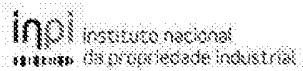

(11) Número de Publicação: **PT 2118123 E**



(51) Classificação Internacional:
C07K 7/54 (2015.01) **C07K 14/47** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2008.01.31**

(30) Prioridade(s): **2007.01.31 US 887526 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.11.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.10.14**
028/2016

(73) Titular(es):

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE
17 QUINCY STREET CAMBRIDGE, MA 02138 US
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. US**

(72) Inventor(es):

LOREN D. WALENSKY	US
STANLEY J. KORSMAYER	US
FEDERICO BERNAL	US
GREGORY L. VERDINE	US

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS DE P53 ESTABILIZADOS E SUAS UTILIZAÇÕES**

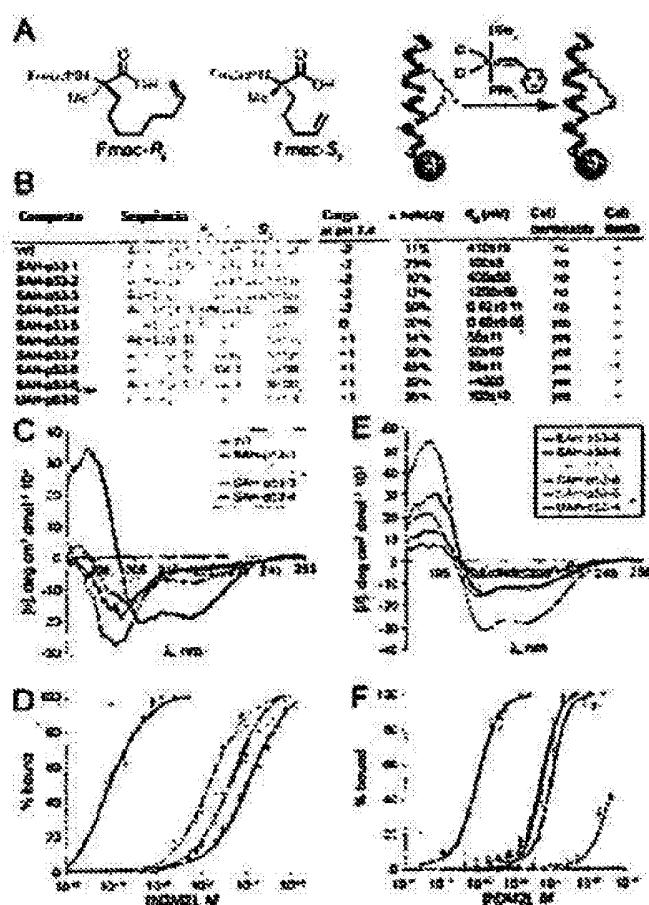
(57) Resumo:

PÉPTIDOS EM LIGAÇÃO RETICULADA RELACIONADOS COM A P53 HUMANA E LIGADOS A HMD2 OU A UM MEMBRO DA FAMÍLIA DE HDM2 UTILIZADO PARA PROMOVER A APOPTOSE, E.G., NO TRATAMENTO DE, E IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES TERAPÊUTICOS QUE SE LIGAM A HMD2 OU A UM MEMBRO DA FAMÍLIA DE HDM2.

RESUMO

"PÉPTIDOS DE P53 ESTABILIZADOS E SUAS UTILIZAÇÕES"

Figura 1



Péptidos em ligação reticulada relacionados com a p53 humana e ligados a HMD2 ou a um membro da família de HDM2 utilizado para promover a apoptose, e.g., no tratamento de, e identificação de agentes terapêuticos que se ligam a HMD2 ou a um membro da família de HDM2.

Descrição**"PÉPTIDOS DE P53 ESTABILIZADOS E SUAS UTILIZAÇÕES"****Antecedentes**

O fator de transcrição de p53 humana induz a paragem do ciclo celular e a apoptose em resposta a lesões do DNA¹ e ao stresse celular², desempenhando desse modo um papel crítico na protecção de células de transformação maligna. A ligase da ubiquitina E3 HDM2 controla os níveis de p53 através de uma interacção de ligação direta que neutraliza a atividade de transactivação de p53, exporta a p53 nuclear, e dirige-a para degradação através da via de ubiquitilação-proteassómica^{3,4}. A perda da atividade de p53, seja por deleção, mutação, ou sobre-expressão de HDM2, é a deficiência mais comum no cancro humano⁵. Os tumores com expressão conservada de p53 de tipo selvagem são tornados vulneráveis por abordagens farmacológicas que estabilizam a p53 nativa. Neste contexto, o direcionamento de HDM2 surgiu como uma abordagem validada para restaurar a actividade de p53 e resensibilizar as células cancerosas para apoptose *in vitro* e *in vivo*⁶. HDMX (HDM4) também foi identificado como um regulador de p53. Para além disso, estudos demonstraram uma semelhança entre a interface de ligação de pS3 de HDM2 e a de HDMX^{6e}.

WO2005/118620; Walensky *et al.* (2004), *Science* 305, 1466-1470; Walensky *et al.* (2006), *Molecular Cell* 24, 199-210 e WO2005/044839 revelam que os péptidos podem ser ciclizados. Picksley *et al* (1994), *Oncogene* 9, 2523-2529 e Uesugi *et al.* (1999) *PNAS* 96, 14801-14806 ilustram a interação de p53 e HDM2.

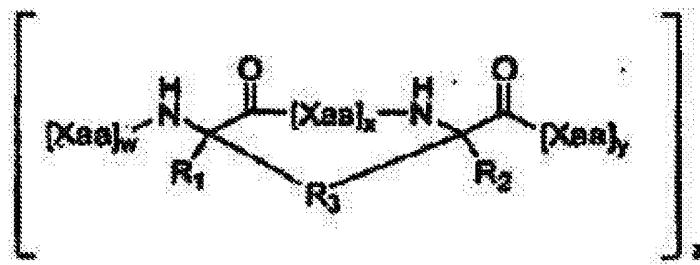
A interação da proteína p53-HDM2 é mediada pelo domínio de transativação de α -hélice de 15 resíduos de p53, que se insere numa fenda hidrofóbica na superfície de HDM2⁷. Três resíduos neste domínio (F19, W23, e L26) são essenciais para a ligação a HDM2^{8,9}.

SUMÁRIO

São descritos abaixo péptidos estáveis de ligação reticulada relacionados com um porção de p53 humano ("péptidos 53 acoplados"). Estes péptidos de ligação reticulada contêm pelo menos dois aminoácidos modificados que em conjunto formam uma ligação reticulada interna (também referida como uma amarra) que pode ajudar a estabilizar a estrutura secundária de alfa-hélice de uma porção de p53 que se pensa ser importante para a ligação de p53 a HDM2. Consequentemente, um polipéptido de ligação reticulada aqui descrito pode possuir uma atividade biológica melhorada em relação ao polipéptido correspondente que não está em ligação reticulada. Pensa-se que os péptidos 53 acoplados interferem com a ligação de p53 a HDM2 inibindo desse modo a destruição de p53. O péptido 53

acoplado aqui descrito pode ser utilizado terapeuticamente, e.g., para tratar uma variedade de cancros num indivíduo. Por exemplo, cancros e outros distúrbios caracterizados por um nível indesejável ou uma atividade baixa de p53 e/ou cancros e outros distúrbios caracterizados por um nível elevado indesejável de atividade de HDM2. Os péptidos modificados também podem ser úteis para o tratamento de qualquer distúrbio associado com a regulação interrompida da via de transcrição de p53, conduzindo a condições de sobrevivência e proliferação celular em excesso (e.g., cancro e autoimunidade), adicionalmente às condições da interrupção inapropriada do ciclo celular e apoptose (e.g., neurodegeneração e deficiência imunitária).

É aqui descrito um polipéptido modificado de Fórmula (I),



Fórmula (I)

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que

cada R₁ e R₂ são independentemente H ou um alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, ci-

cloalquilalquilo, heteroarilalquilo, ou heterociclilalquilo C₁ a C₁₀;

R₃ é alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno, ou [R₄'-K-R₄]_n; cada um dos quais é substituído com 0-6 R₅;

R₄ e R₄' são independentemente alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno (e.g., cada são independentemente um alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ ou C₁₀);

R₅ é halo, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, uma unidade fluorescente, ou a radioisótopo;

K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆, ou



aziridina, episulfureto, diol, amino álcool;

R₆ é H, alquilo, ou um agente terapêutico;

n é 2, 3, 4 ou 6;

x é um inteiro de 2-10;

w e y são independentemente um inteiro de 0-100;

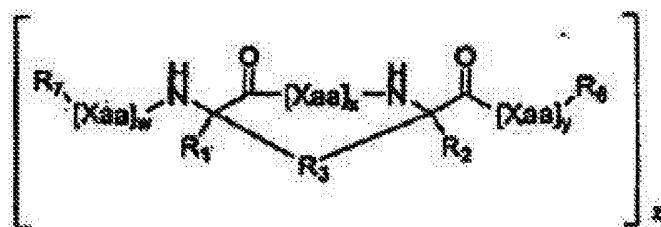
z é um inteiro de 1-10 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); e

cada Xaa é independentemente um aminoácido (e.g., um dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente ou qualquer aminoácido que ocorra não naturalmente); em que o polipéptido compreende pelo menos 8

aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 1 (p53 humano) ou uma sua variante, SEQ ID NO:2 ou uma sua variante, ou outra sequência polipeptídica aqui descrita exceto que: (a) nos 8 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 1 as cadeias laterais de pelo menos um par de aminoácidos separados por 3, 4 ou 6 aminoácidos é substituído pelo grupo de ligação, R₃, que liga os carbonos alfa do par de aminoácidos como apresentado na Fórmula I; e (b) o carbono alfa do primeiro do par de aminoácidos é substituído com R₁ como apresentado na fórmula 1 e o carbono alfa do segundo do par de aminoácidos é substituído com R₂ como apresentado na Fórmula I.

A presente invenção proporciona um polipéptido de hélice alfa que se liga ao duplo do minuto 2 humano (HDM2) e/ou duplo do minuto X humano (HDMX) de Fórmula (I), como apresentado acima em que cada R₃ se estende através de duas voltas da hélice do polipéptido e é independentemente alquíleno, ou alqueníleno ou alquiníleno, x é 6 e em que o polipéptido modificado compreende pelo menos 8 aminoácidos contíguos da sequência Leu₁ Ser₂ Gln₃ Glu₄ Thr₅ Phe₆ Ser₇ Asps Leu₉ Trp₁₀ Lys₁₁ Leu₁₂ Leu₁₃ Pro₁₄ Glu₁₅ Pro₁₄ exceto que as cadeias laterais de Ser₇ e Pro₁₄ são substituídas pelo grupo de ligação R₃, e em que até 6 aminoácidos para além dos aminoácidos portadores do grupo de ligação R₃, Phe₆, Trp₁₀ e Leu₁₃ são independentemente substituídos por qualquer outro aminoácido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

É aqui descrito um polipéptido modificado de Fórmula (II),



Fórmula (II)

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que;

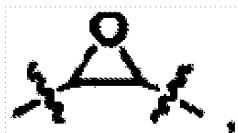
cada R_1 e R_2 são independentemente H ou um alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, ou heterocyclalquilo C₁ até C₁₀;

R_3 é alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno, ou $[R_4'-K-R_4]_n$; cada um dos quais é substituído com 0-6 R_5 ;

R_4 e R_4' são independentemente alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno (e.g., cada um é independentemente um alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ ou C₁₀);

R_5 é halo, alquilo, OR₆, N(R₆)₂, SR₆, SOR₆, SO₂R₆, CO₂R₆, R₆, uma unidade fluorescente, ou um radioisótopo;

K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, CONR₆, ou



aziridina, episulfureto, diol, amino álcool; R₆ é H, alquilo, ou um agente terapêutico; nis2,3,4 ou 6; x é um Inteiro de 2-10; w e y são independentemente um inteiro de 0-100; z é um inteiro de 1-10 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); e cada Xaa é independentemente um aminoácido (e.g., um dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente ou qualquer aminoácidos que ocorre não naturalmente); R₇ é PEG, uma proteína tat, um marcador de afinidade, uma unidade de direcionamento, um grupo acilo derivado de ácido gordo, uma unidade de biotina, uma sonda fluorescente (e.g. fluoresceína ou rodamina) ligado através de, e.g., uma ligação tiocarbamato ou carbamato; R₉ é H, OH, NH₂, NHR_{8a}, NR_{8a}R_{8b}; em que o polipéptido compreende pelo menos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:1 (p53 humana) ou uma sua variante, SEQ ID NO:2 ou uma sua variante, ou outra sequência polipeptídica aqui descrita exceto que: (a) nos 8 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO: 1 as cadeias laterais de pelo menos um par de aminoácidos separados por 3, 4 ou 6 aminoácidos é substituído pelo grupo de ligação,

R_3 , que liga os carbonos alfa do par de aminoácidos como apresentado na fórmula I; e (b) o carbono alfa do primeiro do par de aminoácidos é substituído com R_1 como apresentado na fórmula II e o carbono alfa do segundo do par de aminoácidos é substituído com R_2 como apresentado na fórmula II.

No caso da Fórmula I ou Fórmula II, os seguintes casos estão entre aqueles descritos.

Nos casos em que $x = 2$ (i.e., ligação $i, i + 3$), R_3 pode ser um alquíleno, alqueníleno C₇. Quando é um alqueníleno podem existir uma ou mais ligações duplas. Nos casos em que $x = 6$ (i.e., ligação $i, i + 7$), R_3 pode ser um alquíleno ou alqueníleno C₁₁, C₁₂ ou C₁₃. Quando é um alqueníleno podem existir uma ou mais ligações duplas. Nos casos em que $x = 3$ (i.e., ligação $i, i + 4$), R_3 pode ser um alquíleno, alqueníleno C₈. Quando é um alqueníleno podem existir uma ou mais ligações duplas.

SEQ ID NO:1 é a sequência da p53 humana. Os péptidos acoplados podem incluir a sequência Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn (SEQ ID NO:2; que corresponde aos aminoácidos 14 até 29 da SEQ ID NO:1). O péptido acoplado também pode incluir a sequência Phe Ser Asn Leu Trp Arg Leu Leu Pro Gln Asn (SEQ ID NO:5) ou a sequência Gln Ser Gln Gln Thr Phe Ser Asn Leu Trp Arg Leu Leu Pro Gln Asn (SEQ ID NO:6). Nestas sequências como

na SEQ ID NO:1, 2, 3 e 4), as cadeias laterais de dois aminoácidos separados por 2, 3, 4 ou 6 aminoácidos podem ser substituídas pelo grupo de ligação R₃. Por exemplo, na SEQ ID NO:5, as cadeias laterais de Ser e Pro podem ser substituídas pelo grupo de ligação R₃.

O polipéptido acoplado pode incluir a totalidade ou parte (e.g., pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13) da seguinte sequência de aminoácidos:

Xaa₁Ser₂Gln₃Xaa₄Thr₅Phe₆Xaa₇Xaa₈Leu₉Trp₁₀Xaa₁₁Leu₁₂Leu₁₃Xaa₁₄Xaa₁₅Pro₁₄. (SEQ ID NO:3) em que cada um de Xaa₁, Xaa₄, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₁, Xaa₁₄, Xaa₁₅ são qualquer aminoácido (e.g., qualquer um dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente).

Em algumas situações:

Xaa₁ = Leu ou Gln ou o grupo de ligação R₃

Xaa₄ = Glu ou Gln ou o grupo de ligação R₃

Xaa₇ = Ser ou o grupo de ligação R₃

Xaa₈ = Asp ou qualquer aminoácido diferente de Asp e Glu (preferencialmente Asn; e.g., Xaa₈ pode ser Asp ou Asn) ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₁ = Lys ou um aminoácido com carga positiva (preferencialmente Arg) ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₄ = Pro ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₅ = Glu ou qualquer aminoácido diferente de Asp e Glu (preferencialmente Gln) ou o grupo de ligação R₃.

Em algumas situações, o péptido compreende SEQ ID. NO:3 em que Xaa₁ = Leu ou Gln ou o grupo de ligação R₃; Xaa₄ = Glu ou Gln ou o grupo de ligação R₃; Xaa₇ = Ser ou o grupo de ligação R₃; Xaa₈ = Asp, Asn ou o grupo de ligação R₃; Xaa₁₁ = Lys, Arg ou o grupo de ligação R₃; Xaa₁₄ = Pro ou o grupo de ligação R₃; Xaa₁₅ = Glu, Gln ou o grupo de ligação R₃. Nos péptidos acoplados, qualquer posição ocupada por Gln pode ser Glu como alternativa e qualquer posição ocupada por Glu pode ser Gln como alternativa. De um modo semelhante, qualquer posição ocupada por Asn pode ser Asp em alternativa e qualquer posição ocupada por Asp pode ser Asn em alternativa. A escolha de Asn ou Arg e Gln ou Glu irá depender da carga desejada do péptido acoplado.

Em alguns casos, o péptido compreende uma porção de SEQ ID NO: 3 possuindo a sequência: Gln₃Xaa₄Thr₅Phe₆Xaa₇Xaa₈Leu₉Trp₁₀Xaa₁₁Leu₁₂Leu₁₃ (SEQ ID NO:4).

Na SEQ ID NO:3, os pares de aminoácido que podem estar em ligação reticulada incluem, mas não estão limitados a: o 5° e o 12° aminoácidos; 4° e 11° aminoácidos; 7° e 11° aminoácidos; e 7° e 14° aminoácidos.

Em alguns casos, o péptido modificado liga-se a HDM2 (e.g., GenBank® N° de Acesso: 228952; GI:228952) e/ou HDM4 (também referido como HDMX; GenBank® N° de Acesso: 88702791; GI:88702791). Em alguns casos pode ser útil criar um péptido acoplado inativo substituindo um ou mais (e.g.,

todos três) de Phe₆, Trp₁₀, Leu₁₃ com outro aminoácido, e.g., Ala.

