, particularmente a un ser humano, debe ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica en el paciente durante un período de tiempo razonable, sin toxicidad letal, y preferiblemente no causa más que un nivel aceptable de efectos secundarios o morbilidad. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis dependerá de una variedad de factores que incluyen la condición (salud) del sujeto, el peso corporal del sujeto, el tipo de tratamiento concurrente, si corresponde, la frecuencia del tratamiento, la proporción terapéutica, así como la gravedad y la etapa de la condición patológica.

55  
60 También se describen kits que comprenden un compuesto descrito en este documento en uno o más recipientes. Los kits descritos pueden incluir opcionalmente vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En una realización, un kit incluye uno o más otros componentes, adjuntos o adyuvantes como se describe en el presente documento. En otra realización, un kit incluye uno o más agentes anticancerosos, tales como los agentes descritos en el presente documento. En una realización, un kit incluye instrucciones o materiales de embalaje que describen cómo administrar un compuesto o composición del kit. Los recipientes del kit pueden ser de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, plástico, metal, etc., y de cualquier tamaño, forma o configuración adecuados. En una realización, un compuesto y/o agente descrito en el presente documento se proporciona en el kit como un sólido, tal como una forma de comprimido, píldora o polvo. En otra realización, un compuesto y/o agente descrito en el presente documento se proporciona en el kit como un líquido o solución. En una realización, el kit comprende una

65

ampolla o jeringa que contiene un compuesto y/o agente descrito aquí en forma líquida o en solución.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que se pueden realizar varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar los métodos y resultados de acuerdo con el objeto descrito. No se pretende que estos ejemplos incluyan todos los aspectos del objeto descrito en el presente documento, sino que ilustren métodos y resultados representativos. Estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones que son evidentes para un experto en la técnica.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o está a temperatura ambiente, y la presión está en o cerca de la atmosférica. Existen numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, temperaturas, presiones y otros intervalos de reacción y condiciones que pueden usarse para optimizar la pureza del producto y el rendimiento obtenido del proceso descrito. Solo se requerirá una experimentación razonable y de rutina para optimizar tales condiciones de proceso.

#### Ejemplo 1

Se descubrió que el ciclo heptapéptido cíclico (F $\Phi$ RRRRQ) (cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, donde  $\Phi$  es L-2-naftilalanina) está internalizado de manera eficiente por las células de mamíferos. En este estudio, su mecanismo de internalización se investigó perturbando diversos eventos endocíticos mediante la introducción de agentes farmacológicos y mutaciones genéticas. Los resultados muestran que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede unirse directamente a los fosfolípidos de la membrana, puede internalizarse en las células cancerosas humanas a través de la endocitosis y puede escapar de los primeros endosomas al citoplasma. Su capacidad de carga se examinó con una amplia variedad de moléculas que incluyen colorantes de molécula pequeña, péptidos lineales y cíclicos de diversos estados cargados y proteínas. Dependiendo de la naturaleza de las cargas, pueden ser entregados por enfoques endocíclicos (inserción de la carga en el anillo cF $\Phi$ R<sub>4</sub>), exocíclicos (sujección de la carga a la cadena lateral de Gln) o bicíclicos (fusión de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> y anillos de carga cíclica). La eficacia de suministro global (es decir, el suministro de carga en el citoplasma y el núcleo) de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> fue 4 a 12 veces más alta que la de nonaarginina (R<sub>9</sub>), péptido derivado de Tat del VIH (Tat) o penetratina (Antp). La mayor eficacia de administración, junto con la estabilidad sérica superior, la toxicidad mínima y la accesibilidad sintética, hacen que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> sea un transportador útil para la administración de carga intracelular y un sistema adecuado para investigar el mecanismo de escape endosomal.

#### Introducción

La membrana plasmática presenta un desafío importante en el descubrimiento de fármacos, especialmente para biología como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Una posible estrategia para subvertir la barrera de la membrana y suministrar las biología a las células es unirlos a "péptidos que penetran en las células (CPP)". Desde la observación inicial de que el transactivador de VIH de transcripción, Tat, se internaliza en las células de los mamíferos y activa la replicación viral a fines de los años 80 (Frankel, AD y Pabo, CO. Cell, 1988, 55, 1189-1193; Green, M y Loewenstein, PM. Cell, 1988, 55, 1179-1188) se ha informado de un gran número de CPP que consta de 6-20 residuos (Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: methods and protocols, Flumana Press, Nueva York, 2011, p xv; Schmidt, N. et al., FEBS Lett., 2010, 584, 1806-1813; Futaki, S. Adv. Drug Delivery Rev., 2005, 57, 547-558; Stewart, KM et al. Org. Biomol. Chem., 2008, 6, 2242-2255; Deshayes, S. et al. Cell. Mol. Life Sci., 2005, 62, 1839-1849; Goun, EA et al. ChemBioChem, 2005, 7, 1497-1515). Los CPP se han utilizado para administrar medicamentos de moléculas pequeñas (Rothbard, JB et al. Nat. Med., 2000, 6, 1253-1257; Nori, A et al. Bioconjugate Chem., 2003, 14, 44-50), ADN (Floyer, J y Neundorf, I. Acc. Chem. Res., 2012, 45, 1048-1056; Eguchi, A et al. J. Biol. Chem., 2001, 276, 26204-26210), ARN (Nakase, I et al., Acc. Chem. Res., 2012, 45, 1132-1139; Andaloussi, SE et al., Nucleic Acids Res., 2011, 39, 3972-3987; Jeong, JH et al., Bioconjugate Chem., 2009, 20, 5-14; Muratovska, A y Eccles, MR FEBS Lett., 2004, 558, 63-68), proteínas (Wadia, JS y Dowdy, SF. Adv. Drug Delivery Rev., 2005, 57, 579-596; Pooga, M. et al. FASEB J., 2001, 15, 1451-1453; Schwarze, SR et al. Science, 1999, 285, 1569-1572) y nanopartículas (Josephson, L et al., Bioconjugate Chem. 1999, 10, 186-191; Gupta, B et al. Adv. Drug Delivery Rev., 2005, 57, 637-651; Liu, J et al. Biomacromolecules, 2001, 2, 362-8), en células de mamíferos y tejidos mediante unión covalente o asociación electrostática. Muchos CPP muestran una toxicidad e inmunogenicidad mínimas en concentraciones fisiológicamente relevantes (Saar, K et al. Anal. Biochem., 2005, 345, 55-65; Suhorutsenko, J et al. Bioconjugate Chem., 2011, 22, 2255-2262) y la incorporación de aminoácidos no naturales específicos (Rueping, M et al. ChemBioChem, 2002, 3, 257-259) y se ha encontrado que otras unidades estructurales químicas (Cooley, CB et al. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 16401-16403; Pham, W et al. ChemBiochem, 2004, 5, 1148-1151) aumentan la estabilidad y la administración citosólica.

A pesar de tres décadas de investigación, la base fundamental para la actividad de CPP sigue siendo difícil de

alcanzar. Se han propuesto dos mecanismos distintos y no mutuamente excluyentes para los CPP cuyas secuencias primarias se caracterizan por tener múltiples residuos de arginina. En el primer mecanismo (translocación de membrana directa), los grupos de arginina guanidinio interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática para generar pares de iones neutros que se difunden pasivamente a través de la membrana (Fierce, FID and García, AE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104, 20805-20810; Flitrose, FI et al. Mol. Ther., 2012, 20, 984-993) o promueven la formación de poros transitorios que permiten que los CPP atraviesen la bicapa lipídica (Fierce, FID et al. Biophys. J., 2009, 97, 1917-1925; Palm-Apergi, C et al., FASEB J., 2009, 23, 214-223). En el segundo mecanismo, los CPP se asocian con las glicoproteínas de la superficie celular y los fosfolípidos de membrana, se internalizan en las células a través de la endocitosis (Richard, JP et al. J. Biol. Chem., 2005, 280, 15300-15306; Ferrari, A et al. Mol. Ther., 2003, 8, 284-294; Fittipaldi, A et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 34141-34149; Kaplan, IM et al., J. Controlled Release, 2005, 102, 247-253; Nakase, I et al., Biochemistry, 2007, 46, 492-501) y posteriormente salen de los endosomas hacia el citoplasma. En conjunto, la mayoría de los datos muestran que a bajas concentraciones de CPP, la captación celular se produce principalmente a través de la endocitosis, mientras que la translocación directa de membrana se vuelve prevalente en concentraciones por encima de 10  $\mu$ M (Duchardt, F et al. Traffic, 2007, 8, 848-866). Sin embargo, el o los mecanismos de entrada y la eficiencia de la captación pueden variar con la identidad de CPP, la carga, el tipo de célula y otros factores (Mueller, J et al. Bioconjugate Chem., 2008, 19, 2363-2374; Maiolo, JR et al. Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1712, 161-172).

Los CPP que ingresan en las células a través de la endocitosis deben salir de las vesículas endocíticas para alcanzar el citosol. Desafortunadamente, la membrana endosómica ha demostrado ser una barrera significativa para el suministro citoplásmico por estos CPP; a menudo, una fracción insignificante de los péptidos se escapa al interior de la célula (El-Sayed, A et al. AAPS J., 2009, 11, 13-22; Varkouhi, AK et al. J. Controlled Release, 2011, 151, 220-228; Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830). Por ejemplo, incluso en presencia del péptido de hemaglutinina fusogénica HA2, que se ha demostrado que mejora la liberación de carga endosomal, >99% de una proteína de fusión Tat-Cre permanece atrapada en macropinosomas 24 h después de la captación inicial (Kaplan, IM et al.). J. Controlled Release, 2005, 102, 247-253). Recientemente, se han descubierto dos nuevos tipos de CPP con eficiencias de escape endosomal mejoradas. Appelbaum et al. mostraron que las proteínas en miniatura plegadas que contenían un motivo pentaarginina discreto podían superar eficazmente el atrapamiento endosomal y alcanzar el citosol de células de mamíferos (Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830). Este motivo consta de cinco argininas a lo largo de tres vueltas de una hélice  $\alpha$ , y las proteínas que contienen este motivo se liberaron desde los endosomas tempranos (Rab5<sup>+</sup>) hacia el interior de la célula. También se ha encontrado que la ciclación de ciertos CPP ricos en arginina mejora su captación celular (Qian, Z et al. ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431; Lattig-Tunnemann, G et al. Nat. Commun., 2011, 2, 453; Mandal, D et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50, 9633-9637; Zhao, K et al., Soft Matter, 2012, 8, 6430-6433). Los péptidos cíclicos anfipáticos pequeños, como el ciclo (FORRRRQ) (c $\Phi$ R<sub>4</sub>, donde  $\Phi$  es L-2-naftilalanina) son internalizados por las células de los mamíferos de una manera dependiente de la energía, y entran en el citoplasma y el núcleo con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que la de la nonaarginina (R<sub>9</sub>) (Qian, Z et al. ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431). Además, las cargas impermeables a la membrana, como los fosfopéptidos, pueden insertarse en el anillo c $\Phi$ R<sub>4</sub> dando como resultado su suministro al citoplasma de las células objetivo. Sin embargo, la inserción de una carga en el anillo peptídico cíclico, que aquí se denomina método de suministro "endocíclico" (Figura 1A), se limita a péptidos relativamente cortos ( $\leq 7$  aminoácidos), ya que los anillos grandes muestran una eficiencia de internalización deficiente (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431).

Para comprender mejor el mecanismo de acción de c $\Phi$ R<sub>4</sub> y diseñar CPP cíclicos potencialmente más eficientes, en este documento se investigó el mecanismo de internalización de c $\Phi$ R<sub>4</sub> mediante el uso de membranas artificiales y agentes farmacológicos, así como mutaciones genéticas que perturban diversos eventos endocíticos. Los datos muestran que c $\Phi$ R<sub>4</sub> puede unirse directamente a los fosfolípidos de la membrana plasmática y puede ingresar a las células a través de la endocitosis. Al igual que las proteínas en miniatura que muestran el motivo pentaarginina (Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830), c $\Phi$ R<sub>4</sub> puede escapar de los primeros endosomas al citosol. También se examinó la capacidad de c $\Phi$ R<sub>4</sub> para suministrar una amplia gama de moléculas de carga, incluidos péptidos lineales de cargas variables, péptidos cíclicos y proteínas grandes, en el citoplasma de células de mamíferos mediante métodos de suministro exocíclicos (unión de carga a la cadena lateral de Gln; Figura 1B) o métodos de suministro bicíclicos (fusión de c $\Phi$ R<sub>4</sub> y los anillos de carga cíclicos; Figura 1C). Se encontró que c $\Phi$ R<sub>4</sub> es tolerante con el tamaño y la naturaleza de las cargas y transportó de manera eficiente todas las cargas analizadas en el citoplasma y el núcleo de las células de mamíferos. Además, c $\Phi$ R<sub>4</sub> exhibe una estabilidad superior frente a la proteólisis sobre los CPP lineales pero con una citotoxicidad mínima. c $\Phi$ R<sub>4</sub>, por lo tanto, proporciona un transportador prácticamente útil para el suministro de carga citosólica, así como un sistema para investigar el mecanismo de liberación temprana de carga endosomal.

Materiales. Los reactivos para la síntesis de péptidos se adquirieron de Advanced ChemTech (Louisville, KY), Nova-Biochem (La Jolla, CA) o Anaspec (San José, CA). Disulfuro de 2,2'-dipiridilo, cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, isotiocianato de fluoresceína (FITC), dexametasona (Dex), sal de trilitio de coenzima A, dextrano marcado con FITC (dextran<sup>FITC</sup>) y suero humano se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Medio de cultivo celular, suero bovino fetal (FBS), penicilina-estreptomicina, tripsina-EDTA al 0,25%, Hoechst 33342, dextrano marcado con Alexa488 (dextran<sup>Alexa488</sup>), solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (2,67 mM, cloruro de potasio, 1,47 mM, fosfato de potasio monobásico, 137 mM de cloruro de sodio, 8,06 mM de fosfato de sodio

dibásico, y Lipofectamine 2000 se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las columnas desalinizadoras PD-10 se adquirieron de GE-Healthcare (Piscataway, NJ). El colorante de tinción nuclear DRAQ5™ se adquirió de Thermo Scientific (Rockford, IL), mientras que el kit de proliferación celular (MTT) se adquirió de Roche (Indianápolis, IN). El anticuerpo anti-fosfotirosina (pY) (clon 4G10) se adquirió de Millipore (Temecula, CA).

La resina de Rink LS (malla 100-200, 0,2 mmol/g) fue comprada de Advanced ChemTech. LC-SMCC (succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxi-[6-amidocaproato]) se adquirió de Thermo Scientific (Rockford, IL), mientras que 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo(1'-rac-glicerol) (sal sódica) (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), esfingomielina (cerebro, porcino) y colesterol fueron comprados de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Se obtuvo sulfato de heparano (HO-03103, lote # HO-10697) de Celcus Laboratories (Cincinnati, OH).

Síntesis y marcado de péptidos. Los péptidos se sintetizaron en resina de Rink LS (0,2 mmol/g) utilizando química estándar de Fmoc. La reacción de acoplamiento típica contenía 5 equivalentes de Fmoc-aminoácido, 5 equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y 10 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) y se dejó que procediera con la mezcla durante 75 min. Después de la adición del último residuo (N-terminal), el grupo alilo en el residuo Glu C-terminal se eliminó mediante tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y fenilsilano (0,1 y 10 equiv, respectivamente) en DCM anhidro (3 x 15 min). El grupo Fmoc N-terminal se eliminó por tratamiento con piperidina al 20% en DMF y el péptido se cicló por tratamiento con hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP)/HOBt/DIPEA (5, 5 y 10 equiv.) en DMF durante 3 h. Los péptidos se desprotegeron y liberaron de la resina por tratamiento con 82,5:5:5:5:2,5 (v/v) TFA/tioanisol/agua/fenol/etanodiol durante 2 h. Los péptidos se trituraron con éter etílico frío (3x) y se purificaron por HPLC de fase inversa en una columna C<sub>18</sub>. La autenticidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

El marcado de péptidos con FITC se realizó disolviendo el péptido purificado (~1 mg) en 300 µL de 1:1:1 (vol/vol) de DMSO/DMF/bicarbonato de sodio 150 mM (pH 8,5) y mezclando con 10 µL de FITC en DMSO (100 mg/mL). Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se sometió a HPLC de fase inversa en una columna C<sub>18</sub> para aislar el péptido marcado con FITC. Para generar péptidos marcados con rodamina y Dex (Figura 2), se añadió al término C N<sup>o</sup>4-metoxitritil-L-lisina. Después de la síntesis de péptidos en fase sólida, la cadena lateral de lisina se desprotegió selectivamente con ácido trifluoroacético al 1% (v/v) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La resina se incubó con cloruro de sulfonilo de rodamina B de lisamina/DIPEA (5 equivalentes cada uno) en DMF durante la noche. Los péptidos se desprotegeron completamente, se trituraron con éter dietílico y se purificaron por HPLC. El péptido marcado con Dex se produjo incubando la resina con ácido dexametasona-21-tiopropiónico/HBTU/DIPEA (5, 5 y 10 equiv.) en DMF durante 3 h (Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830). El péptido se desprotegió, se trituró y se purificó por HPLC. Los péptidos bicíclicos, el ácido fosfocoumarilaminopropiónico (pCAP) y los péptidos que contenían pCAP (PCP) se sintetizaron como se describió previamente (Lian, W. et al., J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 11990-11995; Mitra, S y Barrios, AM. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 15, 5124-5145; Stanford, SM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109, 13972-13977). La autenticidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Preparación de conjugados de cFΦR<sub>4</sub>-proteína. El gen que codifica para el dominio catalítico de PTP1B (aminoácidos 1-321) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando PTP1B ADNc como plantilla y los oligonucleótidos 5'-ggaattc-catatggagatggaaaaggaggtcgcagcag-3' y 5'-gggatcgcgcacattgtgtgctccaggatcgttgg-3' como cebadores. El fragmento de ADN resultante se digirió con las endonucleasas Nde I y Sal I y se insertó en el vector procariótico pET-22b(+)-ybbR (Yin, J et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102, 15815-15820). Este procedimiento de clonación dio como resultado la adición de una marca ybbR (VLDSLEFIASKL) al término N de PTP1B. La expresión y la purificación del PTP1B marcado con ybbR se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Ren, L et al. Biochemistry, 2011, 50, 2339-2356).

El péptido cFΦR<sub>4</sub> que contenía una cisteína C-terminal (cFΦR<sub>4</sub>-SH, ~10 µmol; Figura 3) se disolvió en 1 ml de DPBS desgasificado y se mezcló con disulfuro de 2,2'-dipiridilo (5 equivalentes) disuelto en acetona (0,5 ml). Después de 2 h a temperatura ambiente, el producto de reacción cFΦR<sub>4</sub>-SS-Py se purificó por HPLC de fase inversa. El producto se incubó con coenzima A (2 equiv.) en DPBS durante 2 h. El aducto cFΦR<sub>4</sub>-SS-CoA resultante se purificó de nuevo por HPLC de fase inversa. La proteína fluorescente verde (GFP) que contenía una marca ybbR N-terminal (VLDSLEFIASKL) y una marca de seis histidinas C-terminal se expresó en Escherichia coli y se purificó como se describió anteriormente (Yin, J et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102, 15815-15820). A continuación, se mezclaron ybbR-GFP (30 µM), cFΦR<sub>4</sub>-SS-CoA (30 µM), y fosfopanteteinil transferasa Sfp (0,5 µM) en HEPES 50 mM (pH 7,4), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (volumen total 1,5 mL) y se incubó a 37°C durante 15 min. La proteína marcada, cFΦR<sub>4</sub>-S-S-GFP (Figura 3), se separó de cFΦR<sub>4</sub>-SS-CoA sin reaccionar pasando la mezcla de reacción a través de una columna de desalinización PD-10. Se prepararon GFP conjugados a Tat (Tat-S-S-GFP) y PTP1B conjugado con cFΦR<sub>4</sub> (cFΦR<sub>4</sub>-PTP1B) de una manera similar (Figura 4).

El péptido que contenía una lisina C-terminal (cFΦR<sub>4</sub>-Lys, ~10 µmol; Figura 4) se sintetizó en la fase sólida, se desprotegió y liberó del soporte, se disolvió en DPBS desgasificado (pH 7,4, 1 mL), y se mezcló con el enlazador bifuncional LC-SMCC (5 equiv.) disuelto en DMSO (0,2 mL). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 h, el producto de reacción cFΦR<sub>4</sub>-SMCC (Figura 4) se purificó por HPLC de fase inversa equipada con una

columna C<sub>18</sub>. El producto se mezcló luego con coenzima A (2 equiv.) en DPBS y se incubó durante 2 h. El aducto de cΦR<sub>4</sub>-SMCC-CoA resultante se purificó de nuevo por HPLC de fase inversa. A continuación, se mezclaron PTP1B marcados con ybbR (30 μM), cΦR<sub>4</sub>-SMCC-CoA (30 μM) y fosfopanteteinil-transferasa Sfp (0,5 μM) en HEPES 50 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM (volumen total de 15 ml) y se incubó a 37°C durante 15 min. La proteína marcada (cΦR<sub>4</sub>-PTP1B; Figura 4) se separó de cΦR<sub>4</sub>-SM-CC-CoA sin reaccionar pasando la mezcla de reacción a través de una columna de desalinización PD-10 eluida con DPBS.

Cultivo de células y transfección. Las células HEK293, HeLa, MCF-7, NIH 3T3 y A549 se mantuvieron en un medio que consistía en DMEM, FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Se cultivaron células Jurkat, H1650 y H1299 en RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la transfección de células HeLa, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo. Después de la unión, las células se transfectaron con plásmidos que codifican la fusión de Rab5-proteína fluorescente verde (Rab5-GFP), Rab7-GFP (plásmido de Addgene N° 28047), fusión de receptor de glucocorticoides (C638G)-GFP (GR-GFP) (Holub, JM et al. *Biochemistry*, 2013, 50, 9036-6046), DsRed-Rab5 WT (plásmido Addgene N° 13050) o DsRed-Rab5<sup>Q79L</sup> (plásmido Addgene N° 29688) siguiendo los protocolos del fabricante de Lipofectamine 2000.

Preparación de pequeñas vesículas unilaminares (SUV). Las SUV se prepararon modificando un procedimiento informado previamente (Magzoub, M et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1563, 53-63). Una mezcla lipídica apropiada se disolvió en cloroformo en un tubo de ensayo. La mezcla lipídica se secó moderadamente soplando argón sobre la solución y se mantuvo en un desecador durante la noche. Los lípidos secos se rehidrataron en DPBS hasta una concentración final de lípidos total de 10 mM. La suspensión se mezcló rigurosamente mediante agitación con vórtex y sonicación en hielo hasta que quedó transparente. Una preparación típica produce una solución homogénea que contiene vesículas con un diámetro promedio de ~80 nm y un índice de polidispersidad (Pdl) de <0,15, según lo determinan las mediciones de dispersión dinámica de la luz utilizando Zeta Sizer Nano Series (Malvern, Brookhaven, CT). La solución de SUV se almacenó a 4°C y se usó para experimentos de FP el mismo día.

Polarización de la fluorescencia. Se realizó un experimento atípico incubando péptido marcado con FITC 100 nM con concentraciones variables de sulfato de heparano (0-5.000 nM) en DPBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Los valores de FP se midieron en un espectrofluorímetro Spectramax M5 de Molecular Devices, con longitudes de onda de excitación y emisión a 485 y 525 nm, respectivamente. Las EC<sub>50</sub> se determinaron representando los valores de FP en función de las concentraciones de sulfato de heparano y se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros con el software GraphPad PRISM ver. 6.

Para obtener el valor EC<sub>50</sub> de CPP con membranas lipídicas, el experimento FP se llevó a cabo de manera similar utilizando péptido marcado con FITC 100 nM con concentraciones crecientes de soluciones de SUV (0-10 mM) en DPBS. Los valores de FP se midieron, representaron y analizaron de manera similar.

Análisis de imagen. Las imágenes en bruto se modificaron uniformemente utilizando imageJ. El coeficiente de correlación de Pearson (R) se obtuvo de las regiones endosómicas utilizando el complemento Just Another Colocalization Plugin (JACoP) (Bolte, S y Cordelieres, FP. *J. Microsc.*, 2006, 224, 213-232). Para el ensayo de translocación de GR-GFP, las imágenes individuales de GFP y Hoechst se cargaron en una tubería personalizada de CellProfiler y se colorearon a gris (Carpenter, AE et al. *Genome Biol.*, 2006, 7, R100). Los núcleos se distinguieron de la imagen Hoechst a través del umbral automático de tres clases de Otsu, con píxeles de la clase de intensidad media asignados al fondo. Los objetos agrupados se identificaron mediante el modelado laplaciano de Gauss y se separaron por forma. La región nuclear se definió como el diámetro de los objetos Hoechst reducidos en 1 μm, mientras que la región del anillo citosólico se definió como la región entre el diámetro nuclear y el diámetro nuclear expandido 2 μm. La relación de translocación se definió como la señal de GFP media dentro de la región nuclear dividida por la señal de GFP media dentro de la región citosólica medida por célula, y se capturaron 30-70 células de 15-30 imágenes para cada condición probada.

Microscopia confocal. Para examinar la colocalización entre el péptido cíclico marcado con rodamina (cΦR<sub>4</sub><sup>Rho</sup>) y los endosomas Rab5<sup>+</sup> o Rab7<sup>+</sup>, se sembraron células HeLa transfectadas con Rab5-GFP o Rab7-GFP (200 μL, 10<sup>4</sup> células/pocillo, MatriPlates de fondo de vidrio de 96 pocillos) el día anterior al experimento. El día del experimento, las células HeLa se trataron con 1 μM de cΦR<sub>4</sub><sup>Rho</sup> en medio DMEM complementado con 300 nM de Hoechst 33342 durante 30 min. Después de eso, las células se lavaron con regulador HKR (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) y se tomaron imágenes usando un microscopio confocal de disco giratorio PerkinElmer LiveView.

Para el ensayo de translocación de GR, las células HeLa transfectadas con GR-GFP se plaquearon como se describió anteriormente (Holub, JM et al. *Biochemistry*, 2013, 50, 9036-6046). Las células se trataron durante 30 minutos con medio DMEM que contenía 1 μM Dex o conjugado de Dex-péptido y 300 nM de Hoechst 33342 y se tomaron imágenes utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert200M equipado con la cámara Zeiss AxioCam mRM y una lámpara EXFO-Excite de 120 Hg. Para examinar el efecto de los inhibidores de la endocitosis, las células HeLa transfectadas se pretrataron durante 30 minutos con DMEM transparente que contenía los inhibidores antes de la incubación con Dex o conjugados de Dex-péptido. Para probar si la actividad de Rab5 es

necesaria para el escape endosomal, las células HeLa se transfectaron con GR-GFP y DsRed-Rab5 WT o DsRed-Rab5<sup>Q79L</sup> antes del tratamiento con Dex o conjugado de Dex-péptido y se tomaron imágenes como se describió anteriormente (Appelbaum, JS et al. Chem. Biol., 2012, 19, 819-830).

5 Para examinar la internalización de péptidos marcados con rodamina, se colocaron  $5 \times 10^4$  células HEK293 en una placa de micropocillos con fondo de vidrio de 35 mm (MatTek). El día del experimento, las células se incubaron con la solución de péptido ( $5 \mu\text{M}$ ) y  $0,5 \text{ mg/ml}$  de dextran<sup>FITC</sup> a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Las células se lavaron moderadamente con DPBS dos veces y se tomaron imágenes en un microscopio confocal de imágenes de células en vivo Visitech Infinity 3 Hawk 2D array. Para detectar la internalización de péptidos que contienen pCAP, las células HEK293 se sembraron en forma similar y se incubaron con la solución de péptido ( $5 \mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 min. Después de la eliminación del medio, las células se lavaron moderadamente con DPBS que contenía pervanadato de sodio ( $1 \text{ mM}$ ) dos veces y se incubaron durante 10 minutos en DPBS que contenía  $5 \mu\text{M}$  de tinte de tinción nuclear con DRAQ5. Las células resultantes se lavaron con DPBS dos veces y se tomaron imágenes en un microscopio de disco giratorio (sistema UltraView VoxCSUX1). Para monitorizar la internalización de GFP, se sembraron  $5 \times 10^4$  células HEK293 en un micropocillo con fondo de vidrio de 35 mm y se cultivaron durante la noche. Las células se trataron con cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-S-S-GFP ( $1 \mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Después de la eliminación del medio, las células se incubaron en DPBS que contenía  $5 \mu\text{M}$  de DRAQ5 durante 10 min. Las células se lavaron con DPBS dos veces y se tomaron imágenes en un microscopio confocal de imágenes en vivo de células en vivo Visitech Infinity 3 Hawk 2D-array.

20 Citometría de flujo. Para cuantificar las eficacias de administración de péptidos que contienen pCAP, las células HeLa se cultivaron en placas de seis pocillos ( $5 \times 10^5$  células por pocillo) durante 24 h. El día del experimento, las células se incubaron con péptido que contenía pCAP  $10 \mu\text{M}$  en DMEM transparente con FBS al 1% a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Las células se lavaron con DPBS que contenía pervanadato sódico  $1 \text{ mM}$ , se separaron de la placa con tripsina al 0,25%, se suspendieron en DPBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Aria con excitación a 355 nm. Los datos fueron analizados con el software Flowjo (Tree Star).

30 Para estimar el efecto de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> en la endocitosis, las células HeLa se sembraron en placas de seis pocillos ( $5 \times 10^5$  células por pocillo) y se dejaron adherir durante la noche. Después de la adherencia, las células se trataron con DMEM transparente que no contenía suplemento,  $1 \mu\text{M}$  de péptido cF $\Phi$ R<sub>4</sub>,  $100 \mu\text{M}$  de dextran<sup>Alexa488</sup> (Life Technologies, D-22910), o ambos péptidos cíclicos de  $1 \mu\text{M}$  y  $100 \mu\text{M}$  de dextran<sup>Alexa488</sup> durante 30 min en condiciones estándar de cultivo de células. Las células se lavaron con DPBS dos veces, se retiraron de la placa con tripsina al 0,25%, se diluyeron en DMEM transparente que contenía FBS al 10%, se sedimentaron a 300 g durante 5 min, se lavaron una vez con DPBS y se resuspendieron en  $200 \mu\text{l}$  de DPBS. La captación de dextrano de células completas se analizó en un citómetro de flujo BD Accuri C6 utilizando el láser FL1 del fabricante y el juego de filtros.

