



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0807578-6 A2



(22) Data do Depósito: 25/02/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 15/06/2021

(54) Título: MACROCICLO PEPTIDOMIMÉTICO, COMPOSTO, KIT E MÉTODOS PARA SINTETIZAR UM MACROCICLO PEPTIDOMIMÉTICO

(51) Int. Cl.: A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/02/2007 US 60/903,073.

(71) Depositante(es): AILERON THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): HUW M. NASH.

(86) Pedido PCT: PCT US2008054922 de 25/02/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/104000 de 28/08/2008

(85) Data da Fase Nacional: 24/08/2009

(57) Resumo: SISTEMAS DE TRIAZÓIS MACROCÍCLICOS. Patente de invenção refere-se a macrociclos peptidomiméticos inusitados e métodos para sua preparação e uso, bem como análogos de aminoácidos e ligantes formadores de macrociclos, e kits úteis na sua produção.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SISTEMAS DE TRIAZÓIS MACROCÍCLICOS**".

REFERÊNCIA CRUZADA

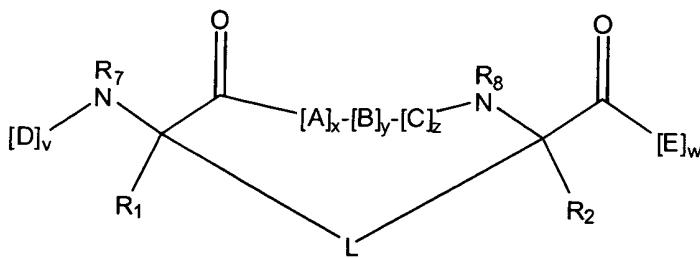
Este pedido de patente reivindica o benefício do pedido de patente provisório nº US 60/903.073, depositado em 23 de fevereiro de 2007, que é aqui incorporado como referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os peptídeos estão se tornando crescentemente importantes em aplicações farmacêuticas. Os peptídeos não-modificados sofrem frequentemente de estabilidade metabólica deficiente, penetrabilidade de células deficiente, e ligação promíscua devido à flexibilidade conformacional. Para melhorar estas propriedades, os pesquisadores geraram peptídeos cíclicos e peptidomiméticos por uma série de métodos, incluindo formação de ligações dissulfeto, formação de ligações amida, e formação de ligações carbono-carbono (Jackson *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 113:9391-9392 (1991); Phelan *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 119:455-460 (1997); Tailor, *Biopolymers* 66:49-75 (2002); Brunel *et al.*, *Chem. Commun.* (20):2552-2554 (2005); Hiroshige *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 117:11590-11591 (1995); Blackwell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:3281-3284 (1998); Schafmeister *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892 (2000)). As limitações destes métodos incluem estabilidade metabólica deficiente (ligações dissulfeto e amida), penetrabilidade de células deficiente (ligações dissulfeto e amida), e o uso de metais potencialmente tóxicos (para formação de ligações carbono-carbono). Assim sendo, há uma necessidade significativa de se obter métodos aperfeiçoados para produzir peptídeos ou peptidomiméticos que possuem maior rigidez conformacional, estabilidade metabólica e penetrabilidade de células. A presente invenção dedica-se a estas e outras necessidades nessas técnicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção fornece macrociclos peptidomiméticos da Fórmula I, em que:



(Fórmula I)

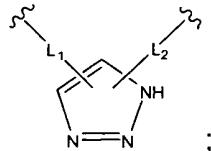
cada A, C, D, e E é independentemente um aminoácido natural ou não-natural;

B é um aminoácido natural ou não-natural, análogo de aminoácido, , [-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], ou [-NH-L₃-];

R₁ e R₂ são independentemente –H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituídos ou substituídos com halo–;

R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterociclo-arila, opcionalmente substituídos com R₅;

L é um ligante formador de macrociclos da fórmula



L₁, L₂ e L₃ são independentemente alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, cicloaríleno, heterocicloaríleno, ou [-R₄-K-R₄-]_n, sendo cada um opcionalmente substituído com R₅;

cada R₄ é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

cada K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;

cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

cada R₆ é independentemente –H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente,

um radioisótopo ou um agente terapêutico;

R_7 é $-H$, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, heteroalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R_5 , ou parte de uma estrutura cíclica com

5 um resíduo D;

R_8 é $-H$, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, ciclo-alquila, heteroalquila, cicloalquil-alquila, heterociclo-alquila, ciclo-arila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R_5 , ou parte de uma estrutura cíclica com um resíduo E;

10 v é um número inteiro entre 1-1.000;

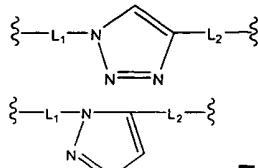
w é um número inteiro entre 1-1.000;

x é um número inteiro entre 0-10;

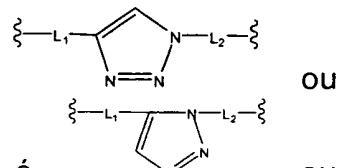
y é um número inteiro entre 0-10;

z é um número inteiro entre 0-10; e

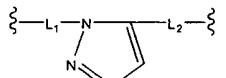
15 n é um número inteiro entre 1-5.



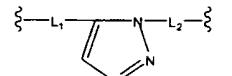
Em algumas modalidades, L é



ou



. Em outras modalidades, L é



ou

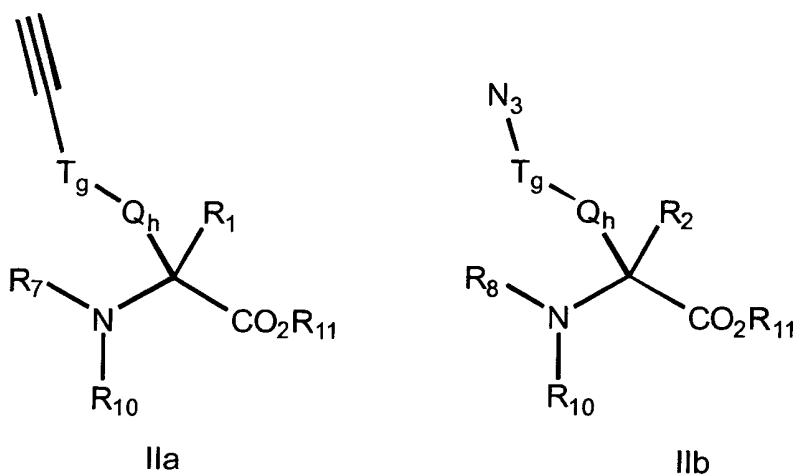
20 . Em outras modalidades, pelo menos um entre R_1 e R_2 é alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituídos ou substituídos com halo-. Em modalidades afins, R_1 e R_2 são independentemente alquila, alquenila, alquinila, aril-alquila, ciclo-alquila, ciclo-alquil-alquila, heteroalquila, ou heterociclo-alquila, não-substituídos ou substituídos com halo-. Por exemplo, pelo menos um entre R_1 e R_2 pode ser alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em algumas modalidades, R_1 e também R_2 são independentemente alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em outras modalidades, pelo menos um entre R_1 e R_2 é metila. Em ainda outras modalidades, R_1 e também R_2 são metila.