Péptidos úteis adicionais incluem péptidos não ligados reticuladamente possuindo a seguinte sequência de aminoácidos:

Xaa₁Ser₂Gln₃Xaa₄Thr₅Phe₆Xaa₇Xaa₈Leu₉Trp₁₀Xaa₁₁Leu₁₂Leu₁₃Xaa₁₄Xaa₁₅Pro₁₄. (SEQ ID NO:3) em que cada um de Xaa₁, Xaa₄, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₁, Xaa₁₄, Xaa₁₅ são qualquer aminoácido (e.g., qualquer um dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente).

Em alguns casos desses péptidos não ligados reticuladamente:

Xaa₁ = Leu ou Gln ou o grupo de ligação R₃

Xaa₄ = Glu ou Gln ou o grupo de ligação R₃

Xaa₇ = Ser ou o grupo de ligação R₃

Xaa₈ = Asp ou qualquer aminoácido diferente de Asp e Glu (preferencialmente Asn) ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₁ = Lys ou um aminoácido com carga positiva (preferencialmente Arg) ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₄ = Pro ou o grupo de ligação R₃

Xaa₁₅ = Glu ou qualquer aminoácido diferente de Asp e Glu (preferencialmente Gln) ou o grupo de ligação R₃

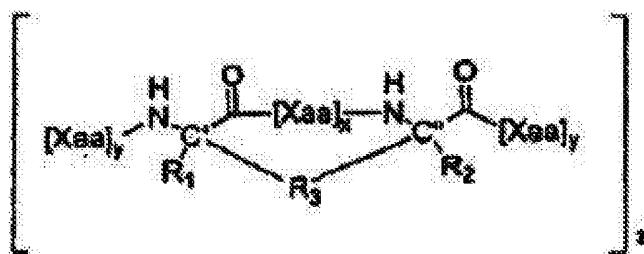
Em alguns casos o péptido não ligado reticuladamente compreende uma porção de SEQ ID NO:3 possuindo a

sequência: Gln₃Xaa₄Thr₅Phe₆Xaa₇Xaa₈Leu₉Trp₁₀Xaa₁₁Leu₁₂Leu₁₃ (SEQ ID NO:4).

Em alguns casos o péptido modificado compreende ainda, por exemplo: PEG, um ácido gordo, ou um anticorpo (*e.g.*, um anticorpo que dirige o péptido modificado para uma célula que expressa p53, HDM2 ou HDM4).

Em alguns casos, cada w é independentemente um inteiro entre 3 e 15. Em alguns casos cada y é independentemente um inteiro entre 1 e 15. Em alguns casos, R₁ e R₂ são cada um independentemente H ou alquilo C₁-C₆. Em alguns casos, R₁ e R₂ são cada um independentemente alquilo C₁-C₃. Em alguns casos, pelo menos um de entre R₁ e R₂ são metilo. Por exemplo R₁ e R₂ são ambos metilo. Em alguns casos R₃ é alquilo (*e.g.*, Ca alquilo) e x é 3. Em alguns casos, R₃ é alquilo C₁₁ e x é 6. Em alguns casos, R₃ é alquenilo (*e.g.*, alquenilo C₈) e x é 3. Em alguns casos x é 6 e R₃ é alquenilo C₁₁. Em alguns casos, R₃ é uma cadeia alquilo, alquenilo, ou alquinilo linear. Em alguns casos R₃ é -CH₂-CH₂-CH₂-CH=CHCH₂-CH₂-CH₂- . Em alguns casos R₃ é -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂- . Em alguns casos R₃ é -CH₂-CH₂-CH₂-CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- .

Em certos casos, os dois estereocentros dissubstituídos alfa, alfa (carbonos alfa) estão ambos na configuração R ou na configuração S (*e.g.*, ligação reticulada i, i+4), ou um estereocentro é R e o outro é S (*e.g.*, ligação reticulada i, i+7). Assim, quando a Fórmula I é apresentada como



os estereocentros dissubstituídos C' e C'' podem estar na configuração R ou pode estar ambos na configuração S, por exemplo quando x é 3. Quando x é 6, o estereocentro dissubstituído C' está na configuração R e o estereocentro dissubstituído C'' está na configuração S. A ligação dupla R_3 pode estar na configuração estereoquímica E ou Z. São possíveis configurações semelhantes para os carbonos na Fórmula II correspondentes a C' e C'' na fórmula apresentada imediatamente acima.

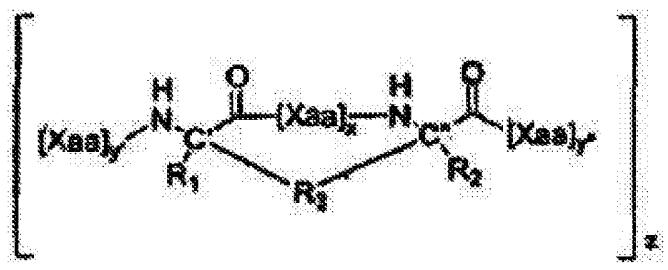
Em alguns casos R_3 é $[R_4-K-R_4']_n$; e R_4 e R_4' são independentemente alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno (e.g., cada um são independentemente um alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 ou C10).

Em alguns casos, o polipéptido inclui uma sequência de aminoácidos que, adicionalmente às cadeias laterais dos aminoácidos que são substituídos por uma ligação reticulada, possuindo 1, 2, 3, 4 ou 5 alterações de aminoácidos em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1-4.

A amarra pode incluir uma unidade alquilo,

alquenilo, ou alquinilo (e.g., alquilo C₅, C₈ ou C₁₁ ou um alquenilo C₅, C₈ ou C₁₁, ou alquinilo C₅, C₈ ou C₁₁). O aminoácido amarrado podem ser dissubstituído em alfa (e.g., C₁-C₃ ou metilo). [Xaa]_y e [Xaa]_w são péptidos que podem compreender independentemente pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 ou mais aminoácidos contíguos (preferencialmente 2 ou 5 aminoácidos contíguos) de um polipéptido p53 (e.g., qualquer uma das SEQ ID NOS: 1-4) e [Xaa]_x é um péptido que pode compreender 3 ou 6 aminoácidos contíguos de ácidos de um péptido p53.

O péptido pode compreender 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 aminoácidos do polipéptido p53. Os aminoácidos são contíguos exceto que um ou mais pares de aminoácidos separados por 3 ou 6 aminoácidos são substituídos por aminoácidos substitutos que formam uma ligação reticulada, e.g., através de R₃. Assim, pelo menos dois aminoácidos podem ser substituídos por aminoácidos amarrados ou aminoácidos substitutos amarrados. Assim, quando a fórmula I é apresentada como



$[Xaa]_y'$, $[Xaa]_x$ e $[Xaa]_y''$ podem compreender cada um sequências de polipéptidos contíguas do mesmo ou de diferentes péptidos p53. O mesmo é verdadeiro para a Fórmula II.

Os péptidos podem incluir 10 (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais) aminoácidos contíguos de um p53 polipéptido em que os carbonos alfa dos dois aminoácidos que são separados por três aminoácidos (ou seis aminoácidos) são ligados através de R₃ um dos dois carbonos alfa é substituído por R₁ e o outro é substituído por R₂ e cada um é ligado através de ligações peptídicas a aminoácidos adicionais.

Em alguns casos, o polipéptido atua como um inibidor negativo dominante da degradação de p53. Em alguns casos, o polipéptido também inclui uma unidade fluorescente ou radioisótopo ou uma unidade que pode quelar um radioisótopo (e.g., mercaptoacetyltriglicina ou 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano-N,N',N'', ácido N'''-tetraacético (DOTA)) quelado para um isótopo radioactivo de Re, In ou Y). Em alguns casos, R₁ e R₂ são metilo; R₃ é alquilo C₈, alquilo C₁₁, alquenilo C₈, alquenilo C₁₁, alquinilo C₈, ou alquinilo C₁₁; e x é 2, 3, ou 6. Em alguns casos, o polipéptido inclui um ligante PEG, uma proteína tat, um marcador de afinidade, uma unidade de direcionamento, um grupo acilo derivado de ácido gordo, uma unidade de biotina, uma sonda fluorescente (e.g. fluoresceína ou rodamina).

É também aqui descrito um método de tratamento de um indivíduo incluindo administrar ao indivíduo qualquer um dos compostos aqui descritos. Em alguns casos, o método também inclui administrar um agente terapêutico adicional, e.g., um agente quimioterapêutico.

Os péptidos podem conter um ou mais centros assimétricos e por isso ocorrem como racematos e misturas racémicas, enantiómeros simples, diastereómeros individuais e misturas diastereoméricas e isómeros geométricos (e.g. Z ou cis e E ou trans) de quaisquer olefinas presentes. Todas essas formas isoméricas destes compostos são expressamente incluídas na presente invenção. Os compostos podem também ser representados em formas tautoméricas múltiplas, nesses casos, a invenção inclui expressamente todas as formas tautoméricas dos compostos aqui descritos (e.g., a alquilação de um sistema em anel pode resultar na alquilação em múltiplos sítios, a invenção inclui expressamente todos esses produtos de reação). Todas essas formas isoméricas desses compostos estão incluídas assim como estão todas as formas de cristal.

Aminoácidos que contêm um grupo amino e um grupo carboxilo ligado a um carbono referido como o carbono alfa. Também ligado ao carbono alfa está um hidrogénio e uma cadeia lateral. Aminoácidos adequados incluem, sem limitação, ambos os isómeros D- e L- dos 20 aminoácidos comuns que ocorrem naturalmente e que se encontram nos péptidos (e.g., A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V (como são conhecidos pelas abreviaturas de

uma letra)) assim como os aminoácidos que ocorrem naturalmente e os aminoácidos que não ocorrem naturalmente preparados por síntese orgânica ou outras vias metabólicas. A tabela abaixo proporciona as estruturas das cadeias laterais para cada um dos 20 aminoácidos comuns que ocorrem naturalmente. Nesta tabela, o “-” no lado direito de cada estrutura é a ligação ao carbono alfa.

Aminoácido	Uma Letra	Três Letras	Estrutura da cadeia lateral
Alanina	A	Ala	CH ₃ -
Arginina	R	Arg	HN=C(NH ₂)-NH-(CH ₂) ₃ -
Asparagina	N	Asn	H ₂ N-C(O)-CH ₂ -
Ácido aspártico	D	Asp	HO(O)C-CH ₂ -
Cisteína	C	Cys	HS-CH ₂
Glutamina	Q	Gln	H ₂ N-C(O)-(CH ₂) ₂ -
Ácido glutâmico	E	Glu	HO(O)C-(CH ₂) ₂ -
Glicina	G	Gly	H-
Histidina	H	His	N-CH-NH-CH=O-CH₃-
Isoleucina	I	Ile	CH ₃ -CH ₂ CH(CH ₃)-
Leucina	L	Leu	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -
Lisina	K	Lys	H ₂ N-(CH ₂) ₄ -
Metionina	M	Met	CH ₃ -S-(CH ₂) ₂ -
Fenilalanina	F	Phe	Fenil-CH ₂ -
Prolina	P	Pro	-N-(CH₂)₃-CH-
Serina	S	Ser	HO-CH ₂ -
Treonina	T	Thr	CH ₃ -CH(OH)-
Triptofano	W	Trp	Phenyl-NH-CH=O-CH₂-
Tirosina		Tyr	4-OH-Fenil-CH ₂ -
Valina	V	Val	CH ₃ -CH(CH ₂)-

Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência de tipo selvagem de um polipéptido (sem abolir ou alterar substancialmente a sua atividade). Um resíduo de aminoácido "essencial" aminoácido é um resíduo que, quando alterado a partir da sequência do polipéptido de tipo selvagem, resulta na abolição ou substancialmente abolição da atividade do polipéptido.

Uma "substituição de aminoácido conservadora" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que possui uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos que possuem cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (e.g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (e.g., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (e.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (e.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (e.g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e.g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

O símbolo "", quando utilizado como parte de uma estrutura molecular refere-se a uma ligação simples ou uma ligação dupla *trans* ou *cis*.

O termo "cadeia lateral do aminoácido" refere-se a uma unidade ligada ao carbono α num aminoácido. Por exemplo, a cadeia lateral do aminoácido para a alanina é metilo, a cadeia lateral do aminoácido para a fenilalanina é fenilmetilo, a cadeia lateral do aminoácido para a cisteína é tiometilo, a cadeia lateral do aminoácido para o aspartato é carboximetilo, a cadeia lateral do aminoácido para a tirosina é 4-hidroxifenilmetilo, etc. Outras cadeias laterais de aminoácidos que não ocorrem naturalmente estão também incluídas, por exemplo, aquelas que ocorrem na natureza (e.g., um metabolito de aminoácido) ou aquelas que são produzidas sinteticamente (e.g., um aminoácido dissubstituído em alfa).

O termo polipéptido engloba dois ou mais aminoácidos que ocorrem naturalmente ou sintéticos ligados por uma ligação covalente (e.g., uma ligação amida). Polipéptidos como aqui descritos incluem proteínas de comprimento total (e.g., proteínas totalmente processadas) assim como sequências de aminoácidos mais curtas (e.g., fragmentos de proteínas que ocorrem naturalmente ou fragmentos de polipéptidos sintéticos).

O termo "halo" refere-se a qualquer radical de flúor, cloro, bromo ou iodo. O termo "alquilo" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto que pode ser uma cadeia linear ou cadeia ramificada, contendo o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₁-C₁₀ indica que o grupo pode

possuir na sua composição desde 1 até 10 (inclusivamente) átomos de carbono. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquil" é uma cadeia (linear ou ramificada) possuindo 1 até 20 (inclusivamente) átomos de carbono na sua composição. O termo "alquileno" refere-se a um alquilo divalente (*i.e.*, -R-).

O termo "alquenilo" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto que pode ser uma cadeia linear ou cadeia ramificada possuindo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono nas configurações geométricas Z ou E. A unidade alquenilo contém o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₂-C₁₀ indica que o grupo pode possuir desde 2 até 10 (inclusivamente) átomos de carbono na sua composição. O termo "alquenilo inferior" refere-se a uma cadeia alquenilo C₂-C₈. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquenilo" é uma cadeia (linear ou ramificada) que possui 2 até 20 (inclusivamente) átomos de carbono na sua composição.

O termo "alquinilo" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto que pode ser uma cadeia linear ou cadeia ramificada que possui uma ou mais ligações triplas carbono-carbono. As unidades alquinilo contêm o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₂-C₁₀ indica que o grupo pode possuir desde 2 até 10 (inclusivamente) átomos de carbono na sua composição. O termo "alquinilo inferior" refere-se a uma cadeia alquinilo C₂-C₈. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquinilo," é uma cadeia

(linear ou ramificada) possuindo 2 até 20 (inclusivamente) átomos de carbono na sua composição.

O termo "arilo" refere-se a um sistema de anel aromático monocíclico de 6-carbonos ou bicíclico de 10-carbonos em que 0, 1, 2, 3, ou 4 átomos de cada anel podem ser substituídos por um substituinte. Exemplos de grupos arilo incluem fenilo, naftilo e afins. O termo "arilalquilo" ou o termo "aralquilo" refere-se a alquilo substituído com um arilo. O termo "arilalcoxilo" refere-se a um alcoxilo substituído com arilo.

O termo "cicloalquilo", como aqui empregue, inclui grupos de hidrocarboneto cílico saturados e parcialmente insaturados possuindo 3 a 12 carbonos, preferencialmente 3 a 8 carbonos, e de um modo preferido 3 a 6 carbonos, em que o grupo cicloalquilo pode ser adicionalmente opcionalmente substituído. Grupos cicloalquilo preferidos incluem, sem limitação, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclo-hexilo, ciclohexenilo, ciclo-heptilo, e ciclooctilo.

O termo "heteroarilo" refere-se a sistema em anel monocíclico aromático de 5-8 membros, bicíclico de 8-12 membros, ou tricíclico de 11-14 membros, possuindo 1-3 heteroátomos se for monocíclico, 1-6 heteroátomos se for bicíclico, ou 1-9 heteroátomos se for tricíclico, sendo os referidos heteroátomos selecionados a partir de O, N, ou S (e.g., átomos de carbono e 1-3, 1-6, ou 1-9 heteroátomos de

N, O, ou S se for monocíclico, bicíclico, ou tricíclico, respetivamente), em que 0, 1, 2, 3, ou 4 átomos de cada anel podem ser substituídos por um substituinte. Exemplos de grupos heteroarilo incluem piridilo, furilo ou furanilo, imidazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, benzimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo ou tienilo, quinolinilolo, indolilo, tiazolilo, e semelhantes. O termo "heteroarylalquilo" ou o termo "heteroaralquilo" refere-se a um alquilo substituído com um heteroarilo. O termo "heteroarilalcoxilo" refere-se a um alcoxilo substituído com heteroarilo.

O termo "heterociclico" refere-se a um sistema de anel não aromático monocíclico de 5-8 membros, bicíclico de 8-12 membros, ou tricíclico de 11-14 membros possuindo 1-3 heteroátomos se for monocíclico, 1-6 heteroátomos se for bicíclico, ou 1-9 heteroátomos se for tricíclico, sendo os referidos heteroátomos selecionados a partir de O, N, ou S (e.g., átomos de carbono e 1-3, 1-6, ou 1-9 heteroátomos de N, O, ou S se for monocíclico, bicíclico, ou tricíclico, respetivamente), em que 0, 1, 2 ou 3 átomos de cada anel podem ser substituídos por um substituinte. Exemplos de grupos de heterociclico incluem piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, aziridinilo, oxirilo, tiirilo, morfolinilo, tetra-hidrofuranilo, e semelhantes.

O termo "substituintes" refere-se a um grupo "substituído" num grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclico, ou heteroarilo em qualquer átomo desse grupo.

Substituintes adequados incluem, sem limitação, grupos halo, hidroxilo, mercapto, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxilo, tioalcoxilo, ariloxilo, amino, alcoxicarbonilo, amido, carboxilo, alcanossulfonilo, alquilcarbonilo, azido, e ciano.