35 Inmunotransferencia. Las células NIH 3T3 se cultivaron en medios de crecimiento completo para alcanzar una confluencia del 80%. Las células se murieron de hambre en medio sin suero durante 3 h y se trataron con diferentes concentraciones de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PTP1B o PTP1B sin marcar durante 2 h, seguido de 30 min de incubación en medio suplementado con pervanadato de sodio  $1 \text{ mM}$ . Las soluciones se eliminaron y las células se lavaron con DPBS frío dos veces. Las células se separaron y se lisaron en Tris-HCl  $50 \text{ mM}$ , pH 7,4, NaCl  $150 \text{ mM}$ , NP-40 al 1%, pirofosfato de sodio  $10 \text{ mM}$ , ácido yodoacético  $5 \text{ mM}$ , NaF  $10 \text{ mM}$ , EDTA  $1 \text{ mM}$ , pervanadato de sodio  $2 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ mg/ml}$  de fluoruro de fenilmetansulfonilo, benzamidina  $1 \text{ mM}$  y  $0,1 \text{ mg/ml}$  de inhibidor de tripsina. Después de 30 minutos de incubación en hielo, el lisado celular se centrifugó a  $15.000 \text{ rpm}$  durante 25 minutos en una microcentrífuga. Las proteínas celulares totales se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a la membrana de PVDF, que se inmunotransportó utilizando el anticuerpo anti-pY 4G10.

50 Prueba de estabilidad sérica. Las pruebas de estabilidad se realizaron modificando un procedimiento previamente informado (Nguyen, LT et al. PLoS One, 2010, 5, e12684). El suero humano diluido (25%) se centrifugó a  $15.000 \text{ rpm}$  durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Una solución madre de péptidos se diluyó en el sobrenadante hasta una concentración final de  $5 \mu\text{M}$  para cF $\Phi$ R<sub>4</sub> y Antp y  $50 \mu\text{M}$  para los péptidos R<sub>9</sub> y Tat y se incubó a  $37^\circ\text{C}$ . En varios puntos temporales (0-6 h), se retiraron partes alícuotas de  $200 \mu\text{l}$  y se mezclaron con  $50 \mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 15% y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche. La mezcla final se centrifugó a  $15.000 \text{ rpm}$  durante 10 minutos en una microcentrífuga, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC de fase inversa equipada con una columna C<sub>18</sub> (Waters). La cantidad de péptido restante (%) se determinó integrando el área debajo del pico de péptido (monitoreado a  $214 \text{ nm}$ ) y se comparó con la de la reacción de control (sin suero).

60 Ensayo de citotoxicidad. Se realizaron ensayos de MTT para evaluar la citotoxicidad del péptido cíclico frente a varias líneas celulares de mamíferos (Mosmann, T.J. Immunol. Methods, 1983, 65, 55-63).  $100 \mu\text{l}$  de células MCF-7, HEK293, H1299, H1650, A549 ( $1 \times 10^5$  células/mL) se colocaron en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se dejaron crecer durante la noche. Se agregaron concentraciones variables del péptido ( $5$  o  $50 \mu\text{M}$ ) a cada pocillo y las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 a 72 h. Se agregaron  $10 \mu\text{l}$  de solución madre de MTT a cada pocillo. La adición de  $10 \mu\text{l}$  de la solución al medio de crecimiento (sin células) se utilizó como control negativo. La placa se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 h. Luego, se agregaron  $100 \mu\text{l}$  de regulador de solubilización SDS-HCl a cada pocillo y la solución resultante se mezcló completamente. La placa se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante otras 4 h. La absorbancia del producto de formazán se midió a  $570 \text{ nm}$  utilizando un lector de placas Molecular Devices Spectramax M5. Cada experimento se realizó por triplicado y las células sin ningún péptido

agregado se trataron como control.

cF $\Phi$ R<sub>4</sub> se une a fosfolípidos de membrana. Se observó previamente que la incubación del péptido cíclico cF $\Phi$ R<sub>4</sub><sup>FITC</sup> marcado con FITC 1  $\mu$ M con vesículas que contenían fosfolípidos cargados negativamente (90% de fosfatidilcolina (PC) y 10% de fosfatidilglicerol (PG)) dio como resultado la extinción de la fluorescencia del péptido, consistente con unión directa de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> a fosfolípidos (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431). Para probar el papel potencial de la unión a la membrana durante la captación endocítica de los CPP, se prepararon las SUV que simulan la membrana externa de las células de mamíferos (45% PC, 20% de fosfatidiletanolamina, 20% de esfingomielinina y 15% de colesterol) y se ensayaron respecto de la unión a cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, R<sub>9</sub> y Tat marcados con FITC (cada uno a 100 nM) mediante un ensayo de polarización de fluorescencia (FP). cF $\Phi$ R<sub>4</sub> unido a las SUV neutras con un valor de EC<sub>50</sub> (concentración de lípidos a la cual se une la mitad de cF $\Phi$ R<sub>4</sub><sup>FITC</sup>) de 2,1  $\pm$  0,1 mM (Figura 5A). R<sub>9</sub> mostró una unión mucho más débil a la membrana artificial (EC<sub>50</sub> > 10 mM), mientras que Tat no se unió en absoluto. A continuación, se probaron los CPP para determinar su unión al sulfato de heparano, que se propuso previamente como el objetivo de unión principal de los CPP catiónicos (Nakase, I et al. Biochemistry, 2007, 46, 492-501; Rusnati, M. et al. J. Biol. Chem., 1999, 274, 28198-28205; Tyagi, M et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 3254-3261; Ziegler, A y Seelig, J. Biophys. J., 2004, 86, 254-263; Goncalves, E et al. Biochemistry, 2005, 44, 2692-2702; Ziegler, A. Adv. Drug Delivery Rev., 2008, 60, 580-597). R<sub>9</sub> y Tat se unieron al sulfato de heparano con alta afinidad, con valores de EC<sub>50</sub> de 144 y 304 nM, respectivamente (Figura 5B). En la misma condición, cF $\Phi$ R<sub>4</sub> no mostró una unión detectable al sulfato de heparano. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones anteriores de que las CPP catiónicas no anfipáticas (por ejemplo, Tat y R<sub>9</sub>) se unen estrechamente con los proteoglicanos de la superficie celular (por ejemplo, sulfato de heparano) pero solo débilmente con los lípidos de la membrana (Ziegler, A. Adv. Drug Delivery Rev., 2008, 60, 580-597). El número insuficiente de cargas positivas de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> es probablemente responsable de su falta de interacción electrostática fuerte con sulfato de heparano. Por otro lado, la naturaleza anfipática y la estructura cíclica más rígida de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> deberían facilitar su unión a las membranas lipídicas neutras. Estos datos, junto con el patrón de inhibición de varios inhibidores endocíticos descritos anteriormente, sugieren que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede unirse directamente a los fosfolípidos de la membrana plasmática y puede ser internalizado por todos los mecanismos endocíticos de una manera concatenada.

Administración intracelular de cargas de peptidilo. Dado que la administración endocítica por cF $\Phi$ R<sub>4</sub> se limita a un heptapéptido o cargas más pequeñas (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431), en este estudio se ensayó la capacidad de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> para suministrar cargas de diferentes tamaños y propiedades fisicoquímicas unidas a la cadena lateral de Gln (Figura 1B, administración exocítica). Primero, los péptidos cargados positivamente (RRRRR), neutros (AAAAA), hidrófobos (FFFF) y cargados negativamente [DE(pCAP)LI] se unieron covalentemente al cF $\Phi$ R<sub>4</sub>. Los tres primeros péptidos se marcaron con rodamina B en una cadena lateral de lisina C-terminal (Figura 2), y se examinó su internalización en células HEK293 mediante microscopía confocal de células vivas. Las células incubadas durante 2 h con 5  $\mu$ M de péptido cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>5</sub> (Figura 6A) o cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-R<sub>5</sub> (Figura 6B) mostraron evidencia de fluorescencia tanto punteada como difusa, con esta última distribuida casi uniformemente en toda la célula. Por el contrario, el marcador endocítico en fase fluida dextran<sup>FITC</sup> mostró predominantemente fluorescencia punteada, indicativa de la localización endosomal. La fluorescencia de rodamina difusa sugiere que una fracción de los péptidos alcanzó el citosol y el núcleo de las células. La incubación conjunta de células con cF $\Phi$ R<sub>4</sub> (1  $\mu$ M) y dextran<sup>Alexa488</sup> aumentó la internalización del marcador endocítico en un 15% (Figura 7), lo que sugiere que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede activar la endocitosis en células cultivadas. cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-F4 no se probó debido a su escasa solubilidad acuosa.

El péptido cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-DE(pCAP)LI (cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP; Figura 2) se diseñó para probar la capacidad de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> para suministrar cargas cargadas negativamente, así como para comparar la eficiencia de administración citoplásmica de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> con los de otros CPP ampliamente utilizados, como R<sub>9</sub>, Tat y penetratina (Antp). Por lo tanto, también se prepararon PCP sin marcar [Ac-DE(pCap)LI-NH<sub>2</sub>] y PCP conjugados con R<sub>9</sub> (R<sub>9</sub>-PCP), Tat (Tat-PCP) o Antp (Antp-PCP). Tener en cuenta que cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP tiene una carga neta de cero a pH fisiológico. pCAP no es fluorescente, pero al entrar en el interior de la célula, debe ser desfosforilado rápidamente por proteínas tirosina fosfatasas endógenas (PTP) para generar un producto fluorescente, ácido coumarilaminopropiónico (CAP, excitación 355 nm; emisión 450 nm) (Mitra, S y Barrios, AM. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 15, 5124-5145; Stanford, SM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109, 13972-13977). Cuando se ensayó contra un panel de PTP in vitro, los cuatro conjugados de CPP-PCP se desfosforilaron eficazmente (Tabla 8). Este ensayo detecta solo la carga de CPP dentro del citoplasma y el núcleo, donde se localizan los dominios catalíticos de todas las PTP de mamíferos conocidos (Alonso, A et al. Cell, 2004, 117, 699-711). Además, la PAC es fluorescente solo en su estado desprotonado (pK<sub>a</sub> = 7,8); incluso si ocurre alguna desfosforilación dentro del endosoma (pH 6,5-4,5) o lisosoma (pH 4,5), contribuiría poco a la fluorescencia total (Figura 8). El tratamiento de células HEK293 con 5  $\mu$ M cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP durante 60 min dio como resultado una fluorescencia azul difusa en toda la célula, lo que sugiere que cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP alcanzó el interior de la célula, mientras que la PCP sin marcar no pudo ingresar a las células en las mismas condiciones (Figura 9A). Cuando las células HEK293 se trataron previamente con el inhibidor de sodio del PTP durante 1 h antes de la incubación con cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP (5  $\mu$ M), la fluorescencia de PAC en las células disminuyó a niveles de fondo. Las células HEK293 tratadas con R<sub>9</sub>-PCP, Antp-PCP o Tat-PCP en condiciones idénticas mostraron una fluorescencia débil, lo que concuerda con la poca capacidad de estos péptidos para acceder al interior de la célula (Figura 9A). Para cuantificar la eficacia de administración de PCP intracelular relativa, las células HeLa se trataron con cada péptido y se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (Figura 9B). cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP fue internalizado de manera más eficiente por las células HeLa, con una intensidad de fluorescencia media (MFI) de

3510 unidades arbitrarias (AU), mientras que R<sub>g</sub>-PCP, Antp-PCP, Tat-PCP y PCP sin marcar produjeron valores de MFI de 960, 400, 290 y 30 AU, respectivamente (Figura 9C). Nuevamente, cuando las células se trataron con cF $\Phi$ R<sub>4</sub>-PCP en presencia de pervanadato de sodio, la cantidad de fluorescencia de CAP se redujo a niveles cercanos al fondo (70 AU). Por lo tanto, cF $\Phi$ R<sub>4</sub> es capaz de administrar cargas de péptido de propiedades físicoquímicas variables en el citoplasma con eficiencias 3,7-12 veces mayores que R<sub>g</sub>, Antp y Tat.

Tabla 8. Actividades cinéticas ( $k_{cat}/K_M$ , M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) de PTP recombinantes contra péptidos que contienen pCAP<sup>a</sup>

| PTP   | cF $\Phi$ R <sub>4</sub> -PCP | Tat-PCP | R <sub>g</sub> -PCP | Antp-PCP |
|-------|-------------------------------|---------|---------------------|----------|
| PTP1B | 37100                         | 13800   | 14700               | 17400    |
| TCPTP | 2780                          | 560     | 457                 | 970      |
| SHP2  | 7400                          | 2290    | 248                 | 2210     |
| CD45  | 35100                         | 21800   | 2940                | 22300    |
| VHR   | 2460                          | 1460    | 6240                | 2030     |

<sup>a</sup> $k_{cat}/K_M$  se midió como se describió previamente (Ren, L et al. Biochemistry, 2011, 50, 2339-2356).

Administración intracelular de péptidos cíclicos. En los últimos años, ha habido mucho interés en los péptidos cíclicos como agentes terapéuticos y herramientas de investigación biomédica (Driggers, EM et al., Nat. Rev. Drug Discov., 2008, 7, 608-624; Marsault, E y Peterson, ML. J. Med. Chem., 2011, 54, 1961-2004). Por ejemplo, los péptidos cíclicos son eficaces para la inhibición de las interacciones proteína-proteína (Lian, W et al. J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 11990-11995; Liu, T et al., ACS Comb. Sci., 2011, 13, 537-546; Dewan, V et al. ACS Chem. Biol., 2012, 7, 761-769; Wu, X et al. Med. Chem. Commun., 2013, 4, 378-382), que son objetivos desafiantes para pequeñas moléculas convencionales. Un obstáculo importante en el desarrollo de la terapéutica de péptidos cíclicos es que generalmente son impermeables a la membrana celular (Kwon, YU y Kodadek, T. Chem. Biol., 2007, 14, 671-677; Rezai, T. et al. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 2510-2511; Chatterjee, J et al. Acc. Chem. Res., 2008, 41, 1331-1342). El intento de administrar péptidos cíclicos mediante cF $\Phi$ R<sub>4</sub> por el método endocíclico solo tuvo un éxito limitado; el aumento en el tamaño de la carga de 1 a 7 residuos condujo a una absorción celular cada vez más pobre, probablemente debido a que los anillos más grandes y más flexibles se unen más pobremente a la membrana celular (Qian, Z et al. ACS Chem. Biol., 2013, 8, 423-431). Para superar esta limitación, se exploró un sistema peptídico bicíclico, en el que un anillo contiene un motivo CPP (por ejemplo, F $\Phi$ R<sub>4</sub>) mientras que el otro anillo consiste en secuencias peptídicas específicas para los objetivos deseados (Figura 1C). El sistema bicíclico debería poder acomodar, en principio, cargas de cualquier tamaño, ya que la carga no cambia la estructura del anillo de CPP y debería tener menos impacto en la eficiencia de administración. La rigidez adicional de una estructura bicíclica también debería mejorar su estabilidad metabólica, así como la afinidad y especificidad de unión al objetivo. Los péptidos bicíclicos se sintetizaron fácilmente formando tres enlaces amida entre una estructura de trimesoilo y tres grupos amino en el péptido lineal correspondiente (es decir, la amina N-terminal, la cadena lateral de un ácido diaminopropiónico C-terminal (Dap), y la cadena lateral de una lisina (u ornitina, Dap) incrustada entre el CPP y los motivos de unión al objetivo (Lian, W et al., J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 11990-11995). Para probar la validez de este enfoque, se eligió F $\Phi$ R<sub>4</sub> en el anillo C-terminal ya que la unidad estructural de CPP y péptidos de diferentes longitudes y cargas (AAAAA, AAAAAA, RARAR o DADAD) se eligieron como carga (Tabla 8, compuestos 13-16). Con fines comparativos, también se prepararon dos péptidos monocíclicos que contienen F $\Phi$ R<sub>4</sub> como transportador y péptidos A<sub>5</sub> y A<sub>7</sub> como cargas (Tabla 8, compuestos 17 y 18). Todos los péptidos se marcaron en una cadena lateral de lisina C-terminal con rodamina B (Figura 2) y se examinó su internalización en células HEK293 mediante microscopía confocal de células vivas. El tratamiento de las células con 5  $\mu$ M de péptido durante 2 h dio como resultado una internalización eficiente de los seis péptidos (Figura 10), aunque el análisis FACS indicó que la captación de biciclo (F $\Phi$ R<sub>4</sub>-A<sub>5</sub>)<sup>Rho</sup> fue 3 veces más eficiente que el correspondiente péptido monocíclico (compuesto 17). La distribución intracelular de los péptidos internalizados fue bastante diferente entre los péptidos bicíclicos y monocíclicos. Mientras que los cuatro péptidos bicíclicos mostraron evidencia de su presencia tanto en el citoplasma/núcleo (como lo indica la fluorescencia difusa de rodamina) y los endosomas (como lo indican los puntos de fluorescencia), los péptidos monocíclicos exhibieron una fluorescencia predominantemente puntiforme que se superpuso con la de marcador endocítico dextran<sup>FITC</sup>. En todos los casos, el marcador endocítico mostró solo una fluorescencia punteada, lo que indica que los endosomas estaban intactos en las células tratadas con los péptidos. Estos resultados indican que el aumento de la rigidez estructural de los péptidos bicíclicos facilita tanto la captación inicial por endocitosis como la liberación endosomal, probablemente debido a su mejor unión al plasma y las membranas endosómicas. El sistema bicíclico puede proporcionar una estrategia general para la administración intracelular de péptidos cíclicos y bicíclicos.

Suministro intracelular de cargas de proteína. Para probar si cF $\Phi$ R<sub>4</sub> es capaz de transportar proteínas de longitud completa a células de mamíferos, se unió GFP al término N de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> a través de un enlace disulfuro (Figura 11A y Figura 3). Se eligió GFP debido a su fluorescencia intrínseca. La reacción de intercambio de disulfuro es altamente específica, eficiente y reversible; al ingresar al citoplasma, el conjugado de la proteína CPP-S-S puede reducirse rápidamente para liberar la proteína nativa. Aunque cF $\Phi$ R<sub>4</sub> se puede unir directamente a un residuo de cisteína de superficie nativo o diseñado en una proteína de carga, se usó una variante de GFP que contiene una marca ybBR de

12 aminoácidos en su extremo N-terminal y se usó fosfopanteteiniltransferasa Sfp para unir enzimáticamente cΦR<sub>4</sub> a la marca ybbR (Yin, J et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102, 15815-15820). Esto permitió la conexión de una sola unidad cΦR<sub>4</sub> a GFP de una manera específica del sitio. Para comparación, se generó un conjugado Tat-S-S-GFP de la misma manera. La incubación de células HEK293 en presencia de 1 μM cΦR<sub>4</sub>-S-S-GFP dio como resultado la acumulación de fluorescencia verde dentro de las células (Figura 11B). La señal de fluorescencia fue difusa y presente en todo el volumen celular, pero con concentraciones más altas en el núcleo. Algunas de las células contenían pequeñas manchas de fluorescencia verde intensa (indicadas por las flechas en la Figura 11B), que pueden representar cΦR<sub>4</sub>-S-S-GFP secuestrada endosomalmente o GFP agregada dentro de la célula. La GFP sin marca no pudo ingresar en las células, mientras que Tat-S-S-GFP ingresó en las células con menos eficiencia que la cΦR<sub>4</sub>-S-S-GFP (Figura 11B); el análisis FACS de las células HeLa tratadas con 1 μM de proteína reveló una fluorescencia intracelular total 5,5 veces mayor para esta última. Los puntos de fluorescencia en la periferia celular, así como la falta de cualquier fluorescencia detectable en la región nuclear de las células tratadas con Tat-SS-GFP, indican que Tat-SS-GFP está mayormente atrapado en los endosomas, de acuerdo con informes anteriores (Kaplan, IM et al., J. Controlled Release, 2005, 102, 247-253). Por lo tanto, con una proteína como carga, cΦR<sub>4</sub> también tiene una mayor eficacia que Tat en lo que respecta tanto a la captación inicial como al escape endosomal.

Para demostrar la generalidad de cΦR<sub>4</sub> para el suministro de proteínas, se eligió una enzima funcional, el dominio catalítico de PTP1B (aminoácidos 1-321), para administrarse en el interior de la célula. Para mostrar que un enlace no escindible también es compatible con el método de administración, cΦR<sub>4</sub> se conjugó con PTP1B marcado con ybbR a través de un enlace tioéter (cΦR<sub>4</sub>-PTP1B) (Figura 4). El ensayo in vitro con fosfato de p-nitrofenilo como sustrato mostró que la adición de la marca cΦR<sub>4</sub> no afecta la actividad catalítica de PTP1B (Tabla 9). Las células NIH 3T3 se incubaron durante 2 h en presencia de PTP1B o cΦR<sub>4</sub>-PTP1B sin marcar y sus niveles globales de proteína pY se analizaron mediante transferencia Western anti-pY (Figura 12A). El tratamiento de las células con cΦR<sub>4</sub>-PTP1B, pero no con PTP1B sin marcar, dio como resultado una disminución dependiente de la concentración en los niveles de pY de la mayoría de las proteínas, pero no de todas. Los niveles de proteína celular total, tal como se detectaron mediante la tinción con azul de Coomassie, no se modificaron (Figura 12B), lo que indica que la disminución observada en los niveles de pY se debió a la desfosforilación de las proteínas pY por cΦR<sub>4</sub>-PTP1B y/o efectos secundarios causados por la introducción de cΦR<sub>4</sub>-PTP1B (por ejemplo, inactivación de proteínas tirosina quinasas celulares). Curiosamente, diferentes proteínas exhibieron variadas cinéticas de desfosforilación. Varias proteínas en el intervalo de 150-200 kD se desfosforilaron completamente con la adición de 62 nM de cΦR<sub>4</sub>-PTP1B, mientras que las proteínas de ~80 kD permanecieron fosforiladas a 500 nM de cΦR<sub>4</sub>-PTP1B. Los cambios en la plantilla de pY son consistentes con la amplia especificidad de sustrato de PTP1B (Ren, L et al. Biochemistry, 2011, 50, 2339-2356) y muy similar a la causada por la sobreexpresión de PTP1B dentro del citosol de células de mamíferos (LaMontagne Jr., KRet al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 14094-14099). Estos resultados indican que cΦR<sub>4</sub> puede administrar PTP1B al interior de las células NIH 3T3 en la forma catalíticamente activa y a niveles suficientes para perturbar el proceso de señalización celular. cΦR<sub>4</sub> proporciona así una herramienta para introducir otras proteínas funcionales, en especial proteínas que no pueden expresarse genéticamente (por ejemplo, proteínas tóxicas y químicamente modificadas), en células de mamíferos para estudiar sus funciones celulares.

Tabla 9. Actividades cinéticas ( $k_{cat}/K_M$ ,  $M^{-1} s^{-1}$ ) de PTP1B y cΦR<sub>4</sub>-PTP1B contra pNPP<sup>a</sup>

| enzima                  | $k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) |
|-------------------------|-----------------------------------|
| PTP1B                   | 1340                              |
| cΦR <sub>4</sub> -PTP1B | 1600                              |

<sup>a</sup>pNPP = fosfato de p-nitrofenilo;  $k_{cat}/K_M$  se midió como se describió previamente (Ren, L et al. Biochemistry, 2011, 50, 2339-2356).

Estabilidad y citotoxicidad de cΦR<sub>4</sub>. La estabilidad relativa de cΦR<sub>4</sub>, R<sub>9</sub>, Tat y Antp (Tabla 8, compuestos 19-22) frente a la degradación proteolítica se determinó incubando los CPP en suero humano al 25% a 37°C y luego de la desaparición de los péptidos de longitud completa mediante HPLC de fase inversa. El péptido catiónico que contiene triptófano, Antp, fue el menos estable entre los cuatro CPP; se degradó a una vida media de <20 min y se digirió completamente después de 2 h (Figura 13A). R<sub>9</sub> y Tat fueron ligeramente más estables que Antp, con vidas medias de ~30 min. Por el contrario, cΦR<sub>4</sub> fue notablemente estable frente a las proteasas séricas. Hubo menos del 10% de degradación después de 6 h de incubación; después de 24 h de incubación en el suero, >70% de cΦR<sub>4</sub> permaneció intacto. Muchos otros estudios también han demostrado que la ciclación de péptidos aumenta sus estabildades proteolíticas (Nguyen, LT et al. PLoS One, 2010, 5, e12684). La citotoxicidad potencial de cΦR<sub>4</sub> se evaluó mediante ensayos MTT con cinco líneas celulares humanas diferentes (HEK293, MCF-7, A549, H1650 y H1299). Después de 24 o 48 h de incubación con hasta 50 μM de cΦR<sub>4</sub>, no hubo inhibición significativa del crecimiento para ninguna de las líneas celulares (Figura 13B y Figura 14). Después de 72 h, se observó una ligera inhibición del crecimiento (hasta 20%) a 50 μM (Figura 14). Por lo tanto, cΦR<sub>4</sub> es relativamente no tóxico para las células de mamíferos.

En este estudio, se demostró que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede ser eficaz para la administración exocíclica de cargas de pequeñas moléculas, péptidos y proteínas en el citoplasma y el núcleo de las células de mamíferos. Al utilizar un péptido que contenía pCAP como carga/informador, se demostró que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede ser 3,7-12 veces más eficiente que R<sub>9</sub>, Tat y Antp para la entrega de carga citoplásmica, lo que hace que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> sea uno de los CPPs más activos conocidos hasta la fecha. Aunque la modificación de los CPP polibásicos, como la adición de grupos acilo hidrófobos, se ha informado anteriormente que aumenta la captación celular en una magnitud similar (Pham, W et al. *Chembiochem*, 2004, 5,1148-1151), estos estudios previos no han establecido si la captación mejorada se traduce en un aumento similar en la concentración de CPP citoplásmica. El sistema informador basado en pCAP descrito en este documento puede proporcionar un método simple y robusto para evaluar cuantitativamente la eficacia del suministro citoplásmico de otros CPP. Varias líneas de evidencia indican que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede ingresar a las células a través de múltiples mecanismos endocíticos, incluyendo su incapacidad para ingresar a las células a 4°C o en presencia de azida sódica, superposición parcial entre el punto de fluorescencia de cF $\Phi$ R<sub>4</sub><sup>Rho</sup> y el marcador dextran<sup>FITC</sup> endocítico en fase fluida, colocalización de cF $\Phi$ R<sub>4</sub><sup>Rho</sup> y proteínas endosómicas Rab5 y Rab7, y disminución de la captación de cF $\Phi$ R<sub>4</sub><sup>Dex</sup> tras la administración de inhibidores endocíticos. El efecto mínimo del inhibidor de PI3K wortmannina y la mutación Rab5 Q79L en el suministro citoplásmico de cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, además de la colocalización fuerte observada entre los endosomas cF $\Phi$ R<sub>4</sub> y Rab5<sup>+</sup>, sugiere que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede escapar de los endosomas tempranos (Figura 15). En comparación, se ha demostrado que Tat ingresa en las células a través de la endocitosis y la liberación de los endosomas tardíos, mientras que R<sub>9</sub> escapa de los endosomas antes del reclutamiento de Rab7 (Appelbaum, JS et al. *Chem. Biol.*, 2012, 19, 819-830). La liberación endosomal temprana puede ofrecer ventajas, especialmente para las cargas de péptidos y proteínas, ya que puede minimizar la degradación de la carga por proteasas endosomales y lisosomales tardías y la desnaturalización causada por la acidificación durante la maduración endosomal. De hecho, tanto GFP como PTP1B administrados en el citoplasma por cF $\Phi$ R<sub>4</sub> estaban en sus formas activas plegadas, como lo demuestra la fluorescencia verde y la capacidad de defosforilar proteínas pY intracelulares, respectivamente. Además, debido a su estructura más rígida, cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede ser más estable frente a la degradación proteolítica que los péptidos lineales, y debido a su tamaño más pequeño, cF $\Phi$ R<sub>4</sub> puede ser menos costoso de sintetizar y potencialmente menos probable de que interfiera con la función de carga. Estas propiedades pueden hacer que cF $\Phi$ R<sub>4</sub> sea un transportador útil para la administración citosólica de cargas de pequeñas moléculas a proteínas. El suministro directo de proteínas puede proporcionar una herramienta de investigación útil, por ejemplo, para estudiar la función celular de una proteína, ya que puede ofrecer un mejor control temporal sobre la transfección de ADN y la subsiguiente expresión de genes y puede permitir el suministro de proteínas modificadas químicamente y proteínas cuya sobreexpresión puede causar toxicidad. La capacidad de cF $\Phi$ R<sub>4</sub> para escapar de los endosomas tempranos y su estructura simple también puede proporcionar un excelente sistema para dilucidar el mecanismo de escape endosomal y los factores que influyen en la eficacia de escape.

## Ejemplo 2

La ciclación de los ligandos peptídicos puede ser eficaz para mejorar su estabilidad frente a la degradación proteolítica y en algunos casos su permeabilidad celular. Sin embargo, esta estrategia no es compatible con proteínas que reconocen ligandos peptídicos en las conformaciones extendidas (por ejemplo, cadena  $\beta$  y hélice  $\alpha$ ). En este trabajo, se desarrolló una estrategia general para el suministro intracelular de ligandos peptídicos lineales, fusionándolos con un motivo de secuencia anfipática (por ejemplo, RRRR $\Phi$ F, donde  $\Phi$  es L-naftilalanina) y ciclando el conjugado resultante a través de un enlace disulfuro. Los péptidos ciclados pueden tener una mayor estabilidad proteolítica y permeabilidad de la membrana; al ingresar en el citoplasma/núcleo de una célula, el enlace disulfuro puede ser escindido por el ambiente intracelular reductor para liberar el péptido lineal, biológicamente activo. Esta estrategia se aplicó para generar péptidos permeables a las células como sustratos de caspasa e inhibidores contra el dominio CAL PDZ para el tratamiento potencial de la fibrosis quística.