25 Em algumas modalidades, pelo menos um entre D e E é um aminoácido natural ou não-natural substituído com um lipídeo ou hidrocarbo-

neto de alto peso molecular. Em outras modalidades, pelo menos um entre D e E está anexado a um ligante formador de macrociclo adicional. Em ainda outras modalidades, uma estrutura secundária do macrociclo peptidomimético é mais estável do que uma estrutura secundária correspondente de um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético compreende uma hélice α . A hélice α pode compreender, por exemplo, entre 1 volta e 5 voltas. Em outras modalidades, a hélice α é mais estável do que uma hélice α de um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. O ligante formador de macrociclo pode abranger 5 entre 1 volta e 5 voltas da hélice α , tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4 ou 5 voltas da hélice α . O comprimento do ligante formador de macrociclo pode ser, por exemplo, cerca de 5 Å e cerca de 9 Å por volta da hélice α . Em algumas modalidades, o ligante formador de macrociclo abrange aproximadamente 1 volta da hélice α . Nessas modalidades, o comprimento do ligante formador de macrociclo pode ser aproximadamente igual ao comprimento de cerca de 6 ligações carbono-carbono a cerca de 14 ligações carbono-carbono, ou pode ser igual ao comprimento de cerca de 8 ligações carbono-carbono a cerca de 12 ligações carbono-carbono. Em modalidades afins, o macrociclo pode compreender um anel de cerca de 18 átomos a 26 átomos.

20 Em outras modalidades, o ligante formador de macrociclo abrange aproximadamente 2 voltas da hélice α . Em algumas modalidades, o comprimento do ligante formador de macrociclo pode ser aproximadamente igual ao comprimento de entre cerca de 8 ligações carbono-carbono e cerca de 16 ligações carbono-carbono, ou pode ser aproximadamente igual ao comprimento de cerca de 10 ligações carbono-carbono a cerca de 13 ligações carbono-carbono. Em modalidades afins, o macrociclo pode compreender um anel de cerca de 29 átomos a cerca de 37 átomos.

Em algumas modalidades, um aminoácido útil na síntese do macrociclo peptidomimético da invenção é um composto da Fórmula IIa ou IIb:



em que

R₁ e R₂ são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo—;

5 cada Q e T é selecionado independentemente no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e [-R₄-K-R₄-]_n, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R₅;

K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;

10 R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, aril-alquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅;

R₄ é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

15 cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

cada R₆ é independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

R₇ e R₈ são independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquilalquila, ou heterocicloalquila;

R₁₀ e R₁₁ são independentemente -H ou qualquer grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos;

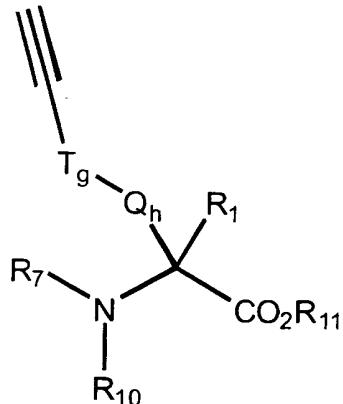
g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5, onde g+h é maior do que 1; e

n é um número inteiro entre 1 e 5.

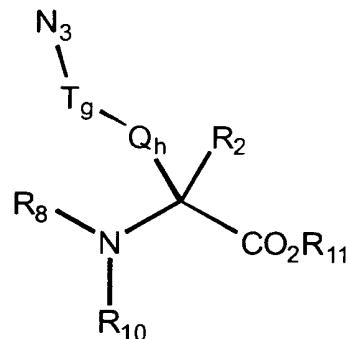
Em algumas modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em outras modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em ainda outras modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₁ pode ser metila. Em ainda outras modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₂ pode de ser metila. Em algumas modalidades dos compostos da invenção, pelo menos um entre R₉ e R₁₀ é um grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos. Em outro aspecto, a presente invenção fornece ainda *kits* que compreendem os compostos da invenção ou outros análogos de aminoácidos úteis na preparação dos macrociclos peptidomiméticos da invenção junto com reagentes de macrociclagem como aqui descritos.

Em algumas modalidades, a invenção fornece um *kit* que compreende:

a) pelo menos um composto selecionado no grupo que consiste em compostos das Fórmulas IIa e IIb:



IIa



IIb

em que

R₁ e R₂ são independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-;

cada Q e T é independentemente selecionado no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e [-R₄-K-R₄-]_n, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R₅;

5 K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;

R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituída com R₅;

10 R₄ é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

15 cada R₆ é independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

R₇ e R₈ são independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquilalquila, ou heterocicloalquila;

20 R₁₀ e R₁₁ são independentemente -H ou qualquer grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos;

g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5;

n é um número inteiro entre 1 e 5; e

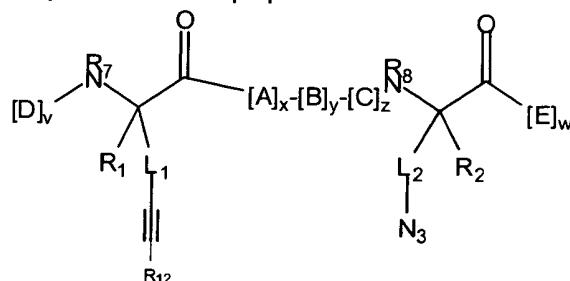
b) um reagente de macrociclização.

25 Em algumas modalidades, o *kit* compreende um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₁ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₁ pode ser metila. Em outras modalidades, o *kit* compreende um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₂ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₂ pode ser metila.