Os detalhes de uma ou mais formas de realização da invenção são apresentados nas figuras acompanhantes e na descrição abaixo. Outras características, objetos, e vantagens da invenção serão óbvios a partir da descrição e das figuras, e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG 1 Síntese, Sequência, e Análise Bioquímica dos péptidos SAH-p53. (A) Os aminoácidos não naturais foram sintetizados como descrito e ligados reticuladamente por metátese de olefina de anel fechado catalisada por ruténio. (B) Os compostos SAH-p53 foram criados acoplando a sequência de p53₁₄₋₂₉ nas posições indicadas. A carga, α-helicidade, afinidade de ligação a HDM2, permeabilidade celular, e viabilidade celular são indicadas para cada composto. (C, E) Espetro de dicroísmo circular revelou aumento da alfa-helicidade para os compostos SAH-p53. (D, F) os ensaios de polarização de fluorescência utilizando FITC-péptidos e HDM2₁₇₋₁₂₅ demonstraram afinidades de ligação a HDM2 subnanomolares para selecionar SAH-péptidos p53. Nota: UAH-p53-8 é a forma "não acoplada" de SAH-p53-8.

FIG 2 SAH-p53-8 Reativa A Via de Transcrição de p53. HDM2 que sobre-expressa células SJSA-1 foram expostos aos péptidos indicados e foram efectuadas análises de Western para p53, HDM2 e p21 às 8-30 h de tratamento.

FIG 3 Reativação da Apoptose em Células SJSA-1 tratadas com SAH-p53-8. SAH-p53-8 demonstrou citotoxicidade dependente da dose, específica, e indução de apoptose. Ensaio de viabilidade celular de células SJSA-1 tratadas com SAH-péptidos p53 (A). Ensaio de ativação da caspase-3 de células SJSA-1 tratadas com SAH-péptidos p53 (B). Comparaçao da ativação da caspase-3 em células SJSA-1, HCT-116 p53^{+/+}, e HCT-116 p53^{-/-} tratadas com SAH-p53-péptidos (25 µM) (C).

FIG. 4 Espetro de massa por eletroaspersão (modo de ião positivo) do péptido SAH-p53-4.

FIG. 5 Para determinar se os SAH-péptidos p53 possuem estabilidade proteolítica aumentada, o p53₁₄₋₂₉ péptido de tipo selvagem e SAH-p53-4 foram expostos a soro ex vivo. SAH-pS3-4 apresentou uma semi-vida no soro ($t_{1/2}$) quase quarto vezes mais longa do que a do péptido de tipo selvagem não modificado.

FIG. 6 Para determinar se os SAH-péptidos p53 1-4 tinham permeabilidade celular, foram incubadas células de leucemia Jurkat T com péptidos p53 fluoresceínados durante 4 horas seguido por lavagem, tripsinização, e análise de

FACS para avaliar a fluorescência celular. Nenhum dos péptidos testados produziu fluorescência celular.

FIG. 7 (A) Células SJSA-1 foram tratadas com FITC-SAH-p53-5 e 4.4 kDa TRITC-dextrano durante 4 horas. A microscopia confocal revelaram co-localização de FITC-SAH-p53-5 péptido com TRITC-dcxttan em pinossomias. (B) Para avaliar se a permeabilidade de FITC-SAH-p53-5 era dependente da temperatura, as células de leucemia Jurkat T-cell foram incubadas com péptidos p53 fluoresceínados durante 4 horas a 4 °C ou a 37 °C seguido por lavagem, tripsinização, e análise de FACS para avaliar a fluorescência celular. (C) Para determinar a cinética da permeabilidade celular, as células de leucemia Jurkat T-cell foram expostas ao péptido FITC-SAH-p53-5 e a fluorescência celular foi avaliada por análise de FACS de pontos de tempo sucessivos. As células tratadas com FITC-SAH-p53-5 apresentaram um aumento dependente do tempo na fluorescência celular. (D) As células SJSA-1 foram tratadas com péptidos FITC-tipo selvagem, SAH-p53-8, e SAH-p53-BP-8_{F19A} durante 4 horas seguido por FACS e microscopia confocal. Foi observada fluorescência celular após tratamento com FITC-SAH-péptidos p53, mas não com o péptido FITC-tipo selvagem p53.

FIG. 8 As células SJSA-1 foram incubadas com FITC-péptidos seguido por lise e abaixamento anti-FITC. HDM2 nativo co-imunoprecipitou com FITC-SAH-p53-8 mas não com péptidos de tipo selvagem ou mutantes SAH-p53-8_{F19A}.

Esquerda: gel corado com prata; direita: Transferências de Western.

FIG. 9 Ligação a anexina V como um indicador de apoptose. As células RKO foram tratadas com péptidos a diferentes doses durante 24 horas seguido por coloração com iodeto de propídio e anexina V marcada com FITC. A indução da apoptose foi quantificada por FACS e os dados analisados com o software FloJo.

FIG.10 Ensaio de ligação da polarização de fluorescência de péptidos acoplados. Os péptidos fluoresceínados (5 nM) foram incubados com HDM₁₇₋₁₂₅ recombinante (25 pM - 10 µM) à temperatura ambiente. A atividade de ligação foi medida por polarização de fluorescência, e os valores de Kd foram obtidos por regressão linear.

FIG.11 Ensaio de viabilidade celular. As células de osteossarcoma SJSA-1 foram tratadas com diferentes concentrações de SAH-p53-8 isoladamente ou em combinação com o agente quimioterapêutico doxorrubicina (20 µM) durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através da adição de reagente de bioluminescência CellTiter-Glo™ e leitura num leitor de placas.

FIG. 12 Competição por polarização de fluorescência. p53₁₄₋₂₉ (25 nM) fluoresceínado, de tipo selvagem foi incubado com HDM₁₇₋₁₂₅ recombinante. SAH-p53s

não marcados foram titulados na mistura, e o deslocamento do ligando marcado foi medido por polarização de fluorescência.

FIG. 13 Ensaio da ativação da caspase-3. As células de osteossarcoma SJSA-1 foram tratadas com diferentes concentrações de SAH-p53s durante 24 h. As células foram então expostas a um substrato específico da caspase-3 (Ac-DEVD-AMC). A fluorescência como um resultado da clivagem foi medida num leitor de microplacas. Para determinar a especificidade da atividade, certos péptidos foram incubados ao lado de DEVD-CHO, um substrato conhecido para inibir especificamente a caspase-3.

FIG. 14 Imuno-histoquímica em xenoenxertos de tumor de murganhos. Dois murganhos, cada um contendo três xenoenxertos de tumor derivado de SJSA-I foram tratados com 10 mg kg⁻¹ SAH-p53-8 (A) ou veículo (B) a cada 12 horas durante dois dias. Foram obtidos cortes em parafina a partir de xenoenxertos de tumor e foram corados utilizando um anticorpo de α -p53. A deficiência em p53 devido à amplificação de HDM2 é evidenciada no controlo não tratado (B), enquanto a acumulação de p53 próxima dos capilares é observada na amostra tratada com SAH-p53-8 (A).

FIG. 15 Sequência de aminoácidos de p53 humana (GenBank® N° de Acesso CAA42627; gi:50637).

FIG. 16 Sequências de vários péptidos acoplados.

DESCRIÇÃO DETALHADA

São aqui descritos internamente polipéptidos do domínio da hélice alfa de ligação reticulada relacionados com o p53 humano. Os polipéptidos incluem a amarra (também denominada ligação reticulada) entre dois aminoácidos não naturais que aumentam significativamente a estrutura secundária da hélice alfa do polipéptido. De um modo geral, a amarra ou ligação reticulada (por vezes referida como a amarra) estende-se através do comprimento de uma ou duas voltas helicoidais (*i.e.*, cerca de 3,4 ou cerca de 7 aminoácidos). Consequentemente, os aminoácidos posicionados a i e $i+3$; i e $i+4$; ou i e $i+7$ são candidatos ideais para a modificação química e ligação cruzada. Assim, por exemplo, quando um péptido possui a sequência ...Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉... (em que "..." indica a presença opcional de aminoácidos adicionais), ligações reticuladas entre Xaa₁ e Xaa₄, ou entre Xaa₁ e Xaa₅, ou entre Xaa₁ e Xaa₈ são úteis como são ligações reticuladas entre Xaa₂ e Xaa₅, ou entre Xaa₂ e Xaa₆, ou entre Xaa₂ e Xaa₉, etc. Os polipéptidos podem incluir mais do que uma ligação reticulada na sequência polipeptídica para estabilizar a sequência ou facilitar a estabilização de porções de polipéptido mais longas. Se os polipéptidos são demasiado longos para serem rapidamente sintetizados numa parte, independentemente sintetizada, os péptidos ligados reticuladamente podem ser conjugados por uma técnica designada por ligação química nativa (Bang, *et al.*, *J. Am. Chem Soc.* 126:1377).

São aqui descritos péptidos da hélice alfa de p53 (SAH-p53) que exibem a elevada afinidade para HDM2, e, em contraste com o péptido p53 não modificado correspondente, rapidamente entram nas células através de um mecanismo de incorporação ativo. Como descrito abaixo, o tratamento SAH-p53 reativou a cascata supressora do tumor p53 induzindo a transcrição dos genes de resposta de p53, que proporcionam o primeiro exemplo de um péptido acoplado que mata as células de cancro por direcionamento para uma via transcricional.

Para conceber compostos de SAH-p53, colocámos derivados olefínicos sintéticos nas posições que evitam os resíduos de ligação a HDM2- crítica. Os acoplamentos dos hidrocarbonetos estendem-se pelas posições *i*, *i*+7 foram criados por metátese de olefina (FIG 1A). Foi sintetizado um painel inicial de quatro SAH-péptidos p53, contendo cada um uma ligação reticulada localizada distintivamente (FIG 1B). Para avaliar o impacto estrutural de instalar um acoplamento de todos os hidrocarbonetos *i*, *i*+7, realizamos experiências de dicroísmo circular (CD) para determinar α -helicidade. Embora o péptido p53 de tipo selvagem apresente 11% de tero em água da hélice α a pH 7,0, SAH_{53s} 1-4 demonstrou 10-59% de helicidade α (FIGs. 1B e 1C). Ensaios de ligação de polarização de fluorescência utilizando HDM2₁₇₋₁₂₅ e derivados marcados com FITC de SAH_{53s} 1-4 identificaram SAH-p53-4 como um interator subnanomolar, possuindo uma afinidade durante HDM2 quase três ordens de

magnitude superior àquelas do péptido de tipo selvagem (FIGs. 1B e 1D). SAH-p53-4 também demonstrou estabilidade proteolítica melhorada (FIG. 5).

Descobrimos que os compostos iniciais SAH-p53 criados foram incapazes de penetrar células Jurkat T-cells intactas (FIG. 1B e FIG. 6). Notámos que os SAH-p53s 1-4 estavam carregados negativamente (-2) ao pH fisiológico. A carga positiva é uma propriedade característica de certas classes de péptidos que penetram na célula¹¹. No desenvolvimento de uma segunda criação de compostos, substituímos os ácidos aspártico e glutâmico com asparaginas e glutaminas para ajustar a carga do péptido e mutámos aminoácidos selecionados previamente relatados como participando na exportação nuclear de p53 (L14Q) e ubiquitilação (K24R)^{4,12} (FIG. 1B). SAH-p53s 5-8 apresentaram um aumento de 2-8,5 vezes no conteúdo de α -hélice, que reteve elevada afinidade de ligação para HDM2, e demonstrou incorporação celular dependente do tempo e da temperatura através de FACS e microscopia confocal (FIGs. 1B, 1E, 1F e 7). Os ensaios de viabilidade utilizando RKO ou SJSAs-1 células cancerosas expostas a SAH-péptidos p53 indicaram que SAH-p53-8, que continha mutações pontuais em ambos os sítios de exportação nuclear e ubiquitilação, foram o único ligante de HDM2 estruturalmente estabilizado, permeável às células, e de elevada afinidade que afetou adversamente a viabilidade celular (FIGs. 1B e 4A).

Para determinar se o direcionamento de HDM2 por

SAH-p53-8 pode restaurar especificamente os níveis de p53 nativo, tratámos células SJSA-1 com péptidos de tipo selvagem, 8, e 8_{F19A} durante 8-30 horas e monitorizámos os níveis de proteína de p53 por análise de Western (FIG. 2). Células expostas a SAH-p53-8 demonstraram um aumento dos níveis de proteínas p53 que apresentaram um pico às 18 horas após tratamento. A ressupressão de p53 por 24 horas estava correlacionado com a regulação positive dependente do tempo de HDM2 por p53, que é consistente com um mecanismo de contra-regulação de p53-HDM2 intacto¹³. De igual modo, o SAH-p53-8 induziu a regulação positiva do inibidor da cinase dependente da ciclina p21¹⁴. A regulação positive de p21 em células tratadas com 8 foi detetada às 12 horas, atingindo níveis de pico às 18 horas. Os níveis da linha de base foram restaurados pelas 30 horas, o que é consistente com a ressupressão de p53 nativa. Os níveis de HDM2 e p21 não sofreram alteração em células SJSA-1 tratadas com o tipo selvagem ou com 8_{F19A}, sublinhando a especificidade de modulação por SAH-p53-8 da via de sinalização de p53.

Para examinar se a estabilização mediada por SAH-p53-8 de p53 nativo pode inibir as células do cancro através da reativação da via apoptótica, realizámos ensaios de viabilidade e de caspase-3 utilizando células SJSA-1 expostas ao tipo selvagem, 8, e 8_{F19A} durante 24 horas (FIG. 3). Embora os péptidos de tipo selvagem e 8_{F19A} não tivessem nenhum efeito sobre a viabilidade celular, o SAH-p53-8 apresentou inibição dependente da dose da viabilidade

celular de SISA-1 ($EC_{50}=8,8 \mu M$) (FIG. 3A). A ativação da caspase-3 por monitorização de fluorescência do substrato da caspase-3 clivada Ac-DEVD-AMC15 demonstrou que nem o péptido de tipo selvagem nem os B_{F19A} tiveram qualquer efeito; contudo, 8 despoletaram a ativação dependente da dose da caspase-3 ($FC_{50}=5,8 \mu M$) que foi bloqueada por DEVDCHO, um inibidor específico para a caspase-3, demonstrando que o SAH-p53-8 inibiu especificamente a viabilidade celular através da ativação da apoptose em células SJSA-1 que sobre-expressam HDM2 (FIG. 3B). Como pode ser observado a partir da FIG. 3C, a inibição da viabilidade celular mediada por SAH-p53-9 observada em células SJSA-1 também foi observada em células HCT 116, uma linha celular de cancro do cólon, mas não numa variante da linha celular HCT 116 que não tem p53 (HCT 116 p53^{-/-}).

A identificação de múltiplos compostos orgânicos e peptidomiméticos p53 com actividade anti-HDM2^{8,16} mantém a promessa para alcançar o benefício clínico a partir da manipulação da via p53. Através da geração de um inibidor de HDM2 baseado no péptido acoplado, nós documentámos uma interação *in situ* entre SAH-p53-8 e HDM2 (FIG. 8), confirmando que a sua atividade proapoptótica deriva da restauração da via p53.

Células RKO foram tratadas com péptidos a diferentes doses durante 24 horas seguido por coloração com iodeto de propídio e anexina V marcada com FITC. A indução da apoptose foi quantificada por FACS e os resultados foram

analisados com o software FloJo. Como observado na FIG. 9, o p53-SAH-p53-6 provocou uma apoptose significativa.

Foi utilizada uma ligação de polarização de fluorescência para avaliar a ligação de péptidos para HDM₁₇₋₁₂₅. Os péptidos fluoresceínados (5 nM) foram incubados com HDM₁₇₋₁₂₅ recombinante (25 pM- 10 μM) à temperatura ambiente. A atividade de ligação foi medida por polarização de fluorescência, e os valores de K_D foram obtidos por regressão linear. Os resultados desta análise são apresentados na FIG. 10.

O efeito de SAH-p53-8 isoladamente ou em combinação com doxorrubicina foi examinado como se segue. As células de osteossarcoma SJSA-1 foram tratadas com diferentes concentrações de SAH-p53-8 isoladamente ou em combinação com o agente quimioterapêutico doxorrubicina (20 μM) durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através da adição do reagente de bioluminescência CellTiter-Glo™ e lida num leitor de placas. Os resultados desta análise são apresentados na FIG. 11.

A capacidade de vários SAH-p53s para competir com o p53₁₄₋₂₉ de tipo selvagem para ligação a HDM₁₇₋₁₂₅ foi avaliada como se segue. O p53₁₄₋₂₉ de tipo selvagem fluorescinado (25 nM) foi incubado com HDM₁₇₋₁₂₅ recombinante. Os SAH p53s não marcados foram titulados na mistura, e a deslocação do ligando marcado foi medida por polarização de fluorescência. Os resultados desta análise são apresentados na FIG. 12.

O efeito de vários péptidos na ativação da caspase-3 foi examinado como se segue. Células de osteossarcoma SJSA-1 foram tratadas com diferentes concentrações de SAH-p53s durante 24 h. As células foram então expostas a um substrato específico para a caspase-3. A fluorescência, como um resultado da clivagem foi medida num leitor de microplacas. Para determinar a especificidade da atividade, certos péptidos foram incubados juntamente com DEVD-CHO, um substrato conhecido para inibir especificamente a caspase-3. Os resultados desta análise são apresentados na FIG. 13.

Aminoácidos α,α -Dissubstituído não naturais contendo cadeias laterais olefínicas de comprimento variável podem ser sintetizados através de métodos conhecidos (Williams *et al.* 1991 *J. Am. Chem. Soc.* 113:9276; Schafmeister *et al.* 2000 *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891). Para os péptidos em que é utilizado um i ligado a i+7 acoplado é utilizado (duas voltas da hélice estabilizada) quer um aminoácido S5 e um R8 ou é utilizado um aminoácido S8 e um R5. R8 é sintetizado utilizando a mesma via, exceto que o quiral de partida auxiliar confere o estereoisómero R-alquilo. Também, é utilizado 8-iodoocteno em vez de 5-iodopenteno. Os inibidores são sintetizados num suporte sólido utilizando a síntese de péptidos em fase sólida (SPPS) em resina MBHA.

Síntese de aminoácidos e de péptidos

Nos estudos descritos acima, α -aminoácidos protegidos com Fmoc (diferentes aminoácidos olefínicos Fmoc-S₅-OH, FmocR₈-OH, Fmoc-R₈-OH, Fmoc-S₈-OH e Fmoc-R₅-OH), hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (HCTU), e a resina Rink Amide MBHA foram adquiridos a Novabiochem (San Diego, CA). Dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidinona (NMP), N,N-diisopropiletilamina (DIEA), ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-dicloroetano (DCE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), e piperidina foram adquiridos a Sigma-Aldrich e utilizada conforme fornecida. A síntese dos aminoácidos olefínicos foram descritos noutro local^{1,2}.