La aplicabilidad de los péptidos lineales como fármacos a menudo está limitada por su susceptibilidad a la escisión proteolítica y la pobre permeabilidad de la membrana. La ciclación de péptidos puede ser efectiva para mejorar su estabilidad proteolítica (Nguyen, LT et al. *PLoS One*, 2010, 5, e12684). Además, recientemente se informó que la ciclación de ciertos péptidos anfipáticos (por ejemplo, F $\Phi$ RRRR, donde  $\Phi$  es L-2-naftilalanina) puede hacer que las células sean permeables a través de un mecanismo de transporte activo (Qian, Z et al. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 423). Los péptidos cíclicos biológicamente activos pueden administrarse en el citoplasma y el núcleo de las células de mamíferos incorporando en ellos estos motivos de secuencia corta (Qian, Z et al. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 423). Sin embargo, en muchas circunstancias, la unión a una diana molecular (por ejemplo, PDZ (Doyle, DA et al. *Cell* 1996, 85, 1067; Morais Cabral, JH et al., *Nature* 1996, 382, 649) y dominios BIR (Wu, G et al., *Nature* 2000, 408, 1008) pueden requerir que el ligando peptídico exista en su conformación extendida (por ejemplo, hélice  $\alpha$  y cadena  $\beta$ ) y la ciclación puede interferir con la unión al objetivo. En este documento, se examina una estrategia potencialmente general para administrar ligandos peptídicos lineales en células de mamíferos a través de la ciclación mediada por enlace disulfuro reversible. Cuando están presentes en el ambiente extracelular oxidante, los péptidos pueden existir como macrociclos, que pueden tener una estabilidad mejorada frente a la proteólisis y la permeabilidad celular. Al entrar en la célula (es decir, citoplasma y/o núcleo), los tioles intracelulares pueden reducir el enlace disulfuro para producir los péptidos lineales y biológicamente activos (Figura 16) (Cascales, L et al. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 36932; Jha, D et al., *Bioconj. Chem.* 2011, 22, 319).

Materiales. Los reactivos para la síntesis de péptidos se adquirieron de Advanced ChemTech (Louisville, KY), Nova-

Biochem (La Jolla, CA) o Anaspec (San José, CA). La resina de Rink LS (malla 100-200, 0,2 mmol/g) se adquirió de Advanced ChemTech. Dextrane<sup>Rho</sup>, tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los medios de cultivo celular, suero bovino fetal, penicilina-estreptomina, tripsina-EDTA al 0,25% y DPBS se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). El colorante de tinción nuclear DRAQ5<sup>TM</sup> se adquirió de Thermo Scientific (Rockford, IL). Caspasa-3, proteína recombinante humana, se compró de EMD Chemicals (San Diego, CA).

Síntesis de péptidos. La mayoría de los péptidos se sintetizaron en resina de Rink LS (0,2 mmol/g) usando química estándar de Fmoc. La reacción de acoplamiento típica contenía 5 equivalentes de Fmoc-aminoácido, 5 equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y 10 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) y se dejó que procediera con la mezcla durante 75 min. Los péptidos se desprotegeron y liberaron de la resina por tratamiento con 92,5:2,5:2,5:2,5 (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA)/agua/fenol/triisopropilsilano (TIPS) durante 2 h. Los péptidos se trituraron con éter etílico frío (3x) y se purificaron por HPLC de fase inversa equipada con una columna C<sub>18</sub>. El marcado de péptidos con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se realizó disolviendo los péptidos purificados (~1 mg cada uno) en 300  $\mu$ L de 1:1:1 DMSO/DMF/bicarbonato de sodio 150 mM (pH 8,5) y mezclando con 10  $\mu$ L de FITC en DMSO (100 mg/ml). Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se sometió a HPLC de fase inversa en una columna C<sub>18</sub> para aislar el péptido marcado con FITC.

Para generar péptidos cíclicos mediados por enlaces disulfuro, el ácido 3,3'-ditiodipropiónico (10 equiv.) se acopló en el extremo N-terminal utilizando 10 equiv. de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 0,1 equiv. de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) en DCM anhidro durante 2 h después de la eliminación del grupo de protección Fmoc N-terminal mediante tratamiento con 20% (v/v) de piperidina en DMF. La resina se incubó luego en 20% de  $\beta$ -mercaptoetanol en DMF durante 2 h dos veces para exponer el tiol libre. Los péptidos lineales crudos triturados se incubaron en DMSO al 5% en regulador PBS de pH 7,4 durante la noche (Tam, JP et al. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6657), seguido de trituración y purificación por HPLC como se describe anteriormente (Tam, JP et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6657).

Para producir péptidos cíclicos mediados por tioéter, se acopló ácido 4-bromobutírico (10 equiv.) en el N-terminal utilizando 10 equivalentes de DIC y 0,1 equiv. de DMAP en DCM anhidro durante 2 h después de la eliminación del grupo de protección Fmoc N-terminal por tratamiento con 20% (v/v) de piperidina en DMF. El grupo de protección 4-metoxitritilo (Mmt) en la cadena lateral de L-cisteína se eliminó selectivamente usando ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en DCM. La formación de tioéter se realizó incubando la resina en DIPEA al 1% en DMF bajo protección con nitrógeno durante la noche. El péptido ciclado se trituró y se purificó luego como se describe anteriormente (Roberts, KD et al. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8357).

Fmoc-Asp (resina de Wang)-AMC (AMC=7-amino-4-metilcoumarina) (NovaBiochem) se usó como soporte sólido para sintetizar sustratos de caspasa fluorogénica. Se empleó la química estándar de Fmoc para sintetizar el péptido en fase sólida. Estos péptidos se liberaron de la resina mediante el tratamiento con 95:2,5:2,5 (v/v) de TFA/fenol/agua durante 2 h (Maly, DJ et al. J. Org. Chem. 2002, 67, 910).

Cultivo celular. Las células HeLa se mantuvieron en un medio que consistía en DMEM, suero bovino fetal al 10% (FBS) y penicilina/estreptomina al 1%. Las células Jurkat se mantuvieron en un medio que consistía en RPMI-1640, FBS al 10% y penicilina/estreptomina al 1%. La línea celular de CFBE epitelial bronquial, homocigótica para la mutación  $\Delta$ F508-CFTR, se mantuvo en DMEM que contenía L-glutamina suplementada con FBS al 10% y penicilina/estreptomina al 1%. Las placas de cultivo de tejidos se recubrieron con fibronectina humana (1 mg/ml), colágeno I bovino (3 mg/ml) y albúmina de suero bovino (1 mg/ml). Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Microscopia confocal. Para detectar la internalización del péptido, se sembró 1 ml de suspensión de células HeLa (5 x 10<sup>4</sup> células) en una placa de micropocillos con fondo de vidrio de 35 mm (MatTek) y se cultivó durante la noche. Las células se lavaron moderadamente con DPBS dos veces y se trataron con péptidos marcados con FITC (5  $\mu$ M) y dextran<sup>Rho</sup> (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) en DMEM libre de rojo fenol que contenía suero al 1% a 37°C durante 1 h en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la eliminación del medio, las células se lavaron moderadamente con DPBS dos veces y se incubaron con DRAQ5 5  $\mu$ M en DPBS durante 10 min. Las células se lavaron de nuevo con DPBS dos veces y se tomaron imágenes en un microscopio confocal de imágenes en vivo de células en vivo Visitech Infinity 3 Hawk 2D-array. Las imágenes se capturaron con los mismos parámetros y se ajustaron con la misma configuración utilizando MetaMorph (Molecular Devices).

Citometría de flujo. Las células HeLa se cultivaron en placas de seis pocillos (5 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) durante 24 h. El día del experimento, las células se incubaron con 5  $\mu$ M de péptido marcado con FITC en DMEM transparente con FBS al 1% a 37°C durante 2 h. Las células se lavaron con DPBS, se separaron de la placa con tripsina al 0,25%, se diluyeron en DMEM transparente que contenía FBS al 10%, se sedimentaron a 250 g durante 5 min, se lavaron una vez con DPBS y se resuspendieron en DPBS que contenía albúmina de suero bovino al 1%, y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Aria. Los datos fueron analizados con el software Flowjo (Tree Star).

Para cuantificar las eficacias de administración de péptidos conjugados con PCP, las células HeLa se cultivaron en

placas de seis pocillos ( $5 \times 10^5$  células por pocillo) durante 24 h. El día del experimento, las células se incubaron con  $5 \mu\text{M}$  de péptidos que contenían pCAP en DMEM transparente con FBS al 1% a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h. Las células se lavaron con DPBS que contenía pervanadato sódico 1 mM, se separaron de la placa con tripsina al 0,25%, se suspendieron en DPBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Aria con excitación a 355 nm.

Ensayo de estabilidad de proteólisis peptídica. Las pruebas de estabilidad se llevaron a cabo modificando ligeramente un procedimiento informado previamente (Frackenpohl, J et al. *Chembiochem* 2001, 2, 445). Se incubaron  $24 \mu\text{L}$  de  $1,5 \text{ mM}$  de solución peptídica a  $37^\circ\text{C}$  con  $30 \mu\text{L}$   $50 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -quimotripsina y  $30 \mu\text{L}$   $50 \mu\text{M}$  de tripsina en  $200 \mu\text{L}$  de regulador de trabajo (Tris-HCl  $50 \text{ mM}$ , pH 8,0, NaCl ( $100 \text{ mM}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $10 \text{ mM}$ )). En varios puntos temporales (0-12 h), se extrajeron alícuotas de  $40 \mu\text{L}$  y se mezclaron con  $40 \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 15% y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche. La mezcla final se centrifugó a  $15.000 \text{ rpm}$  durante 10 min en una microcentrífuga y el sobrenadante se analizó mediante HPLC de fase inversa equipada con una columna  $\text{C}_{18}$  (Waters). La cantidad de péptido restante (%) se determinó integrando el área debajo del pico de péptido (monitoreado a 214 nm) y se comparó con la de la reacción de control (sin proteasas).

Ensayo fluorimétrico in cellulo.  $100 \mu\text{L}$  de suspensión de células Jurkat ( $5 \times 10^5$  células/ml) se sembraron en una placa de 96 pocillos una hora antes del experimento. Se agregaron  $10 \mu\text{L}$  de solución madre de estaurosporina ( $10 \mu\text{M}$ ) a la mitad de los pocillos para inducir la apoptosis, mientras que se agregaron  $10 \mu\text{L}$  de medio a los otros pocillos. Después de 1 h de incubación, se añadieron a las células sustratos fluorogénicos de caspasa-3 hasta una concentración final de  $5 \mu\text{M}$ . La fluorescencia de la coumarina liberada se midió en el lector de placas Spectramax M5 con longitudes de onda de excitación y emisión a 360 y 440 nm en diversos momentos (0-6 h). Los incrementos de la unidad de fluorescencia (FU) entre las células inducidas y no inducidas se representaron en función del tiempo para presentar las actividades de la caspasa-3 medidas utilizando diversos sustratos fluorogénicos en células vivas en tiempo real. Se realizaron tres conjuntos independientes de experimentos, cada uno realizado por triplicado.

Ensayo fluorimétrico in vitro.  $0,5 \mu\text{L}$  ( $100 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) de enzima caspasa-3 se incubaron primero con  $90 \mu\text{L}$  de regulador de reacción (HEPES  $50 \text{ mM}$ , pH 7,4, NaCl  $100 \text{ mM}$ , DTT  $10 \text{ mM}$ ) durante 30 min en una placa de 96 pocillos. Se mezclaron sustratos fluorogénicos ( $10 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ) en las soluciones anteriores para iniciar las reacciones, y la placa se midió en un lector de placas Spectramax M5 (Ex = 360 nm, Em = 440 nm) (Molecular Devices). El aumento de las unidades de fluorescencia (FU) a intervalos de un minuto se correlacionó con la liberación de Amc debido a la actividad de la proteasa.  $\Delta\text{FU}/\text{min}$  se calculó a partir de la porción lineal de la curva de reacción. Los valores informados son promedios de tres ensayos con la desviación estándar indicada.

Anisotropía de fluorescencia. El experimento completo de titulación de anisotropía de fluorescencia (FA) se realizó mediante la incubación de ligandos peptídicos marcados con fluoróforo  $100 \text{ nM}$  con concentraciones variables (0-6  $\mu\text{M}$ ) de CAL-PDZ (Cushing, PR et al. *Biochemistry* 2008, 47, 10084) en regulador FA (HEPES  $20 \text{ mM}$ , pH 7,4, NaCl  $150 \text{ mM}$ , glutatión  $5 \text{ mM}$ , albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los valores de FA se midieron en un espectrofluorímetro Spectramax M5 de Molecular Devices, con longitudes de onda de excitación y emisión a 485 nm y 525 nm, respectivamente. Las constantes de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se determinaron mediante el trazado de los valores de anisotropía de fluorescencia en función de la concentración de CAL-PDZ. Las curvas de titulación se ajustaron a la siguiente ecuación, que supone una estequiometría de unión 1:1

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

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

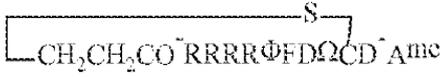
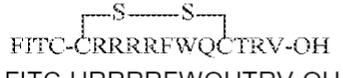
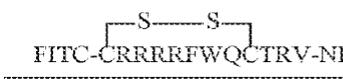
Tinción inmunofluorescente. Brevemente, las células CFBE epiteliales bronquiales, homocigóticas para la mutación DF508-CFTR, se trataron con Corr-4a  $10 \text{ mM}$  en presencia y ausencia de  $50 \mu\text{M}$  de péptido 8 no marcado. Después de los tratamientos, las células se fijaron en metanol frío durante 20 minutos. Luego, los portaobjetos se incubaron en BSA/PBS al 1% durante 10 minutos, seguido de una incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora con anticuerpo CFTR monoclonal anti-humano de ratón (R&D Systems). Posteriormente, los portaobjetos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 minutos con el anticuerpo secundario IgG2a anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488. Las células se visualizaron en un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP2 AOBS. Todas las mediciones se realizaron de forma doble ciego por dos investigadores independientes.

Ensayo de concentración de cloruro intracelular SPQ. Se utilizó un ensayo de SPQ (6-metoxi-N-(3-sulfopropil)quinolinio) para estimar la actividad de transporte de la actividad de  $\Delta F508$ -CFTR en células CFBE, ya que la fluorescencia de SPQ se correlaciona negativamente con el aumento de la concentración de cloruro intracelular (Ilsley), NP y Verkman, AS. Biochemistry 1987, 26, 1215). Las células CFBE se cultivaron en una placa de 96 pocillos, que se recubrió previamente con 1 mg/ml de fibronectina humana, 3 mg/ml de colágeno I bovino y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, utilizando medios DMEM complementados con L-glutamina y 10% de FBS. Las células se trataron por primera vez en presencia o ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de CFTR corrector VX809 (Van Goor, F et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 108, 18843) durante 24 h y 50°C de Inhibidores de dominio CAL-PDZ durante 1 h. Las células luego se cargaron con SPQ utilizando un choque hipotónico a 37°C durante 15 minutos con SPQ 10 mM que contenía una solución Opti-MEM/agua 1:1 (v/v). Las células se lavaron y luego se incubaron dos veces durante 10 minutos con el regulador Nal de desactivación de la fluorescencia (130 mM de Nal, 5 mM de  $\text{KNO}_3$ , 2,5 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2,5 mM de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , 10 mM de D-glucosa, 10 mM de ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazin-N'-(2-etansulfónico) (HEPES, pH 7,4)). Posteriormente, las células se cambiaron a un regulador de  $\text{NaNO}_3$  isotónico de extinción (idéntico al regulador Nal, excepto que se reemplazó Nal 130 mM con  $\text{NaNO}_3$  130 mM) con un cóctel de activación CFTR (forskolina 10  $\mu\text{M}$  y genisteína 50  $\mu\text{M}$ ). La fluorescencia no específica para el flujo de yoduro mediado por CFTR se midió incubando las células con el cóctel de activación y el inhibidor específico de CFTR GlyH101 (10  $\mu\text{M}$ ). Los efectos de los inhibidores de CAL-PDZ fueron evaluados por la tasa de aumento de fluorescencia por encima del nivel basal. La fluorescencia de la SPQ inactivada se midió utilizando el lector de placas VICTOR X3 (Perkin Elmer) con longitud de onda de excitación a 350 nm y filtro de emisión DAPI. Los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

Se ha informado un péptido cíclico anfipático homodéctico, ciclo(F $\Phi$ RRRRQ) (cF $\Phi$ R $_4$ ), como un péptido altamente activo que penetra en las células (CPP) que puede ingresar en el citoplasma de las células de los mamíferos a través de la endocitosis y el escape endosomal (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423). Para probar la validez de la estrategia de ciclación reversible, se sintetizó un péptido N-3-mercaptopropionil-F $\Phi$ RRRRRCK-NH $_2$  y luego se ciclizó formando un enlace disulfuro intramolecular (Figura 17; Tabla 10, péptido 1). También se sintetizó un péptido lineal de la misma secuencia (Tabla 10, péptido 2) reemplazando el grupo 3-mercaptopropionilo N-terminal con un grupo butirilo y la cisteína C-terminal con ácido 2-aminobifílico (Abu o U). Ambos péptidos se marcaron en un residuo de lisina C-terminal con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se evaluó su captación celular mediante microscopia confocal de células vivas y citometría de flujo. Las células HeLa tratadas con el péptido cíclico (5  $\mu\text{M}$ ) mostraron una fluorescencia verde fuerte y difusa en todo el volumen celular, mientras que el marcador de endocitosis, dextrano marcado con rodamina (dextran<sup>Rho</sup>), exhibió solo una fluorescencia punteada en la región citoplásmica (Figura 18A). La distribución casi uniforme de la fluorescencia de FITC en las regiones tanto citoplásmica como nuclear sugiere que el péptido cíclico fue internalizado de manera eficiente por las células HeLa y, como el péptido cíclico original, cF $\Phi$ R $_4$ , pudo escapar eficientemente del endosoma. Por el contrario, las células tratadas con el péptido de control lineal mostraron una fluorescencia intracelular mucho más débil en la misma condición de imagen. La cuantificación de la fluorescencia intracelular total por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) dio una intensidad de fluorescencia media (MFI) de 27, 100, 5530 y 1200 unidades arbitrarias (AU) para las células tratadas con el péptido ciclizado con disulfuro, el péptido lineal y FITC solo, respectivamente (Figura 18B). También se usó un pentapéptido con carga negativa, Asp-Glu-pCAP-Leu-Ile (PCP, donde pCAP es ácido fosfocoumarilaminopropiónico), y se unió a los péptidos 1 y 2 a través de un enlazador de polietilenglicol (Figura 17). pCAP no es fluorescente, pero, cuando se administra en el citoplasma de los mamíferos, sufre una rápida desfosforilación para generar un producto fluorescente, ácido coumarilaminopropiónico (CAP) (Stanford, SM et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 13972). Por lo tanto, el ensayo de pCAP proporciona una evaluación cuantitativa de las concentraciones citoplásmicas/nucleares de diferentes CPP (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423). El análisis FACS de células HeLa tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de péptido 1-PCP y péptido 2-PCP dio valores de MFI de 3020 y 700, respectivamente (Figura 19). Por lo tanto, los resultados anteriores indican que la ciclación de F $\Phi$ RRRRR a través de un enlace disulfuro puede tener un efecto similar a la ciclación de N a C y puede aumentar su eficacia de captación celular en aproximadamente 5 veces (Qian, Z et al. ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423). Además, la ciclación por formación de enlaces disulfuro puede mejorar la resistencia proteolítica del péptido. La incubación del péptido 1 con un cóctel de proteasas durante 12 h dio como resultado una degradación <50%, mientras que el péptido lineal 2 se degradó con una vida media de ~20 min en la misma condición (Figura 20).

Tabla 10. Secuencias de péptidos

| SEQ ID NO | ID de péptido | Secuencia de péptido <sup>a</sup>                         |
|-----------|---------------|---|
| 123       | 1             |   |
| 124       | 2             | CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CO-F $\Phi$ RRRRRUK(FITC)-NH $_2$ |
| 125       | 3             | Ac-DMUD-Amc   |

|     |    |  |
|-----|----|--|
| 126 | 4  |  |
| 127 | 5  |  |
| 128 | 6  |  |
| 129 | 7  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-RRRRΦFDΩUD-A <sup>mc</sup>      |
| 130 |    | Ac-RRRRRRRRRDΩUD-A <sup>mc</sup>   |
| 131 | 8  |  |
| 131 | 9  |  |
| 132 | 11 |  |

<sup>a</sup>A<sup>mc</sup>, 7-amino-4-metilcourmarina; FITC, isotiocianato de fluoresceína; Φ, L-2-naftilalanina; Ω, norleucina; U, ácido 2-aminobutírico.

Para ilustrar la utilidad de la estrategia de ciclación reversible, se usó para entregar sustratos de caspasa específicos a las células y monitorear las actividades de caspasa intracelular en tiempo real (Riedl, SJ y Shi, Y. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004, 5, 897). Aunque los derivados de peptidilcourmarina se han usado ampliamente para detectar las actividades de caspasa in vitro (Maly, DJ et al. Chembiochem 2002, 3, 16), en general no son adecuados para aplicaciones in vivo debido a la impermeabilidad a la membrana celular de los mamíferos. Para generar un sustrato de caspasa permeable a las células, un sustrato de caspasa 3/7, Ac-Asp-Nle-Abu-Asp-Amc (Thornberry, NA et al., J. Biol. Chem. 1997, 272, 17907) (Tabla 10, péptido 3, donde Amc es 7-amino-4-metilcourmarina y Nle es norleucina), se fusionó con el motivo CPP RRRRΦF. El péptido de fusión se cicla posteriormente mediante la adición de un grupo 3-mercaptopropionilo a su término N, el reemplazo del Abu C-terminal con una cisteína y la formación de un enlace disulfuro intramolecular, para dar el péptido cíclico 4 (Tabla 10). Para comparación, se sintetizó un péptido isostérico pero irreversiblemente ciclado (Tabla 10, péptido 5) formando un enlace tioéter entre una unidad estructural bromobutirilo N-terminal y la cisteína C-terminal (Figura 17). También se preparó un péptido de control lineal de la misma secuencia como se describe anteriormente (Tabla 10, péptido 6). Finalmente, el sustrato de caspasa 3/7 se conjugó con nonaarginina (R<sub>9</sub>) para generar un péptido de control positivo (Tabla 10, péptido 7). El análisis cinético in vitro reveló que la fusión del sustrato de caspasa 3/7 con RRRRΦF y R<sub>9</sub> disminuyó su actividad en un 53% y 72%, respectivamente, en relación con el péptido 3, mientras que la ciclación por formación de tioéter hizo que el péptido fuera inactivo hacia la caspasa 3 recombinante (Tabla 11). La actividad del péptido 4 hacia la caspasa 3 no pudo determinarse de manera confiable porque el ensayo de caspasa requería un ambiente reductor, que rompería el enlace disulfuro. Dada la similitud estructural entre los péptidos 4 y 5, se puede suponer que el péptido 4 en la forma cíclica también es inactivo hacia las caspasas, pero tiene una actividad similar al péptido 6 después de la escisión reductiva del enlace disulfuro.

Tabla 11. Actividad in vitro de diversos sustratos fluorogénicos contra la enzima caspasa-3 recombinante

| ID de péptido | ΔFU/min                      |
|---------------|------------------------------|
| 3             | 159 ± 19                     |
| 5             | Ninguna actividad detectable |
| 6             | 74,7 ± 5,5                   |
| 7             | 45,3 ± 6,5                   |

Las células Jurkat se trataron previamente con el inhibidor de quinasa estaurosporina para inducir actividades de caspasa y, por lo tanto, apoptosis (Belmokhtar, CA et al. Biochem. J. 1996, 315, 21). Estas células se incubaron luego con los péptidos 3-7 y la cantidad de Amc liberada se controló en varios puntos temporales (0-10 h). El sustrato de caspasa impermeable (péptido 3) produjo un pequeño aumento de fluorescencia durante el período de 10 h (Figura 21). El péptido 4 produjo el aumento de fluorescencia más rápido, alcanzando 459 unidades de fluorescencia (FU), seguido de los péptidos 7 y 6. El péptido 5, que es inactivo hacia la caspasa 3, también produjo AMC en función del tiempo, aunque a una velocidad mucho más lenta (99 FU). Esta lenta velocidad de liberación de AMC puede atribuirse a la hidrólisis por otras proteasas intracelulares y peptidasas. De acuerdo con esta interpretación, el tratamiento previo de las células Jurkat con un inhibidor de la pancaspasa Z-VAD (OMe)-FMK (Slee, EA et al. Biochem J. 1996, 315, 21) seguido de una incubación con péptido 4 liberó AMC a una velocidad que era similar a la del péptido 5 solo. Una explicación de las observaciones anteriores es que ambos péptidos 4 y 5

pueden entrar en el interior de la célula de manera eficiente, pero solo el péptido 4 se puede convertir en el sustrato de caspasa lineal dentro de las células.

Muchas interacciones proteína-proteína (IBP) están mediadas por dominios proteicos que se unen a péptidos cortos en sus conformaciones extendidas (por ejemplo, hélice  $\alpha$  y cadena  $\beta$ ) (Pawson, T y Nash, P. *Science* 2003, 300, 445). Por ejemplo, el dominio PDZ es un dominio estructural común de 80-90 aminoácidos que se encuentra en las proteínas de señalización de las bacterias para el hombre (Doyle, DA et al. *Cell* 1996, 85, 1067; Morais Cabral, JH et al., *Nature* 1996, 382, 649; Lee, HJ y Zheng, JJ. *Cell Commun. Signal.* 2010, 8, 8). Los dominios PDZ reconocen secuencias específicas en los términos C de sus pares de unión y los ligandos peptídicos unidos están en su conformación de cadena  $\beta$  extendida (Doyle, DA et al. *Cell* 1996, 85,1067; Songyang, Z et al. *Science* 1997, 275, 73). Recientemente se informó que la actividad del regulador de conductancia de la membrana de la fibrosis quística (CFTR), una proteína del canal de iones de cloruro mutada en pacientes con fibrosis quística (CF), está regulada negativamente por el ligando asociado a CFTR (CAL) a través de su dominio PDZ (CAL-PDZ) (Wolde, M et al. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 8099). Se demostró que la inhibición de la interacción CFTR/CAL-PDZ mejora la actividad de  $\Delta$ Phe508-CFTR, la forma más común de mutación de CFTR (Cheng, SH et al. *Cell* 1990, 63, 827; Kerem, BS et al. *Science* 1989, 245,1073), al reducir su degradación mediada por proteasoma (Cushing, PR et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9907). La selección previa de bibliotecas y el diseño racional han identificado varios inhibidores de peptidilo del dominio CAL-PDZ de potencias moderadas (valores de  $K_D$  en el intervalo nM alto a  $\mu$ M bajo) (Cushing, PR et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9907; Roberts, KE et al. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 8, e1002477; Kundu, Retal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 7217-7220). Sin embargo, ninguno de los inhibidores de péptidos era permeable a las células, lo que limita su potencial terapéutico.

Comenzando con un ligando hexapéptido para el dominio CAL-PDZ, WQVTRV (Roberts, KE et al. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 8, e1002477), se diseñó un péptido cíclico mediado por disulfuro agregando la secuencia CRRRRF a su término N y reemplazando la Val en la posición -3 con una cisteína (Tabla 10, péptido 8). Por lo tanto, en el péptido 8, el residuo de triptófano en la posición -5 se diseñó para servir a la función dual de la unión de PDZ y la translocación de membrana. Para facilitar las mediciones de afinidad y la cuantificación de su captación celular, se agregó un grupo FITC al término N del péptido 8. El análisis de FA mostró que, en ausencia de un agente reductor, el péptido 8 no mostró una unión detectable al dominio CAL-PDZ (Figura 22A). En presencia de tris(carboxiletil)fosfina 2 mM, que puede reducir el enlace disulfuro, el péptido 8 se une al dominio CAL-PDZ con un valor  $K_D$  de 489 nM. El péptido 8 era fácilmente permeable a las células; la incubación de células HeLa con 5  $\mu$ M de péptido 8 durante 2 h dio como resultado una fluorescencia intensa y difusa en toda la célula (Figura 22B).

Como se esperaba, el péptido 8 es fácilmente permeable a las células (Figura 25C). Células CFBE epiteliales bronquiales, que son homocigotas para la mutación  $\Delta$ F508-CFTR, se trataron con 10  $\mu$ M de Corr-4a en presencia y ausencia de 50  $\mu$ M de péptido 8 no marcado. Se espera que el péptido 8 inhiba la función del dominio CAL-PDZ para aumentar la cantidad de proteína  $\Delta$ F508-CFTR transferida a la membrana plasmática, mientras que Corr-4a es una pequeña molécula que ayuda a plegar la proteína  $\Delta$ F508-CFTR administrada a la membrana plasmática. La inmunotinción de células no tratadas (Figura 25D, panel I) mostró que la mayor parte del  $\Delta$ F508-CFTR expresado estaba en el retículo endoplásmico que rodea el núcleo celular. Por el contrario, el tratamiento de las células con Corr-4a y el péptido 8 dio como resultado cantidades mucho mayores de la proteína en la superficie celular (Figura 25D, panel II). La cuantificación de la población celular reveló que un porcentaje pequeño pero significativo de células tienen una distribución de tipo salvaje de  $\Delta$ F508-CFTR en la superficie celular (Figura 25D). Finalmente, se utilizó un ensayo SPQ para cuantificar la actividad del canal iónico de las células  $\Delta$ F508-CFTR CFBE no tratadas o tratadas con el corrector de plegado CFTR VX809 y el péptido 8. De nuevo, VX809 y el péptido 8 actuaron sinérgicamente para mejorar la función de la actividad del canal de  $\Delta$ F508-CFTR (Figura 25E).

### Ejemplo 3

Los péptidos cíclicos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos y herramientas de investigación, pero generalmente son impermeables a la membrana celular. La fusión de los péptidos cíclicos con un péptido que penetra en las células cíclicas puede producir péptidos bicíclicos que pueden ser permeables a las células y puede retener la capacidad de reconocer dianas intracelulares específicas. La aplicación de esta estrategia a la proteína tirosina fosfatasa 1B y peptidil prolil cis-trans isomerasa Pin1 produjo inhibidores potentes, selectivos, proteolíticamente estables y biológicamente activos contra las enzimas.