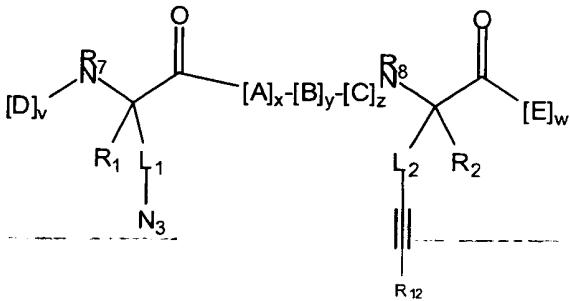
30 Em algumas modalidades, um *kit* compreende pelo menos um composto da Fórmula IIa e pelo menos um composto da Fórmula IIb. Um *kit* da invenção pode compreender também um composto da Fórmula IIa ou

Fórmula IIb no qual pelo menos um entre R₉ e R₁₀ é um grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos. Em modalidades específicas do *kit* da invenção, o reagente de macrociclagem é um reagente de Cu. Em ainda outras modalidades do *kit* da invenção, o reagente de macrociclagem é um reagente de Ru.

A presente invenção fornece também um método para sintetizar um macrociclo peptidomimético, sendo que o método compreende as etapas de colocar um precursor de peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV:



(Fórmula III)



(Fórmula IV)

em contato com um reagente de macrociclagem;

- 10 em que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ e L₂ são como definidos acima; R₁₂ é -H quando o reagente de macrociclagem é um reagente de Cu e R₁₂ é -H ou alquila quando o reagente de macrociclagem é um reagente de Ru; e ainda onde a dita etapa de colocar em contato resulta em uma ligação covalente sendo formada entre o alquino e o grupamento azida na Fórmula III ou Fórmula IV. Por exemplo, R₁₂ pode ser metila quando o reagente de macrociclagem é um reagente de Ru.

Em algumas modalidades do método da invenção, pelo menos um entre R₁ e R₂ é alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₁ e R₂ são independentemente alqui-

la, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-.

- Por exemplo, pelo menos um entre R_1 e R_2 pode ser alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em outro exemplo, R_1 e também 5 R_2 são independentemente alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em algumas modalidades, pelo menos um entre R_1 e R_2 é metila. Em outras modalidades, R_1 e R_2 são metila. O reagente de macrociclização pode ser um reagente de Cu. Alternativamente, o reagente de macrociclização pode ser um reagente de Ru.
- 10 Em algumas modalidades, o precursor peptidomimético é purificado antes da etapa de colocar em contato. Em outras modalidades, o macrociclo peptidomimético é purificado depois da etapa de colocar em contato. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético é redobrado depois da etapa de colocar em contato. O método pode ser realizado em 15 solução, ou, alternativamente, o método pode ser realizado sobre um suporte sólido.

Está previsto também nesta invenção realizar o método da invenção na presença de uma macromolécula-alvo que se liga ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação. Em algumas modalidades, o método é realizado na presença de uma macromolécula-alvo que se liga preferencialmente ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação. O método pode ser aplicado também para sintetizar uma biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

25 O macrociclo peptidomimético resultante de um método da invenção pode compreender uma hélice α em solução aquosa. Por exemplo, o macrociclo peptidomimético pode apresentar maior estrutura helicóide α em solução aquosa em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior estabilidade térmica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior atividade biológica em comparação com um

polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior resistência contra degradação proteolítica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior capacidade de penetrar em células vivas, em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

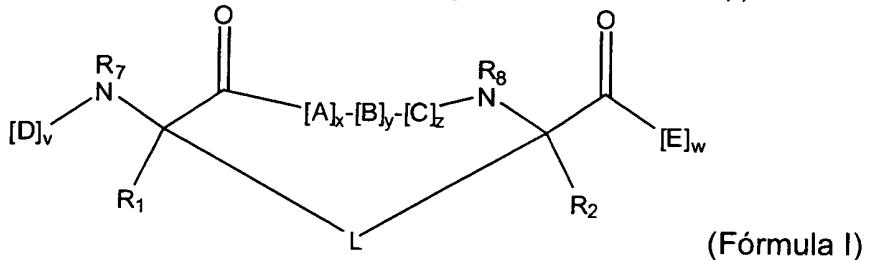
Em algumas modalidades, o grupamento alquino do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionada no grupo que consiste em L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninóico e o grupamento azida do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionado no grupo que consiste em ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, δ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alfa-metil-L-ornitina, e δ -azido-alfa-metil-D-ornitina.

Em algumas modalidades, $x+y+z$ é 3, e A, B e C são independentemente aminoácidos naturais ou não-naturais. Em outras modalidades, $x+y+z$ é 6, e A, B e C são independentemente aminoácidos naturais ou não-naturais.

Em algumas modalidades, o reagente de macrociclização é um reagente de Cu e a etapa de colocar em contato é realizada em um solvente selecionado no grupo que consiste em solvente prótico, solvente aquoso, solvente orgânico, e misturas deles. Por exemplo, o solvente pode ser escaldado no grupo que consiste em H₂O, THF/H₂O, tBuOH/H₂O, DMF, DIPEA, CH₃CN, CH₂Cl₂, ClCH₂CH₂Cl ou uma mistura deles. Em outras modalidades, o reagente de macrociclização é um reagente de Ru e a etapa de colocar em contato é realizada em um solvente orgânico. Por exemplo, o solvente pode ser DMF, THF, CH₃CN, CH₂Cl₂ ou ClCH₂CH₂Cl. O solvente pode ser um sol-

vente que favorece a formação de hélices.

Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético resultante da realização do método da invenção tem a Fórmula (I):



onde v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, e L são como definidos acima.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

Todas publicações, patentes, e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados como referência até o mesmo grau como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado como referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

Como aqui utilizado, o termo "macrociclo" refere-se a uma molécula que tem uma estrutura química que inclui um anel ou ciclo formado por pelo menos 9 átomos ligados de forma covalente.

Como aqui utilizado, o termo "macrociclo peptidomimético" refere-se a um composto que comprehende uma pluralidade de resíduos de aminoácidos unidos por uma pluralidade de ligações peptídicas e pelo menos um ligante formador de macrociclo que forma um macrociclo entre o carbono α de um resíduo de aminoácido de ocorrência natural ou de um resíduo de aminoácido de ocorrência não-natural ou de um resíduo de análogo de aminoácido e o carbono α de outro resíduo de aminoácido de ocorrência natural ou de um resíduo de aminoácido de ocorrência não-natural ou de um resíduo de análogo de aminoácido. Os macrociclos peptidomiméticos incluem opcionalmente uma ou mais ligações não-peptídicas entre um ou mais resíduos de aminoácidos e/ou resíduos de análogos de aminoácidos, e incluem

opcionalmente um ou mais resíduos de aminoácidos de ocorrência não-natural, ou resíduos de análogos de aminoácidos além daqueles que formam o macrociclo.