Os polipéptidos nos estudos descritos acima foram sintetizados manualmente utilizando química de péptido em fase sólida Fmoc em resina Rink amide MBHA com níveis de carga de 0,4-0,6 mmol/g de resina. O protocolo que se segue foi utilizado:

1. O grupo protetor Fmoc foi removido com 20% de piperidina em NMP durante 30 min.
2. A resina foi lavada com NMP cinco vezes.
3. O subsequente aminoácido protegido com Fmoc foi acoplado durante 30 min (60 min para uma ligante

reticulado) utilizando Fmoc-AA (10 equiv., 4 equiv. para um ligante reticulado), HCTU (9,9 equiv., 3,9 equiv. para um ligante reticulado), e DIEA (20 equiv., 7,8 equiv. para um ligante reticulado).

4. A resina foi lavada com NMP cinco vezes.

5. Repetido a partir do passo 1.

Todos os péptidos foram protegidos com um resíduo de P-alanina no terminal *N*. As experiências de CD utilizam os péptidos que foram acetilados no terminal *N*. A reação de acetilação consistiu na desproteção do grupo Fmoc como delineado acima, seguido por reação com anidrido acético e DIEA. Todas as outras experiências apresentadas utilizam os péptidos fluoresceínados no terminal *N*. Para este fim, os péptidos com o terminal *N* desprotegido foram expostos a isotiocianato de fluoresceína em DMF durante a noite na presença de DIEA.

A reação de metátese de fecho de anel foi efetuada no péptido protegido no terminal *N* enquanto ainda no suporte sólido num vaso de reacção de frita descartável. A resina foi exposta a uma solução de 10 mM de dicloreto de bis(triciclo-hexilfosfina)benzilidina ruténio (IV) (Catalisador de Primeira Geração de Grubbs) em 1,2-dicloroetano ou diclorometano durante 2 horas. A adição do catalisador e 2 horas de reacção de metátese foi repetida uma vez. O péptido ligado à resina foi lavado com CH₂Cl₂ três vezes e seco sob uma corrente de azoto.

O péptido foi clivado da resina e desprotegido por exposição ao Reagente K (82,5% de TFA, 5% de tioanisole, 5% de fenol, 5% de água, 2,5% de 1,2-etanoditiol) e precipitado com éter de metil-*terc*-butilo e a 4 °C e liofilizada.

Os péptidos liofilizados foram purificados por HPLC de fase reversa utilizando uma coluna C18 (Agilent). Os péptidos foram caracterizados por LC-MS e análise de aminoácido. Os espetros de massa foram obtidos por electroaspersão em modo de ião positivo ou por MALDI-TOF. Um traço LC representativo e espetro de massa são apresentados a seguir (FIGs. 4-A e 4-B) e os dados de espetro de massa para todos os compostos são do mesmo modo apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Dados de espectro de massa para vários polipéptidos

Composto	Massa Calculada	Massa Encontrada	Método
WTp53 ₁₄₋₂₉	2033,26	2033,12 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-1	2097,41	2097,14 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-2	2132,40	2132,84 [M + Na]	MALDI-TOF
SAH-p53-3	2089,37	2089,18 [M + Na]	MALDI-TOF
SAH-p53-4	2140,48	2140,70 [M + H]	MALDI-TOF
SAH-p53-5	2138,3	2139,0 [M + H]	ESI
SAH-p53-6	2165,5	1083,2 [M/2 + H]	ESI
SAH-p53-7	2152,4	1077,2 [M/2 + H]	ESI

(continuação)

Composto	Massa Calculada	Massa Encontrada	Método
SAH-p53-8	2180,5	1112,9 [M/2 + Na]	ESI
SAH-p53-8γ19A	2104,4	1052,9 [M + H]	ESI
SAH-p53-8 não acoplado	2208,5	2109,1 [M + H]	ESI
FTTC-WT p53 ₁₄₋₁₉	2401,59	2402,94 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-1	2466,74	2467,29 [M + Na]	MALDI-TOF
FTTC-SAH-p53-2	24,79,74	2479,27 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-3	2437,72	2437,31 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-4	2509,81	2509,10 [M + Na]	MALDI-TOF
FITC-SAH-p53-5	2401,59	2402-94 [M + Na]	MALDI-TOF
FTTC-SAH-p53-6	2512,8	1257,1 [M/2 + H]	ESI
FITC-SAH-p53-7	2499,8	1250,6 [M/2 + H]	ESI
PITCSAB-pS3-8	2527,8,	1286,3 [M/2 + Na]	ESI
FITC-SAH-p53-8γ19A	2451,7	1248,5 [M/2 + Na]	ESI
FITC-SAH-p53-8 não acoplado	2555,9	1278,5 [M/2 + Na]	ESI

Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Para a espectroscopia de dicroísmo circular (CD) os compostos foram dissolvidos em H₂O em concentrações variando de 10-50 μM. Os espectros foram obtidos num espetropolarímetro Jasco J-715 a 20 °C. Os espectros foram recolhidos utilizando uma cuvete de quartzo de 0,1 cm de comprimento de caminho com os seguintes parâmetros medidos comprimento de onda, 185-255 nm; passo de resolução 0,1 nm; velocidade, 20 nm min⁻¹; acumulações, 6; largura de banda, 1 nm. O conteúdo hélico de cada péptido foi calculado como reportado previamente.³

Estabilidade Ex vivo a Protease

Para avaliar a estabilidade dos péptidos a protease, os péptidos fluoresceínados (2,5 µg) foram incubados com soro fresco de murganho (20 mL) a 37°C durante 0-24 horas. O nível de composto fluoresceínado intacto foi determinado por congelamento flash das amostras de soro em azoto líquido, liofilização, extração em 1:1 CH₃CN:H₂O contendo 0,1% de TFA, seguido por quantificação com base em HPLC utilizando detecção de fluorescência em a 495/530 nm de excitação/emissão.

Produção de Proteína e Polarização de Fluorescência

O HDM₁₇₋₁₂₅ foi preparado como se segue. *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo que codifica HDM₁₇₋₁₂₅ com uma marca hexa-histidina N-terminal e um sítio de clivagem de trombina foram cultivadas em Luria Broth contendo canamicina e cloranfenicol e induzidas com 0,1 mM de isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG). As células foram recolhidas após 4 horas por centrifugação durante 20 min a 3200 rpm, ressuspensa em tampão A (20 mM de Tris pH 7,4, 0,5 M de NaCl) e lisadas por sonicação. Os resíduos celulares foram sedimentados por centrifugação durante 30 minutos a 15 000 rpm, e o sobrenadante foi incubado com Ni-NTA agarose (QIAGEN) durante 2 h. A resina foi lavada com tampão A e eluída com um gradiente de imidazole

variando de 5 mM a 500 mM. As frações contendo a proteína eluída foram concentradas e diluídas 1:1 com tampão de clivagem de trombina (5 mM de CaCl₂, 20 mM de Tris pH 7,4, 1 mL mL⁻¹ de β-mercaptoetanol, e 0,8 U mL⁻¹ de trombina). A reacção de clivagem foi incubada durante a noite a 4 °C. A reacção foi concentrada em 2 mL e purificada por filtração em gel utilizando uma coluna G75. A pureza da proteína foi avaliada por SDS-PAGE, FPLC e MALDI-TOF e determinada como sendo ≥90%. A sua identidade foi depois confirmada por digestão seguida por espectrometria de massa dos fragmentos de péptidos resultantes.

Os compostos fluoresceínados (L_T = 5-25 nM) foram incubados com HDM2₁₇₋₁₂₅ em tampão de ensaio de ligação (140 mM NaCl, 50 mM, Tris pH 8,0) à temperatura ambiente. A actividade de ligação foi medida por polarização de fluorescência num espectrofotómetro de luminescência Perkin-Elmer LS50B utilizando uma cuvete contendo uma barra de agitação ou um Leitor de Placas Spectramax M5 (Molecular Devices). Os valores K_d foram determinados por análise de regressão não linear de curvas de resposta à dose utilizando Prism software 4.0 Graphpad. No caso de compostos em que $L_T < K_d$ e sob a assunção de que $L_T \approx L_{free}$, as isotérmicas de ligação foram ajustadas à equação

$$P = P_f + \left[(P_b - P_f) \times \frac{R_f}{K_d + R_f} \right] \quad (1)$$

em que P é o valor da medida de polarização, P_f é a

polarização do ligando fluorescente livre, P_b é a polarização do ligando ligado, e R_T é a receptor/concentração de proteína.

Com compostos em que $L_T > K_d$, a assunção de que $L_T \approx L_{free}$ não se mantém devido a remoção do ligando. Deste modo, as isotérmicas de ligação foram ajustadas à equação mais explícita

$$P = P_f + (P_b - P_f) \left[\frac{(L_T + K_d + R_T) - \sqrt{(L_T + K_d + R_T)^2 - 4L_T R_T}}{2L_T} \right] \quad (2)$$

em que P é a medida do valor de polarização, P_f é a polarização do ligando fluorescente livre, P_b é a polarização do ligando ligado, P é a polarização total do ligando ligado, L_T é a concentração total de ligando fluorescente e R_T é a receptor/concentração de proteína⁴. Cada ponto de dados representa a média de uma condição experimental efetuada em pelo menos triplicado.

Citometria de Fluxo

As células de leucemia de células T foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco) com 10% de soro fetal de bovino, 100 U mL⁻¹ penicilina, 100 µg mL⁻¹, 2 mM de glutamina, 50 mM de Hepes pH 7, e 50 µM de β-mercaptoetanol. As células SJSA-1 foram cultivadas em meio McCoy 5A (ATCC) suplementado com 10% de soro fetal de bovino e 100 U mL⁻¹ de penicilina. As células Jurkat (50 000 células por poço)

foram tratadas com péptidos fluoresceínados ($10 \mu\text{M}$) até 4 horas a 37°C . Após lavagem com meio, as células foram expostas a digestão com tripsina (0,25%; Gibco) (30 min, 37°C), lavadas com PBS, e ressuspensas em PBS contendo 0,5 mg mL $^{-1}$ DE iodeto de propídeo (BD Biosciences). A fluorescência celular e a positividade para o iodeto de propídeo foram analisados utilizando um citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) e FlowJo software (TreeStar). Foi efectuada experiência idêntica com 30 min de pré-incubação de células a 4°C seguido por 4 horas de incubação com péptidos fluoresceínados a 4°C para avaliar a dependência da temperatura da marcação fluorescente.

Microscopia Confocal

As células de leucemia de células T Jurkat foram incubadas com compostos fluoresceínados durante 24 horas a 37°C . Após lavagem com PBS, as células foram centrifugadas a 600 rpm durante 5 minutos em lâminas de vidro Superfrost plus (Fisher Scientific). As células foram fixadas em 4% de paraformaldeído, lavadas com PBS, incubadas com iodeto TOPRO-3 (100 nM; Molecular Probes) para contrastar os núcleos, tratadas com meio de montagem Vectashield (Vector), e visualizadas por microscopia confocal (BioRad 1024 ou Nikon E800).

De uma forma semelhante, as células de osteossarcoma SJSA-1 (1×10^5 células) foram incubadas com compostos fluoresceínados durante 24 horas a 37°C em Lab-

Tek™-CC2 Chamber Slides (Nunc). Após lavagem com PBS, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído, lavadas com PBS, e tratadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI (contraste nuclear) (Vector), cobertas com lamela e visualizadas por microscopia confocal (BioRad 1024 ou Nikon E800).

Transferência de Western

As células de osteossarcoma SJSA-1 (1×10^6) incubadas a 37 °C foram tratadas com péptidos p53 (20 µM) em meio isento de soro durante 4 horas, seguido por substituição de soro e incubação adicional durante 4-26 horas adicionais. As células foram lisadas (20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,8% de SDS, 1 mM de PMSF, 1 U mL⁻¹ de benzonase nuclease) e os lisados brutos foram clarificados por breve centrifugação e concentração de proteína total foi determinada utilizando o ensaio de proteína Pierce BCA. As alíquotas contendo 5 µg de proteína total foram separadas em géis 4-12% de poliacrilamida de Bis-Tris (Invitrogen). As proteínas foram detetadas por reagente de quimiluminescência (Perkin Elmer) utilizando anticorpos específicos para p53 (clone DO-1; Calbiochem), HDM2 (clone IF2; EMD Biosciences), p21 (clone EA10; Calbiochem), e β-actina (Sigma-Aldrich).

Viabilidade Celular e Ensaios de Apoptose de Elevado Processamento

As células de osteossarcoma SJSA-1 (4×10^5

células por poço) foram incubadas em placas de 96 poços e tratadas com péptidos p53 em meio isento de soro durante 4 horas, seguido por substituição de soro e incubação adicional durante 20 horas. A viabilidade celular foi ensaiada por adição de reagente de bioluminescência CellTiter-Glo™ (Promega) e leitura da luminescência num leitor de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices). A extensão da apoptose foi medida através da deteção da atividade de caspase-3 por exposição das células a um substrato específico de caspase-3 (Oncogene). A fluorescência como um resultado da clivagem do substrato foi medida num leitor de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices).

Co-Imunoprecipitação de FITC-SAH-Péptidos p53 e HDM2 Endógeno

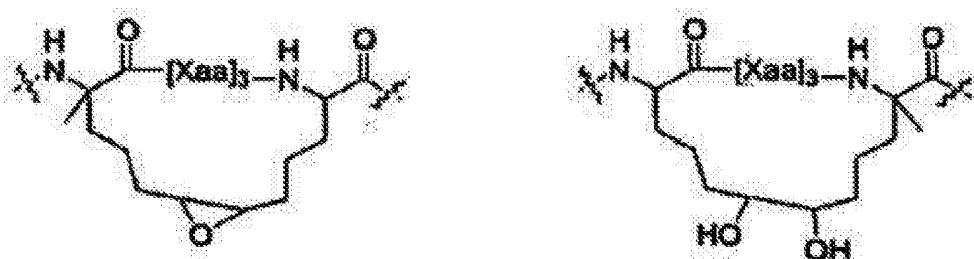
As células de osteossarcoma SJSA-1 (1×10^6) foram tratadas com FITC-péptidos p53 (15 µM) meio isento de soro durante 4 horas, seguido por substituição do soro e mais 8 horas de incubação. As células foram exaustivamente lavadas com meio contendo soro e PBS e expostas a tampão de lise (50 mM de Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, 1 mM de PMSF, 1 U mL⁻¹ de benzonase nuclease [EMD Biosciences] e comprimido de inibidor completo de protease [Roche]) à temperatura ambiente. Todos os passos subsequentes foram todos efetuados a 4 °C. Os extratos foram centrifugados, e os sobrenadantes foram incubados com proteína A/G sepharose (50 µL de 50% de sedimento de

esferas por 0,5 mL de lisados; Santa Cruz Biotechnology). Os sobrenadantes pré-eliminados (500 µL) foram recolhidos após centrifugação, incubados com 10 µL de anticorpo de cabra anti-FITC (AbCam) durante 1,5 h seguido por proteína A/G sepharose durante mais 1,5 horas. As reações de imunoprecipitação foram sedimentadas e lavadas três vezes com tampão de lise. As proteínas precipitadas foram suspendidas em tampão de aplicação contendo SDS, fervidas, e os sobrenadantes foram processados em géis SDS-PAGE a 4-12% Bis-Tris (Invitrogen). As proteínas foram transferidas para membranas Immobilon-P (Millipore). Após bloqueamento, as transferências foram incubadas com uma diluição 1:100 de anticorpo de murganho anti-HDM2 humano (clone IF2; EMD Biosciences) ou uma diluição 1:200 de anticorpo anti-FITC de coelho (Zymed) em 3% de BSA em PBS seguido por anti-peroxidase de rábano-conjugada com IgG de murganho ou de coelho (Pharmingen). A proteína HDM2 e os péptidos FITC foram visualizados utilizando o reagente de quimiluminescência Western Lightning™ (Perkin Elmer) e exposição a filme. Os géis foram corados utilizando um kit de coloração com prata (Bio-Rad) seguindo as instruções do fabricante.

Polipéptidos

Em alguns casos, as amarras de hidrocarboneto (*i.e.*, ligação reticulada) aqui descritas podem ser ainda manipuladas. Num caso, uma dupla ligação de um hidrocarboneto alquenilo amarra, (*e.g.*, as sintetizadas utilizando uma metátese de fecho de anel catalisada por ruténio (RCM))

pode ser oxidada (e.g., via epoxidação ou di-hidroxilação) para proporcionar um dos compostos a seguir.



A unidade epóxido ou uma das unidades hidroxilo livres pode ser ainda funcionalizada. Por exemplo, o epóxido pode ser tratado com um nucleófilo, que proporciona funcionalidade adicional que podem ser utilizado, por exemplo, para se ligar a uma marca (e.g., uma marca de radioisótopo ou fluorescente). A marca pode ser utilizada para auxiliar a direcionar o composto para uma localização desejada no corpo ou rastrear a localização do composto no corpo. Alternativamente, um agente terapêutico adicional pode ser quimicamente ligado à amarra funcionalizada (e.g., um agente anti-cancro tal como rapamicina, vinblastina, taxol, etc.). Esta derivação pode alternativamente ser atingida por manipulação sintética do terminal amino ou carboxilo do polipéptido ou via a cadeia lateral do aminoácido. Outros agentes podem ser ligados à amarra funcionalizada, e.g., um agente que facilita a entrada do polipéptido nas células.

Embora as amarras de hidrocarboneto tenham sido descritas, são também visadas outras amarras. Por exemplo,

a amarra pode incluir uma ou mais de uma unidade éter, tioéter, éster, amina, ou amida. Em alguns casos, uma cadeia lateral de aminoácido que ocorre naturalmente pode ser incorporada na amarra. Por exemplo, uma amarra pode ser acoplada com um grupo funcional tal como o hidroxilo na serina, o tiol na cisteína, a amina primária na lisina, o ácido no aspartato ou glutamato, ou a amida na asparagina ou glutamina. De acordo com o exposto, é possível criar uma amarra utilizando aminoácidos que ocorrem naturalmente em vez de utilizar uma amarra que é preparada por acoplamento de dois não aminoácidos que ocorrem naturalmente. É também possível utilizar um único aminoácido que não ocorre naturalmente em conjunto com um aminoácido que ocorre naturalmente.