Los péptidos cíclicos (y depsipéptidos) exhiben una amplia gama de actividades biológicas (Pomilio, AB et al. *Curr. Org. Chem.* 2006, 10, 2075-2121). Recientemente se han desarrollado varias metodologías innovadoras para sintetizar péptidos cíclicos, ya sea individualmente (Meutermans, WDF et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 9790-9796; Schafmeister, CE et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 5891-5892; Sun, Y et al. *Org. Lett.* 2001,3, 1681-1684; Kohli, RM et al. *Nature* 2002, 418, 658-661; Qin, C et al. *J. Comb. Chem.* 2004, 6, 398-406; Turner, RA et al. *Org. Lett.* 2007, 9, 5011-5014; Hill, R et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 2889-2891; Lee, J et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 2122-2124; Frost, JR et al. *ChemBioChem* 2013, 14, 147-160) o combinatoriamente (Eichler, J et al. *Mol. Divers.* 1996, 1, 233-240; Giebel, LB et al. *Biochemistry* 1995, 34, 15430-15435; Scott, CP et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 13638-13643; Millward, SW et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127,14142-14143; Sako, Y et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 7232-7234; Li, S et al., *Chem. Commun.* 2005, 581-583; Joo, SH et al. *J. Am. Chem.*

Soc. 2006, 128, 13000-13009; Heinis, C et al. *Alabama. Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 502-507; Tse, BN et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 15611-15626), y analizarlos para detectar actividad biológica. Una aplicación particularmente interesante de los péptidos cíclicos es la inhibición de las interacciones proteína-proteína (IBP) (Leduc, AM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 11273-11278; Millward, SW et al. *ACS Chem. Biol.* 2007, 2, 625-634; Tavassoli, A et al. *ACS Chem. Biol.* 2008, 3, 757-764; Wu, X et al. *Med. Chem. Commun.* 2013, 4, 378-382; Birts, CN et al., *Chem. Sci.* 2013, 4, 3046-3057; Kawakami, T et al., *ACS Chem. Biol.* 2013, 8, 1205-1214; Lian, W et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 11990-11995), que siguen siendo objetivos desafiantes para las moléculas pequeñas convencionales. Sin embargo, una limitación importante de los péptidos cíclicos es que generalmente son impermeables a la membrana celular, lo que impide cualquier aplicación contra objetivos intracelulares, que incluyen la mayoría de los IBP terapéuticamente relevantes. Aunque la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (Rezai, T et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 14073-14080) o la metilación de la estructura peptídica (Chatterjee, J et al. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1331-1342; White, TR et al. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 810-817) puede mejorar la permeabilidad de la membrana de ciertos péptidos cíclicos, son claramente necesarias estrategias alternativas para aumentar la permeabilidad celular de los péptidos cíclicos.

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) es un miembro prototípico de la superfamilia de PTP y desempeña numerosas funciones durante la señalización de células eucariotas. Debido a su papel en la regulación negativa de la señalización del receptor de insulina y leptina, PTP1B es un objetivo válido para el tratamiento de la diabetes de tipo II y la obesidad (Elchelby, M et al. *Science* 1999, 283, 1544-1548; Zabolotny, JM et al. *Dev. Cell* 2002, 2, 489-495). Se ha informado un gran número de inhibidores de PTP1B (He, R et al. en *New Therapeutic Strategies for Diabetes Type 2: Small Molecule Approaches*. Ed. RM Jones, RSC Publishing 2012, pp142), sin embargo, ninguno de ellos ha tenido éxito en la clínica. El diseño de inhibidores de la PTP es un desafío porque la mayoría de los isómeros de fosfotirosina (pY), como difluorofosfonometilfenilalanina (F<sub>2</sub>Pmp) (Burke Jr., TR et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 204, 129-134), son impermeables a la membrana celular. Además, como todos los PTP comparten un sitio activo similar, lograr la selectividad para un solo PTP ha sido difícil. En este documento, se presenta un enfoque potencialmente general para diseñar inhibidores de peptidilo cíclicos permeables a células contra proteínas intracelulares tales como PTP1B.

Materiales. Los aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron de Advanced ChemTech (Louisville, KY), Peptides International (Louisville, KY) o Aapptec (Louisville, KY). Fmoc-F<sub>2</sub>Pmp-OH se compró a EMD Millipore (Darmstadt, Alemania). La resina aminometil-ChemMatrix (0,66 mmol/g) era de SJPC (Quebec, Canadá). La resina de Rink LS (malla 100-200, 0,2 mmol/g) y N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) se adquirieron de Advanced ChemTech. Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) se adquirieron de Aapptec. El isotiocianato de fenilo en ampollas selladas de 1 mL, el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el dextrano marcado con rodamina B (dextran<sup>Rho</sup>) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Medio de cultivo celular, suero bovino fetal (FBS), penicilina-estreptomina, tripsina-EDTA al 0,25%, solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (cloruro de potasio 2,67 mM, fosfato de potasio monobásico 1,47 mM, cloruro de sodio 137 mM, fosfato sódico dibásico 8,06 mM) y el anticuerpo antifosfo-IR/IGFIR se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). El colorante de tinción nuclear DRAQ5™ y el anticuerpo anti-β-actina se adquirieron de Thermo Scientific (Rockford, IL). El anticuerpo 4G10 se compró a Millipore (Temecula, CA). Todos los disolventes y otros reactivos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario.

Cultivo celular. Las células A549, HEK293 y HepG2 se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con FBS al 10% en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Expresión, purificación y marcado de proteínas. El gen que codifica para el dominio catalítico de PTP1B (aminoácidos 1-321) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando PTP1B ADNc como plantilla y los oligonucleótidos 5'-ggaattccatgagatggaaaaggagttcgagcag-3' y 5'-gggatccgctgacattgtgtgctccaggattcgttgg-3' como cebadores. El fragmento de ADN resultante se digirió con las endonucleasas Nde I y Sal I y se insertó en el vector procariótico pET-22b(+)-ybbR (Yin, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 15815-15820). Este procedimiento de clonación dio como resultado la adición de una marca ybbR (VLDSLEFIASKL) al término N de PTP1B. La expresión y la purificación de PTP1B marcados con ybbR se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Ren, L et al. *Biochemistry* 2011, 50, 2339-2356). El marcado con rojo tejano de PTP1B se llevó a cabo tratando la proteína PTP1B marcada con ybbR (80 μM) en HEPES 50 mM, pH 7,4, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> con fosfopanteteiniltransferasa Sfp (1 μM) y Texas Red-CoA (100 μM) durante 30 min a temperatura ambiente (Yin, J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 15815-15820). La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de desalinización rápida G-25 equilibrada en HEPES 30 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM para eliminar cualquier molécula de colorante libre. Pin1 mutante de S16A/Y23A humano de longitud completa se expresó y se purificó a partir de *E. coli* como se describió anteriormente (Liu, T et al. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2494-2501).

Síntesis de la biblioteca. La biblioteca de péptidos cíclicos se sintetizó en 1,35 g de resina aminometil-ChemMatrix (0,57 mmol/g). La síntesis de la biblioteca se realizó a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. La secuencia de enlace (BBM) se sintetizó utilizando la química estándar de Fmoc. La reacción de acoplamiento típica

5 contenía 5 equivalentes de Fmoc-aminoácido, 5 equivalentes de HBTU y 10 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) y se dejó que continuara mezclando durante 2 h. El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento dos veces con piperidina al 20% (v/v) en DMF (5 + 15 min), y las perlas se lavaron exhaustivamente con DMF (6x). Para segregar espacialmente las perlas en capas externas e internas, la resina (después de la eliminación del grupo Fmoc N-terminal) se lavó con DMF y agua, y se empapó en agua durante la noche. La resina se drenó rápidamente y se suspendió en una solución de Fmoc-Glu( $\delta$ -NHS)-OA11 (0,10 equiv.), Boc-Met-OSu (0,4 equiv.) y N-metilmorfolina (2 equiv.) en 20 ml de 1:1 (v/v) de DCM/dietil éter (Joo, SH et al. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 13000-13009). La mezcla se incubó en un agitador de carrusel durante 30 min. Las perlas se lavaron con 1:1 de DCM/dietil éter (3x) y DMF (8x). A continuación, el grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina. Luego, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4x), Fmoc-Nal-OH y Fmoc-Phe-OH se acoplaron secuencialmente mediante química estándar de Fmoc a la mitad de la resina. La otra mitad se acopló con los mismos aminoácidos en la secuencia inversa. La resina se combinó y la secuencia aleatoria se sintetizó mediante el método de división y agrupación utilizando 5 equivalentes de aminoácidos Fmoc, 5 equivalentes de HATU y 10 equivalentes de DIPEA como agente de acoplamiento. La reacción de acoplamiento se repitió una vez para asegurar el acoplamiento completo en cada etapa. Para posiciones aleatorias, se seleccionó un conjunto de 24 aminoácidos en función de su diversidad estructural, estabilidad metabólica y disponibilidad comercial, incluidos 10  $\alpha$ -L-aminoácidos proteínogénicos (Ala, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Ser, Trp, Pro y Tyr), 5  $\alpha$ -L-aminoácidos no proteínogénicos (L-4-fluorofenilalanina (Fpa), L-homoprolina (Pip), L-norleucina (Nle), L-fenilglicina (Phg) y L-4-(fosfonodifluorometil)fenilalanina (F<sub>2</sub>Pmp) y 9  $\alpha$ -D-aminoácidos (D-2-naftilalanina (D-Nal), D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Leu, D-Phe, D-Pro, D-Thr, y D-Val). Para diferenciar los aminoácidos isobáricos durante el análisis de PED-MS, se añadió 4% (mol/mol) de CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D a las reacciones de acoplamiento de D-Ala, D-Leu y D-Pro, mientras que se añadió 4% de CH<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>D a las reacciones de Nle. Fmoc-F<sub>2</sub>Pmp-OH (0,06 equiv.) y Fmoc-Tyr-OH (0,54 equiv.) se colocaron en el medio de las posiciones aleatorias usando HATU/DIPEA. Después de que se sintetizó la secuencia completa, el grupo alilo en el residuo Glu C-terminal se eliminó mediante tratamiento con una solución de DCM que contenía tetrakis(trifenilfosfina)paladio [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 0,25 equiv.] y fenilsilano (5 equivalentes) para 15 min (3x). Las perlas se lavaron secuencialmente con DIPEA al 0,5% (v/v) en DMF, hidrato de dimetilditiocarbamato de sodio al 0,5% (p/v) en DMF, DMF (3x), DCM (3x) y DMF (3x). El grupo Fmoc en el residuo aleatorio N-terminal se eliminó mediante piperidina como se describió anteriormente. Las perlas se lavaron con DMF (6x), DCM (3x) y HOBt 1 M en DMF (3x). Para la ciclación de péptidos, una solución de Py-BOP/HOBt/DIPEA (5, 5, 10 equiv, respectivamente) en DMF se mezcló con la resina y la mezcla se incubó en un agitador de carrusel durante 3 h. La resina se lavó con DMF (3x) y DCM (3x) y se secó al vacío durante >1 h. La desprotección de la cadena lateral se llevó a cabo con un reactivo modificado K 78,5:7,5:5:5:2,5:1:1 (v/v) de TFA/fenol/ agua/ tioanisol/ etanoditiol/ anisol/ triisopropilsilano) durante 3 h. La resina se lavó con TFA y DCM y se secó al vacío antes de su almacenamiento a -20 °C.

35 Selección de bibliotecas y secuenciación de péptidos. La resina de biblioteca (100 mg, -300,000 perlas) se hinchó en DCM, se lavó abundantemente con DMF, H<sub>2</sub>O bidestilada, y se incubó en 1 ml de regulador de bloqueo (PBS, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05% y gelatina al 0,1%) que contenía 20 nM de PTP1B marcado con rojo tejano a 4°C durante 3 h. Las perlas se examinaron bajo un microscopio Olympus SZX12 equipado con un iluminador de fluorescencia (Olympus America, Center Valley, PA) y las perlas más intensamente fluorescentes se recogieron a mano como coincidencias positivas. Las perlas que contenían péptidos lineales codificantes se secuenciaron individualmente mediante espectrometría de degradación de masas de Edman parcial (PED-MS) (Liu, T et al. J. Med. Chem. 2010, 53, 2494-2501).

45 Síntesis y marcado de péptidos individuales. Los péptidos monocíclicos y bicíclicos se sintetizaron en resina de Rink LS (0,2 mmol/g) usando química estándar de Fmoc. Para los péptidos monocíclicos, después de que se acopló el último residuo (N-terminal), el grupo alilo en el residuo Glu del término C se eliminó mediante tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y fenilsilano (0,1 y 10 equiv, respectivamente) en DCM anhidro (3 x 15 min). El grupo Fmoc N-terminal se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20% (v/v) en DMF y el péptido se cicló mediante tratamiento con PyBOP/HOBt/DIPEA (5, 5 y 10 equiv.) en DMF durante 3 h. Para los péptidos bicíclicos, el grupo Fmoc N-terminal se eliminó con piperidina y se acopló un ácido trimésico en la amina N-terminal utilizando HBTU como agente de acoplamiento. Los grupos alloxocarboxilo en las cadenas laterales de dos residuos Dap se eliminaron mediante tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y fenilsilano (0,1 y 10 equiv, respectivamente) en DCM anhidro durante 2 h. El péptido resultante se cicla con PyBOP como se describió anteriormente. Los péptidos se desprendieron y se liberaron de la resina por tratamiento con 82,5:5:5:5:2,5 (v/v) de TFA/tioanisol/agua/fenol/etanoditiol durante 2 h. Los péptidos se trituraron con éter etílico frío (3x) y se purificaron por HPLC de fase inversa en una columna C<sub>18</sub>. La autenticidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La marcación del péptido con FITC se realizó disolviendo el péptido purificado (~1 mg) en 300  $\mu$ L de 1:1:1 (vol/vol) de DMSO/DMF/bicarbonato de sodio 150 mM (pH 8,5) y mezclando con 10  $\mu$ L de FITC en DMSO (100 mg/mL). Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se sometió a HPLC de fase inversa en una columna C<sub>18</sub> para aislar el péptido marcado con FITC.

65 Ensayo de inhibición de PTP. Los ensayos de PTP se realizaron en una microcubeta de cuarzo (volumen total 150  $\mu$ L). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, TCEP 1 mM, 0-1  $\mu$ M de inhibidor de PTP y fosfato de para-nitrofenilo (PNPP) 500  $\mu$ M. La reacción enzimática se inició mediante la adición de PTP (concentración final 15-75 nM) y se controló continuamente a 405 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Las tasas iniciales se calcularon a partir de las curvas de progreso de la reacción (típicamente <60 s). La mitad de la

constante de inhibición máxima ( $IC_{50}$ ) se definió como la concentración de un inhibidor que redujo la actividad de la enzima al 50% y se obtuvo trazando las tasas ( $V$ ) contra la concentración del inhibidor  $[I]$  y ajustando los datos respecto de la ecuación

$$V = \frac{V_0}{\left(1 + \frac{[I]}{IC_{50}}\right)}$$

donde  $V_0$  es la velocidad de reacción enzimática en ausencia de inhibidor. La constante de inhibición ( $K_i$ ) se determinó midiendo las tasas iniciales a una concentración de enzima fija (15 nM) pero variando las concentraciones de pNPP (0-24 mM) e inhibidor (0-112 nM). La velocidad de reacción ( $V$ ) se representó en función de la concentración de pNPP ( $[S]$ ) y se ajustó en función de la ecuación

$$\frac{1}{V} = K \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

para obtener la constante de Michaelis  $K$ . El valor  $K_i$  se obtuvo al trazar los valores  $K$  contra la concentración del inhibidor  $[I]$  y se ajustó a la ecuación

$$\frac{K}{K_0} = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

donde  $K_0$  es la constante de Michaelis en ausencia de inhibidor ( $[I] = 0$ ).

Microscopia confocal. Se sembraron aproximadamente  $5 \times 10^4$  células A549 en una placa de micropocillos con fondo de vidrio de 35 mm (MatTek) que contenía 1 mL de medio y se cultivaron durante un día. Las células A549 se lavaron moderadamente con DPBS una vez y se trataron con los inhibidores de PTP1B marcados con FITC (5  $\mu$ M), dextran<sup>Rho</sup> (1 mg mL<sup>-1</sup>) en medios de crecimiento durante 2 horas a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. El medio que contenía el péptido se eliminó y las células se lavaron con DPBS tres veces y se incubaron durante 10 minutos en 1 ml de DPBS que contenía 5  $\mu$ M de DRAQ5. Las células se lavaron de nuevo con DPBS dos veces. Luego, se tomaron imágenes de las células en un microscopio confocal de imágenes en vivo de imágenes Visitech Infinity 3 Hawk 2D-array (con una lente de inmersión en aceite 60x) a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. La imagen microscópica confocal de células en vivo de células HEK293 después del tratamiento con inhibidores de Pin1 marcados con FITC se realizó de manera similar.

Inmunotransferencia. Se cultivaron células A549 en medios de crecimiento completo para alcanzar una confluencia del 80%. Las células se murieron de hambre en medio sin suero durante 3 h y se trataron con concentraciones variables de inhibidores de PTP1B durante 2 h, seguido de 30 minutos de incubación en medio suplementado con pervanadato de sodio 1 mM. Las soluciones se eliminaron y las células se lavaron con DPBS frío dos veces. Las células se separaron y se lisaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, pirofosfato sódico 10 mM, ácido yodoacético 5 mM, NaF 10 mM, EDTA 1 mM, pervanadato de sodio 2 mM, 0,1 mg/ml de fluoruro de fenilmetansulfonilo, benzamidina 1 mM y 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina. Después de 30 minutos de incubación en hielo, el lisado celular se centrifugó a 15.000 rpm durante 25 minutos en una microcentrífuga. Las proteínas celulares totales se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de PVDF, que se sometió a inmunotransferencia utilizando el anticuerpo anti-fotofosina 4G10. Las mismas muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE separado y se tiñeron con azul brillante de Coomassie para determinar la carga de muestra igual en todos los carriles.

Para probar el efecto del inhibidor en la vía de señalización de la insulina, las células HepG2 se cultivaron para alcanzar una confluencia del 80%. Las células se murieron de hambre durante 4 h en medio DMEM sin suero antes de ser tratadas con inhibidor de PTP1B (2 h), seguido de estimulación con insulina 100 nM durante 5 min. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE como se describió anteriormente y se inmunotransfirieron con el anticuerpo anti-fosfo-IR/IGFIR. La membrana de PVDF también se probó con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina como control de carga.

Prueba de estabilidad sérica. Las pruebas de estabilidad se realizaron modificando un procedimiento informado previamente (Nguyen, LT et al. PLoS One 2010, 5, e12684). El suero humano diluido (25%) se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Una solución madre de péptido se diluyó en el sobrenadante hasta una concentración final de 5  $\mu$ M y se incubó a 37°C. En varios puntos temporales (0-24 h), se extrajeron alícuotas de 200  $\mu$ L y se mezclaron con 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 15% y se incubaron a 4°C durante la noche. La mezcla final se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga, y el sobrenadante se analizó mediante HPLC de fase inversa equipada con una columna C<sub>18</sub>. La cantidad de péptido restante (%) se determinó integrando el área debajo del pico de péptido (monitoreado a 214 nm) y comparando con el de la reacción de control (sin suero).

5 Anisotropía de fluorescencia. Los experimentos de FA se llevaron a cabo incubando un péptido marcado con FITC 100 nM con concentraciones variables de proteína en HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, acetato de magnesio 2 mM y albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los valores de FA se midieron en un lector de placas Molecular Devices Spectramax M5, con longitudes de onda de excitación y emisión a 485 y 525 nm, respectivamente. Las constantes de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se determinaron representando los valores de FA en función de la concentración de proteína y ajustando la curva a la siguiente ecuación:

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

10 en donde Y es el valor de FA a una concentración x de proteína dada, L es la concentración de péptido,  $Q_b/Q_f$  es el factor de corrección para la interacción fluoróforo-proteína,  $A_{max}$  es el valor máximo de FA cuando todos los péptidos están unidos a la proteína, mientras que  $A_{min}$  es el valor de FA mínimo cuando todos los péptidos están libres. El ensayo de competición FA se realizó incubando el inhibidor 5 de Pin1 marcado con FITC 100 nM con 1  $\mu$ M de Pin1, seguido de la adición de 0-5  $\mu$ M de inhibidor no marcado. Los valores de FA se midieron de manera similar en un lector de placas. Los valores de  $IC_{50}$  se obtuvieron al trazar los valores de FA frente a la concentración del competidor y el ajuste de la curva utilizando la ecuación de inhibición de dosis-respuesta de cuatro parámetros (Prism 6, GraphPad).

Se descubrió una clase de péptidos que penetran en las células (CPP), ciclo (Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Gln) (cP $\Phi$ K<sub>4</sub>, donde  $\Phi$  o Nal es L-naftilalanina), (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423-431). A diferencia de los CPP anteriores, que son típicamente péptidos lineales y predominantemente atrapados en el endosoma, cP $\Phi$ K<sub>4</sub> puede escapar eficientemente del endosoma al citoplasma. Se podrían administrar cargas peptídicas cortas (1-7 aa) en células de mamíferos incorporándolas directamente en el anillo cP $\Phi$ R<sub>4</sub>. Se examinó la posibilidad de desarrollar péptidos cíclicos bifuncionales que contienen secuencias que se adhieren a la célula y que se unen a la diana como inhibidores de células permeables frente a proteínas intracelulares. Para generar inhibidores específicos contra PTP1B, se sintetizó una biblioteca de una perla y dos compuestos en resina ChemMatrix espacialmente segregada (Liu, R et al., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 7678-7680), en donde cada perla exhibía un péptido cíclico bifuncional en su superficie y contenía el péptido lineal correspondiente en su interior como una marca de codificación (Figura 23 y Figura 24). Todos los péptidos cíclicos bifuncionales presentaron el motivo CPP anfifático F $\Phi$ R4 (o su secuencia inversa RRRR $\Phi$ F) en un lado y una secuencia de pentapéptidos aleatorios ( $X^1X^2X^3X^4X^5$ ) en el otro lado, donde  $X^2$  representa una mezcla 9:1 (mol/mol) de Tyr y F<sub>2</sub>Pmp mientras que  $X^1$  y  $X^3$ - $X^5$  son cualquiera de los 24 aminoácidos que incluían 10 L-aminoácidos proteinogénicos (Ala, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Tyr, Trp), 5  $\alpha$ -L-aminoácidos no naturales (F<sub>2</sub>Pmp, L-4-fluorofenilalanina (Fpa), L-norleucina (Nle), L-fenilglicina (Phg), ácido L-pipecólico (Pip)) y 9  $\alpha$ -D-aminoácidos (D-Ala), D-Asn, D-Glu, D-Leu, L- $\beta$ -naftilalanina (D-Nal), D-Phe, D-Pro, D-Thr y D-Val). El uso de una relación Tyr/F<sub>2</sub>Pmp de 9:1 en la posición  $X^2$ , junto con una reducción de 5 veces de la carga de péptidos en la superficie, redujo la cantidad de péptidos que contienen F<sub>2</sub>Pmp en la superficie de la perla en 50 veces, aumentando la rigurosidad y minimizando la unión no específica durante la selección de bibliotecas (Chen, X et al. J. Comb. Chem. 2009, 11, 604-611). El análisis de la biblioteca (diversidad teórica  $6,6 \times 10^5$ ) frente a PTP1B marcado con rojo tejano dio como resultado 65 perlas positivas, que se secuenciaron individualmente mediante espectrometría de degradación de masas parcial de Edman (PED-MS) (Thakkar, A et al. Anal. Chem. 2006, 78, 5935-5939) para dar 42 secuencias completas (Tabla 12). Curiosamente, la mayoría de los inhibidores de PTP1B seleccionados contenían el motivo CPP inverso (RRRR $\Phi$ F).

Tabla 12. Secuencias de péptidos seleccionadas de la biblioteca de péptidos cíclicos frente a PTP1BA

| SEQ ID NO. | Perla N° | Secuencia   |
|------------|----------|---|
| 136        | 1        | Pro-Pip-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-Arg                |
| 137        | 2        | Ser-Pip-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-F <sub>2</sub> Pmp-Arg |
| 138        | 3        | Ile-His-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-Arg                |
| 139        | 4        | Ala-D-Ala-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-Arg              |
| 140        | 5        | Fpa-Ser-Pip-F <sub>2</sub> Pmp-D-Val-Arg              |
| 141        | 6        | Pip-D-Asn-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-Arg              |
| 142        | 7        | Tyr-Phg-Ala-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg                |
| 143        | 8        | Ala-His-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-D-Ala-Arg              |
| 144        | 9        | Gly-D-Asn-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-D-Pro-Arg            |
| 145        | 10       | D-Phe-Gln-Pip-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-Arg              |

|     |     |  |
|-----|-----|--|
| 146 | 11  | Ser-Pro-Gly-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg         |
| 147 | 12  | Pip-Tyr-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg         |
| 148 | 13* | Ser-D-Val-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg       |
| 149 | 14  | Ala-Ile-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-D-Asn-Arg       |
| 150 | 15  | Fpa-Ser-Ile-F <sub>2</sub> Pmp-Gln-Phe         |
| 151 | 16  | Ala-D-Ala-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-D-Phe-Arg     |
| 152 | 17  | D-Asn-D-Thr-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Phg-Arg     |
| 153 | 18* | Ile-Pro-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-Arg         |
| 154 | 19  | Gln-Pip-Fpa-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-Arg         |
| 155 | 20  | D-Asn-Ala-Fpa-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg       |
| 156 | 21  | D-Asn-D-Thr-Tyr-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-Arg     |
| 157 | 22  | D-Glu-Ala-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-D-Val-Arg     |
| 158 | 23  | Ile-D-Val-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-Arg       |
| 159 | 24  | Tyr-D-Thr-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-Arg       |
| 160 | 25  | D-Asn-Pip-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-Arg       |
| 161 | 26  | Pip-D-Asn-Trp-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg       |
| 162 | 27  | Tyr-Pip-D-Val-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-Arg       |
| 163 | 28  | D-Asn-Ser-D-Ala-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg     |
| 164 | 29* | D-Thr-D-Asn-D-Val-F <sub>2</sub> Pmp-D-Ala-Arg |
| 165 | 30  | D-Asn-D-Thr-D-Val-F <sub>2</sub> Pmp-D-Thr-Arg |
| 166 | 31  | Ser-Ile-D-Thr-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-Arg       |
| 167 | 32  | D-Asn-Fpa-D-Asn-F <sub>2</sub> Pmp-D-Leu-Arg   |
| 168 | 33  | Tyr-D-Asn-D-Asn-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-Arg     |
| 169 | 34  | D-Asn-Tyr-D-Asn-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg     |
| 170 | 35  | Ala-Trp-D-Asn-F <sub>2</sub> Pmp-Ala-Arg       |
| 171 | 36  | D-Val-D-Thr-His-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-Arg     |
| 172 | 37  | Pro-Phg-His-F <sub>2</sub> Pmp-Pip-Arg         |
| 173 | 38  | D-Asn-Phg-His-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg       |
| 174 | 39  | Pro-Ala-His-F <sub>2</sub> Pmp-Gly-Arg         |
| 175 | 40  | Ala-Tyr-His-F <sub>2</sub> Pmp-Ile-Arg         |
| 176 | 41  | D-Asn-Pip-D-Glu-F <sub>2</sub> Pmp-Tyr-Arg     |
| 177 | 42  | D-Val-Ser-Ser-F <sub>2</sub> Pmp-D-Thr-Arg     |

<sup>a</sup>Fpa, L-4-fluorofenilalanina; Pip, L-homoprolina; Nle, L-norleucina; Phg, L-fenilglycine; F<sub>2</sub>Pmp, L-4-(fosfonodifluorometil)fenilalanina.

\*Secuencias sujetas a ulterior análisis.

5 Tres secuencias de coincidencias (D-Thr-D-Asn-D-Val-F<sub>2</sub>Pmp-D-Ala-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln (inhibidor 1), Ser-D-Val-Pro-F<sub>2</sub>Pmp-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln (inhibidor 2), e Ile-Pro-Phg-F<sub>2</sub>Pmp-Nle-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln (inhibidor 3)) fueron resintetizadas y purificadas por HPLC. Los tres péptidos son inhibidores competitivos de PTP1B (Tabla 13), siendo el péptido 2 el más potente ( $K_i = 54$  nM) (Figura 25). El análisis microscópico confocal de células humanas tratadas con inhibidor 2 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) indicó una pobre captación celular del péptido (Figura 26a). Se ha demostrado anteriormente que a medida que aumenta el tamaño de la carga insertada en el anillo cF $\Phi$ R<sub>4</sub>, disminuye la eficiencia de captación celular de los péptidos cíclicos (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423-431). Los anillos más grandes pueden ser más flexibles y pueden unirse menos estrechamente a los receptores de la superficie celular (por ejemplo, fosfolípidos de membrana) durante la endocitosis. El F<sub>2</sub>Pmp con carga negativa también puede interactuar intramolecularmente con el motivo PΦK<sub>4</sub> e interferir con su función de CPP.

Tabla 13. Potencia de los inhibidores de péptidos monocíclicos seleccionados contra PTP1B

| SEQ ID NO | Inhibidor monocíclico | Secuencia   | IC <sub>50</sub> (nM) |
|-----------|-----------------------|---|-----------------------|
| 178       | 1                     | cicloCD-Thr-D-Asn-D-Val-F <sub>2</sub> Pmp-D-Ala-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln) | ~100                  |

|     |   |   |      |
|-----|---|---|------|
| 179 | 2 | ciclo(Ser-D-Val-Pro-F <sub>2</sub> Pmp-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln) | -30  |
| 180 | 3 | ciclo(Ile-Pro-Phg-F <sub>2</sub> Pmp-Nle-Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Gln)   | -200 |

Para mejorar la permeabilidad celular del inhibidor 2, se exploró un sistema bicíclico en el que el motivo CPP se coloca en un anillo, mientras que la secuencia de unión al objetivo constituye el otro anillo (Figura 23). El sistema bicíclico mantiene el anillo de CPP a un tamaño mínimo que, de acuerdo con la tendencia observada anteriormente (Qian, Z et al., ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423-431), puede resultar en una captación celular más eficiente. El sistema bicíclico debe poder acomodar cargas de cualquier tamaño, ya que la incorporación de este último no cambia el tamaño del anillo de CPP y, por lo tanto, no debe afectar la eficacia de administración del CPP cíclico. El uso de un andamio rígido (por ejemplo, ácido trimésico) también puede ayudar a mantener los CPP y los motivos de carga alejados entre sí y minimizar cualquier interferencia mutua. Los anillos más pequeños de un péptido bicíclico, en comparación con su contraparte monocíclica, pueden dar como resultado una mayor rigidez estructural y una mejor estabilidad metabólica.