Como aqui utilizado, o termo "estabilidade" refere-se à manutenção de uma estrutura secundária definida em solução por um macrociclo peptidomimético da invenção, medida por dicroísmo circular, RMN ou outra medida biofísica, ou resistência à degradação proteolítica *in vitro* ou *in vivo*. Os exemplos não-limitativos de estruturas secundárias contempladas nesta invenção são hélices α, voltas β, folhas β pregueadas.

Como aqui utilizado, o termo "estabilidade helicóide" refere-se à manutenção de uma estrutura helicóide a por um macrociclo peptidomimético da invenção, medida por dicroísmo circular. Por exemplo, em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos da invenção apresentam pelo menos um aumento de 1,25, 1,5, 1,75 ou 2 vezes em helicidade α, determinada por dicroísmo circular, em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

O termo " α -aminoácido" ou simplesmente "aminoácido" refere-se a uma molécula que contém um grupo amino e também um grupo carboxila ligados a um carbono que é designado carbono α . Os aminoácidos apropriados incluem, sem limitações, os isômeros D e L dos aminoácidos de ocorrência natural, bem como aminoácidos de ocorrência não-natural preparados por síntese orgânica ou outras rotas metabólicas. A menos que o contexto indique especificamente e forma diferente, o termo aminoácido, como aqui utilizado, pretende incluir análogos de aminoácidos.

O termo "aminoácido de ocorrência natural" refere-se a qualquer um dos vinte aminoácidos encontrados comumente em peptídeos sintetizados na natureza, e conhecidos pelas abreviaturas de uma letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y e V.

O termo "análogo de aminoácido" refere-se a uma molécula que é estruturalmente similar a um aminoácido e que pode ser substituído por um aminoácido na formação de um macrociclo peptidomimético. Os análogos de aminoácidos incluem, sem limitações, os compostos que são estrutu-

ralmente idênticos a um aminoácido, como aqui definido, exceto pela inclusão de um ou mais grupos metileno adicionais entre o grupo amino e carboxila (por exemplo, α-amino-β-carbóxi-ácidos), ou pela substituição o grupo amino ou carboxila por um grupo similarmente reativo (por exemplo, substituição da amina primária por uma amina secundária ou terciária, ou substituição do grupo carboxila por um éster).

Um resíduo de aminoácido "não-essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir de uma sequência do tipo selvagem de um polipeptídeo (por exemplo, um domínio BH3 ou o domínio ligante p53 MDM2) sem abolir ou alterar substancialmente sua atividade biológica ou bioquímica essencial (por exemplo, ligação ou ativação de receptor). Um resíduo de aminoácido "essencial" é um resíduo que, quando alterado a partir da sequência do tipo selvagem do polipeptídeo, resulta em abolir ou abolir substancialmente a atividade biológica ou bioquímica essencial do polipeptídeo.

Uma "substituição conservativa de aminoácido" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduo de aminoácidos que têm cadeias laterais similares foram identificadas nessas técnicas. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, K, R, H), cadeias laterais ácidas (por exemplo, D, E), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, G, N, Q, S, T, Y, C), cadeias laterais apolares (por exemplo, A, V, L, I, P, F, M, W), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, T, V, I) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, Y, F, W, H). Assim sendo, um resíduo de aminoácido não-essencial previsto em um polipeptídeo BH3, por exemplo, é de preferência substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral.

O termo "membro", como aqui utilizado, em conjunto com macrociclos ou ligantes formadores de macrociclos, refere-se aos átomos que formam ou podem formar o macrociclo, e exclui átomos de substituintes ou cadeias laterais. Por analogia, ciclodecano, 1,2-difluor-decano e 1,3-dimetilcyclodecano são todos considerados macrociclos com dez membros, pois os substituintes hidrogênio ou flúor ou as cadeias laterais metila não participam

da formação do macrociclo.

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 de aminoácido" refere-se a um grupo anexado ao carbono α em um aminoácido. Por exemplo, a cadeia lateral de aminoácido para alanina é metila, a cadeia lateral de aminoácido para fenilalanina é fenil-metila, a cadeia lateral de aminoácido para cisteína é tiometila, a cadeia lateral de aminoácido para aspartato é carbóxi-metila, a cadeia lateral de aminoácido para tirosina é 4-hidróxi-fenil-metila, etc. Outras cadeias laterais de aminoácidos de ocorrência não-natural também estão incluídas, por exemplo, aquelas que ocorrem na natureza (por exemplo, um metabólito de aminoácido) ou aquelas que são fabricadas sinteticamente (por exemplo, um aminoácido α,α-dissubstituído).

O termo "polipeptídeo" engloba dois aminoácidos de ocorrência natural ou não-natural unidos por uma ligação covalente (por exemplo, uma ligação amida). Os polipeptídeos, como aqui descritos, incluem proteínas de comprimento inteiro (por exemplo, proteínas completamente processadas), bem como sequências de aminoácidos mais curtas (por exemplo, fragmentos de proteínas de ocorrência natural ou fragmentos de polipeptídeos sintéticos).

O termo "reagente de macrociclização", como aqui utilizado, refere-se a qualquer reagente que pode ser usado para preparar um macrociclo peptidomimético da invenção, mediando a reação entre uma azida e um alquino. Tais reagentes incluem, sem limitações, reagentes de Cu, tais como os reagentes que produzem uma espécie Cu(I) reativa, tal como CuBr, Cul ou CuOTf, bem como sais de Cu(II) tais como Cu(CO₂CH₃)₂, CuSO₄, e CuCl₂ que podem ser convertidos *in situ* em um reagente Cu(I) reativo pela adição de um agente redutor, tal como ácido ascórbico ou ascorbato de sódio. Os reagentes de macrociclização incluem adicionalmente, por exemplo, reagentes de Ru conhecidos nessas técnicas tais como Cp*RuCl(PPh₃)₂, [Cp*RuCl]₄ ou outros reagentes de Ru que podem produzir uma espécie Ru(II) reativa.

O termo "halo" ou "halogênio" refere-se a flúor, cloro, bromo ou iodo ou um seu radical.