É ainda pretendido que o comprimento da amarra possa ser variado. Por exemplo, uma amarra de comprimento curto pode ser utilizada quando é desejado proporcionar um constrangimento de grau relativamente elevado na estrutura secundária de alfa-hélice, enquanto, em alguns casos, é desejado proporcionar um constrangimento menor à estrutura secundária de alfa-hélice, e neste pode ser desejada uma amarra mais longa.

Adicionalmente, embora os exemplos de aminoácidos em amarra que se estendem de i a $i+3$, i a $i+4$; e i a $i+7$ foram descritos de modo a proporcionar uma amarra que está primariamente numa face única da hélice alfa, podendo os amarras ser sintetizados para atravessarem quaisquer combinações de números de aminoácidos.

Em alguns casos, os aminoácidos dissubstituídos em alfa são utilizados no polipeptídeo para melhorar a estabilidade da estrutura secundária em hélice alfa. contudo, os aminoácidos dissubstituídos em alfa não são necessários, e por vezes a utilização dos substituintes monoalfa (e.g., nos aminoácidos em amarra) são também pretendidos.

Como pode ser considerado pelo especialista da técnica, que os métodos de síntese dos compostos aqui descritos serão óbvios, em geral, para os técnicos com experiência na técnica. Adicionalmente, os vários passos de síntese podem ser efetuados numa sequência ou ordem alternadas para produzir os compostos desejados. As transformações da química de síntese e as metodologias do grupo de proteção (proteção e desproteção) úteis na síntese dos compostos aqui descritos são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, as descritas em R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene e P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3d. Ed., John Wiley e Sons (1999); L. Fieser e M. Fieser, *Fieser e Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley e Sons (1994); e L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), e subsequentes edições destes.

Os péptidos aqui descritos podem ser preparados por métodos de síntese química, que são bem conhecidos do

especialista da técnica. Ver, por exemplo, Fields *et al.*, Capítulo 3 in *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nova Iorque, N.Y., 1992, p. 77. Deste modo, os péptidos podem ser sintetizados utilizando as técnicas automatizadas de Merrifield de síntese em fase sólida com o α -NH₂ protegido pela química de t-Boc ou Fmoc utilizando aminoácidos protegidos de cadeia lateral, por exemplo, num Applied Biosystems Peptide Synthesizer Modelo 430A ou 431.

Uma maneira de preparar os péptidos aqui descritos é utilizando a síntese de péptidos em fase sólida (SPPS). O aminoácido C-terminal é ligado a uma resina de poliestireno de forma reticulada via uma ligação lábil ácida com uma molécula ligante. Esta resina é insolúvel nos solventes utilizados para a síntese, tornando-o relativamente simples e rápido para lavar o excesso de reagentes e produtos colaterais. O terminal N é protegido com o grupo Fmoc, que é estável em ácido, mas removível por base. Quaisquer grupos de cadeia lateral funcional são protegidos com grupos estáveis a base, lábeis a ácido. Os péptidos mais longos podem ser preparados por ligação de péptidos individuais sintéticos utilizando uma ligação química nativa. Alternativamente, os péptidos individuais sintéticos podem ser sintetizados por técnicas de DNA recombinante bem conhecidas. Estas técnicas são proporcionadas e, manuais convencionais bem conhecidos com protocolos detalhados. Para construir um gene que codifica um péptido desta invenção, a sequência de aminoácidos é reversamente traduzida para obter uma sequência de ácido

nucleico que codifica a sequência de aminoácidos, de um modo preferido com codões que são ótimos para o organismo em que o gene deve ser expresso. A seguir, um é preparado um gene sintético, tipicamente por síntese de oligonucleótidos que codificam o péptido e quaisquer elementos reguladores, se necessário. O gene sintético é inserido num vetor de clonagem adequado e transfetado para uma célula hospedeira. O péptido é então expresso sob condições adequadas apropriadas para o sistema de expressão e hospedeiro selecionados. O péptido é purificado e caracterizado por métodos convencionais. Os péptidos podem ser preparados de uma forma de elevado processamento, combinatória, *e.g.*, utilizando um sintetizador combinatório de canais múltiplos de elevado processamento disponível de Advanced Chemtech.

Nos polipéptidos modificados, uma ou mais ligações peptídicas convencionais substituídas por uma ligação diferente podem aumentar a estabilidade do polipéptido no corpo. As ligações peptídicas podem ser substituídas por: uma ligação retro-invertida ($\text{C}(\text{O})-\text{NH}$) ; uma ligação amida reduzida ($\text{NH}-\text{CH}_2$) ; uma ligação tiometileno ($\text{S}-\text{CH}_2$ ou CH_2-S) ; uma ligação oxometileno ($\text{O}-\text{CH}_2$ ou CH_2-O) ; uma ligação etileno (CH_2-CH_2) ; uma ligação tioamida ($\text{C}(5)-\text{NH}$) ; uma ligação trans-olefina ($\text{CH}=\text{CH}$) ; uma ligação fluoro substituída com trans-olefina ($\text{CF}=\text{CH}$) ; uma ligação cetometileno ($\text{C}(\text{O})-\text{CHR}$) ou $\text{CHR}-\text{C}(\text{O})$ em que R é H ou CH_3 ; e uma ligação fluoro-cetometileno ($\text{C}(\text{O})-\text{CFR}$ ou $\text{CFR}-\text{C}(\text{O})$ em que R é H ou F ou CH_3 .

Os polipéptidos podem ser ainda modificados por: acetilação, amidação, biotinilação, cinamoilação, farnesilação, fluoresceinação, formilação, miristoilação, palmitoilação, fosforilação (Ser, Tyr ou Thr), estearoilação, succinilação e sulfurilação. Os polipéptidos da invenção podem também ser conjugados com, por exemplo, polietilenoglicol (PEG); grupos alquilo (e.g., grupos alquilo C₁-C₂₀ lineares ou ramificados); radicais de ácidos gordos e suas combinações.

Métodos de Tratamento

A presente revelação refere-se a métodos profiláticos e terapêuticos de tratamento de um indivíduo em risco de (ou suscetível a) um distúrbio ou possuindo um distúrbio associado com atividade reduzida de p53. Isto é porque se espera que os polipéptidos atuem como inibidores da ligação de p53 a HDM2 e/ou HDMX. Como aqui utilizado, o termo "tratamento" é definido como a aplicação ou administração de um agente terapêutico a um doente, ou aplicação ou administração de um agente terapêutico a um tecido isolado ou linha de células de um doente, que tem uma doença, um sintoma de doença ou uma predisposição para um a doença, com o objectivo de cura, cicatrização, suavizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, melhorar ou afetar a doença, os sintomas de doença ou uma predisposição para a doença. Um agente terapêutico inclui, mas não está limitado a, pequenas moléculas, péptidos, anticorpos, ribozimas e oligonucleótidos anti-sentido.

Os polipéptidos aqui descritos podem ser utilizados para tratar, prevenir, e/ou diagnosticar cancros e estados neoplásicos. Como aqui utilizado, os termos "cancro", "hiperproliferativo" e "neoplásico" referem-se a células possuindo a capacidade para crescimento autónomo, *i.e.*, um estado anormal ou estado caracterizado por haver um rápido crescimento celular proliferativo. Os estados de doença hiperproliferativos e neoplásicos podem ser categorizados como patológicos, *i.e.*, caracterizando ou constituindo um estado de doença, ou podem ser categorizados como não patológicos, *i.e.*, um desvio do normal mas não associado com um estado de doença. O termo significa incluir todos os tipos de crescimento de cancro ou processos oncogénicos, tecidos metastásicos ou células transformadas em forma maligna, tecidos, ou órgãos, independentemente do tipo histopatológico ou estádio de Invasão. As células "hiperproliferativas patológicas" ocorrem em estados de doença caracterizados por crescimento de tumor maligno. Exemplos de células não patológicas hiperproliferativas incluem a proliferação de células associadas à reparação de feridas.

Exemplos de distúrbios de proliferação e/ou diferenciação celular inclui cancro, *e.g.*, carcinoma, sarcoma, ou distúrbios metastásicos. Os compostos (*i.e.*, polipéptidos) podem atuar como novos agentes terapêuticos para controlar osteossarcomas, cancro do cólon, cancro da mama, cancro de células T e cancro de células B. Os

polipéptidos podem também ser úteis para o tratamento de carcinoma mucoepidermóide, retinoblastoma e meduloblastoma. Os compostos podem ser utilizados para tratar distúrbios associados com a proliferação indesejada de células possuindo atividade reduzida e/ou expressão de p53, particularmente quando as células produzem pelo menos algum p53 ativo.

Exemplos de distúrbios proliferativos incluem distúrbios neoplásicos hematopoiéticos. Como aqui utilizado, o termo "distúrbios neoplásicos hematopoiéticos" inclui doenças que envolvem células hiperplásica/neoplásica de origem hematopoiética, e.g., provenientes de linhagens mielóides, linfóides ou eritróides, ou suas células precursoras. Distúrbios exemplificativos incluem: leucemias agudas, e.g., leucemia eritroblástica e leucemia megacarioblástica aguda. Distúrbios mielóides exemplificativos adicionais incluem, mas não estão limitados a, leucemia promielóide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) e leucemia mielógena crónica (CML) (revista em Valckus, L. (1991) *Crit Rev. in Oncol./Hemotol*, 11:267-97); malignidades linfóides incluem, mas não estão limitados a leucemia linfooblástica aguda (ALL) que inclui a linhagem B ALL e linhagem T ALL, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), mieloma múltiplo, leucemia das células pilosas (HLL) e macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). As formas adicionais de linfomas malignos incluem, mas não estão limitados a linfoma não-Hodgkin e suas variantes, linfomas de células T periféricas,

leucemia/linfoma de células T de adulto (ATL), linfoma de células T cutâneas (CTCL), leucemia granular de grandes linfócitos (LGF), doença de Hodgkin e doença de Reed-Sternberg.

Exemplos de distúrbios de proliferação e/ou diferenciação celular da mama incluem, mas não estão limitados a, doença proliferativa da mama incluindo, e.g., hiperplasia epitelial, adenose esclerosante, e papilomas dos pequenos ductos; tumores, e.g., tumores do estroma tais como fibroadenoma, tumor filóide, e sarcomas, e tumores epiteliais tais como papiloma dos grandes ductos; carcinoma da mama incluindo carcinoma *in situ* (não invasivo) que inclui carcinoma ductal *in situ* (incluindo doença de Paget) e carcinoma lobular *in situ*, e carcinoma invasivo (infiltrante) incluindo, mas não se limitando a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma colóide (mucinoso), carcinoma tubular, e carcinoma papilar invasivo, e miscelânea de neoplasmas malignos. Distúrbios na mama masculina incluem, mas não estão limitados a, ginocomastia e carcinoma.

Composições Farmacêuticas e Vias de Administração

Como aqui utilizado, estes compostos, incluindo os compostos de fórmulas aqui descritas, são definidos para incluir os seus derivados ou pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis. Um "farmaceuticamente aceitáveis" derivado ou pró-fármaco" significa qualquer sal farmaceuticamente

aceitável, éster, sal de um éster, ou outros derivados de um composto desta invenção que, após administração a um recetor, é capaz de proporcionar (diretamente ou indiretamente) um composto desta invenção. Os derivados e pró-fármacos particularmente favorecidos são os que aumentam a biodisponibilidade dos compostos desta invenção quando estes compostos são administrados a um mamífero (e.g., permitindo que um composto oralmente administrado seja mais rapidamente absorvido no sangue) ou que melhora a distribuição do composto parental num compartimento biológico (e.g., o cérebro ou sistema linfático) relativamente às espécies parentais. Os pró-fármacos preferidos incluem derivados em que um grupo que melhora a solubilidade aquosa ou transporte ativo através da membrana intestinal é ligada à estrutura de fórmulas aqui descritas.

Os compostos aqui descritos podem ser modificados adicionando funcionalidades apropriadas para melhorar as propriedades biológicas seletivas. Estas modificações são conhecidas na técnica e incluem as que aumentam a penetração biológica num determinado compartimento biológico (e.g., sangue, sistema linfático, sistema nervoso central), aumentam a disponibilidade oral, aumentam a solubilidade para permitir a administração por injeção, alteram o metabolismo e alteram a taxa de excreção.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos aqui descritos incluem os derivados de farmaceuticamente aceitáveis ácidos inorgânicos e orgânicos e bases.

Os exemplos de sais de ácido adequados incluem acetato, adipato, benzoato, benzenossulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formato, fumarato, glicolato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, lactato, maleato, malonato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartarato, tosilato, trifluoromethylsulfonato, e undecanoato. Os sais derivados de bases apropriadas incluem o metal alcalino (e.g., sódio), metal alcalino-terroso (e.g., magnésio), amónio e N-(alquil)₄ + sais. Esta invenção também visa a quaternização de quaisquer grupos básicos contendo azoto dos compostos aqui revelados. A água ou óleo-solúvel ou produtos dispersáveis podem ser obtidos por esta quaternização.

Os compostos das fórmulas aqui descritas podem, por exemplo, ser administrados por injeção, intravenosamente, intraarterialmente, subdermicamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, ou subcutaneamente; ou oralmente, bucalmente, nasalmente, transmucosamente, topicamente, numa preparação oftálmica, ou por inalação, com uma dosagem que varia desde cerca de 0,001 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, ou de acordo com os requisitos do fármaco particular. Estes métodos contemplam a administração de uma quantidade eficaz de composto ou composição de composto para atingir o efeito desejado ou declarado. Tipicamente, as composições farmacêuticas desta invenção serão administradas desde cerca de 1 a cerca de 6

vezes por dia ou alternativamente, como uma infusão contínua. Esta administração pode ser utilizada como uma terapia crónica ou aguda. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com os materiais transportadores para produzir uma forma de dosagem única irão variar dependendo do hospedeiro tratado e o particular modo de administração. Uma preparação irá conter de cerca de 5% a cerca de 95% de composto ativo (p/p). Alternativamente, estas preparações contêm de cerca de 20% a cerca de 80% do composto ativo.

Doses menores ou maiores do que as citadas acima podem ser necessárias. Os regimes de dosagem e tratamento específicos para qualquer doente particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico empregue, a idade, peso corporal, estado geral de saúde, sexo, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármaco, a gravidade e duração da doença, estado ou sintomas, disposição do doente para a doença, estado ou sintomas, e o julgamento do médico assistente.

Depois da melhoria de um estado de um doente, uma dose de manutenção de um composto, composição ou combinação desta invenção pode ser administrada, se necessário. Subsequentemente, a dosagem ou frequência de administração, ou ambos, podem ser reduzidos, como função dos sintomas, para um nível em que o estado melhorado é mantido. Os doentes podem, no entanto, requerer tratamento intermitente

numa base de longo prazo após qualquer recorrência dos sintomas de doença.

As composições farmacêuticas aqui descritas compreendem um composto das fórmulas aqui descritas ou um seu sal farmaceuticamente aceitável; um agente adicional incluindo por exemplo, morfina ou codeína; e qualquer transportador, adjuvante ou veículo farmaceuticamente aceitável. As composições alternativas aqui descritas compreendem um composto das fórmulas aqui descritas ou um seu sal farmaceuticamente aceitável; e um transportador, adjuvante ou veículo farmaceuticamente aceitável. As composições aqui delineadas incluem os compostos das fórmulas aqui delineadas, assim como agentes terapêuticos adicionais se presentes, em quantidades eficazes para conseguir uma modulação da doença ou sintomas de doença. O termo "farmaceuticamente aceitáveis transportador ou adjuvante" refere-se a um transportador ou adjuvante que pode ser administrado a um doente, em conjunto com um composto desta invenção, e que não destrói a sua atividade farmacológica e é não tóxica quando administrado em doses suficientes para distribuir uma quantidade terapêutica do composto.

Os transportadores, adjuvantes e veículos farmaceuticamente aceitáveis que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas desta invenção incluem, mas não estão limitados a, trocadores de iões, alumina, estearato de alumínio, lecitina, sistemas de distribuição de fármaco

auto-emulsificantes (SEDDS) tais como d- α -tocoferol succinato de polietilenoglicol 1000, tensioativos utilizados nas formas de dosagem farmacêutica tais como Tweens ou outras matrizes semelhantes de distribuição polimérica, proteínas do soro, tais como albumina do soro humano, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas parciais de glicerído e ácidos gordos vegetais saturados, água, sais ou electrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disódio, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros de polietileno-polioxipropileno em bloco, polietilenoglicol e lanolina. Ciclodextrinas tais como α -, β -, e γ -ciclodextrina, podem ser também vantajosamente utilizadas para melhorar a distribuição de compostos das fórmulas aqui descritas.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas oralmente, parentericamente, por inalação de spray, topicalmente, retalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente ou via um reservatório implantado, de um modo preferido, por administração oral ou administração por injeção. As composições farmacêuticas aqui descritas podem conter quaisquer veículos, adjuvantes ou veículos convencionais não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis. Em alguns casos, o pH da formulação pode ser ajustado com ácidos, bases ou tampões farmaceuticamente aceitáveis para

melhorar a estabilidade do composto formulado ou da sua forma de distribuição. O termo parentérico como aqui utilizado inclui injeção ou técnicas de infusão subcutânea, intracutânea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrassinovial, intraesterno, intratecal, intralesão e intracraniana.