Para convertir el inhibidor de PTP1B monocíclico 2 en un péptido bicíclico, el residuo de Gln (usado para la unión al soporte sólido y la ciclación de péptidos) se reemplazó con ácido (S)-2,3-diaminopropiónico (Dap) y un segundo residuo Dap se insertó en la unión de las secuencias de unión a CPP y PTP1B (C-terminal a His) (Figura 23). La síntesis del biciclo se llevó a cabo mediante la formación de tres enlaces amida entre un ácido trimésico y la amina N-terminal y las cadenas laterales de los dos residuos Dap (Figura 27) (Lian, W et al. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 11990-11995). Brevemente, el péptido lineal se sintetizó en resina de amida de Rink utilizando la química estándar de Fmoc y Dap protegido con N<sup>β</sup>-aloxycarbonilo (Alloc). Después de la eliminación del grupo Fmoc N-terminal, la amina expuesta se aciló con ácido trimésico. La eliminación de los grupos Alloc con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> seguido del tratamiento con PyBOP proporcionó la estructura bicíclica deseada. Para facilitar el marcado con sondas fluorescentes, se añadió una lisina al extremo C-terminal. El péptido bicíclico (péptido 4) se desprotegió por TFA y se purificó hasta homogeneidad por HPLC.

El péptido 4 bicíclico puede actuar como un inhibidor competitivo de PTP1B, con un valor K<sub>i</sub> de 37 nM (Figura 26b). Puede ser altamente selectivo para PTP1B. Cuando se ensayó contra fosfato de p-nitrofenilo como sustrato (500 μM), el inhibidor 4 tenía valores de IC<sub>50</sub> de 30 y 500 nM para PTP1B y TCPTP, respectivamente (Figura 26c y Tabla 14). Exhibió una inhibición mínima de cualquiera de las otras PTP probadas (≤10% de inhibición de HePTP, SHP-1, PTPRC, PTPH1 o PTPRO a una concentración de inhibidor de 1 μM). El inhibidor 4 tiene una permeabilidad celular mejorada sobre el péptido 2, según lo detectado por microscopía confocal de células vivas de células A549 tratadas con inhibidor 4 marcado con FITC (Figura 26a). Las células tratadas mostraron una fluorescencia difusa en todo el citoplasma y el núcleo, así como puntos de fluorescencia, lo que indica que una fracción de los inhibidores alcanzó el citoplasma y el núcleo, mientras que el resto probablemente quedó atrapado en los endosomas. La incubación del inhibidor 4 en suero humano durante 24 horas a 37°C dio como resultado una degradación de ~10%, mientras que el 91% del inhibidor 2 se degradó en las mismas condiciones (Figura 28). En general, el inhibidor 4 se compara favorablemente con los inhibidores de PTP1B de molécula pequeña informados hasta la fecha (Qian, Z et al. ACS Chem. Biol. 2013, 8, 423-431) con respecto a la potencia, selectividad sobre el TCPTP altamente similar (17 veces), permeabilidad celular, y estabilidad.

Tabla 14. Selectividad de inhibidor bicíclico 4 contra varios PTP<sup>a</sup>

| PTP                   | PTP1B  | TCPTP     | HePTP | PTPRC | SHP1 | PTPRO | PTPH1 |
|-----------------------|--------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|
| IC <sub>50</sub> (nM) | 30 ± 4 | 500 ± 250 | NA    | NA    | NA   | NA    | NA    |

<sup>a</sup>NA, ninguna inhibición significativa a 1 μM de inhibidor.

El inhibidor 4 se probó a continuación para determinar su capacidad para perturbar la función PTP1B durante la señalización celular. El tratamiento de las células A549 con el inhibidor 4 (0-5 μM) dio como resultado aumentos dependientes de la dosis en los niveles de fosfotirosina (pY) de un gran número de proteínas, lo que concuerda con la amplia especificidad de sustrato de PTP1B (Ren, L et al. Biochemistry 2011, 50, 2339) (Figura 29a). El análisis de las mismas muestras mediante tinción con azul de Coomassie mostró cantidades similares de proteínas en todas las muestras (Figura 29b), lo que indica que el aumento de los niveles de pY reflejó un aumento de la fosforilación (o una disminución de la reacción de PTP) en lugar de cambios en los niveles totales de proteínas. Cabe destacar que el aumento en la fosforilación de tirosina ya era evidente en el inhibidor 4 de 8 nM. Es interesante observar que un aumento adicional en la concentración de inhibidor más allá de 1 μM invirtió el efecto sobre la fosforilación de tirosina, una observación que también se realizó anteriormente por Zhang et al. con un inhibidor de PTP1B diferente (Xie, L et al. Biochemistry 2003, 42, 12792-12804). Para obtener evidencia adicional de que el PTP1B intracelular fue inhibido por el péptido 4, el nivel pY de receptor de insulina (IR), un sustrato de PTP1B bien establecido in vivo (Elchelby, M et al. Science 1999, 283, 1544-1548; Zabolotny, JM et al. Dev. Cell 2002, 2, 489-495), se controló mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra el sitio pY<sup>1162</sup>pY<sup>1163</sup>. Nuevamente, el tratamiento

con el inhibidor 4 causó un aumento dependiente de la dosis en la fosforilación del receptor de insulina hasta 1  $\mu\text{M}$  de inhibidor y el efecto se estabilizó en concentraciones más altas (Figura 29c, d). En conjunto, estos datos indican que el inhibidor 4 bicíclico puede entrar de manera eficiente en las células de los mamíferos y puede inhibir el PTP1B in vivo. La disminución de la fosforilación a concentraciones más altas de inhibidores puede ser causada por una inhibición no específica de otras PTP (que, a su vez, puede regular a la baja las proteínas tirosina quinasas). También puede reflejar los papeles pleiotrópicos desempeñados por PTP1B, que pueden regular tanto negativa como positivamente las actividades de diferentes proteínas quinasas (Lessard, L et al. Biochys. Biophys. Acta 2010, 1804, 613).

Para probar la generalidad del enfoque bicíclico, se aplicó para diseñar inhibidores permeables a las células contra la peptidil proil cis-trans isomerasa Pin1, un objetivo potencial para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas, incluido el cáncer (Lu, KP y Zhou, XZ. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8, 904-916), para los cuales todavía faltan inhibidores potentes, selectivos y biológicamente activos (More, JD y Potter, A. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013, 23, 4283-91). Por lo tanto, un péptido monocíclico (5) informado anteriormente, que es un potente inhibidor contra Pin1 in vitro ( $K_D$  258 nM) pero impermeable a la membrana (Liu, T et al, J. Med. Chem. 2010, 53, 2494-2501), se fusionó con  $c\text{P}\Phi\text{P}_4$  (Figura 30). Además, el L-Tyr en la posición pThr+3 se reemplazó con un Arg para mejorar la solubilidad acuosa. El péptido 6 bicíclico resultante se unió a Pin1 con un valor  $K_D$  de 131 nM (Tabla 15 y Figura 31). La inserción de un D-Ala en la posición pThr+5 para aumentar la separación entre los motivos de unión a Pin1 y de penetración celular mejoró la potencia del inhibidor en aproximadamente 2 veces ( $K_D$  = 72 nM para el inhibidor 7). El inhibidor 7 compitió con el inhibidor 5 marcado con FITC por unirse al Pin1 (Figura 32), lo que indica que ambos pueden unirse al sitio activo Pin1. La sustitución de D-Thr por D-pThr del inhibidor 7 redujo su potencia en aproximadamente 10 veces ( $K_D$  = 620 nM para el inhibidor 8, Tabla 16), mientras que la sustitución adicional del residuo de pipicolilo con D-Ala suprimió la actividad inhibitoria de Pin1 (péptido 9). Los inhibidores bicíclicos 7-9 eran permeables a las células (Figura 33). El tratamiento de las células HeLa con inhibidor 7 dio como resultado una inhibición del crecimiento celular dependiente del tiempo y la dosis (inhibición del 45% después del tratamiento de 3 días a 20  $\mu\text{M}$  de inhibidor 7), mientras que el inhibidor 5 monocíclico y el péptido 9 inactivo no tuvieron efecto (Figura 34). El péptido 8 también inhibió el crecimiento celular, pero en menor medida que el inhibidor 7.

Tabla 15. Constantes de disociación de péptidos monocíclicos y bicíclicos contra Pin1 según lo determinado por el análisis de FA

| SEQ ID NO | Inhibidor de Pin1 | Secuencia <sup>a</sup>   | $K_D$ (nM) |
|-----------|-------------------|--|------------|
| 181       | 5                 | ciclo(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Tyr-Gln)-Lys-NH <sub>2</sub>  | 258 ± 65   |
| 182       | 6                 | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Arg-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>        | 131 ± 44   |
| 183       | 7                 | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>  | 72 ± 21    |
| 184       | 8                 | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub>   | 620 ± 120  |
| 185       | 9                 | biciclo[Tm(D-Ala-Sar-D-Thr-D-Ala-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys-NH <sub>2</sub> | >>6000     |

<sup>a</sup>Dap, ácido L-2,3-diaminopropiónico; Nal, L- $\beta$ -naftilalanina; Pip, ácido L-pipecólico; Sar, sarcosina; Tm, ácido trimésico.  
Para análisis de FA, todos los péptidos se marcos en la cadena lateral de lisina C-terminal con FITC.

En conclusión, se desarrolló un enfoque potencialmente general para diseñar péptidos bicíclicos permeables a las células contra dianas intracelulares. Estos estudios preliminares muestran que la sustitución del motivo de unión a PTP1B con otras secuencias peptídicas de diferentes propiedades fisicoquímicas también daba como resultado su suministro eficaz en células de mamíferos cultivadas. La disponibilidad de un método de administración intracelular general debería ampliar considerablemente la utilidad de los péptidos cíclicos en el descubrimiento de fármacos y la investigación biomédica.

#### Ejemplo 4

También se analizan en este documento las secuencias de CPP en la Tabla 16. Todas las eficacias de

captación/suministro que se encuentran en la Tabla 17 son relativas a las de cFΦR<sub>4</sub> (290-1F, 100%). SUV1 son pequeñas vesículas unilaminares que imitan la membrana externa neutra de las células de mamíferos [45% de fosfatidilcolina (PC), 20% de fosfatidiletanolamina (PE), 20% de esfingomielina (SM) y 15% de colesterol (CHO)]. SUV2 son pequeñas vesículas unilaminares que imitan la membrana endosomal cargada negativamente de células de mamíferos [50% de PC, 20% de PE, 10% de fosfatidilinositol (PI) y 20% de bis(monoacilglicerol)fosfato],

Las mediciones se llevaron a cabo polarización de fluorescencia utilizando péptidos cíclicos marcados con FITC frente a concentraciones crecientes de vesículas. Los experimentos se realizaron a pH 7,4 y 5,5 (pH dentro de endosomas tardíos).

La eficacia de administración general parece estar relacionada con la afinidad de unión de los CPP a la membrana endosomal a pH 7,4, es decir, una unión más estrecha conduce a una mayor eficacia de suministro.

Tabla 16. CPP cíclicos y sus propiedades de captación celular y de unión a la membrana

|          | SEQ ID NO | Secuencia de CPP | Eficacia de captación (%) | Unión a membrana K <sub>D</sub> (mM) |                 |             |             |
|----------|-----------|------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
|          |           |                  |                           | SUV1 pH 7,4                          | SUV1 pH 5,5     | SUV2 pH 7,4 | SUV2 pH 5,5 |
| 290-1F   | 186       | c(FΦRRRRQ)       | 100                       | 4                                    | 1,1             | 0,66        | 0,63        |
| 290-12F  | 187       | c(FfΦRrRrQ)      | 681                       | 0,8                                  |                 | 0,026       | 0,004       |
| 290-9F   | 188       | c(fΦRrRrQ)       | 602                       | 1,2                                  | 0,81            | 0,033       | 0,012       |
| 290-1 IF | 189       | c(fΦRrRrRQ)      | 542                       | 2,7                                  |                 | 0,092       | 0,019       |
| 290-18F  | 190       | c(FφrRrRq)       | 205                       | 0,75                                 |                 | 0,04        | 0,022       |
| 290-13F  | 191       | c(FφrRrRQ)       | 200                       | 0,68                                 |                 | 0,28        | 0,04        |
| 290-6F   | 192       | c(FΦRRRRRQ)      | 184                       | 2,2                                  |                 | 0,12        | 0,019       |
| 290-3F   | 193       | c(RRFRVΦRQ)      | 163                       | 0,22                                 |                 | 0,4         | 0,26        |
| 290-7F   | 194       | c(FFRRRΦRQ)      | 134                       | 1,65                                 |                 | 0,11        | 0,007       |
| 290-8F   | 195       | c(RFRFRΦRQ)      | 98                        | 0,4                                  |                 | 0,39        | 0,082       |
| 290-5F   | 196       | c(FΦRRRQ)        | 97                        | 10,1                                 |                 | 2,4         | 0,066       |
| 290-4F   | 197       | c(FRRRRΦQ)       | 59                        | 7,24                                 |                 | 0,54        | 0,11        |
| 290-10F  | 198       | c(rRFRΦRQ)       | 52                        | 1,2                                  |                 | 0,87        | 0,17        |
| 290-2F   | 199       | c(RRΦFRRQ)       | 47                        | 1,95                                 |                 | 0,69        | 0,025       |
| Tat      |           |                  | 32                        | demasiado débil                      | demasiado débil | 3,3         | 4,5         |
| R9       |           |                  | 35                        | demasiado débil                      | demasiado débil | 0,47        | 0,03        |

Φ = L-naftilalanina; φ = D-naftilalanina; f = D-fenilalanina; r = D-arginina; q = D-glutamina

Ejemplo 5

En general, los cardiomiocitos son difíciles de transfectar con el ADN y el suministro de proteínas en ellos mediante el uso de CPP anteriores no ha sido exitoso. Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de suministrar proteínas terapéuticas a los tejidos del corazón.

Los CPP cíclicos descritos son muy efectivos en la administración de proteínas en cardiomiocitos. Se sintetizaron CPP cíclicos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) [c(FΦRRRRQ)-K(FITC)-NH<sub>2</sub> y c(FΦRrRrQ)-K(FITC)-NH<sub>2</sub>] y su internalización en miocitos cardíacos ventriculares del ratón se probó tratando las células con 5 μM de péptido marcado con FITC durante 3 h. Después de lavar los péptidos extracelulares, se examinó la internalización de los CPP mediante microscopía confocal de células vivas fluorescentes. Ambos péptidos mostraron una

fluorescencia significativa y predominantemente difusa en todas las células, lo que indica una internalización eficiente de los CPP en las células musculares cardíacas (Figura 35a y 35b). Se evaluó si los CPP cíclicos son capaces de transportar proteínas de longitud completa a las células musculares cardíacas. La calmodulina (con un Thr5Cys diseñado), una proteína mensajera de unión a calcio multifuncional, se conjugó con c(F $\Phi$ RRRRQ)-C-NH<sub>2</sub> en el residuo Cys cerca del extremo N-terminal a través de un enlace disulfuro. La reacción de intercambio de disulfuro es altamente específica, eficiente y reversible. Además, al entrar en el citosol de las células, se espera que el enlace disulfuro se reduzca para liberar la proteína nativa (Figura 35c). El conjugado de proteína CPP se marcó químicamente en grupos amino con cianina3, lo que permite la visualización de la calmodulina internalizada. Los miocitos cardíacos ventriculares de ratón se incubaron con 6  $\mu$ M del conjugado CPP-calmodulina durante 3 h y se examinaron mediante microscopia confocal de células vivas. La señal de fluorescencia intracelular estuvo presente en todo el volumen celular y mostró un patrón sarcomérico (Figura 35d), lo que indica que la calmodulina internalizada se integró correctamente en la maquinaria celular. Estos datos indican que los CPP cíclicos descritos, como c(F $\Phi$ RRRRQ), tienen una capacidad única para administrar moléculas pequeñas y proteínas (probablemente en su forma nativa) en cardiomiocitos con alta eficiencia, lo que abre la puerta a futuras aplicaciones terapéuticas.

#### Ejemplo 6

Pin1 es una isomerasa peptidil-prolil cis/trans dependiente de la fosforilación (PPlasa). Contiene un dominio WW N-terminal y un dominio catalítico C-terminal, ambos de los cuales reconocen motivos específicos de fosfoserina (pSer)/fosfononina (pThr)-Pro en sus sustratos de proteína. Mediante la isomerización cis-trans de enlaces pSer/pThr-Pro específicos, Pin1 regula los niveles, las actividades y la localización intracelular de una amplia variedad de fosfoproteínas. Por ejemplo, Pin1 controla la estabilidad in vivo de la ciclina D1 y la ciclina E y cambia c-Jun, c-Fos y NF- $\kappa$ B entre sus formas inestables inactivas y formas estables activas. La isomerización por Pin1 también regula la actividad catalítica de numerosas proteínas de señalización del ciclo celular, como la fosfatasa CDC25C y la quinasa Weel. Finalmente, los cambios conformacionales catalizados por Pin1 en  $\beta$ -catenina y NF- $\kappa$ B conducen a la translocación subcelular.

Dado su papel crítico en la regulación del ciclo celular y el aumento de los niveles de expresión y la actividad en los cánceres humanos, Pin1 se ha propuesto como un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Pin1 también está implicado en enfermedades degenerativas neurales como la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, ha habido un interés significativo en desarrollar inhibidores específicos contra Pin1. Los inhibidores de moléculas pequeñas como Juglone, PiB, monosulfuro de dipentamentilauram y fenilisotiazolona halogenada (TME-001) generalmente carecen de suficiente potencia y/o especificidad. Se han informado varios inhibidores potentes de peptidil Pin1 y son más selectivos que los inhibidores de molécula pequeña. Sin embargo, los inhibidores de peptidilo son generalmente impermeables a la membrana celular y, por lo tanto, tienen una utilidad limitada como agentes terapéuticos o sondas in vivo. Un inhibidor de peptidilo bicíclico permeable a las células contra Pin1, en el que un anillo (anillo A) presentaba un motivo de fosfopéptido de unión a Pin1 [D-pThr-Pip-Nal, donde Pip y Nal son ácido (R)-piperidin-2-carboxílico y L-naftilalanina, respectivamente], mientras que el segundo anillo (anillo B) contenía un péptido que penetra en las células, Phe-Nal-Arg-Arg-Arg se muestra en la Figura 36, péptido 1. Aunque el inhibidor de peptidilo bicíclico es potente ( $K_D = 72$  nM) y activo en ensayos celulares, su porción D-pThr puede ser metabólicamente lábil debido a la hidrólisis por fosfatasas no específicas. Las cargas negativas del grupo fosfato también podrían impedir la entrada celular del inhibidor. Aquí se preparó un inhibidor de peptidilo bicíclico no fosforilado contra Pin1 mediante la selección de una biblioteca de péptidos y la optimización de coincidencias. El inhibidor de peptidilo bicíclico resultante es potente y selectivo frente a Pin1 in vitro, permeable a las células y metabólicamente estable en ensayos biológicos.

Aunque la eliminación del grupo fosforilo del péptido 1 redujo significativamente su potencia contra Pin1, el péptido no fosforilado (Figura 36, péptido 2) todavía era un inhibidor de Pin1 relativamente potente ( $K_D = 0,62$   $\mu$ M). La potencia del péptido 2 podría mejorarse aún más optimizando las secuencias que flanquean el motivo D-Thr-Pip-Nal. Así que una biblioteca de péptidos bicíclicos de segunda generación, biciclo[Tm-(X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala-Pra- $\beta$ -Ala-Hmb- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala-Met (Figura 35, donde Tm era ácido trimésico, Dap era ácido 2,3-diaminopropiónico,  $\beta$ -Ala era  $\beta$ -alanina, Pra era L-propargilglicina y Hmb era ácido 4-hidroximetilbenzoico), aleatorizando los tres residuos N-terminales del péptido 2. X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representaron cualquiera de los 27 bloques de construcción de aminoácidos que incluían 12 L-aminoácidos proteínogénicos [Arg, Asp, Gln, Gly, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp y Tyr], 5  $\alpha$ -L-aminoácidos no proteicos [L-4-fluorofenilalanina (Fpa), L-norleucina (Nle), L-omitina (Orn), L-fenilglicina (Phg) y L-Nal], 6  $\alpha$ -D-aminoácidos [D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Leu, D-Phe y D-Val], y 4 L-aminoácidos N<sup>o</sup>-metilados [L-N<sup>o</sup>-metilalanina (Mal), L-N<sup>o</sup>-metileucina (Mle), L-N<sup>o</sup>-metilfenilalanina (Mpa) y sarcosina (Sar)], mientras que X<sup>3</sup> era Asp, Glu, D-Asp, D-Glu o D-Thr. Se esperaba que la incorporación de estos aminoácidos no proteicos aumentara tanto la diversidad estructural como la estabilidad proteolítica de los péptidos de la biblioteca. La biblioteca tenía una diversidad teórica de 5 x 27 x 27 o 3645 péptidos bicíclicos diferentes, la mayoría (si no todos) de los cuales se esperaba que fueran permeables a las células. La biblioteca se sintetizó en 500 mg de microperlas de TentaGel (130  $\mu$ m,  $\sim 7,8 \times 10^5$  perlas/g,  $\sim 350$  pmol de péptidos/perla). La ciclación de péptidos se logró formando tres enlaces amida entre Tm y la amina N-terminal y las aminas de cadena lateral de los dos residuos Dap.

Tabla 17. Secuencias de coincidencias de la selección de la biblioteca de péptidos<sup>a</sup>

| Coincidencia | X <sup>1</sup> | X <sup>2</sup> | X <sup>3</sup> |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 1            | Pro            | Sar            | D-Asp          |
| 2            | Pro            | Sar            | D-Asp          |
| 3            | D-Phe          | Fpa            | D-Thr          |
| 4            | His            | Phg            | D-Thr          |
| 5            | Mpa            | Ile            | D-Glu          |
| 6            | Phg            | His            | D-Glu          |
| 7            | Mpa            | Gly            | D-Thr          |

5 <sup>a</sup> Las coincidencias 1-3 fueron seleccionadas de la primera ronda de selección, mientras que las coincidencias 4-7 fueron seleccionadas después de la segunda ronda de selección.

10  $\beta$ -Ala proporciona un enlazador flexible, mientras que Pra sirve como un identificador para el marcado en perlas de los péptidos bicíclicos con sondas fluorescentes a través de la química de clic. El enlace éster de Hmb permite la liberación selectiva de los péptidos bicíclicos de la resina para el análisis de unión en fase de solución. Finalmente, el Met C-terminal permite la liberación de péptidos de la resina por escisión de CNBr antes del análisis de MS.

15 La biblioteca (100 mg de resina) se seleccionó contra un Pin1 mutante S16A/Y23A, que tiene un dominio WW defectuoso. El Pin1 mutante se produjo como una fusión de la proteína de unión a la maltosa (MBP) en el término N. Durante la primera ronda de selección, el MBP-Pin1 marcado con rojo tejano se incubó con la biblioteca de péptidos y las perlas fluorescentes se eliminaron de la biblioteca bajo un microscopio. Tres perlas positivas tuvieron intensidades de fluorescencia sustancialmente mayores que el resto de las coincidencias y se sometieron directamente a la secuenciación de péptidos mediante espectroscopia de masas de degradación de Edman parcial (PED-MS) (Tabla 17). Las otras 13 perlas fluorescentes se sometieron a una segunda ronda de selección, durante la cual el péptido bicíclico de cada perla se marcó con azida de tetrametilrodamina (TMR) en el residuo de Pra y se liberó de la perla por tratamiento con una solución de NaOH.

20

Tabla 18. Secuencias y afinidades de unión a Pin1 de los péptidos utilizados

| SEQ ID NO | Péptido | Secuencia peptídica  | K <sub>D</sub> ( $\mu$ M) |
|-----------|---------|--|---------------------------|
| 200       | 1       | biciclo[Tm-(D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | 0.072 $\pm$<br>0.021      |
| 201       | 2       | biciclo[Tm-(D-Ala-Sar-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.62 $\pm$<br>0.12        |
| 202       | 3       | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys        | 0.87 $\pm$<br>0.17        |

ES 2 739 613 T3

|     |    |   |                |
|-----|----|---|----------------|
| 203 | 4  | biciclo[Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | 0.67 ±<br>0.12 |
| 204 | 5  | biciclo[Tm-(Mpa-Gly-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys           | 1.08 ±<br>0.12 |
| 205 | 6  | biciclo[Tm-(Phg-His-D-Glu-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys           | 1.47 ±<br>0.19 |
| 206 | 7  | biciclo[Tm-(Mpa-Ile-D-Glu-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys           | 1.25 ±<br>0.20 |
| 207 | 8  | biciclo[Tm-(His-Phg-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys           | 1.40 ±<br>0.24 |
| 208 | 9  | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys             | 2.59 ±<br>0.37 |
| 209 | 10 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys                 | 3.42 ±<br>0.61 |
| 210 | 11 | biciclo[Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys           | 0.90 ±<br>0.25 |
| 211 | 12 | biciclo[Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys               | 2.36 ±<br>0.48 |
| 212 | 13 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Ala-β-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 2.08 ±<br>0.31 |
| 213 | 14 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-β-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | 1.75 ±<br>0.18 |
| 214 | 15 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-β-Ala-β-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | 4.83 ±<br>0.96 |
| 215 | 16 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | 2.49 ±<br>0.57 |
| 216 | 17 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Tyr-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 2.17 ±<br>0.55 |
| 217 | 18 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Val-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 1.75 ±<br>0.24 |
| 218 | 19 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Arg-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 0.72 ±<br>0.09 |
| 219 | 20 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Asp-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 3.19 ±<br>0.50 |
| 220 | 21 | biciclo[Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ser-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | 0.57 ±<br>0.11 |

ES 2 739 613 T3

|     |    |  |                |
|-----|----|--|----------------|
| 221 | 22 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Arg-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys          | 0.48 ±<br>0.07 |
| 222 | 23 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Arg-D-Val)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys          | 1.92 ±<br>0.19 |
| 223 | 24 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Arg-D-Arg)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys          | 1.31 ±<br>0.10 |
| 224 | 25 | biciclo[Tm-(Pro-Sar-D-Asp-Pip-Nal-Arg-Arg-D-Asp)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys          | 4.60 ±<br>1.42 |
| 225 | 26 | biciclo[Tm-(D-Phe-4-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Gly-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.74 ±<br>0.11 |
| 226 | 27 | biciclo[Tm-(D-Phe-4-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.27 ±<br>0.08 |
| 227 | 28 | biciclo[Tm-(D-Phe-Phe-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys        | 1.26 ±<br>0.28 |
| 228 | 29 | biciclo[Tm-(D-Phe-3,4-diFphe-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | 0.41 ±<br>0.10 |
| 229 | 30 | biciclo[Tm-(D-Phe-4-CiPhe-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys    | 0.78 ±<br>0.05 |
| 230 | 31 | biciclo[Tm-(D-Phe-His-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys        | 1.68 ±<br>0.17 |
| 231 | 32 | biciclo[Tm-(D-Phe-4-BrPhe-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys    | 1.78 ±<br>0.42 |
| 232 | 33 | biciclo[Tm-(D-Ala-4-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 1.49 ±<br>0.11 |
| 233 | 34 | biciclo[Tm-(D-Val-4-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 1.07 ±<br>0.16 |
| 234 | 35 | biciclo[Tm-(D-2-Fpa-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.59 ±<br>0.05 |
| 235 | 36 | biciclo[Tm-(D-3-Fpa-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.39 ±<br>0.05 |
| 236 | 37 | biciclo[Tm-(D-4-Fpa-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.12 ±<br>0.03 |
| 237 | 38 | biciclo[Tm-(D-4-CyanoPhe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | 0.35 ±<br>0.04 |
| 238 | 39 | biciclo[Tm-(D-4-Phe-Fpa-D-Ile-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys      | 0.46 ±<br>0.17 |

|     |    |  |                |
|-----|----|--|----------------|
| 239 | 40 | biciclo [Tm-(D-4-Phe-Fpa-D-Nle-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | 0.71 ±<br>0.12 |
| 240 | 41 | biciclo [Tm-(D-4-Phe-Fpa-D-homoGlu-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys | 0.87 ±<br>0.08 |
| 241 | 42 | biciclo [Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Arg-Arg-Arg-Arg-Nal-Phe-Dap)]-Lys       | 0.98 ±<br>0.18 |
| 242 | 43 | biciclo [Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Arg-Arg-Nal-Phe-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 1.38 ±<br>0.16 |
| 243 | 44 | biciclo [Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(Arg-Nal-Arg-Phe-Arg-Arg-Dap)]-Lys       | 0.45 ±<br>0.05 |
| 244 | 45 | biciclo [Tm-(D-Phe-Fpa-D-Thr-Pip-Nal-Arg-Ala-D-Phe)-Dap-(D-Arg-Arg-D-Arg-Arg-Nal-D-Phe-Dap)]-Lys | 3.10 ±<br>0.38 |
| 245 | 46 | ciclo (D-Ala-Sar-D-pThr-Pip-Nal-Tyr-Gln)-Lys   | 0.24 ±<br>0.04 |
| 246 | 47 | biciclo [Tm-(D-Ala-Sar-D-Thr-D-Ala-Nal-Arg-Ala-D-Ala)-Dap-(Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg-Dap)]-Lys     | Sin<br>unión   |

Los péptidos liberados se incubaron con 5  $\mu$ M de MBP-Pin1 y se midió el aumento de la anisotropía de fluorescencia (FA). Para péptidos bicíclicos que mostraron  $\geq 50\%$  de aumento de FA (en relación con el control sin proteína), las perlas correspondientes (5 perlas, que aún contenían los péptidos codificantes lineales) fueron secuenciadas por PED-MS para dar 4 secuencias completas adicionales (Tabla 1). Las 7 secuencias de coincidencias contenían un D-aminoácido en la posición X<sup>3</sup>, de acuerdo con la observación anterior de que Pin1 prefiere D-pThr sobre pThr en esta posición. Existe una fuerte preferencia por los residuos hidrófobos, especialmente hidrófobos aromáticos, en la posición X<sup>1</sup>, pero no hay una selectividad obvia en la posición X<sup>2</sup>.