O termo "alquila" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada que é uma cadeia linear ou cadeia ramificada, que contém o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₁-C₁₀ indica que o grupo tem entre 1 e 10 (inclusive) átomos de carbono nele. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquila" é uma cadeia (linear ou ramificada) que tem 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono nela.

O termo "alquileno" refere-se a uma alquila bivalente (isto é, -R-).

O termo "alquenila" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada que é uma cadeia linear ou cadeia ramificada que tem uma ou mais ligações duplas carbono-carbono. O grupamento alquenila contém o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₂-C₁₀ indica que o grupo tem entre 2 e 10 (inclusive) átomos de carbono nele. O termo "alquenila inferior" refere-se a uma cadeia alquenila de C₂-C₆. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquenila" é uma cadeia (linear ou ramificada) que tem 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono nela.

O termo "alquinila" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada que é uma cadeia linear ou cadeia ramificada que tem uma ou mais ligações triplas carbono-carbono. O grupamento alquinila contém o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C₂-C₁₀ indica que o grupo tem entre 2 e 10 (inclusive) átomos de carbono nele. O termo "alquinila inferior" refere-se a uma cadeia alquinila de C₂-C₆. Na ausência de qualquer designação numérica, "alquinila" é uma cadeia (linear ou ramificada) que tem 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono nela.

O termo "arila" refere-se a um sistema anelar aromático monocíclico com 6 carbonos ou bicíclico com 10 carbonos, onde 0, 1, 2, 3, ou 4 átomos de cada anel são substituídos com um substituinte. Os exemplos de grupos arila incluem fenila, naftila e similares. O termo "arilalquila" ou o termo "aralquila" refere-se a alquila substituída com uma arila. O termo "arilalcóxi" refere-se a um alcóxi substituído com arila.

"Arilalquila" refere-se a um grupo arila, como definido acima, on-

de um dos átomos de hidrogênio do grupo arila foi substituído por um grupo alquila de C₁-C₅, como definido. Os exemplos representativos de um grupo arilalquila incluem, porém sem limitações, 2-metilfenila, 3-metilfenila, 4-metilfenila, 2-etilfenila, 3-etilfenila, 4-etilfenila, 2-propilfenila, 3-propilfenila, 4-propilfenila, 2-butilfenila, 3-butilfenila, 4-butilfenila, 2-pentilfenila, 3-pentilfenila, 4-pentilfenila, 2-isopropilfenila, 3-isopropilfenila, 4-isopropilfenila, 2-isobutilfenila, 3-isobutilfenila, 4-isobutilfenila, 2-sec-butilfenila, 3-sec-butilfenila, 4-sec-butilfenila, 2-t-butilfenila, 3-t-butilfenila e 4-t-butilfenila.

"Arilamido" refere-se a um grupo arila, como definido acima, onde um dos átomos de hidrogênio do grupo arila foi substituído por um ou mais grupos -C(O)NH₂. Os exemplos representativos de um grupo aril-amido incluem 2-C(O)NH₂-fenila, 3-C(O)NH₂-fenila, 4-C(O)NH₂-fenila, 2-C(O)NH₂-piridila, 3-C(O)NH₂-piridila, e 4-C(O)NH₂-piridila.

"Alquil-heterociclo" refere-se a um grupo alquila de C₁-C₅, como definido acima, onde um dos átomos de hidrogênio do grupo alquila de C₁-C₅ foi substituído por um heterociclo. Os exemplos representativos de um grupo alquil-heterociclo incluem, porém sem limitações, -CH₂CH₂-morfolina, -CH₂CH₂-piperidina, -CH₂CH₂CH₂-morfolina, e -CH₂CH₂CH₂-imidazol.

"Alquilamido" refere-se a um grupo alquila de C₁-C₅, como definido acima, onde um dos átomos de hidrogênio do grupo alquila de C₁-C₅ foi substituído por um grupo -C(O)NH₂. Os exemplos representativos de um grupo alquilamido incluem, porém sem limitações, -CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)NH₂, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₃, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃, -CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃ e -C(CH₃)₂CH₂C(O)NH₂.

"Alcanol" refere-se a um grupo alquila de C₁-C₅, como definido acima, onde um dos átomos de hidrogênio do grupo alquila de C₁-C₅ foi substituído por um grupo hidroxila. Os exemplos representativos de um grupo alanol incluem, porém sem limitações, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH(OH)CH₃, -CH₂CH(OH)CH₂CH₃, -CH(OH)CH₃ e -C(CH₃)₂CH₂OH.

"Alquilcarbóxi" refere-se a um grupo alquila de C₁-C₅, como defi-

- nido acima, onde um dos átomos de hidrogênio do grupo alquila de C₁-C₅ foi substituído por um grupo -COOH. Os exemplos representativos de um grupo alquilcarbóxi incluem, porém sem limitações, -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH,
- 5 -CH₂CH(COOH)CH₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₂CH₃, -CH(COOH)CH₂CH₃ e -C(CH₃)₂CH₂COOH.

O termo "cicloalquila", como aqui empregado, inclui grupos hidrocarbonados cílicos saturados e parcialmente insaturados que têm 3 a 12 carbonos, de preferência 3 a 8 carbonos, e mais preferivelmente, 3 a 6 carbonos, onde o grupo cicloalquila é além disso opcionalmente substituído. Alguns grupos cicloalquila incluem, sem limitações, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclopentenila, ciclo-hexila, ciclo-hexenila, ciclo-heptila, e ciclo-octila.

- O termo "heteroarila" refere-se a um sistema anelar aromático monocíclico com 5-8 membros, bicíclico com 8-12 membros, ou tricíclico com 11-14 membros, tendo 1-3 heteroátomos caso monocíclico, 1-6 heteroátomos caso bicíclico, ou 1-9 heteroátomos caso tricíclico, sendo os ditos heteroátomos selecionados entre O, N, ou S (por exemplo, átomos de carbono 1-3, 1-6, ou 1-9 heteroátomos de O, N, ou S caso monocíclico, bicíclico, ou tricíclico, respectivamente), onde 0, 1, 2, 3, ou 4 átomos de cada anel são substituídos com um substituinte. Os exemplos de grupos heteroarila incluem piridila, furila ou furanila, imidazolila, benzimidazolila, pirimidinila, tiofenila ou tienila, quinolinila, indolila, tiazolila, e similares.

O termo "heteroaril-alquila" ou o termo "heteroaralquila" refere-se a uma alquila substituída com uma heteroarila. O termo "heteroaril-alcóxi" refere-se a um alcóxi substituído com heteroarila.