As composições farmacêuticas podem estar na forma de uma preparação injetável estéril, por exemplo, como uma suspensão aquosa ou oleaginosa estéril injetável. Esta suspensão pode ser formulada de acordo com técnicas conhecidas na técnica utilizando agentes adequados de dispersão ou humedecimento (tais como, por exemplo, Tween 80) e agentes de suspensão. A preparação injetável estéril pode também ser uma solução injectável estéril ou suspensão num diluente ou solvente não tóxico parentericamente aceitável, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanediol. De entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregues estão o manitol, água, Solução de Ringer e solução de cloreto de sódio isotónica. Adicionalmente, são convencionalmente empregues óleos fixados, estéreis são como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito, qualquer óleo de fixação brando pode ser empregue incluindo momo ou diglicéridos sintéticos. Ácidos gordos, tais como ácido oleico e seus derivados glicéridos são úteis na preparação de injetáveis, como são os óleos naturais farmaceuticamente aceitáveis, tais como azeite ou óleo de rícino, especialmente nas suas versões polioxietiladas. Estas soluções ou suspensões de óleo podem também conter um

diluente ou dispersante álcool de cadeia longa, ou carboximetilcelulose ou agentes de dispersão semelhantes que são normalmente utilizados na formulação de formas de dosagens farmaceuticamente aceitáveis tais como emulsões e ou suspensões. Outros tensioativos normalmente utilizados tais como Tween ou Span e/ou outros agentes emulsificantes semelhantes ou melhoradores de biodisponibilidade que são normalmente utilizados na preparação de formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis sólidas, líquidas ou outras, podem também ser utilizadas para os propósitos de formulação.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser oralmente administradas em qualquer forma de dosagem oralmente aceitável incluindo, mas não se limitando a, cápsulas, comprimidos, emulsões e suspensões, dispersões e soluções aquosas. No caso de comprimidos para utilização oral, os veículos que são normalmente utilizados incluem lactose e amido de milho. Os agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, são também tipicamente adicionados. Para administração oral numa forma de cápsula, os diluentes úteis incluem lactose e amido de milho seco. Quando as suspensões aquosas e/ou emulsões são administradas oralmente, o ingrediente ativo que pode ser suspenso ou dissolvido numa fase aquosa é combinado com agentes emulsificantes e/ou de suspensão. Se desejado, podem ser adicionados certos agentes adoçantes e/ou aromatizantes e/ou corantes.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem também ser administradas na forma de supositórios para administração retal. Estas composições podem ser preparadas por mistura de um composto desta invenção com um excipiente não irritante adequado que é sólido à temperatura ambiente mas líquido à temperatura retal e deste modo fundirá no reto para libertar os componentes ativos. Estes materiais incluem, mas não se limitam a, manteiga de cacau, cera de abelha e polietilenoglicóis.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Estas composições são preparadas de acordo com técnicas bem conhecidas na técnica da formulação farmacêutica e podem ser preparadas como soluções em salino, empregando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para melhorar a biodisponibilidade, fluorocarbonetos, e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes conhecidos na técnica.

Quando as composições aqui descritas compreendem uma combinação de um composto das fórmulas aqui descritas e um ou mais agentes terapêuticos e profiláticos adicionais, o composto e o agente adicional deve estar presente a níveis de dosagem entre cerca de 1 a 100%, e de um modo preferido entre cerca de 5 a 95% da dosagem normalmente administrada num regime de monoterapia. Os agentes adicionais podem ser administrados separadamente, como parte de um regime de dose múltipla, dos compostos aqui descritos. Alternativamente, estes agentes podem ser parte

de uma forma de dosagem única, misturada em conjunto com os compostos desta invenção numa composição única.

Modificação de Polipéptidos

Os polipéptidos acoplados podem incluir um fármaco, uma toxina, um derivado do polietilenoglicol; um segundo polipéptido; um carbo-hidrato, etc. Sempre que um polímero ou outro agente é ligado ao polipéptido acoplado é/pode ser desejado que a composição seja substancialmente homogénea.

A adição de moléculas de polietilenoglicol (PEG) pode melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do polipéptido. Por exemplo, a PEGuilação pode reduzir a eliminação renal e pode resultar numa concentração mais estável no plasma. O PEG é um polímero solúvel em água e pode ser representado como ligado ao polipéptido como fórmula:

XO- $(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ em que n é 2 a 10 000 e X é H ou uma modificação terminal, e.g., um alquilo C₁₋₄; e Y é uma ligação amida, carbamato ou ureia com um grupo amina (incluindo, mas não limitado a, amina epsilon da lisina ou o terminal N) do polipéptido. Y pode também ser uma ligação maleimida a um grupo tiol (incluindo mas não se limitando ao grupo tiol da cisteína). Outros métodos para a ligação de PEG a um polipéptido, diretamente ou indiretamente, são conhecidos por

qualquer especialista na técnica. O PEG pode ser linear ou ramificado. Várias formas de PEG incluindo vários derivados funcionalizados estão comercialmente disponíveis.

Pode ser utilizado PEG possuindo ligações degradáveis na estrutura. Por exemplo, o PEG pode ser preparado com ligações éster que são sujeitos a hidrólise. São descritos os conjugados possuindo ligações PEG degradáveis nos documentos WO 99/34833; WO 99/14259, e U.S. 6 348 558.

Em certos casos, o polímero macromolecular (e.g., PEG) é ligado a um agente aqui descrito através de um ligante intermediário. Em certas formas de realização, o ligante é preparado desde 1 a 20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são selecionados a partir de 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente. Alguns destes aminoácidos podem ser glicosilados, como é bem entendido pelos especialistas na técnica. Em outras formas de realização, o 1 a 20 aminoácidos são seleccionados a partir de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, e lisina. Em outras formas de realização, é preparado um ligante de uma maioria de aminoácidos que estão estericamente desimpedidos, tais como glicina e alanina. Os ligantes não-péptidos são também possíveis. Por exemplo, ligantes alquilo tais como $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C(O)}-$, em que $n = 2-20$ pode ser utilizado. Estes ligantes alquilo podem ainda ser substituídos por qualquer grupo não estericamente impedido tal como alquilo inferior (e.g., C_1-C_6) acilo inferior,

halogénio (e.g., Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. A Pat. U.S. N° 5 446 090 descreve um ligante PEG bifuncional e sua utilização na formação de conjugados possuindo um péptido em cada um dos terminais PEG ligantes.

Ensaios de Rastreio

São também descritos métodos (também aqui referidos como "ensaios de rastreio") para identificar polipéptidos, pequenas moléculas, ou derivados funcionais que se ligam a to HDM2 e/ou HDMX.

A afinidade de ligação de polipéptidos que se ligam a HDM2 e/ou HDMX podem ser medida utilizando os métodos aqui descritos, por exemplo, utilizando um ensaio de titulação de ligação. HDM2 e/ou HDMX podem ser expostos a várias concentrações de um composto candidato (*i.e.*, polipéptido) (e.g., 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM, e 10 mM) e a ligação podem ser medida utilizando ressonância de plasmão de superfície para determinar a K_d para a ligação. Adicionalmente, as interações de ligação dos SAH-péptidos p53 fluorescentemente marcados a HDM2 e/ou HDMX pode ser utilizada num ensaio de ligação competitiva para pesquisar e identificar péptidos, pequenas moléculas, ou seus derivados bifuncionais que competem com péptidos FITC-SAH-p53, e calculam ainda os valores de K_i para a competição por ligação. Os compostos candidatos podem também ser pesquisados quanto a actividade biológica *in vivo*. Os ensaios de pesquisa de permeabilidade celular em que os compostos candidatos fluorescentemente

marcados são aplicados a células intactas, que são depois ensaiadas quanto a fluorescência celular por microscopia ou detecção de fluorescência celular de elevado processamento podem também ser utilizados.

Os ensaios aqui descritos podem ser efetuados com compostos candidatos individuais ou podem ser efetuados com uma pluralidade de compostos candidatos. Quando os ensaios são efetuados com uma pluralidade de compostos candidatos, os ensaios podem ser efetuados utilizando misturas de compostos candidatos ou podem ser testados em reações paralelas, possuindo cada reação um único composto candidato. Os compostos de teste ou agentes podem ser obtidos utilizando qualquer das numerosas abordagens nos métodos de bibliotecas combinatórias conhecidos na técnica.

Deste modo, pode expor-se HDM2 (e.g., MDM2 purificado) ou HDMX (e.g., MDMX purificado) purificado a um composto de teste na presença de um péptido 53 acoplado e determinar se o composto de teste reduz (inibe) a ligação do péptido 53 acoplado a MDM2 ou MDMX. Um composto de teste que inibe a ligação é um candidato inibidor da interação entre p53 e MDM2 ou MDMX (ou ambos). Os compostos de teste podem ser testados quanto à sua capacidade de inibir a ligação a MDM2 e MDMX de modo a identificar compostos que são relativamente seletivos para a inibição da ligação a p53. Em alguns casos, nutlin-3 (CAS 548472-68-0) pode ser utilizada como um controlo uma vez que nutlin-3 é um inibidor seletivo da ligação de p53 a HDM2.

Referências

- (1) Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W., *Cancer Res.* 1991, 51, 6304-6311.
- (2) Wu, X.; Bayle, J. H.; Olson, D.; Levine, A. J., *Genes Dev.* 1993, 7, 1126-1 132; Yonish-Rouach, E.; Resnftzky, D.; Lotem, J.; Sachs, L.; Kimchi, A.; Oren, M., *Nature* 1991, 352, 345-347; Momand, J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C; George, D.; Levine, A. J., *Cell* 1992, 69, 1237.
- (3) Levine, A. J.; Hu, W.; Feng, Z., *Cell Death Differ* 2006, 13, 1027; Honda, R.; Tanaka, H.; Yasuda, H., *FEBS Lett.* 1997, 420, 25; Tao, W.; Levine, A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 3077-3080.
- (4) Li, M.; Brooks, C. L.; Wu-Baer, F.; Chen, D.; Baer, R.; Gu, W., *Science* 2003, 302, 1972-1975.
- (5) Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C., *Science* 1991, 253, 49-53.
- (6) Chéne. P., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 102-109.
- (6a) Toledo, F.; Ward, G-M., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 1476-82.
- (7) Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P., *Science* 1996, 274, 948-953.

- (8) Sakurai, K.; Chung, H. S.; Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 16288-16289; Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C; Klein, C; Fotouhi, N.; Liu, E. A., *Science* 2004, 303, 844-848.
- (9) Lin, J.; Chen, J.; Elenbaas, B.; Levine, A. J., *Genes Dev.* 1994, 8, 1235-1246.
- (10) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 5891-5892; Walensky, L.D.; Kung, A.L.; Escher, L; Malia, T.J.; Barbuto, S.; Wright, R.D.; Wagner, G.; Verdine.G.L.; Korsmeyer, S.J.; *Science*, 2004, 305, 1466-1470.
- (11) Vivés, E.; Leblou, B., The Tat-Derived Cell-Penetrating Peptide. In Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications, Langel, O., Ed. CRC Press: Boca Raton, 2002; pp 3-21.
- (12) Zhang, Y.; Xiong, Y., *Science* 2001, 292, 1910-1915.
- (13) Barak, Y.; Juven, T.; Haffner, R.; Oren, M., *EMBO J.* 1993, 12, 461-468; Juven, T.; Barak, Y.; Zaiberman, A.; George, D. L.; Oren, M., *Oncogene* 1993, 8, 3411-3416.
- (14) Dulic, V.; Kauffmann, W. K.; Wilson, S. J.; Tisty, T. D.; Lees, E.; Harper, J. W.; Elledge, S. J.; Reed, S. I.,

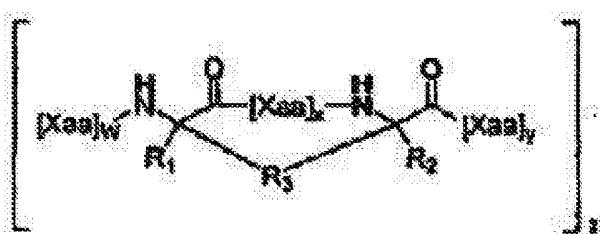
Cell 1994, 76, 1013; El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B., Cell 1993, 75, 817.

(15) Pochampally, R.; Fodera, B.; Chen, L.; Lu, W.; Chen, J., *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 15271-15277.

(16) Duncan, S. J.; Gruschow, S.; Williams, D. H.; McNicholas, C; Purewal, R.; Hajek, M.; Gerlitz, M.; Martin, S.; Wrigley, S. K.; Moore, M., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 554-560; Chéne, P.; Fuchs, J.; Bohn, J.; Garcia-Echeverria, C; Furet, P.; Fabbro, D., *J. Mol. Biol.* 2000, 299, 245; Sakurai, K.; Schubert, C; Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11000-11001; Kritzer, J. A.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 4118-4119; Kritzer, J. A.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9468-9469; Wasyluk, C; Salvi, R.; Argentini, M.; Dureuil, C; Delumeau, I.; Abecassis, J.; Debussche, L.; Wasyluk, B., *Oncogene* 1999, 18, 1921-1934; Garcia-Echeverria, C; Chene, P.; Blommers, M. J. J.; Furet, P., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 3205-3208; Grasberger, B. L., et al., *J. Med. Chem.* 2005, 48, 909-912.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido de hélice alfa que se liga ao duplo do minuto 2 humano (HDM2) e/ou duplo do minuto 4 humano (HDMX) de Fórmula (I),



em que:

cada R_1 e R_2 são independentemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, ou heteracicliclalquilo;

cada R_3 estende-se através de duas voltas da hélice do polipéptido e é independentemente alquíleno, ou alqueníleno ou alquiníleno;

n é um inteiro de 1-4;

x é 6;

y e w são independentemente inteiros de 0-100;

z é um inteiro de 1-10; e

cada Xaa é independentemente um aminoácido;

em que o polipéptido modificado compreende pelo menos 8 aminoácidos contíguos da sequência Leu₁ Ser₂ Gln₃ Glu₄ Thr₅ Phe₆ Ser₇ Asp₈ Leu₉ Trp₁₀ Lys₁₁ Leu₁₂ Leu₁₃ Pro₁₄ Glu₁₅ Pro₁₄ exceto que as cadeias laterais de Ser₇ e Pro₁₄ são substituídas pelo grupo de ligação R₃, e em que até 6 aminoácidos para além dos aminoácidos portadores do grupo de ligação R₃, Phe₆, Trp₁₀ e Leu₁₃ são independentemente substituídos por qualquer outro aminoácido; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

2. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1, em que R₃ é um alquíleno, alquenileno ou alquinileno de cadeia linear.

3. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 2, em que R₃ é alquíleno C₁₁ ou alquenileno C₁₁.

4. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1, em que R₃ é um grupo alquenileno.

5. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1, em que R₁ e R₂ são independentemente H ou alquilo C₁₋₆.

6. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 5, em que R₁ e R₂ são metilo.

7. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1, em que cada y é de 1 a 15.

8. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 em que cada w é de 3 a 15.

9. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 que compreende ainda um grupo acilo derivado de ácido gordo.

10. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 que compreende ainda uma unidade de direcionamento.

11. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 que se liga a HDMX.

12. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 que se liga a HDM2.

13, Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1 que se liga a HDM2 e HDM2.

14. Polipéptido ou um seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado na reivindicação 1, em que o polipéptido não tem uma carga negativa global de pH7.

Lisboa, 12 de janeiro de 2014

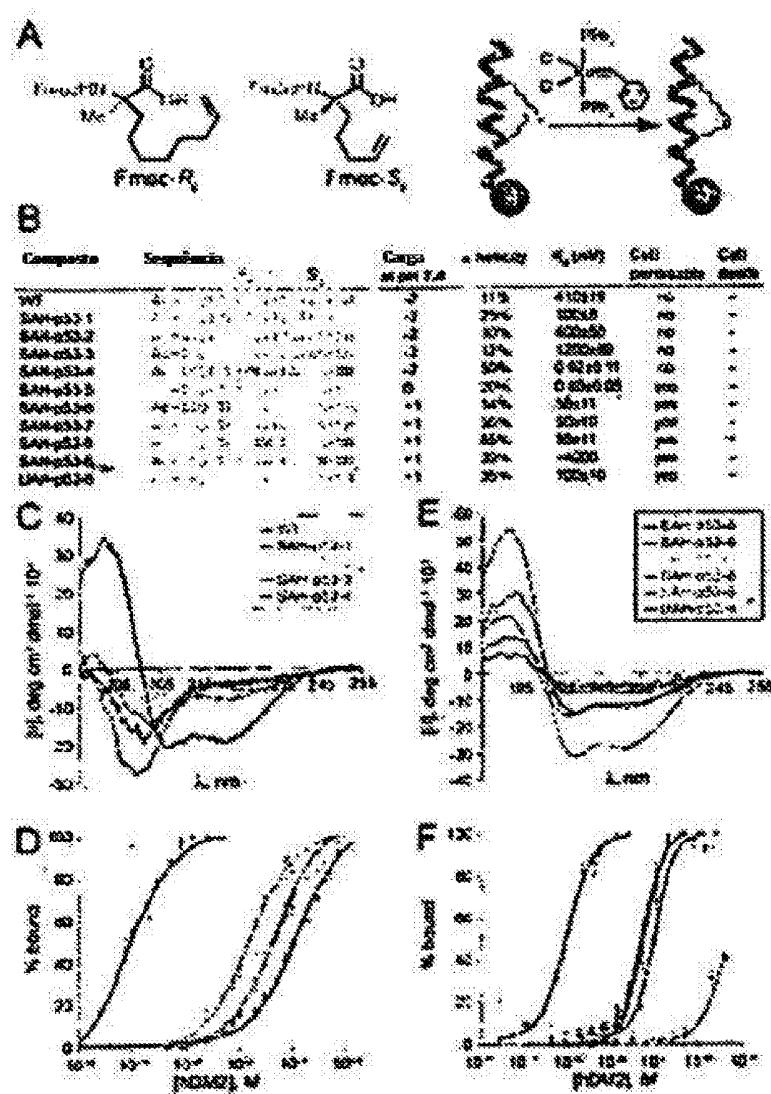
Figura 1

Figura 2

Treatment	Vehicle	WT (20 µM)	SAH-p53-B (20 µM)	SAH-p53-B ₁₋₃₉ (20 µM)
Time post-Tx	5	5	5	5
	12	12	12	12
	18	18	18	18
	24	24	24	24
	30	30	30	30
WB: p53				
WB: HDM2				
WB: p21				
WB: actin				