Optimización de coincidencias. Las 6 secuencias de coincidencias (coincidencias 1 y 2 tienen la misma secuencia) se resintetizaron con un Lys agregado a sus términos C, se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se probaron para determinar su unión a Pin1 por FA (Tabla 18, péptidos 3-8). Los seis péptidos se unieron a Pin1 con afinidades moderadas ( $K_D \sim 1 \mu$ M), pero no mejoraron con respecto al péptido 2 ( $K_D = 0,62 \mu$ M). Los péptidos 3 y 4 se utilizaron para el análisis y la optimización de la relación estructura-actividad. La expansión o la contracción del tamaño del anillo de unión a Pin1 (anillo A) disminuyó la afinidad de unión (Tabla 18, péptidos 9-16). El reemplazo del residuo Ala del péptido 3 con aminoácidos que contienen cadenas laterales de diferentes propiedades fisicoquímicas, incluyendo Arg, Asp, Ser, Tyr y Val, tampoco logró mejorar significativamente la afinidad de unión (Tabla 18, péptido 17-21). Por otro lado, la modificación del residuo D-Ala reveló que la sustitución de un D-Phe en esta posición aumenta la actividad inhibitoria de Pin1 en aproximadamente 2 veces ( $K_D = 0,48 \mu$ M para el péptido 22).

El péptido 4 se sometió a estudios de SAR similares. Como se observó para el péptido 3, la modificación del residuo Ala del péptido 4 (en Gly) tuvo poco efecto (péptido 26), pero la sustitución del residuo D-Ala con D-Phe mejoró la afinidad de unión a Pin1 en aproximadamente 2 veces (Tabla 18,  $K_D = 0,27 \mu$ M para el péptido 27). Las modificaciones del residuo de Fpa en la posición X<sup>2</sup> (por ejemplo, el reemplazo con otros análogos de fenilalanina halogenada) disminuyeron la potencia del inhibidor (péptidos 28-32). Del mismo modo, la eliminación de la cadena lateral aromática en la posición X<sup>1</sup> fue perjudicial para la unión de Pin1 (péptidos 33 y 34). Sin embargo, la sustitución de análogos D-Phe halogenados mejoró la actividad de unión de Pin1 (péptidos 35-38). En particular, el reemplazo de D-Phe con D-4-fluorofenilalanina (D-Fpa) resultó en el inhibidor de Pin1 más potente de esta serie ( $K_D = 0,12 \mu$ M para el péptido 37) (Figuras 36 y 37a). Otros intentos de modificar el residuo D-Thr o el motivo CPP no lograron mejorar la actividad Pin1 (Tabla 18, péptidos 39-45).

Evaluación biológica. Para determinar si el péptido 37 se une al sitio catalítico del Pin1, se examinó su capacidad para competir con el péptido 1 para unirse al Pin1 mediante análisis de FA. Anteriormente se había demostrado que el péptido 1 se unía al sitio activo Pin1. Como se esperaba, el péptido 37 inhibió la unión del péptido 1 a Pin1 con un valor de IC<sub>50</sub> de 190 nM (Figura 37b). A continuación, se monitoreó la actividad catalítica de Pin1 hacia un sustrato peptídico, Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA, en presencia de concentraciones crecientes de péptido 37. El péptido 37 inhibió la actividad del Pin1 de una manera dependiente de la concentración, con un valor de IC<sub>50</sub> de 170 nM (Figura 37c). Estos resultados demuestran que el péptido 37 se une al sitio activo del Pin1 (o cerca de él).

La selectividad del péptido 37 se evaluó mediante dos pruebas diferentes. Primero, se probó el péptido 37 para determinar su unión a un panel de proteínas seleccionadas arbitrariamente, incluida la albúmina de suero bovino (BSA), las proteínas tirosina fosfatasas 1B, SHP1 y SHP2, el dominio SH2 de Grb2, Ras y el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral. El péptido 37 se unió débilmente a BSA ( $K_D \sim 20 \mu\text{M}$ ), pero no a ninguna de las otras seis proteínas. El péptido 37 se probó a continuación para determinar la posible inhibición de Pin4, FKBP12 y ciclofilina A, las otras tres isomerasas de peptidil-prolil cis-trans humanas comunes. Aunque Pin4 es estructuralmente similar a Pin1 y tiene funciones parcialmente superpuestas con Pin1, el péptido 37 solo inhibió ligeramente Pin4 (-15% a  $5 \mu\text{M}$  de inhibidores), con un valor de  $IC_{50}$  estimado de aproximadamente  $34 \mu\text{M}$  (Figura 37c). El péptido 37 no tuvo efecto sobre la actividad catalítica de FKBP12 o ciclofilina A de hasta  $5 \mu\text{M}$  de concentración. Estos datos sugieren que el péptido 37 es un inhibidor altamente específico de Pin1.

La estabilidad metabólica del péptido 37 se evaluó incubándolo en suero humano durante períodos de tiempo variables y analizando las mezclas de reacción mediante HPLC de fase inversa. El inhibidor Pin1 que contiene pThr se usó como control. Después de 6 h de incubación, el 97% del péptido 37 permaneció intacto, mientras que aproximadamente el 50% del péptido 1 bicíclico se degradó después de 3 h (Figura 37d). La pérdida del péptido 1 estuvo acompañada por la aparición concomitante de un nuevo pico en la HPLC. El análisis espectrométrico de masas de la nueva especie lo identificó como el producto de desfosforilación del péptido 1 (péptido 2). Este resultado está de acuerdo con nuestra observación anterior de que los péptidos bicíclicos estructuralmente restringidos son altamente resistentes a la degradación proteolítica. La unidad estructural de D-pThr permanece susceptible a la hidrólisis por las fosfatasas no específicas en suero humano.

La eficacia de captación celular del péptido 37, el péptido 1 y un inhibidor de Pin1 monocíclico impermeable a la membrana previamente informado (Tabla 18, péptido 46) se evaluó incubando células HeLa con los péptidos marcados con FITC ( $5 \mu\text{M}$ ) durante 2 h y cuantificación de la fluorescencia intracelular total mediante análisis de citometría de flujo. Como era de esperar, las células no tratadas y las células tratadas con el péptido 46 mostraron poca fluorescencia celular, con valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) de 101 y 193, respectivamente (Figura 38a). Por el contrario, las células tratadas con los péptidos 1 y 37 dieron valores de MFI de 2562 y 8792, respectivamente. Por lo tanto, el péptido 37 se internaliza por células HeLa  $\sim 4$  veces más eficientemente que el péptido 1. Presumiblemente, el grupo fosfato con carga negativa del péptido 1 interactuó de modo electrostático con el motivo de CPP cargado positivamente y redujo la eficacia de captación celular de este último.

Se ha demostrado anteriormente que la inhibición de la actividad del Pin1 disminuye la proliferación celular. El efecto del péptido 37 sobre el crecimiento de las células HeLa se examinó utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT. El péptido impermeable a la membrana 46 y un péptido bicíclico permeable a las células, pero inactivo (defectuoso en la unión de Pin1) (Tabla 18, péptido 47) se utilizaron como controles. El péptido 37 inhibió el crecimiento celular de HeLa de una manera dependiente de la concentración, con un valor de  $IC_{50}$  de  $1,0 \mu\text{M}$  (Figura 38b). Como se esperaba, ni el péptido 46 ni el 47 tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento celular. Un estudio de curso temporal también mostró una inhibición significativa del crecimiento ( $>60\%$ ) después de un tratamiento de 3 días con  $5 \mu\text{M}$  de péptido 37, pero no con el péptido 46 o 47. El péptido 1 bicíclico fosforilado en condiciones de prueba similares tenía un valor  $IC_{50}$  de  $1,8 \mu\text{M}$ .

Finalmente, para determinar que Pin1 es la diana molecular del péptido 37 in vivo, el nivel de proteína intracelular de un sustrato de Pin1 bien establecido, la proteína de leucemia promielorretinoica (PML), se examinó mediante análisis de transferencia Western. Pin1 regula negativamente el nivel de PML de una manera dependiente de la fosforilación y se espera que la inhibición de la actividad de Pin1 estabilice la PML y aumente su nivel intracelular. De hecho, el tratamiento de las células HeLa con el péptido 37 ( $0,2$ - $5 \mu\text{M}$ ) dio lugar a aumentos dependientes de la concentración en el nivel de PML (Figura 38c, d). El efecto ya era significativo con un inhibidor de  $0,2 \mu\text{M}$  (1,8 veces el aumento en el nivel de PML) y se estabilizó a  $\sim 1 \mu\text{M}$  (aumento de 3,3 veces). De nuevo, el péptido 47 bicíclico no tuvo efecto en las mismas condiciones, mientras que el péptido 1 (el control positivo, a  $5 \mu\text{M}$ ) aumentó el nivel de PML en 3,1 veces.

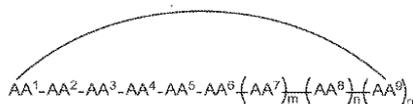
Al seleccionar una biblioteca de péptidos seguida de métodos convencionales de química médica, se ha descrito el primer inhibidor de peptidilo potente, selectivo, metabólicamente estable y permeable a las células frente al Pin1 humano. Su alta potencia y selectividad deberían convertirlo en una sonda química útil para explorar las funciones celulares de Pin1.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención descrita.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Dichos equivalentes se incluyen en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido cíclico que comprende la fórmula Ia:



Ia

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-arginina;

10 AA<sup>4</sup> es D-arginina;

AA<sup>5</sup> es L-arginina;

AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m y n son cada uno 0;

p es 1; y

15 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

o

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-arginina;

20 AA<sup>4</sup> es D-arginina;

AA<sup>5</sup> es L-arginina;

AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m es 0;

n y p son cada uno 1;

25 AA<sup>8</sup> es L-arginina; y

AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

o

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

30 AA<sup>3</sup> es L-arginina;

AA<sup>4</sup> es D-arginina;

AA<sup>5</sup> es L-arginina;

AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m es 0;

35 n y p son cada uno 1;

AA<sup>8</sup> es L-glutamina; y

AA<sup>9</sup> es L-fenilalanina.

2. El péptido cíclico según la reivindicación 1, en el que:

40 AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-arginina;

AA<sup>4</sup> es D-arginina;

AA<sup>5</sup> es L-arginina;

45 AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m y n son cada uno 0;

p es 1; y

AA<sup>9</sup> es L-glutamina.

50 3. El péptido cíclico según la reivindicación 1, en el que:

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-arginina;

AA<sup>4</sup> es D-arginina;

55 AA<sup>5</sup> es L-arginina;

AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m es 0;

n y p son cada uno 1;

AA<sup>8</sup> es L-arginina; y

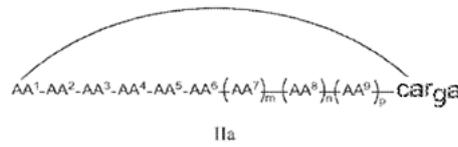
60 AA<sup>9</sup> es L-glutamina.

4. El péptido cíclico según la reivindicación 1, en el que:

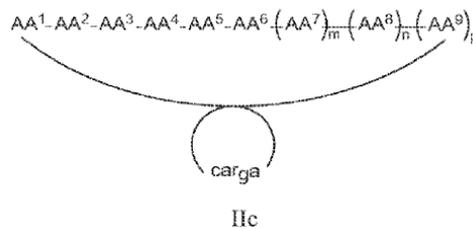
- 5  
10
- AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
m es 0;  
n y p son cada uno 1;  
AA<sup>8</sup> es L-glutamina; y  
AA<sup>9</sup> es L-fenilalanina.

5. El péptido cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, una unidad estructural de carga, en el que la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida o una combinación de las mismas.

15 6. Un péptido cíclico que comprende la fórmula IIa, IIb o IIc.



o



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

- 25  
30
- AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
m y n son cada uno 0;  
p es 1; y  
AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

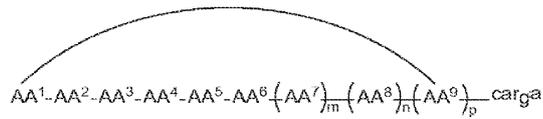
o

- 35  
40
- AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
m es 0;  
n y p son cada uno 1;  
AA<sup>8</sup> es L-arginina; y  
AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

o

- 45  
50
- AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
m es 0;  
n y p son cada uno 1;  
AA<sup>8</sup> es L-glutamina; y  
AA<sup>9</sup> es L-fenilalanina;

o



IIb

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 en el que:

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 10 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
 m y n son cada uno 0;  
 p es 1; y  
 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

15 o  
 AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 20 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
 m es 0;

n y p son cada uno 1;  
 AA<sup>8</sup> es L-arginina; y  
 25 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

o  
 AA<sup>1</sup> es L-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-naftilalanina;  
 30 AA<sup>4</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es L-arginina;  
 m es 0;

n y p son cada uno 1;  
 35 AA<sup>8</sup> es D-arginina; y  
 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;

40 y en el que la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural detectable, una unidad estructural terapéutica, una unidad estructural dirigida, o una combinación de las mismas.

7. El péptido cíclico según la reivindicación 6, en el que

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 45 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina;  
 m y n son cada uno 0;  
 p es 1; y  
 50 AA<sup>9</sup> es L-glutamina.

8. El péptido cíclico según la reivindicación 6, en el que:

AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 55 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina; m es 0;  
 n y p son cada uno 1;  
 60 AA<sup>8</sup> es L-arginina; y

AA<sup>9</sup> es L-glutamina.

9. El péptido cíclico según la reivindicación 6, en el que:

i) el péptido cíclico comprende la fórmula IIa o IIc o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

5 AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-arginina;

AA<sup>4</sup> es D-arginina;

AA<sup>5</sup> es L-arginina;

10 AA<sup>6</sup> es D-arginina;

m es 0;

n y p son cada uno 1;

AA<sup>8</sup> es L-glutamina; y

AA<sup>9</sup> es L-fenilalanina;

15 O

ii) el péptido cíclico comprende la fórmula IIb o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y

AA<sup>1</sup> es L-fenilalanina;

20 AA<sup>2</sup> es D-fenilalanina;

AA<sup>3</sup> es L-naftilalanina;

AA<sup>4</sup> es L-arginina;

AA<sup>5</sup> es D-arginina;

AA<sup>6</sup> es L-arginina;

25 m es 0;

n y p son cada uno 1;

AA<sup>8</sup> es D-arginina; y

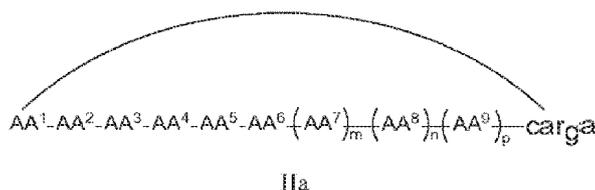
AA<sup>9</sup> es L-glutamina.

30 10. El péptido cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural detectable.

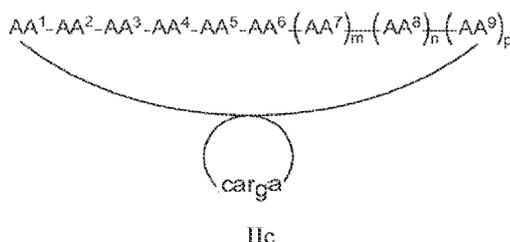
11. El péptido cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural terapéutica

35 12. El péptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que la unidad estructural de carga comprende una unidad estructural dirigida.

40 13. Un péptido cíclico que penetra en las células, que comprende la fórmula IIa, IIb o IIc para usar como un medicamento,



o



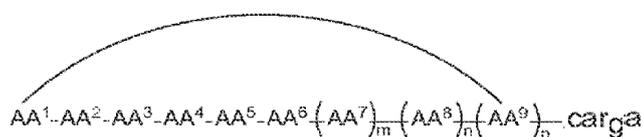
45

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la carga comprende un agente terapéutico

y

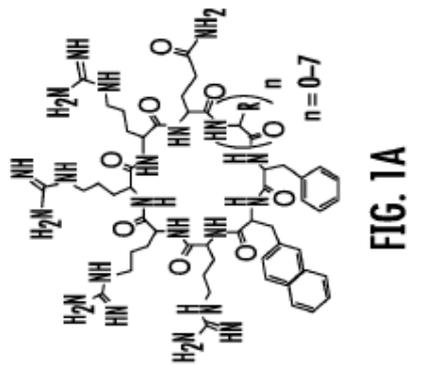
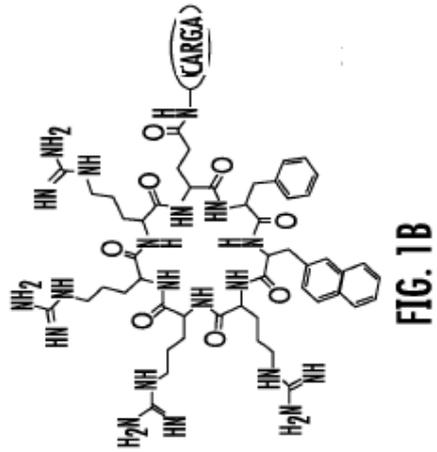
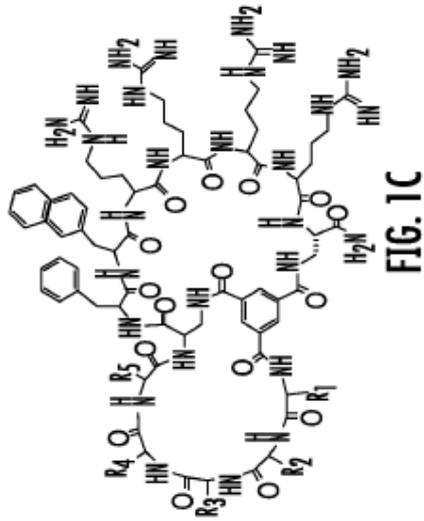
50 AA<sup>1</sup> es L-fenilalanina;

- 5 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es L-arginina;  
 m y n son cada uno 0;  
 p es 1; y  
 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o
- 10 AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina; y  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina;
- 15 y m y n son cada uno 0; p es 1; y AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o m es 0; n y p son cada uno 1; AA<sup>8</sup> es L-arginina; y AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o m es 0; n y p son cada uno 1; AA<sup>8</sup> es L-glutamina; y AA<sup>9</sup> es L-fenilalanina;  
 o



IIb

- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 en el que la carga comprende un agente terapéutico  
 y
- 25 AA<sup>1</sup> es L-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es L-arginina;
- 30 m y n son cada uno 0;  
 p es 1; y  
 AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o
- 35 AA<sup>1</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es L-naftilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>4</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es L-arginina; y  
 AA<sup>6</sup> es D-arginina;
- 40 y m y n son cada uno 0; p es 1; y AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o m es 0; n y p son cada uno 1; AA<sup>8</sup> es L-arginina; y AA<sup>9</sup> es L-glutamina;  
 o AA<sup>1</sup> es L-fenilalanina;  
 AA<sup>2</sup> es D-fenilalanina;  
 AA<sup>3</sup> es L-naftilalanina;
- 45 AA<sup>4</sup> es L-arginina;  
 AA<sup>5</sup> es D-arginina;  
 AA<sup>6</sup> es L-arginina;  
 m es 0; n y p son cada uno 1; AA<sup>8</sup> es D-arginina; y AA<sup>9</sup> es L-glutamina.
- 50 14. El medicamento según la reivindicación 13, en el que el agente terapéutico es un inhibidor contra Ras, PTP1B, Pin1, Grb2, SH2, o combinaciones de los mismos.
- 55 15. El medicamento según la reivindicación 13 o 14, en el que el péptido cíclico que penetra en las células comprende, además, una unidad estructural detectable, una unidad estructural dirigida o una combinación de las mismas.



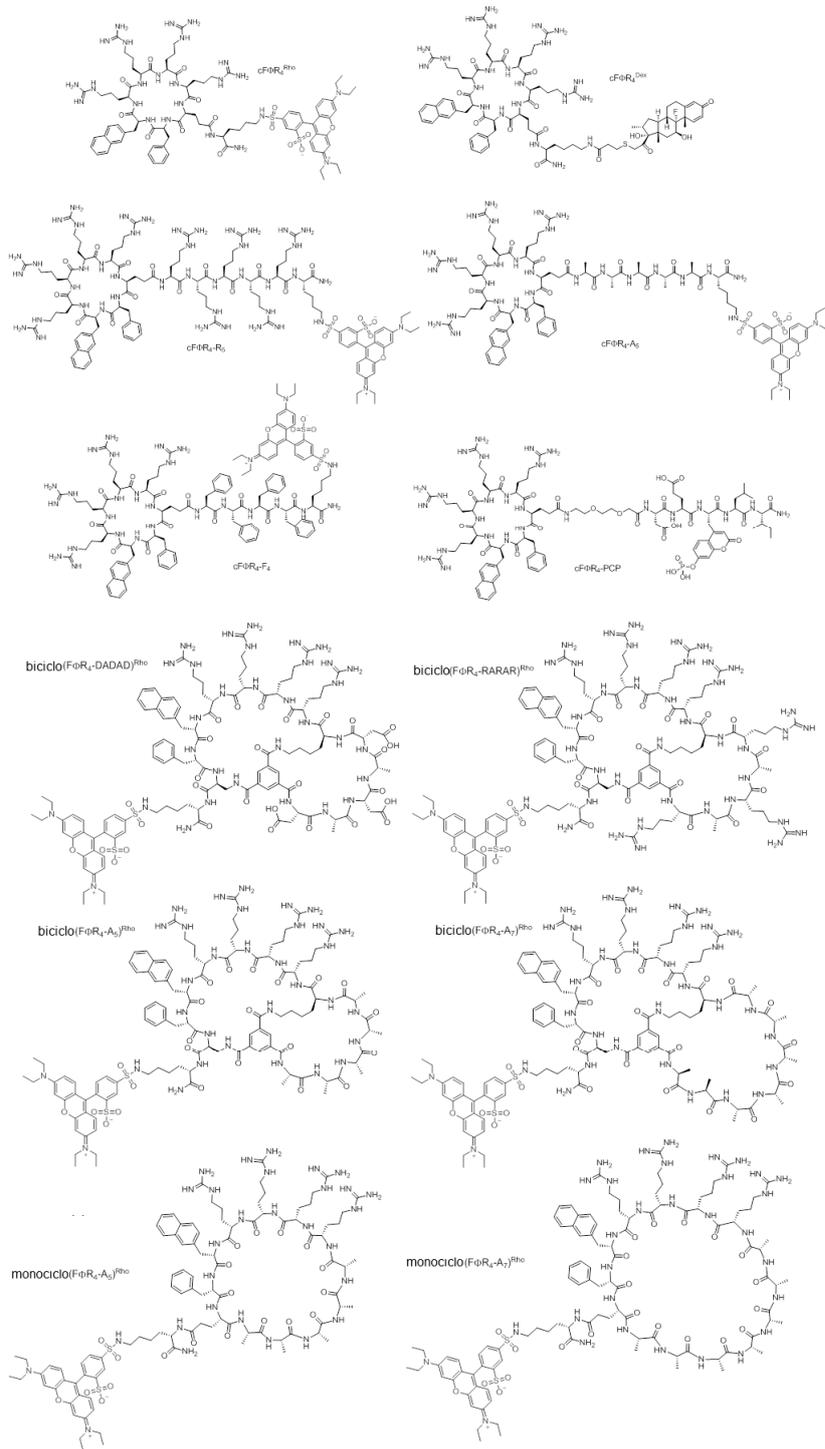


Figura 2

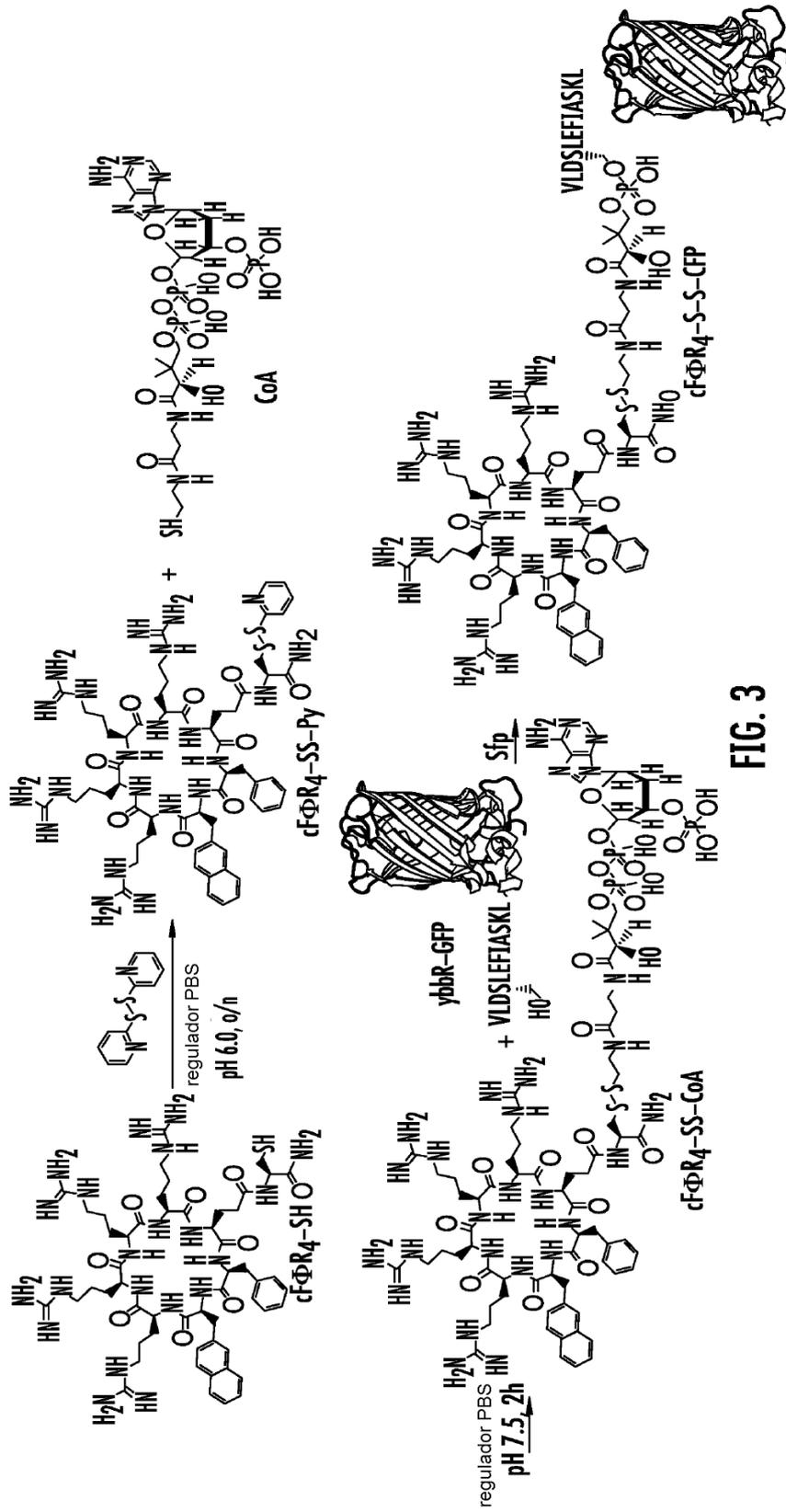


FIG. 3

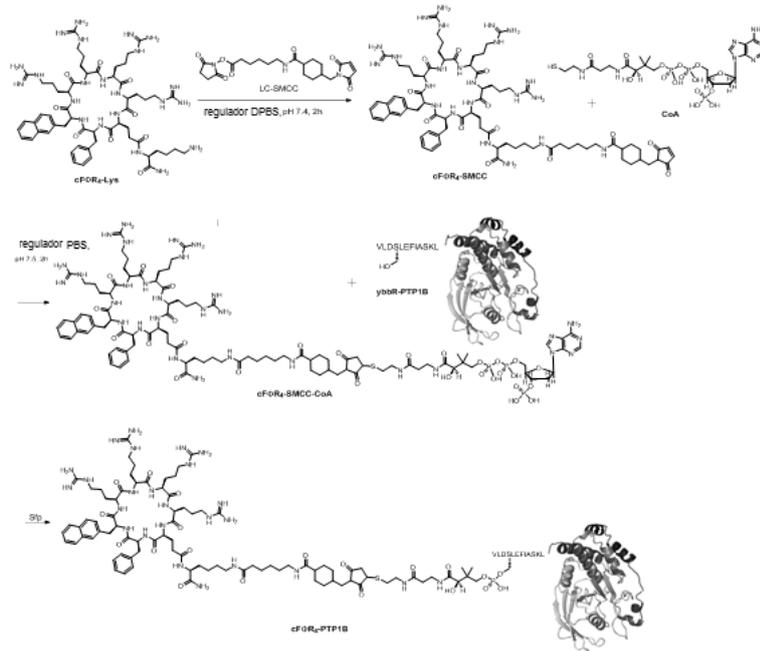


Figura 4

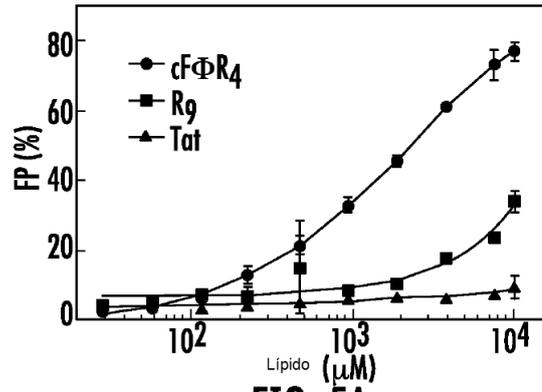


FIG. 5A

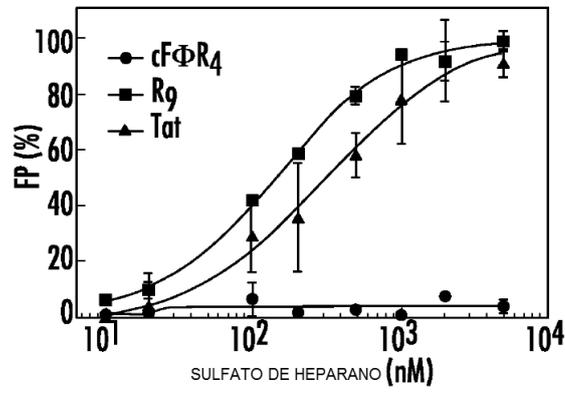
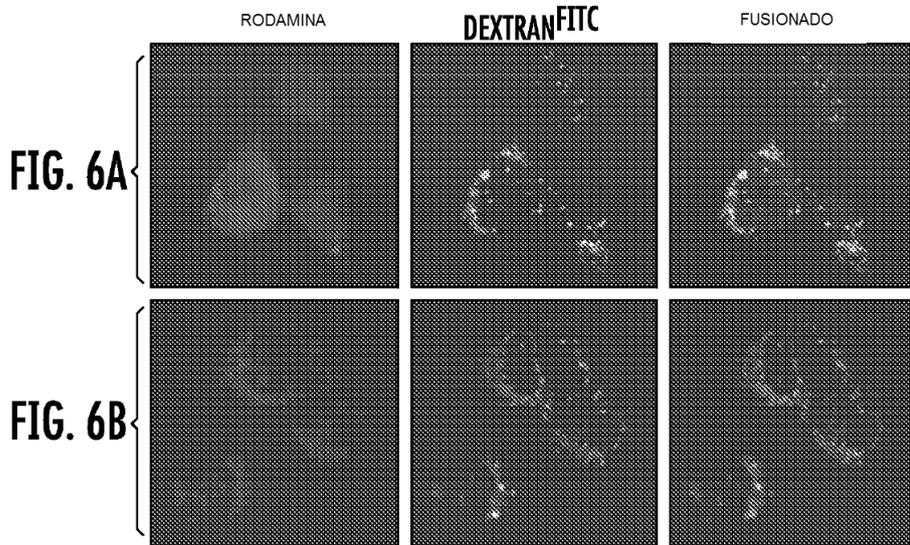