O termo "heteroarilalquila" ou o termo "heteroaralquila" refere-se a uma alquila substituída com uma heteroarila. O termo "heteroarilalcóxi" refere-se a um alcóxi substituído com heteroarila.

- 30 O termo "heterociclila" refere-se a um sistema anelar não-aromático monocíclico com 5-8 membros, bicíclico com 8-12 membros, ou tricíclico com 11-14 membros, tendo 1-3 heteroátomos caso monocíclico, 1-6

heteroátomos caso bicíclico, ou 1-9 heteroátomos caso tricíclico, sendo os ditos heteroátomos selecionados entre O, N, ou S (por exemplo, átomos de carbono e 1-3, 1-6, ou 1-9 heteroátomos de O, N, ou S caso monocíclico, bicíclico, ou tricíclico, respectivamente), onde 0, 1, 2 ou 3 átomos de cada 5 anel são substituídos com um substituinte. Os exemplos de grupos heterociclica incluem piperazinila, pirrolidinila, dioxanila, morfolinila, tetra-hidrofuranila, e similares.

O termo "substituintes" refere-se a um grupo "substituído" de um grupo alquila, cicloalquila, arila, heterociclica, ou heteroarila em qualquer átomos desse grupo. Os substituintes apropriados incluem, sem limitações, os grupos halo, hidróxi, mercapto, oxo, nitro, haloalquila, alquila, alcarila, arila, aralquila, alcóxi, tioalcóxi, arilóxi, amino, alcoxicarbonila, amido, carbóxi, alcanossulfonila, alquilcarbonila, e ciano.

Em algumas modalidades, os compostos desta invenção contêm 15 um ou mais centros assimétricos, e assim sendo, ocorrem como racematos e misturas racêmicas, enantiômeros individuais, diastereoisômeros individuais e misturas diastereoisoméricas. Todas estas formas isoméricas destes compostos estão incluídas na presente invenção, a menos que expressamente indicado de forma diferente. Em algumas modalidades, os compostos 20 desta invenção são representados também em múltiplas formas tautoméricas, e em tais casos, a invenção inclui todas formas tautoméricas dos compostos aqui descritos (por exemplo, caso a alquilação de um sistema anelar resulte em alquilação em múltiplos sítios, a invenção inclui todos esses produtos da reação). Todas essas formas isoméricas desses compostos estão 25 incluídas na presente invenção, a menos que expressamente indicado de forma diferente. Todas formas cristalinas dos compostos aqui descritos estão incluídas na presente invenção, a menos que expressamente indicado de forma diferente.

Como aqui utilizados, os termos "aumento" e "decréscimo" significam, respectivamente, causar um aumento ou decrecimento estatisticamente significante (isto é, $p < 0,1$) de pelo menos 5%.

Como aqui utilizada, a citação de uma faixa numérica para uma

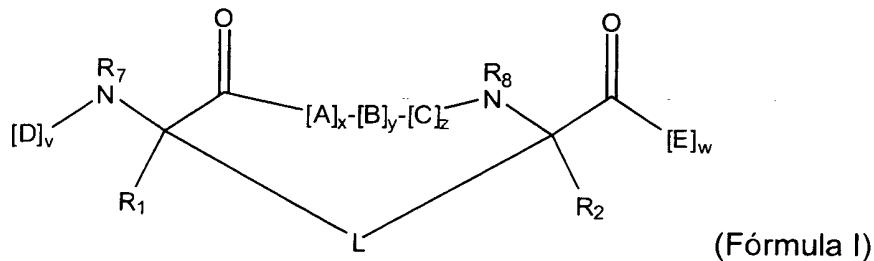
variável pretende inferior que a invenção pode ser praticada com a variável igual a qualquer um dos valores dentro daquela faixa. Assim sendo, para uma variável que é inherentemente distinta, a variável é igual a qualquer valor de número inteiro dentro da faixa numérica, incluindo os limites da faixa. Similmente, para uma variável que é inherentemente contínua, a variável é igual a qualquer valor real dentro da faixa numérica, incluindo os limites da faixa. Como um exemplo, e sem limitações, uma variável é descrita como tendo valores entre 0 e 2 toma os valores 0, 1 ou 2 caso a variável seja inherentemente distinta, e toma os valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, ou quaisquer outros valores reais ≥ 0 e ≤ 2 caso a variável seja inherentemente contínua.

Como aqui utilizada, a menos que especificamente indicado de forma diferente, a palavra "ou" é utilizada no sentido inclusivo de "e/ou" e não no sentido excludente de "um ou outro".

Os detalhes de uma ou mais modalidades específicas da invenção estão enunciados nos desenhos e na descrição abaixo. Outras características, objetos, e vantagens da invenção ficarão evidentes a partir da descrição e dos desenhos, e a partir das reivindicações.

Macrociclos Peptidomiméticos da Invenção

A presente invenção fornece um macrociclo peptidomimético da Fórmula (I):



em que:

cada A, C, D, e E é independentemente um aminoácido natural ou não-natural;

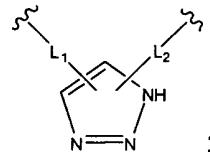
B é um aminoácido natural ou não-natural, análogo de aminoácido, $\text{R}_3\text{N}-\text{NH}-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_3$, $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{CO}-]$, $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{SO}_2-]$, ou $[-\text{NH}-\text{L}_3-]$;

R_1 e R_2 são independentemente $-\text{H}$, alquila, alquenila, alquinila,

arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituídos ou substituídos com halo-;

- R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅;

L é um ligante formador de macrociclos da fórmula



- L₁, L₂ e L₃ são independentemente alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, ciclo-alquíleno, heterociclo-alquíleno, ciclo-aríleno, heterociclo-aríleno, ou [-R₄-K-R₄-]_n, sendo cada um opcionalmente substituído com R₅;
- cada R₄ é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

- cada K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;
- cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

- cada R₆ é independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, aril-alquila, ciclo-alquil-alquila, heterociclo-alquila, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

R₇ é -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, heteroalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅, ou parte de uma estrutura cíclica com um resíduo D;

- R₈ é -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, heteroalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅, ou parte de uma estrutura cíclica com um resíduo E;

v é um número inteiro entre 1-1.000;

- w é um número inteiro entre 1-1.000;

x é um número inteiro entre 0-10;
y é um número inteiro entre 0-10;
z é um número inteiro entre 0-10; e
n é um número inteiro entre 1-5.