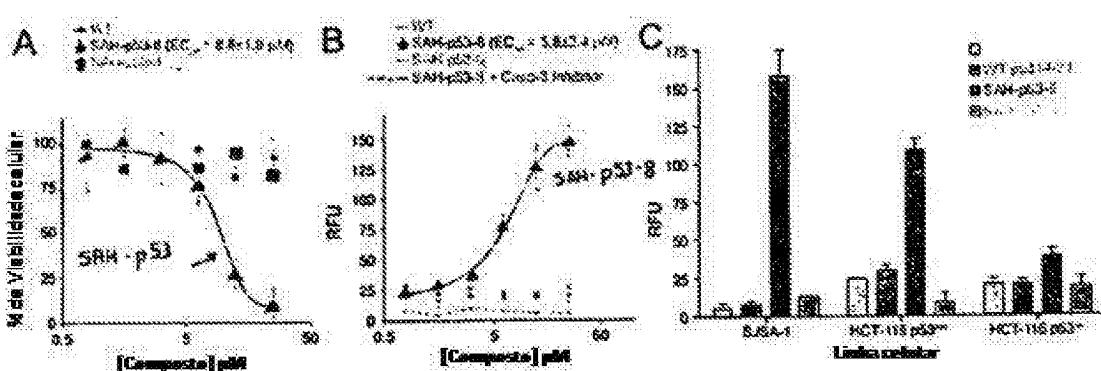
Figura 3

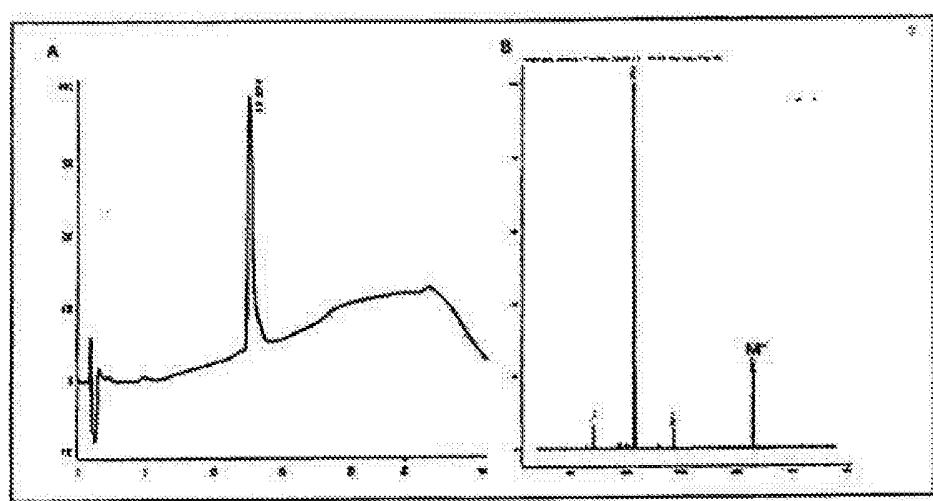
Figura 4

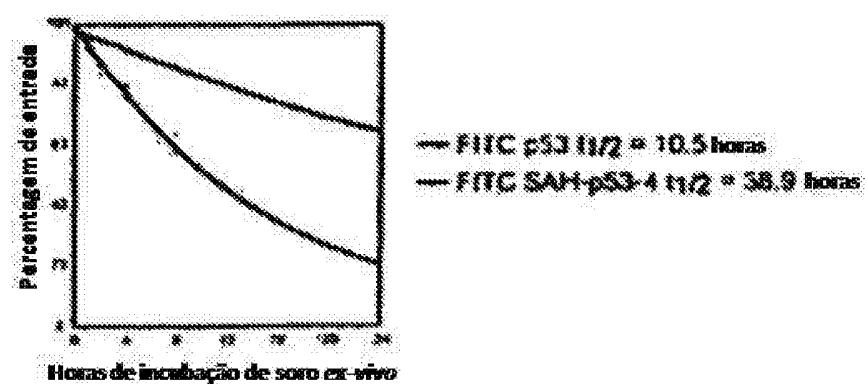
Figura 5

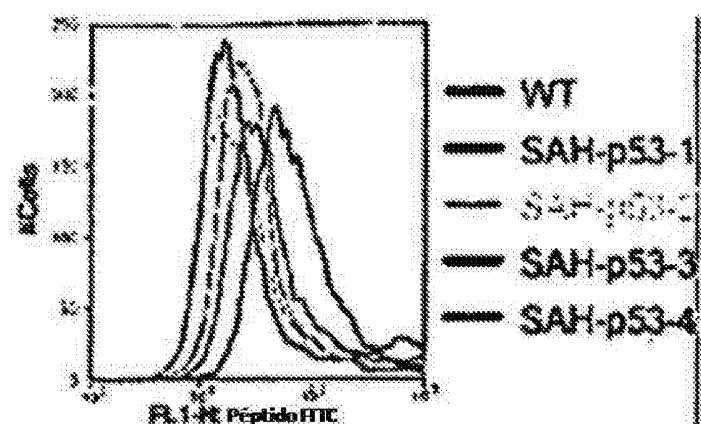
Figura 6

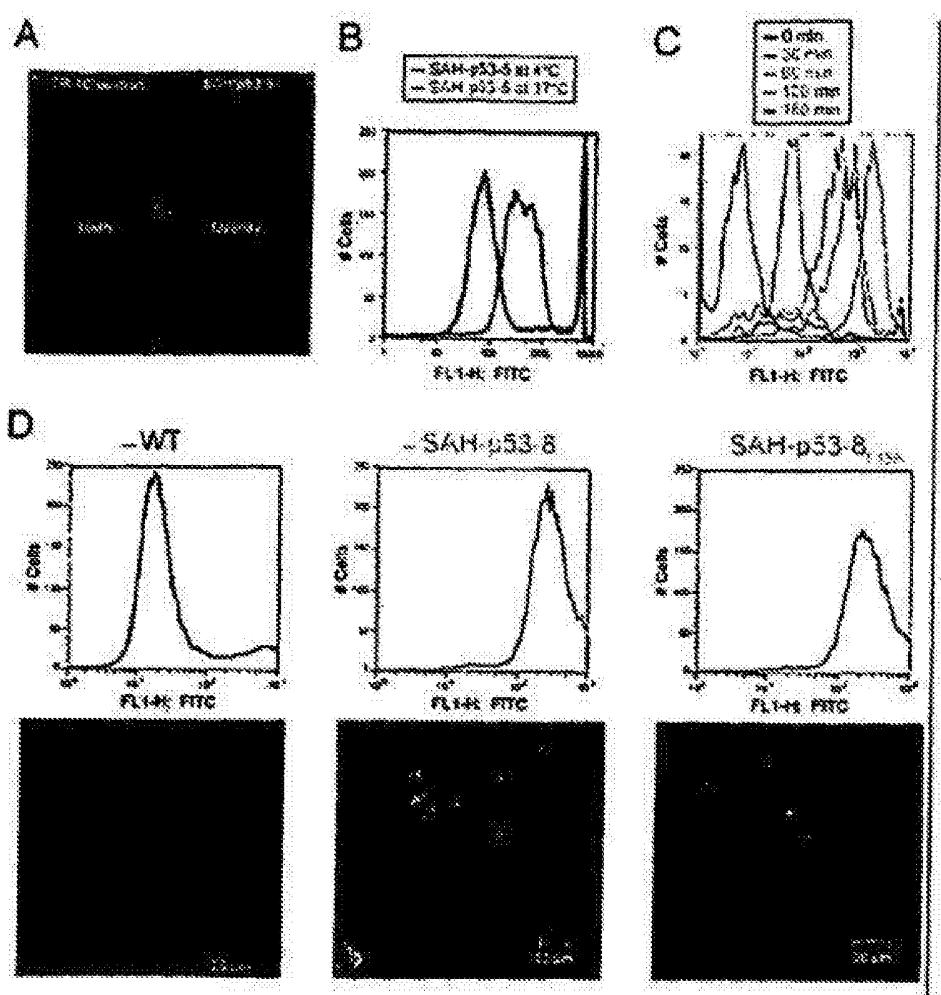
Figura 7

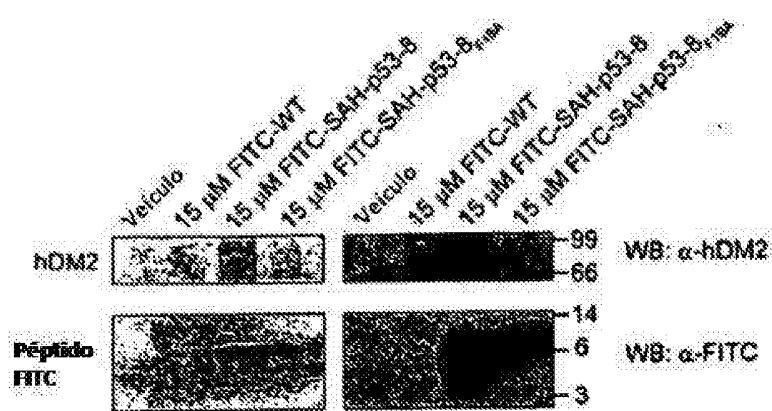
Figura 8

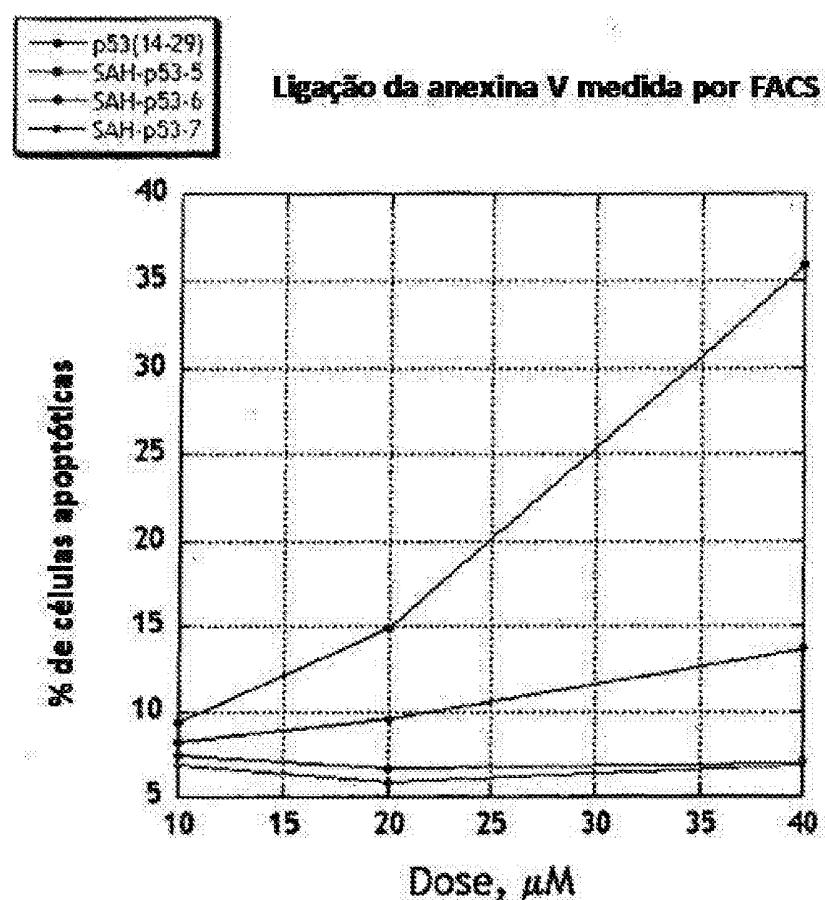
Figura 9

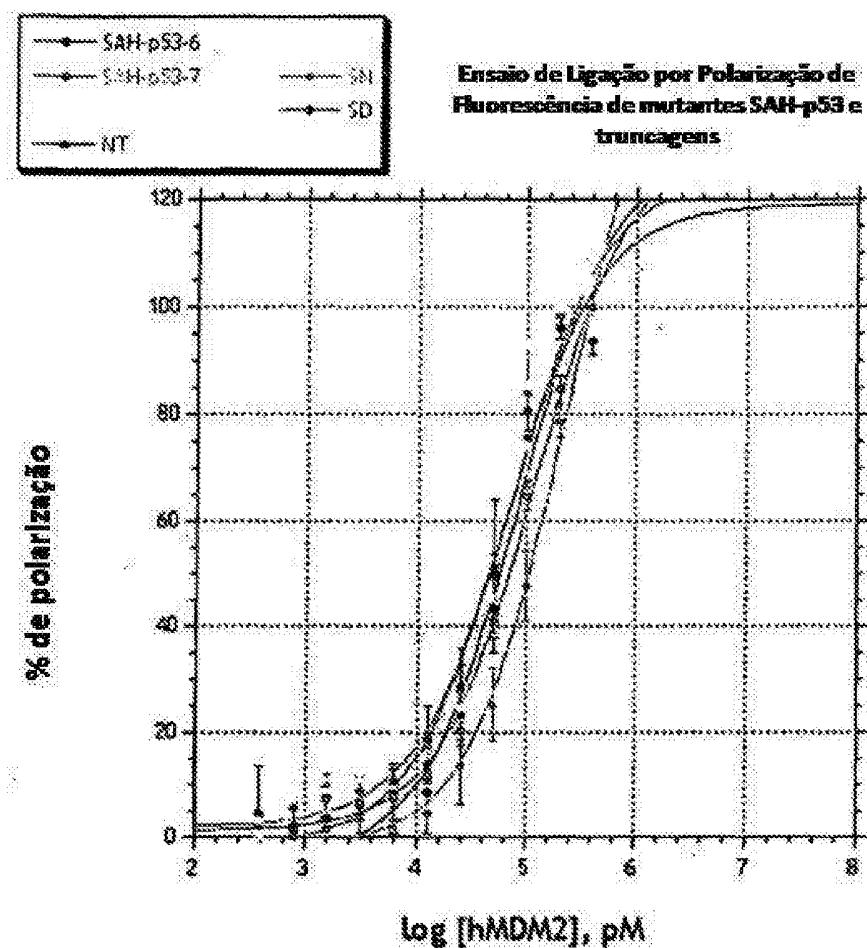
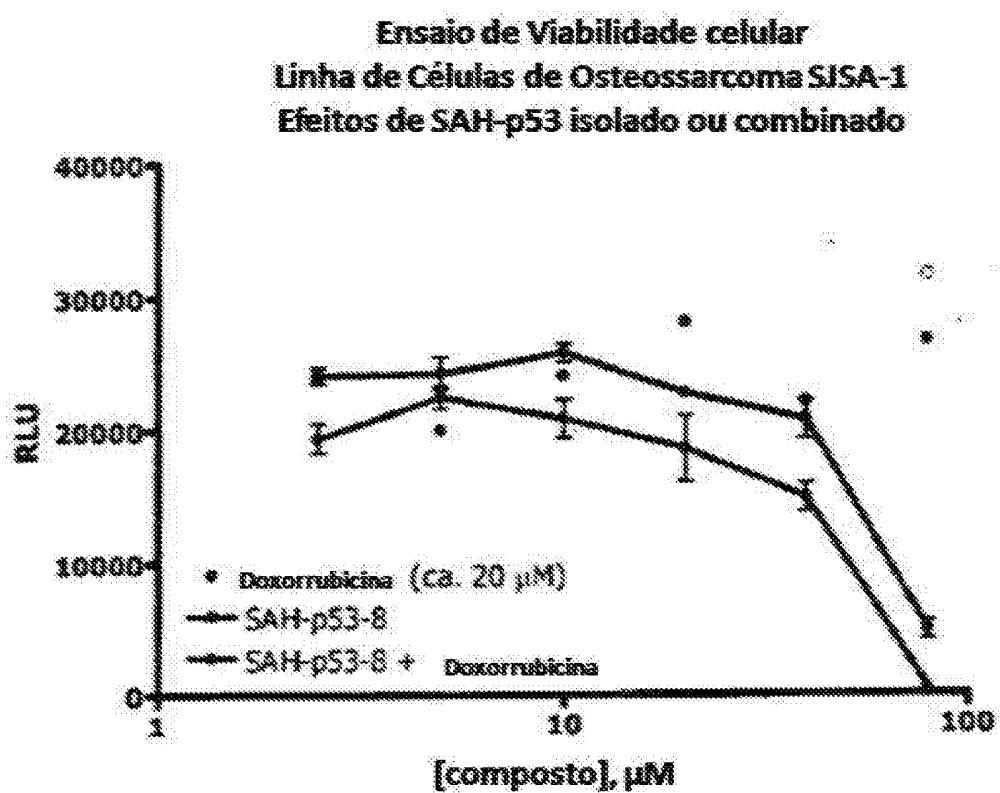
Figura 10