FIG. 5B



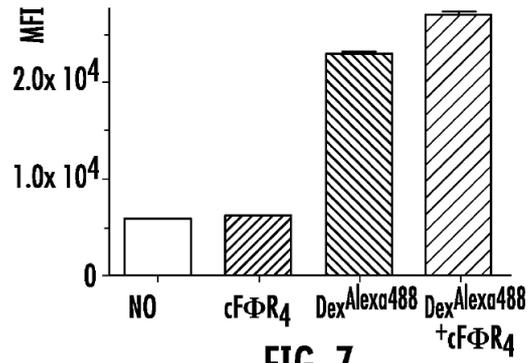


FIG. 7

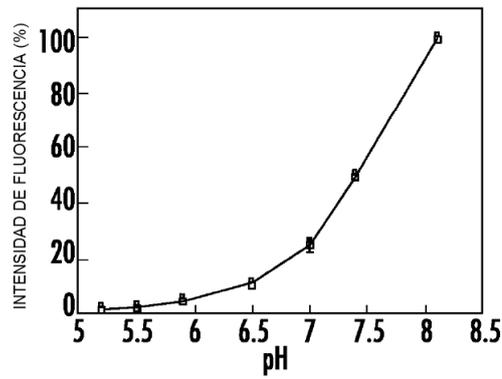


FIG. 8

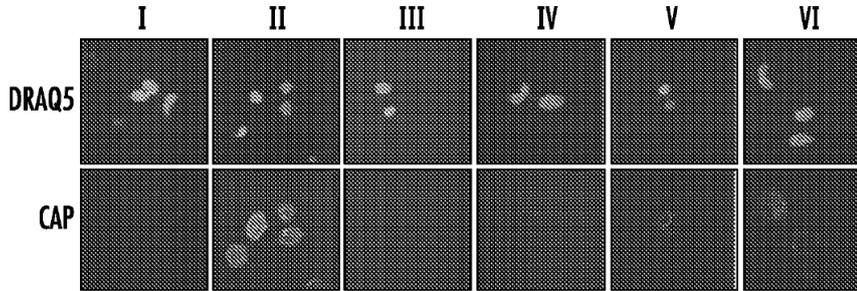


FIG. 9A

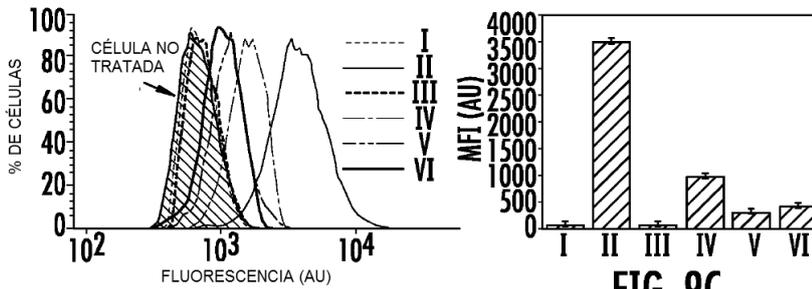
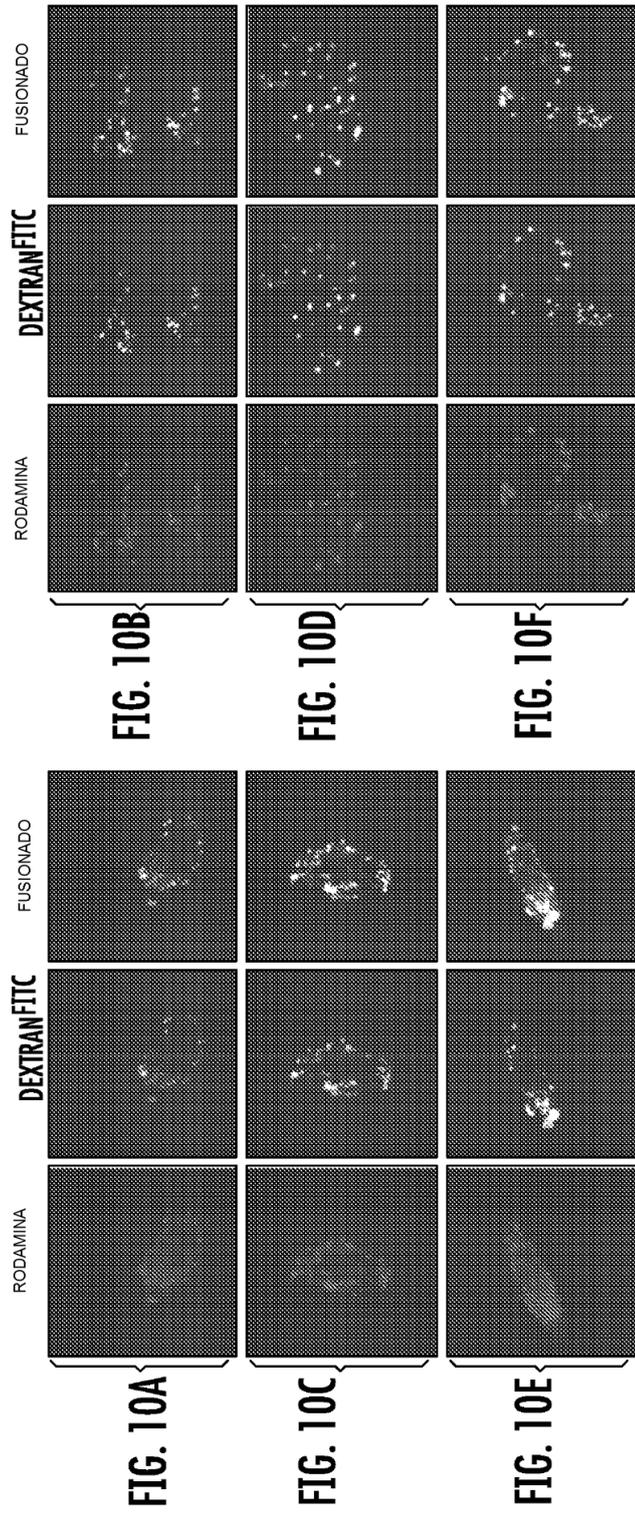


FIG. 9B

FIG. 9C



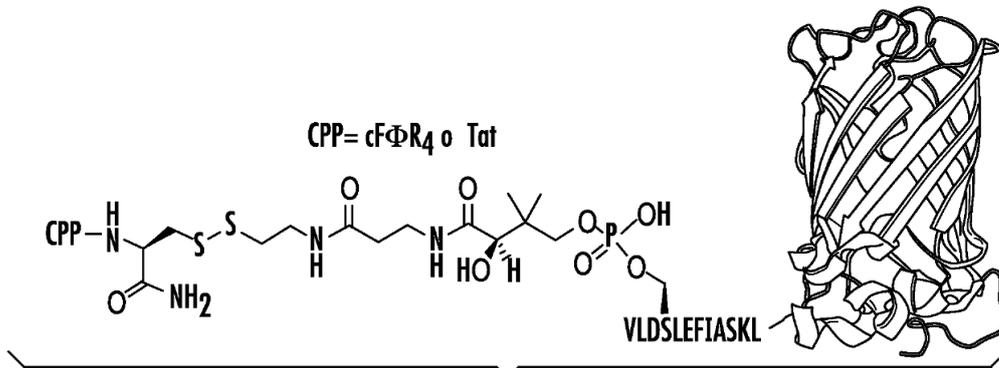


FIG. 11A

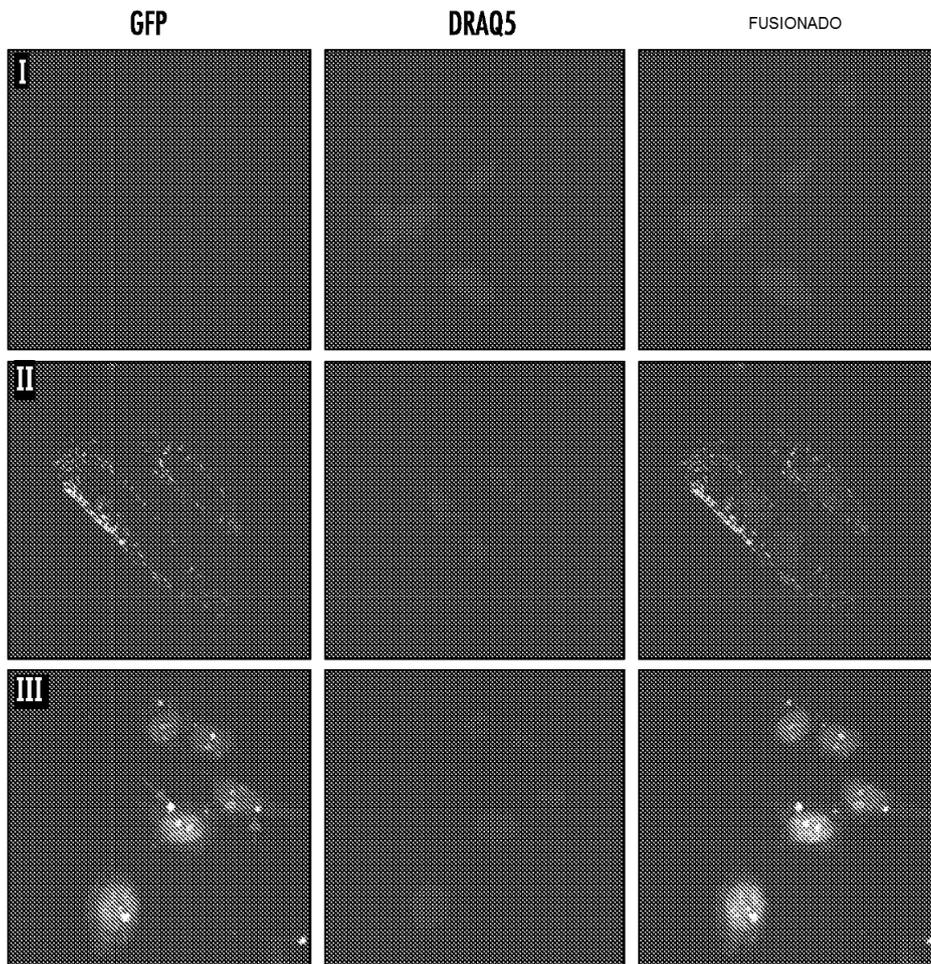


FIG. 11B

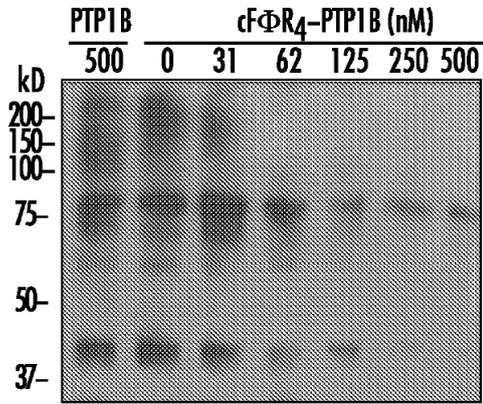


FIG. 12A

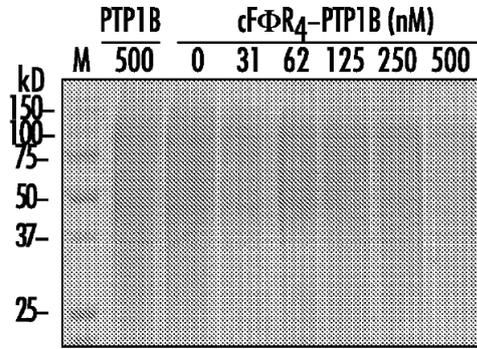


FIG. 12B

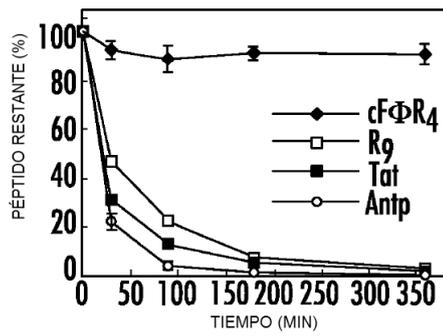


FIG. 13A

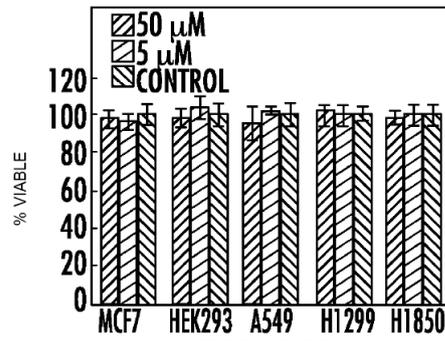


FIG. 13B

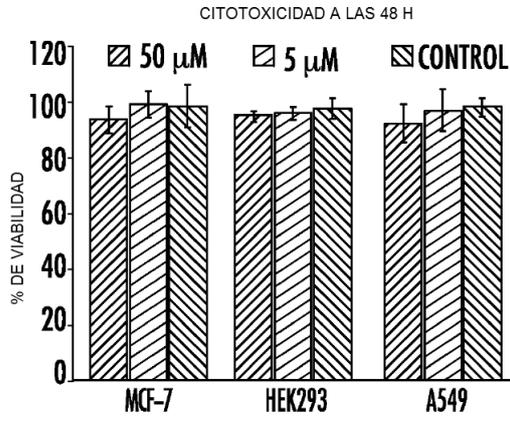


FIG. 14A

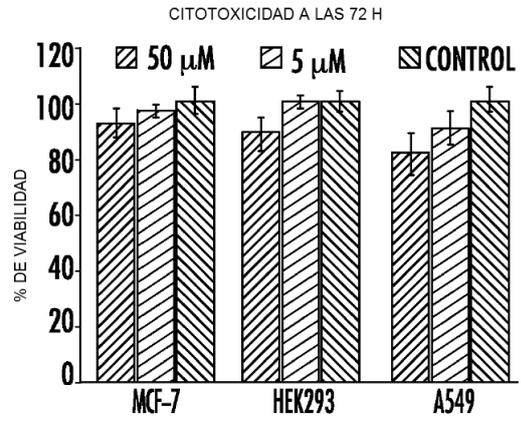


FIG. 14B

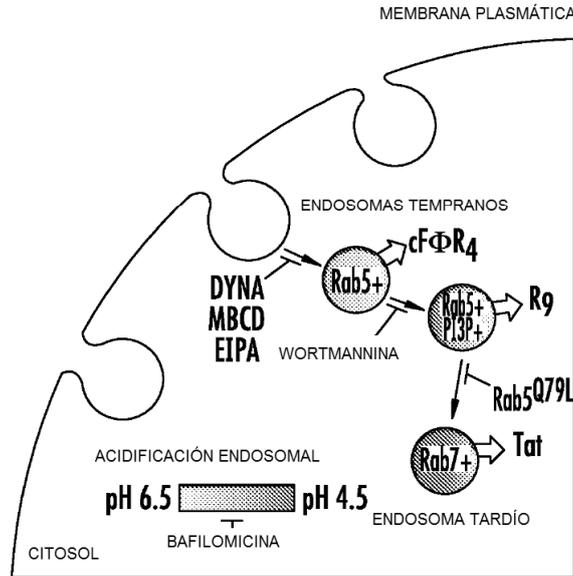


FIG. 15

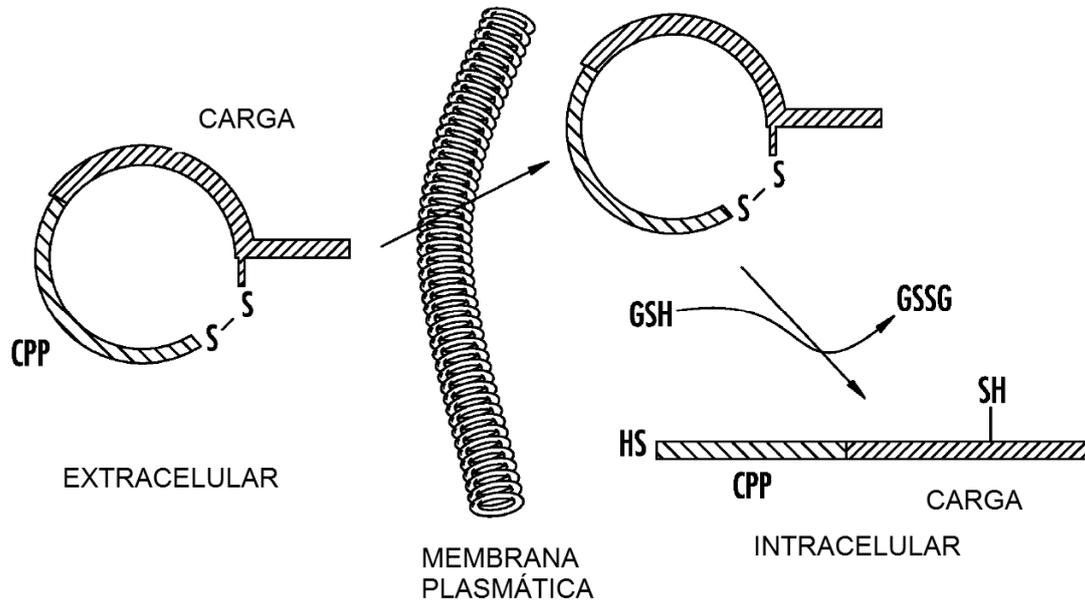


FIG. 16

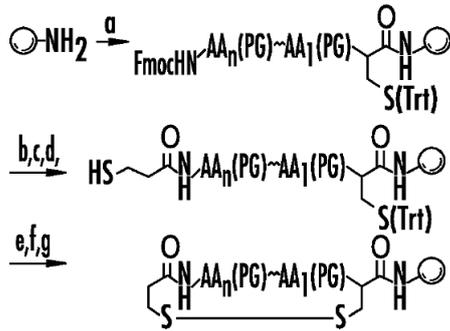


FIG. 17A

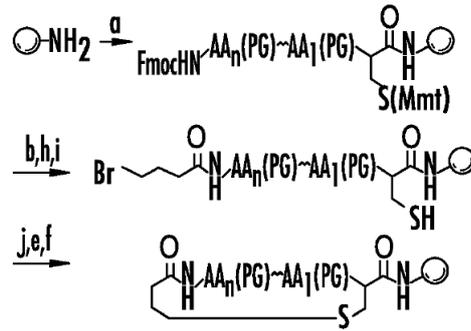


FIG. 17B

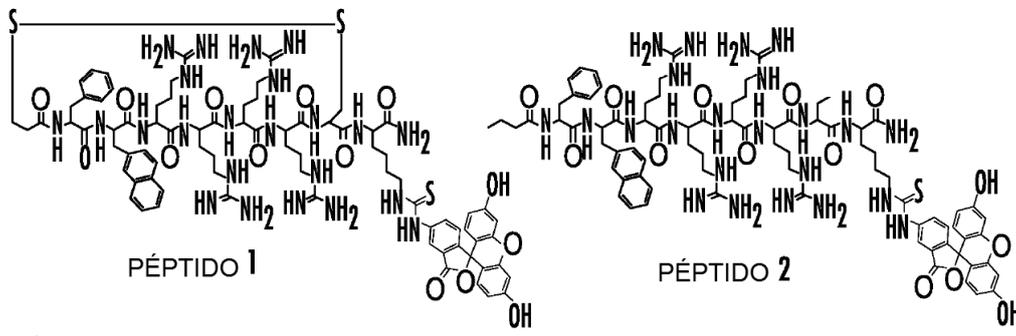


FIG. 17C

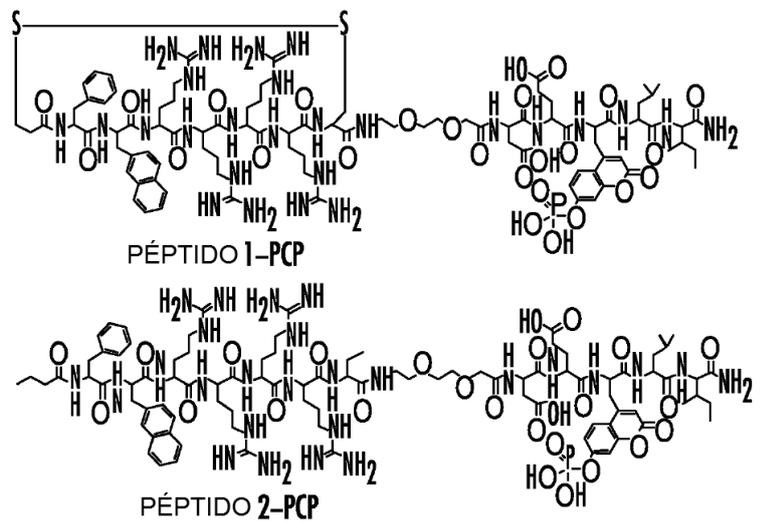
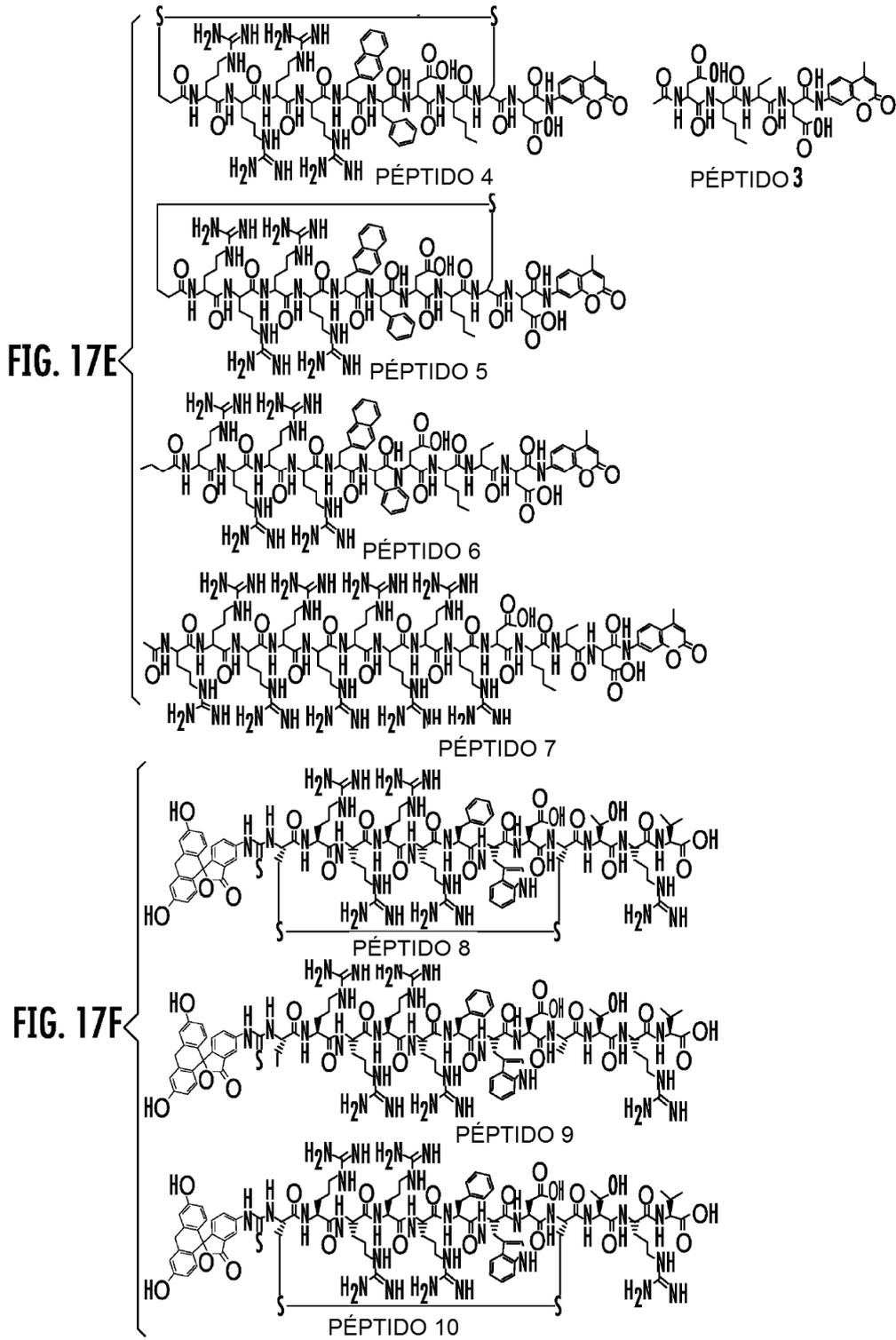
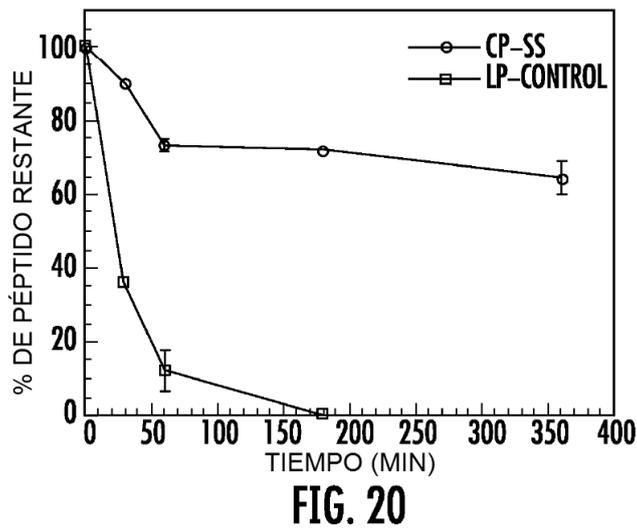
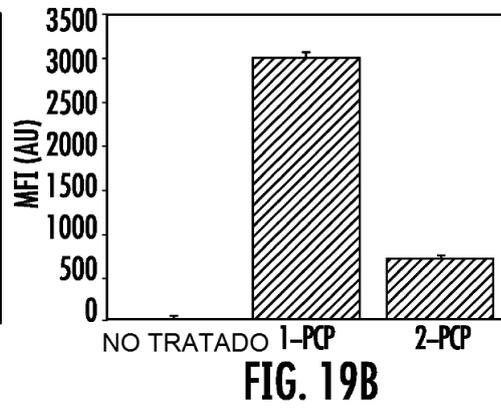
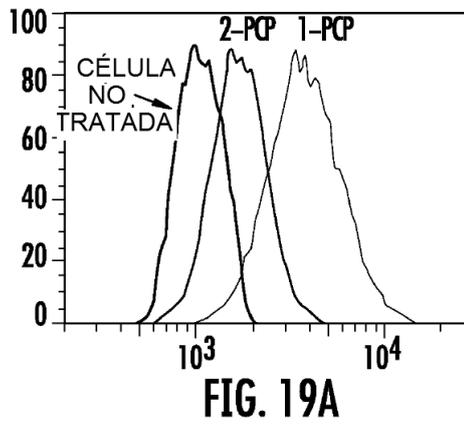
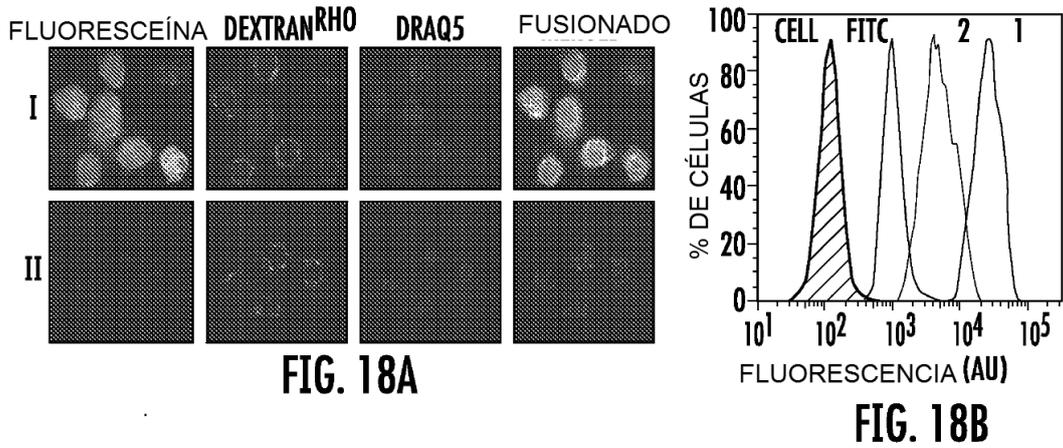