5 Em algumas modalidades da invenção, $x+y+z$ é pelo menos 3.

Em outras modalidades da invenção, $x+y+z$ é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

Cada ocorrência de A, B, C, D ou E em um macrociclo ou precursor de ma-

crociclo da invenção é selecionado independentemente. Por exemplo, uma sequência representada pela fórmula $[A]_x$, quando x é 3, engloba modalida-

10 des nas quais os aminoácidos não são idênticos, por exemplo, Gln–Asp–Ala,

bem como modalidades nas quais os aminoácidos são idênticos, por exem-

plo, Gln–Gln–Gln. Isto se aplica para qualquer valor de x, y, ou z nas faixas indicadas.

15 Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético da in-
venção compreende uma estrutura secundária que é uma hélice α , e R_8 é –
H, permitindo a ligação hidrogênio intra-helicóide.

20 Em outras modalidades, o comprimento do ligante formador de
macrociclo, L, medido a partir de um primeiro $C\alpha$ até um segundo $C\alpha$ é sele-
cionado para estabilizar uma estrutura peptídica secundária, tal como uma
hélite α formada por resíduos do macrociclo peptidomimético incluindo, po-
rém não necessariamente limitados àquelas entre o primeiro $C\alpha$ e o segundo
 $C\alpha$.

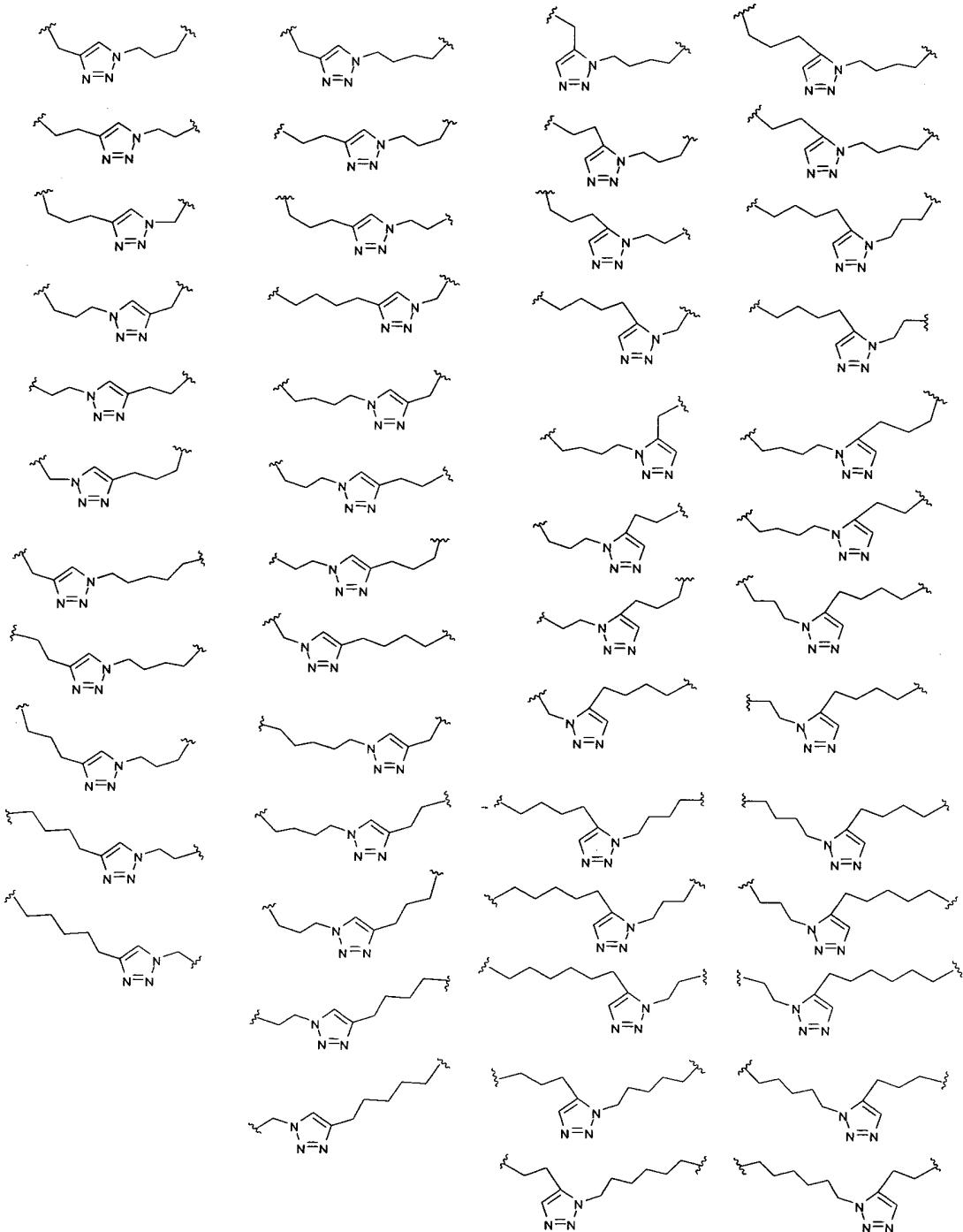
25 Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético com-
preende pelo menos um modelo de hélice α . Por exemplo, A, B e/ou C no
composto da Fórmula I incluem uma ou mais hélices α . Como regra geral, as
hélites α incluem entre 3 e 4 resíduos de aminoácidos por volta. Em al-
gumas modalidades, a hélice α do macrociclo peptidomimético inclui 1 a 5 vol-
tas e, portanto, 3 a 20 resíduos de aminoácidos. Em modalidades especifi-
cas, a hélice α inclui 1 volta, 2 voltas, 3 voltas, 4 voltas, ou 5 voltas. Em al-
30 gumas modalidades, o ligante formador de macrociclo estabiliza um modelo
de hélice α incluído dentro do macrociclo peptidomimético. Assim sendo, em
algumas modalidades, o comprimento do ligante formador de macrociclo, L,