Figura 11

Fluorescência de mutantes SAH-p53 e truncagens

Figura 12

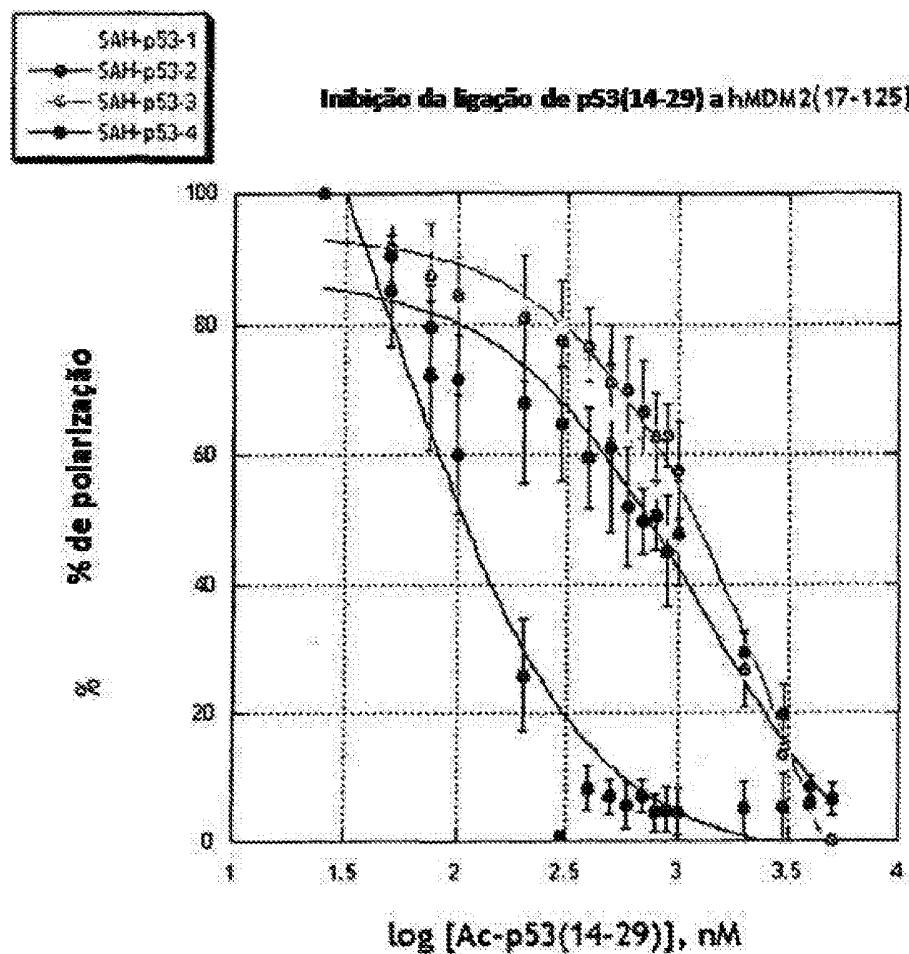
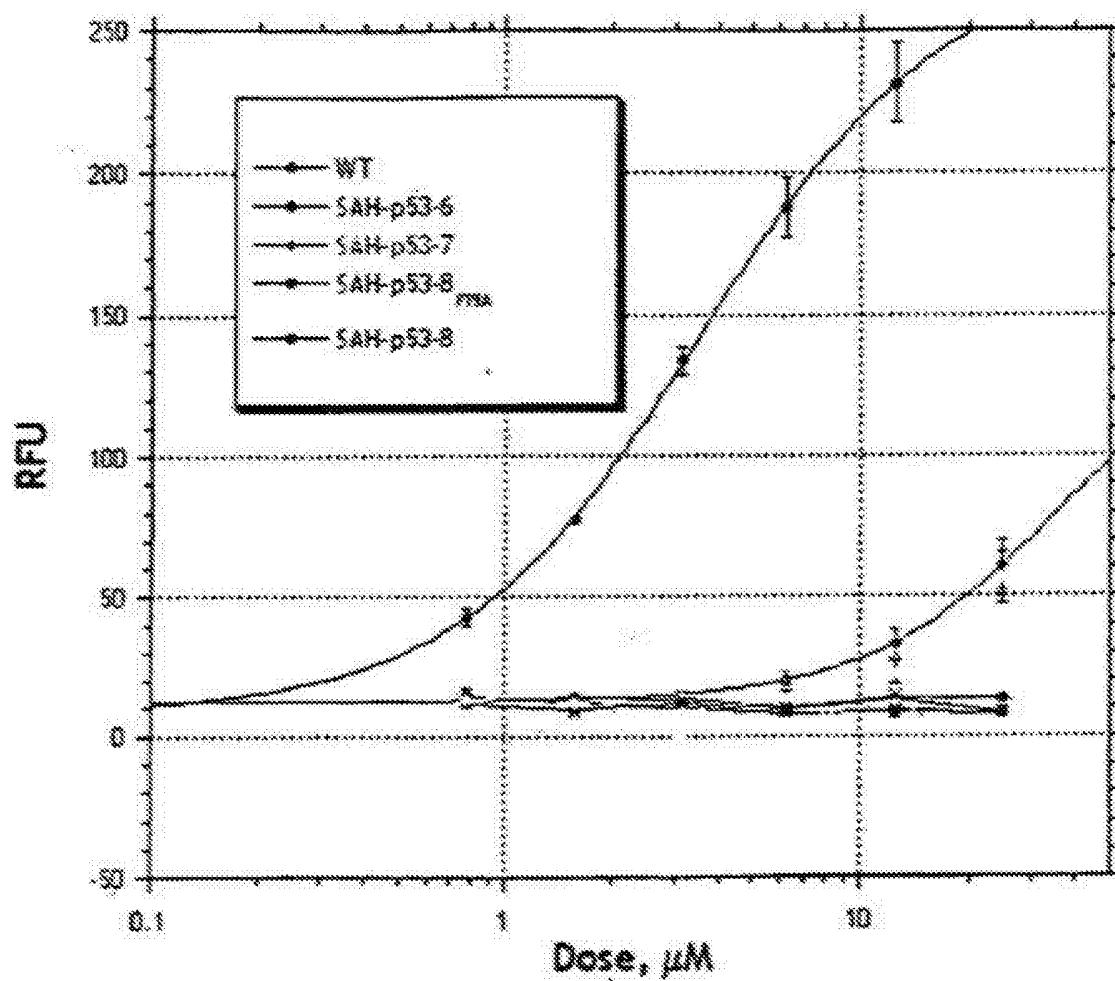
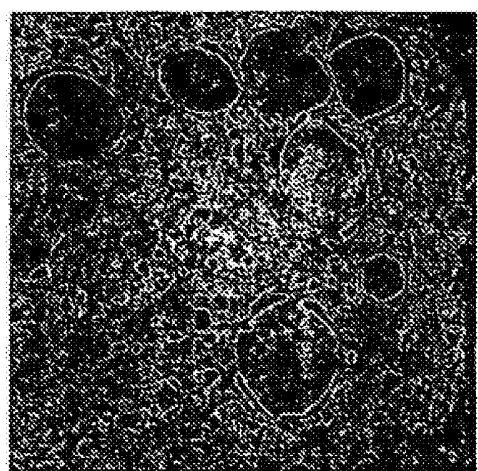


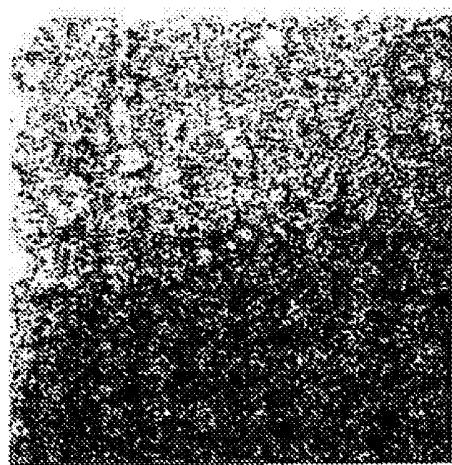
Figura 13**Ensaio fluorimétrico de Caspase-3
24 h Tx, linha de células SISA-1**

Fluorescência de mutantes SAH-p53 e truncagens

Figura 14



A



B

**Fluorescência de mutantes SAH-p53 e
transgênsis**

Figura 15

1 meepqcdpsv eppisqstfs diukkilpenn vlsplipaqam ddialsppdi eqwiftedpgp
61 dseprmpessa prvapapaasp tpaapapaps wpissavpsq ktyqssygsfr lgfihsgtak
121 avtctyspal nkmfcqiakt cpwqiwwdxt pppgtcrvram aiykqsgshmt evvrcphhe
181 zcsdssdgslsp pchilirvegn irveyldorn tfrhsvvvpy eppevqsdct rihynymens
241 smgggnxrp litiitlads sgnligrnaf evrvaccpqr drrteenirx kkgephhelp
301 pgsttkralpn stassapppkk kpidgesyftl qixgrerxfem frainealsi kdsgsgkepq
361 qsrabssshlk skkgqstarh kklnsfktesgp dad

Fluorescência de mutantes SAH-p53 e truncagens

Figura 16-1

1. Cap-Linker-L-**-Q-E-T-F-S-N-**-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 2. Cap-Linker-L-3-Q-**-T-F-S-D-L-N-**-L-L-**-Q-N-NH
 3. Cap-Linker-L-3-Q-E-**-T-F-S-D-L-N-K-**-L-L-**-Q-N-NH
 4. Cap-Linker-L-3-Q-E-T-**-S-D-L-N-K-L-**-L-L-**-Q-N-NH
 5. Cap-Linker-L-3-Q-E-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-L-L-**-Q-N-NH (SAH-p53-4)
 6. Cap-Linker-L-**-Q-E-T-F-S-**-D-L-N-K-L-L-**-L-L-**-Q-N-NH
 7. Cap-Linker-L-3-Q-E-T-Ligante-L-**-D-L-N-K-L-L-**-L-L-**-Q-N-NH
- * "Cap" denota Ac (acetil) ou FITC (tiocarbamilo de fluoresceína); "Linker" denota β -alanina ou sem ligante; " **" indica os pares de aminoácidos R-S ou R-S em qualquer forma ligada não reticulada (não acoplada, não metatécnica) ou ligada reticulada (acoplada, metatécnica)
-
8. Cap-Linker-L-3-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 9. Cap-Linker-L-3-Q-E-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 10. Cap-Linker-L-3-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 11. Cap-Linker-L-3-Q-E-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 12. Cap-Linker-L-3-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 13. Cap-Linker-L-3-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 14. Cap-Linker-Q-3-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 15. Cap-Linker-Q-3-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH (SAH-p53-8)
 16. Cap-Linker-Q-3-Q-Q-T-A-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH (SAH-p53-8)
- * "Cap" denota Ac (acetil) ou FITC (tiocarbamilo de fluoresceína); BOA (criptando capaz de quebração de ^{32}I radioativo, lauroílico, heptanoílico e miristanoílico; "Linker" denota β -alanina ou sem ligante; " **" indica os pares de aminoácidos R-S ou R-S, em qualquer forma ligada não reticulada (não acoplada, não metatécnica) ou ligada reticulada (acoplada, metatécnica)
-
17. Cap-Linker-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 18. Cap-Linker-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 19. Cap-Linker-L-3-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 20. Cap-Linker-Q-Q-T-F-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 21. Cap-Linker-Q-Q-T-A-**-D-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
- * "Cap" denota Ac (acetil) ou FITC (tiocarbamilo de fluoresceína), lauroílico, heptanoílico e miristanoílico; "Linker" denota β -alanina ou sem ligante; " **" indica os pares de aminoácidos R-S, (peptídeos 17, 18 e 21) ou R-S, (peptídeos 19 e 20) nas formas ligada não reticulada (não acoplada, não metatécnica) ou ligada reticulada (acoplada, metatécnica)
-
22. Cap-K(Myr)-Linker-Q-S-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 23. Cap-K(Sietin)-Linker-Q-S-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 24. Cap-K(PEG3)-Linker-Q-S-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH
 25. Cap-Linker-Q-3-Q-Q-T-F-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH, diol
 26. Cap-Linker-Q-3-Q-Q-T-A-**-N-L-N-K-L-L-**-Q-N-NH, diol
- * "Cap" denota Ac (acetil) ou FITC (tiocarbamilo de fluoresceína); "Linker" denota β -alanina ou sem ligante; " **" indica os pares de aminoácidos R-S ou R-S em qualquer forma ligada não reticulada (não acoplada, não metatécnica) ou ligada reticulada (acoplada, metatécnica); "Diol" indica uma oleofina de ligação reticulada di-hidroxilada

Figura 16-2

- 27. Cap-Linker-Q-S-Q-Q-T-P--D-J-W-N-L-L--Q-H-NH₂ (SAB-p53-18)
- 28. Cap-Linker-Q-T-P--N-L-N-R-L-L--NH₂ (SAB-p53-13)
- 29. Cap-Linker-Q-S-Q-Q-T-P--N-L-N--L-L-P-Q-H-NH₂ (SAB-p53-88)
- 30. Cap-Linker-Q-S--Q-T-P--N-L-N-R-L-L-P-Q-H-NH₂ (SAB-p53-88_a)
- 31. Cap-Linker--T-F-S--L-W-K-L-L-NH₂ (SAB-p53-12)
- 32. Cap-Linker-S-T-P--D-L-W--L-L-NH₂ (SAB-p53-13)
- 33. Cap-Linker-Q-T-P--N-L-N--L-L-NH₂ (SAB-p53-14)
- 34. Cap-Linker--S-Q-S--P-S-N-L-W-K-L-L-NH₂ (SAB-p53-15)

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 2005116236 A
- * WO 2005044838 A
- * WO 9934833 A
- * WO 9914299 A
- * US 6346558 B
- * US 5446030 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * WALENSKY et al. Science, 2004, vol. 305, 1466-1470
- * WALENSKY et al. Molecular Cell, 2006, vol. 24, 193-210
- * PICKSLEY et al. *Oncogene*, 1994, vol. 9, 2523-2539
- * UESUGI et al. PNAS, 1999, vol. 96, 14801-14806
- * R. LAROCK. Comprehensive Organic Transformations. VCH Publishers, 1999
- * T.W. GREENE ; P.G.M. WUTS. Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley and Sons, 1999
- * L. FIESER ; M. FIESER. Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis. John Wiley and Sons, 1994
- * Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. John Wiley and Sons, 1995
- * FIELDS et al. Synthetic Peptides: A User's Guide. W.H. Freeman & Co, 1992, 77
- * VALCKUS, L. *Crit Rev in Oncol/Hematol*, 1991, vol. 11, 267-97
- * KASTAN, M. B. ; ONYEKWERE, O. ; SIDRANSKY, D. ; VOGELSTEIN, B. ; CRAIG, R. W. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 6304-6311
- * WU, X. ; BAYLE, J. H. ; OLSON, D. ; LEVINE, A. J. *Genes Dev.*, 1993, vol. 7, 1126-1132
- * YONISH-ROUACH, E. ; RESNFTZKY, D. ; LOTEM, J. ; SACHS, L. ; KIMCHI, A. ; OREN, M. *Nature*, 1991, vol. 352, 345-347
- * MOMAND, J. ; ZAMBETTI, G. P. ; OLSON, D. C. ; GEORGE, D. ; LEVINE, A. J. *Cancer*, 1992, vol. 69, 1237
- * LEVINE, A. J. ; HU, W. ; FENG, Z. *Cell Death Differ*, 2006, vol. 13, 1027
- * HONDA, R. ; TANAKA, H. ; YASUDA, H. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 420, 25
- * TAO, W. ; LEVINE, A. J. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1998, vol. 95, 3077-3080
- * LI, M. ; BROOKS, C. L. ; WU-BAER, F. ; CHEN, D. ; BAER, R. ; GU, W. *Science*, 2003, vol. 302, 1372-1375
- * HOLLSTEIN, M. ; SIDRANSKY, D. ; VOGELSTEIN, B. ; HARRIS, C. C. *Science*, 1991, vol. 253, 49-53
- * CHENE, P. *Annu Rev Cancer*, 2003, vol. 3, 103-109
- * TOLEDO, F. ; WARD, G.-N. M. ; BUCHANAN, C. F. et al. 2007, vol. 39, 1476-82
- * KUSSIE, P. H. ; GORNA, S. ; MARECHAL, V. ; ELENBAAS, B. ; MOREAU, J. ; LEVINE, A. J. ; PAVLETICH, N. P. *Science*, 1990, vol. 274, 948-953
- * SAKURAL, K. ; CHUNG, H. S. ; KAHNE, D. *J Am Chem Soc*, 2004, vol. 126, 16286-16289
- * VASSILEV, L.T. ; VU, B. T. ; GRAVES, B. ; CARVALHO, D. ; POBLASKI, F. ; FILIPOVIC, Z. ; KONG, N. ; KAMMLOTT, U. ; LUKACS, C. ; KLEIN, C. *Science*, 2004, vol. 302, 844-848
- * LIN, J. ; CHEN, J. ; ELENBAAS, B. ; LEVINE, A. J. *Genes Dev.*, 1994, vol. 8, 1235-1246
- * SCHAFMEISTER, C. E. ; PO, J. ; VERDINE, G. L. *J Am Chem Soc*, 2000, vol. 122, 5901-5902 [0129]
- * WALENSKY, L.D. ; KUNG, A.L. ; ESCHER, L. ; MALLIA, T.J. ; BARBUTO, S. ; WRIGHT, R.D. ; WAGNER, G. ; VERDINE, G.L. ; KORSMEYER, S.J. *Science*, 2004, vol. 305, 1466-1470
- * The Tat-Derived Cell-Penetrating Peptides. VIVES, E. ; LEBOU, B. Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications. CRC Press, 2002, 3-21
- * ZHANG, Y. ; XIONG, Y. *Science*, 2001, vol. 292, 1910-1915
- * BARAK, Y. ; JUVEN, T. ; HAFFNER, R. ; OREN, M. *EMBO J*, 1993, vol. 12, 461-468
- * JUVEN, T. ; BARAK, Y. ; ZAUBERMAN, A. ; GEORGE, D. L. ; OREN, M. *Oncogene*, 1993, vol. 8, 3411-3416
- * DULIC, V. ; KAUFFMANN, W. K. ; WILSON, S. J. ; TISTY, T. D. ; LEES, E. ; HARPER, J. W. ; ELLEDGE, S. J. ; REED, S. I. *Cell*, 1994, vol. 76, 1013

- * EL-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VO- GELSTEIN, B. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 817.
- * POCHAMPALLY, R.; PODERA, B.; CHEN, L.; LU, W.; CHEN, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, 15271-15277.
- * DUNCAN, S. J.; GRUSCHOW, S.; WILLIAMS, D. H.; McNICHOLAS, C.; PUREWAL, R.; HAJEK, M.; GERLITZ, M.; MARTIN, S.; WRIGLEY, S. K.; MOORE, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 554-560.
- * CHENE, P.; FUCHS, J.; BOHN, J.; GARCIA-ECHEVERRIA, C.; FURET, P.; FAUBRO, D. J. *Mol. Biol.*, 2000, vol. 298, 245.
- * SAKURAI, K.; SCHUBERT, C.; KAHNE, D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, vol. 128, 11000-11001.
- * KRITZER, J. A.; HODSDON, M. E.; SCHEPARTZ, A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, 4118-4119.
- * KRITZER, J. A.; LEAR, J. D.; HODSDON, M. E.; SCHEPARTZ, A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, 9484-9489.
- * WASYLYK, C.; SALVI, R.; ARGENTINI, M.; DU- REUIL, C.; DELUMEAU, I.; ABECASSIS, J.; DE- BUSSCHE, L.; WASYLYK, B. *Oncogene*, 1998, vol. 18, 1921-1934.
- * GARCIA-ECHEVERRIA, C.; CHENE, P.; BLOM- MERS, M. J. J.; FURET, P. *J. Med. Chem.*, 2000, vol. 43, 3205-3208.
- * GRASBERGER, B. L. et al. *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, 909-912.