FIG. 17D





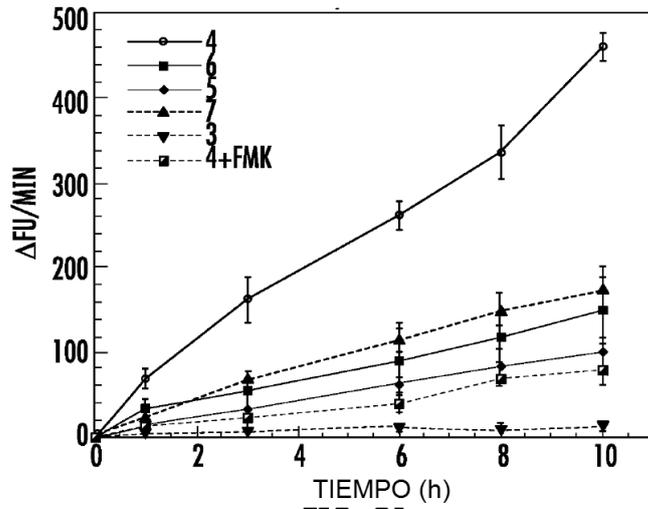


FIG. 21

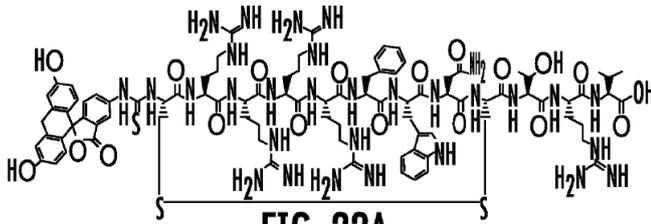


FIG. 22A

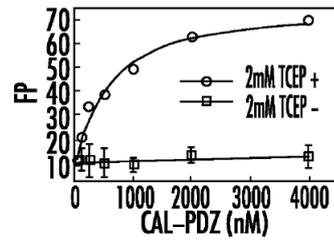


FIG. 22B

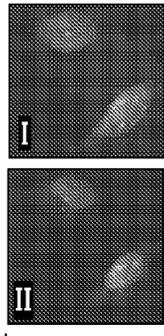


FIG. 22C

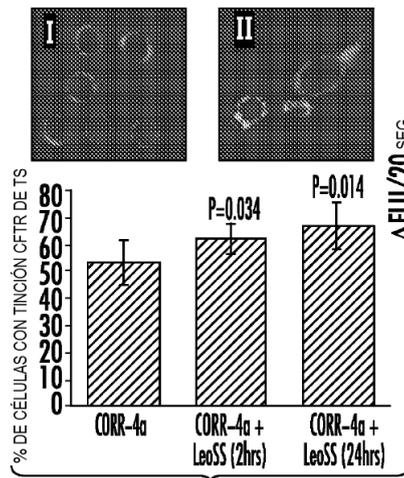


FIG. 22D

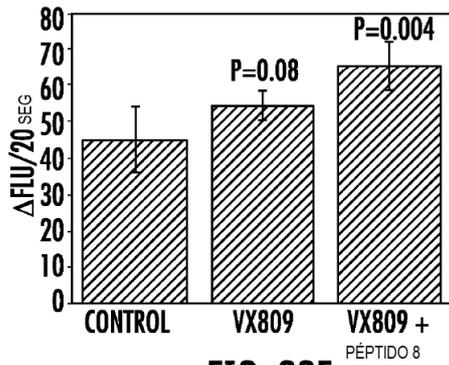


FIG. 22E

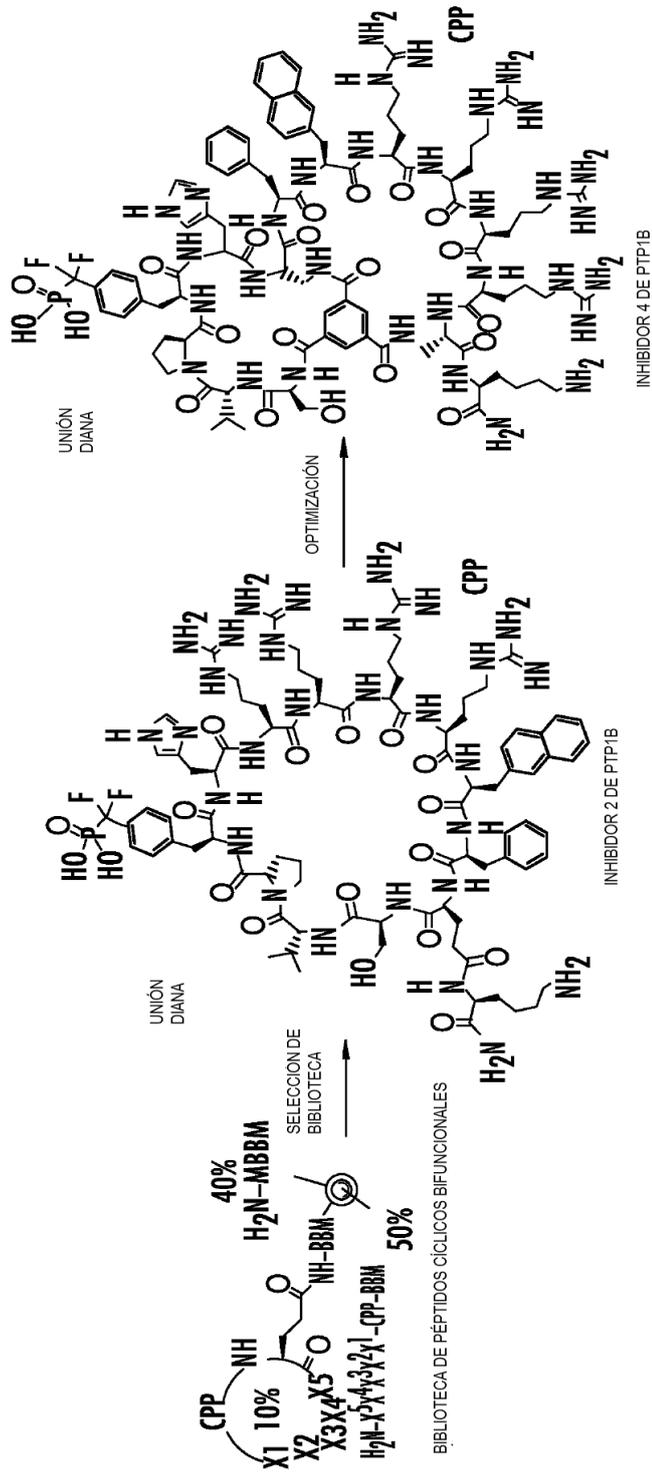


FIG. 23

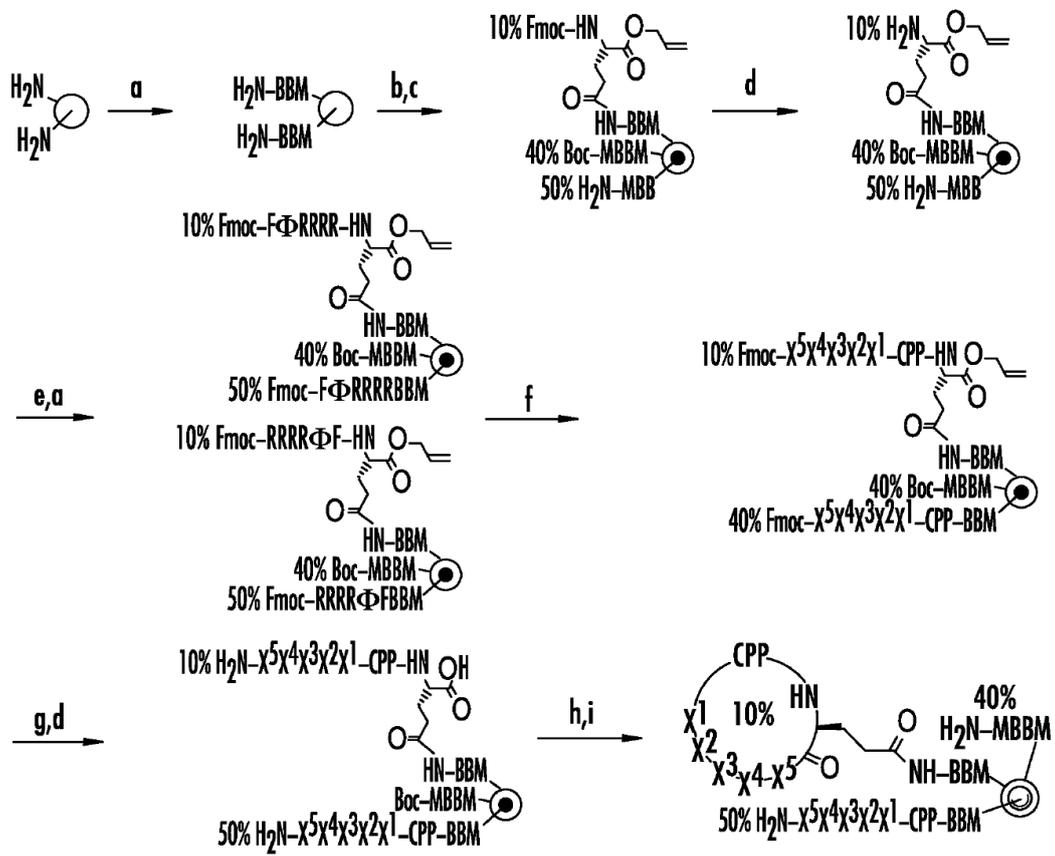


FIG. 24

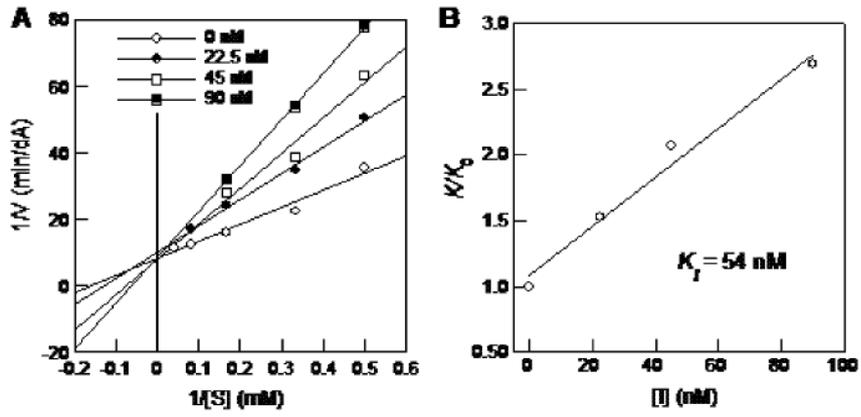


Figura 25

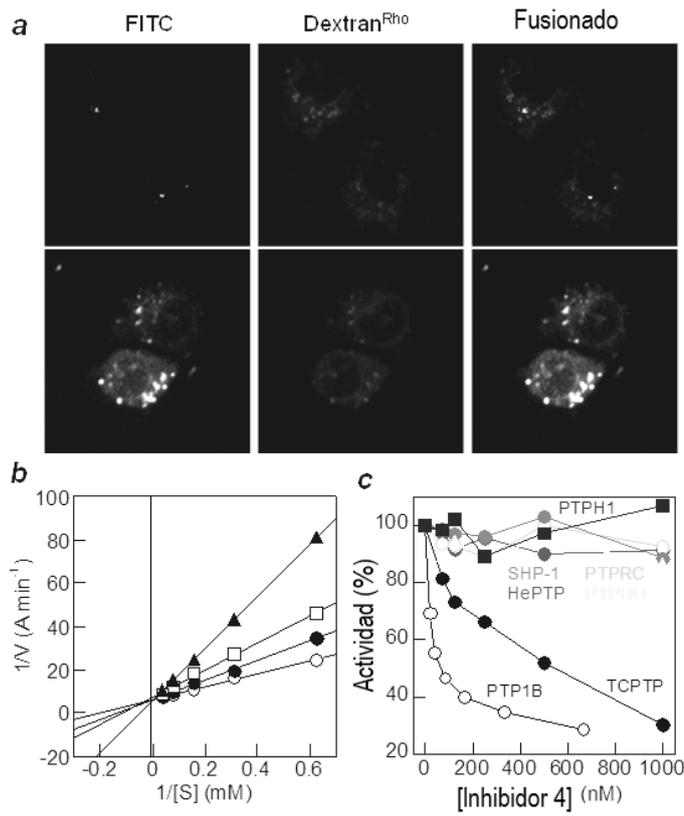


Figura 26

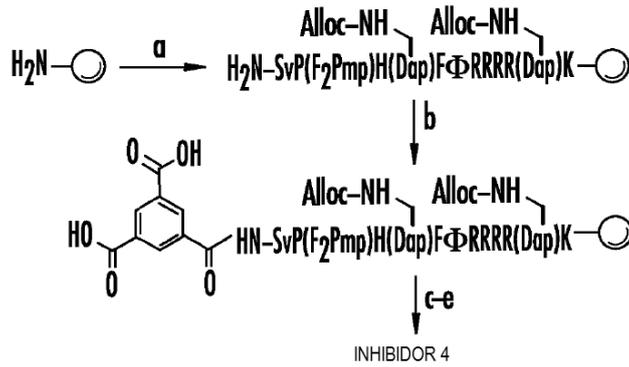


FIG. 27

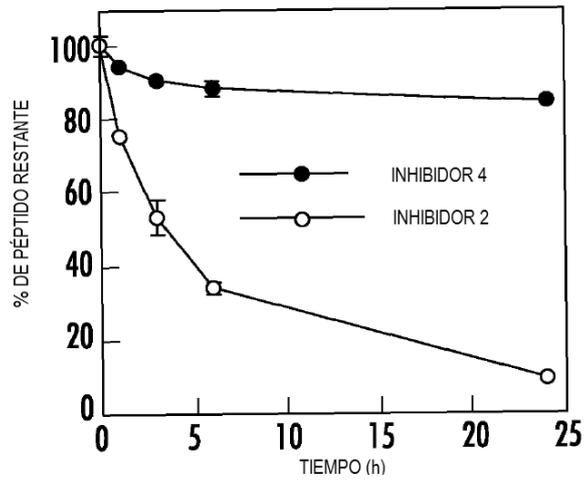


FIG. 28

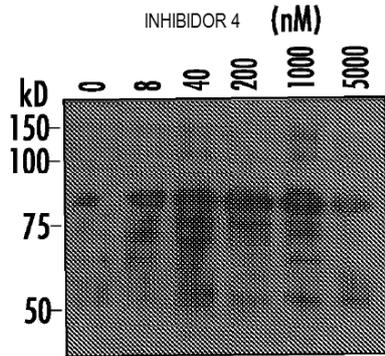


FIG. 29A

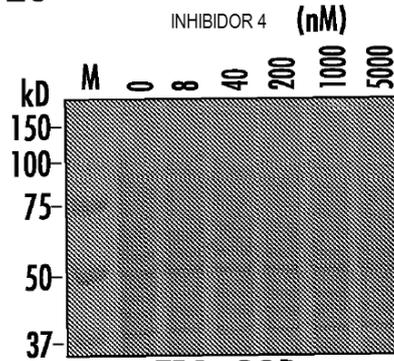


FIG. 29B

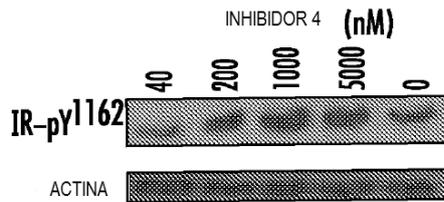


FIG. 29C

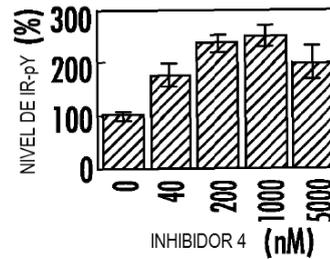


FIG. 29D

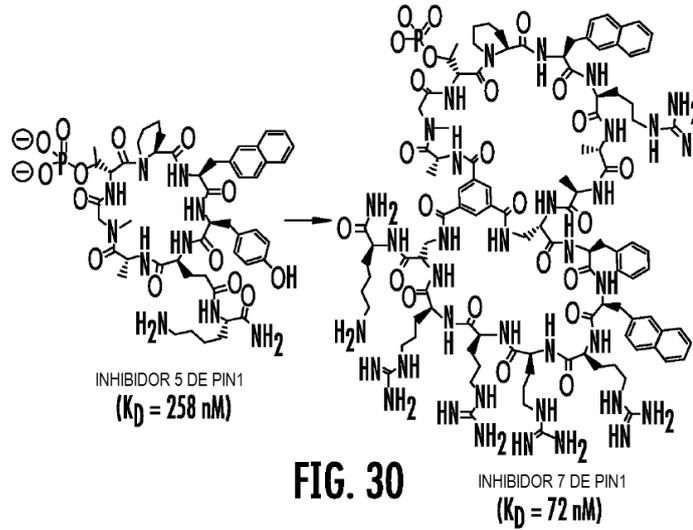


FIG. 30

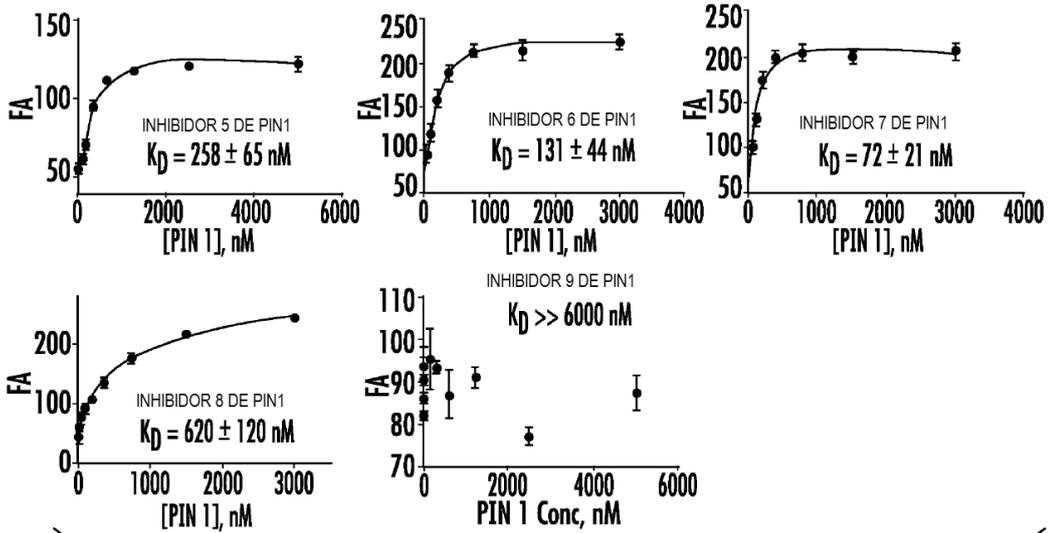


FIG. 31

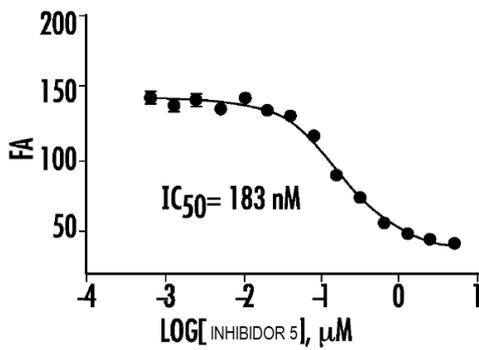


FIG. 32A

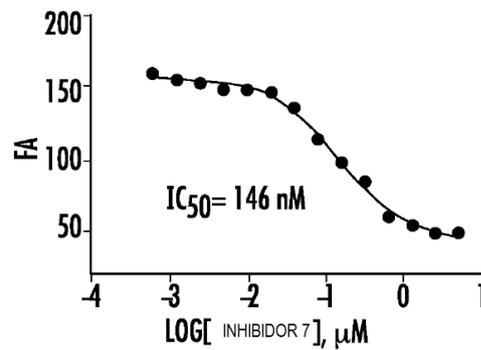
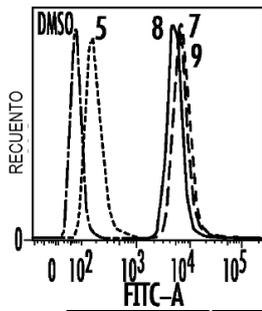
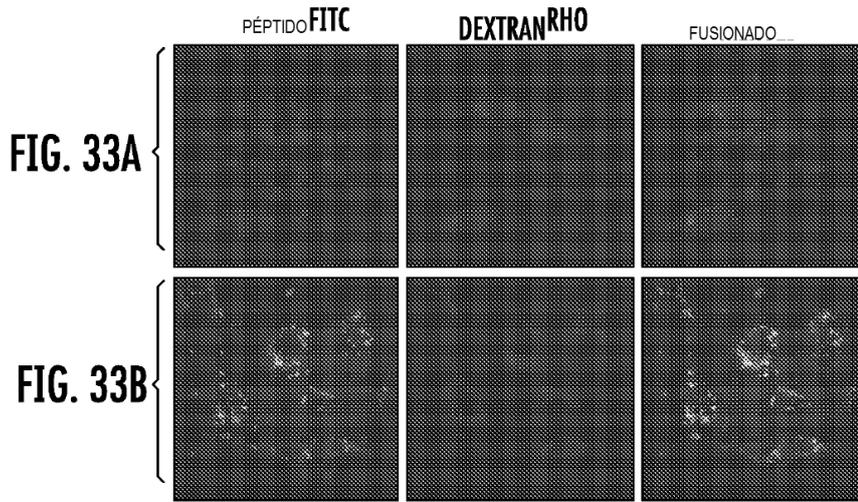


FIG. 32B



| INHIBIDOR DE PIN1 | MFI  |
|-------------------|------|
| INHIBIDOR 9-FITC  | 7655 |
| INHIBIDOR 8-FITC  | 6355 |
| INHIBIDOR 7-FITC  | 7805 |
| INHIBIDOR 5-FITC  | 224  |
| SOLO DMSO         | 76   |

FIG. 33C

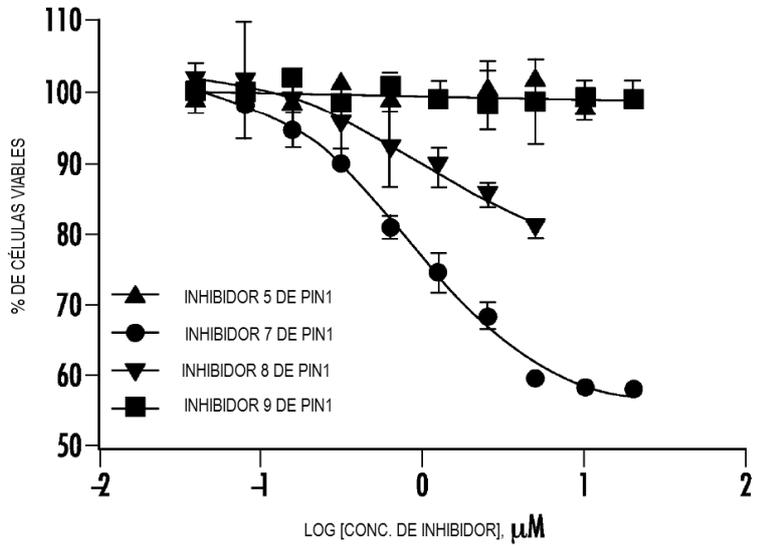


FIG. 34

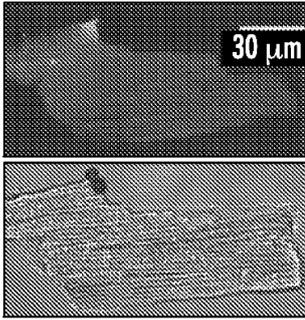


FIG. 35A

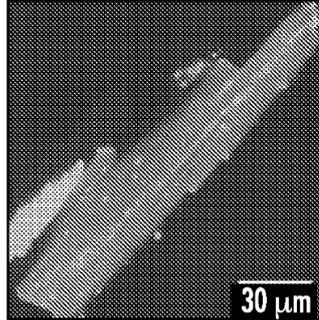
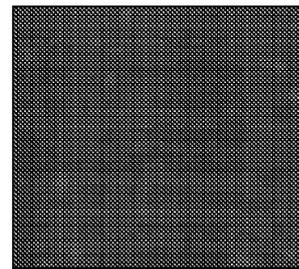
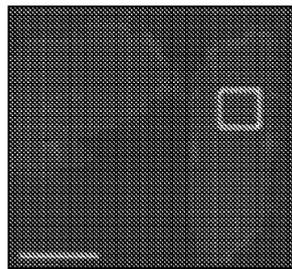
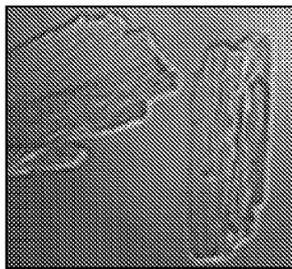
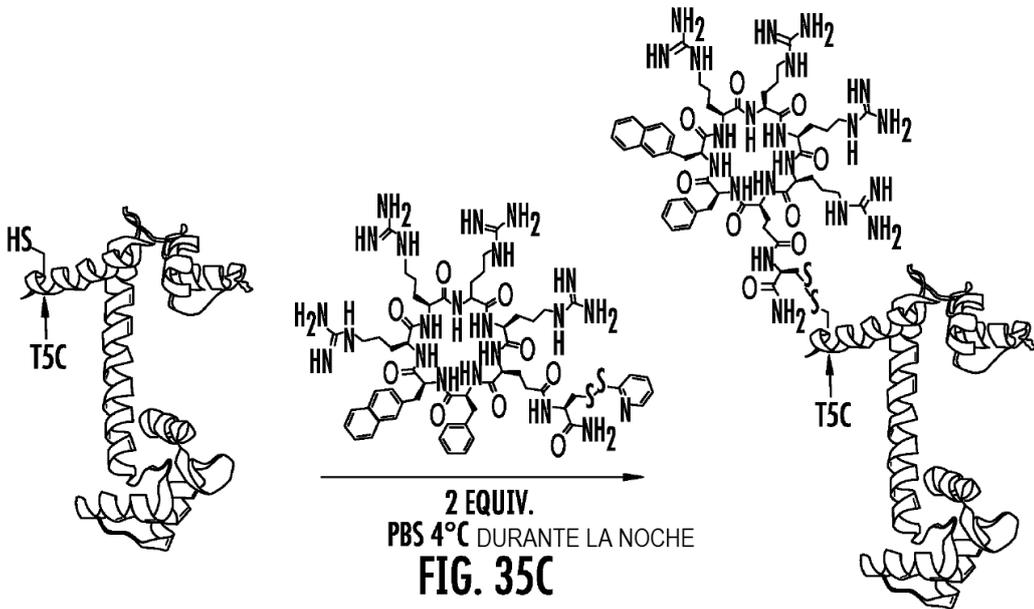
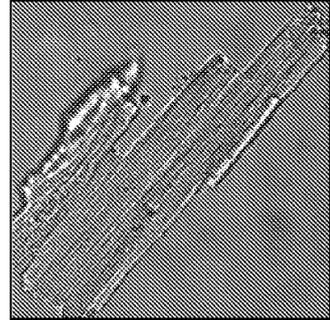


FIG. 35B



50 μm  
FIG. 35D

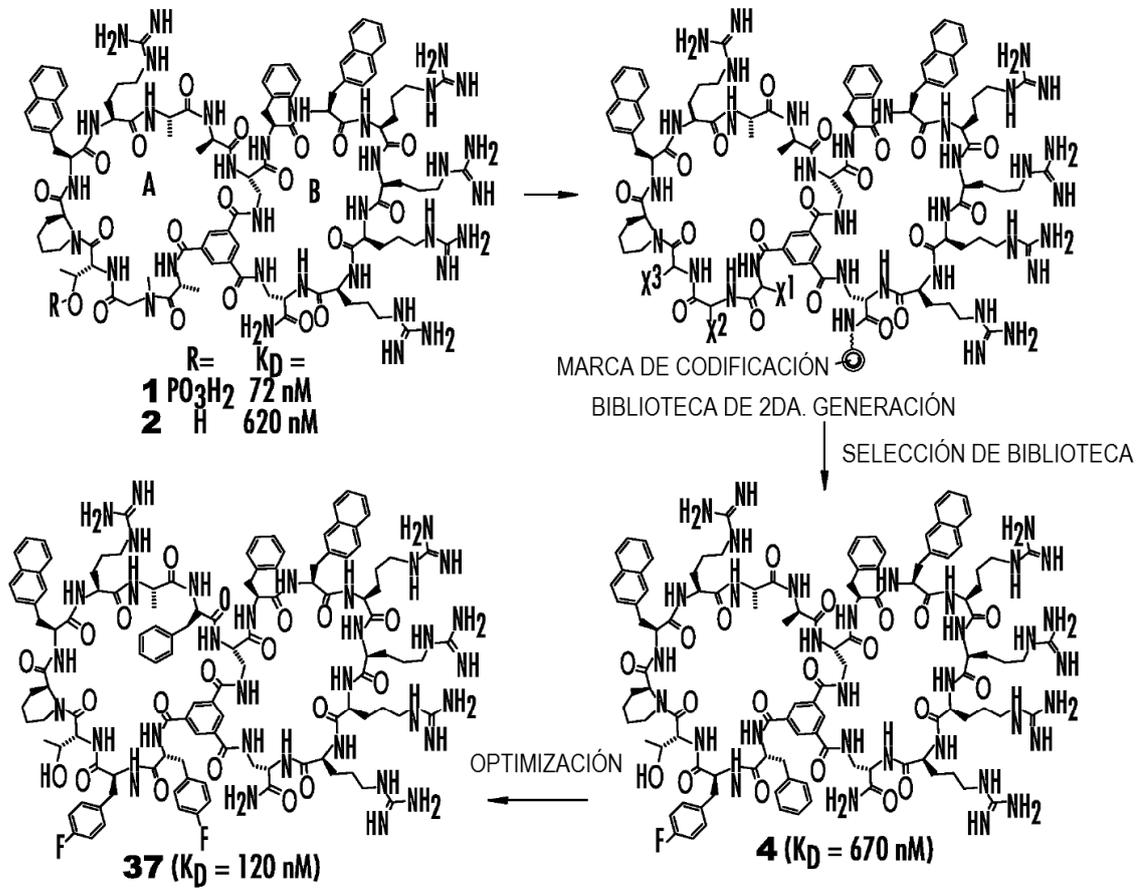


FIG. 36