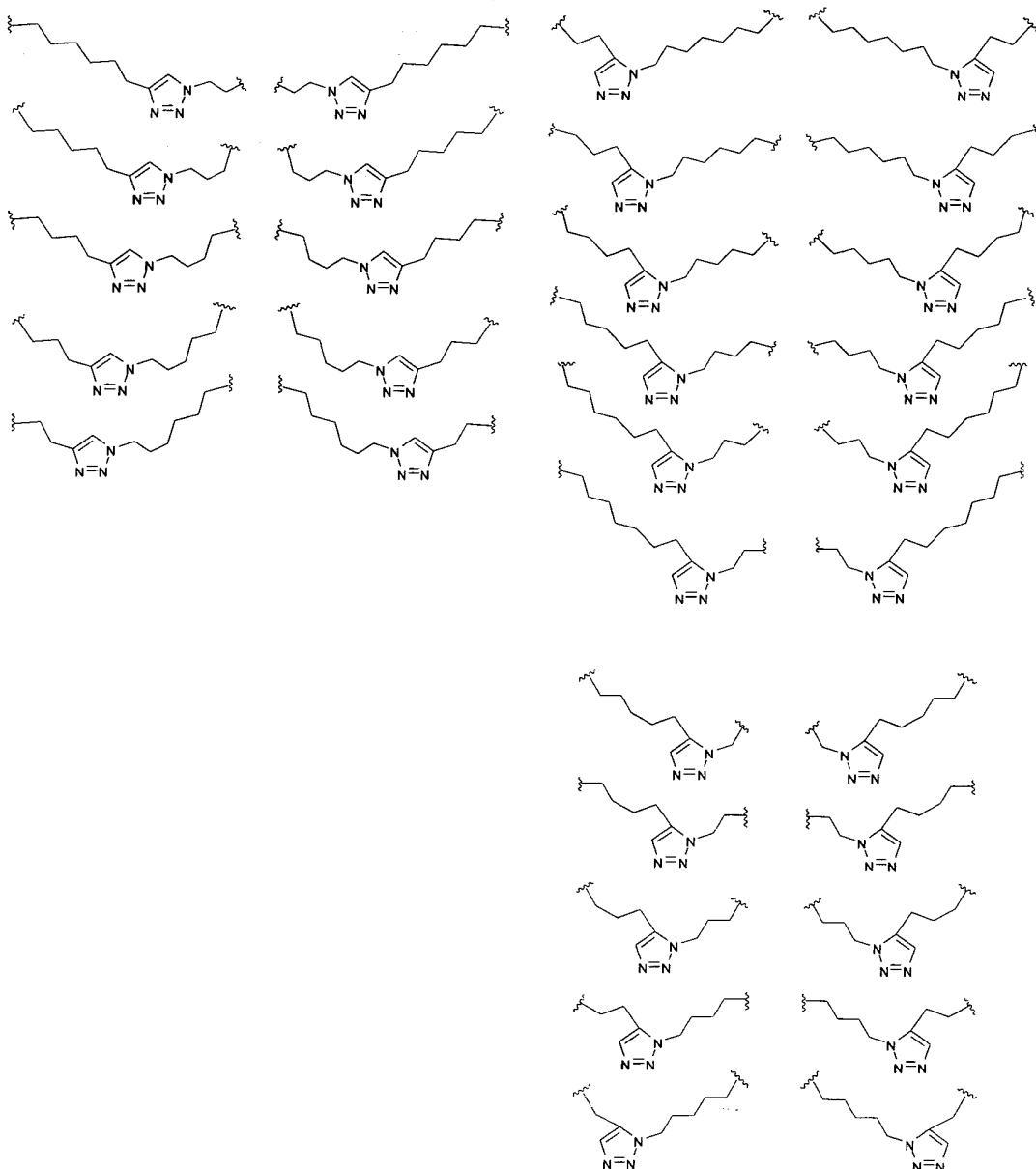
a partir de um primeiro Ca até um segundo Ca é selecionado para aumentar a estabilidade de uma hélice α . Em algumas modalidades, o ligante formador de macrociclo abarca entre 1 volta e 5 voltas da hélice α . Em algumas modalidades, o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 volta, 2 voltas, 3 voltas, 4 voltas, ou 5 voltas da hélice α . Em algumas modalidades, o comprimento do ligante formador de macrociclo é aproximadamente 5 Å a 9 Å por volta da hélice α , ou aproximadamente 6 Å a 8 Å por volta da hélice α . Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 volta de uma hélice α , o comprimento é igual a aproximadamente 5 ligações carbono-carbono a 13 ligações carbono-carbono, aproximadamente 7 ligações carbono-carbono a ligações carbono-carbono, ou aproximadamente 9 ligações carbono-carbono. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 voltas de uma hélice α , o comprimento é igual a aproximadamente 8 ligações carbono-carbono a 16 ligações carbono-carbono, aproximadamente 10 ligações carbono-carbono a ligações 14 carbono-carbono, ou aproximadamente 12 ligações carbono-carbono. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 voltas de uma hélice α , o comprimento é igual a aproximadamente 14 ligações carbono-carbono a ligações 22 carbono-carbono, aproximadamente 16 ligações carbono-carbono a 20 ligações carbono-carbono, ou aproximadamente 18 ligações carbono-carbono. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 voltas de uma hélice α , o comprimento é igual a aproximadamente 20 ligações carbono-carbono a 28 ligações carbono-carbono, aproximadamente 22 ligações carbono-carbono a 26 ligações carbono-carbono, ou aproximadamente 24 ligações carbono-carbono. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 voltas de uma hélice α , o comprimento é igual a aproximadamente 26 ligações carbono-carbono a 34 ligações carbono-carbono, aproximadamente 28 ligações carbono-carbono a 32 ligações carbono-carbono, ou aproximadamente 30 ligações carbono-carbono. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 volta de uma hélice α , a ligação contém aproximadamente 4 átomos a 12 átomos, aproximadamente 6 átomos a 10 átomos, ou apro-

ximadamente 8 átomos. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 voltas da hélice α , a ligação contém aproximadamente 7 átomos a 15 átomos, aproximadamente 9 átomos a 13 átomos, ou aproximadamente 11 átomos. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 5 aproximadamente 3 voltas da hélice α , a ligação contém aproximadamente 13 átomos a 21 átomos, aproximadamente 15 átomos a 19 átomos, ou aproximadamente 17 átomos. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 10 aproximadamente 4 voltas da hélice α , a ligação contém aproximadamente 19 átomos a 27 átomos, aproximadamente 21 átomos a 25 átomos, ou aproximadamente 23 átomos. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 15 aproximadamente 5 voltas da hélice α , a ligação contém aproximadamente 25 átomos a 33 átomos, aproximadamente 27 átomos a 31 átomos, ou aproximadamente 29 átomos. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 20 aproximadamente 1 volta da hélice α , o macrociclo resultante forma um anel que contém aproximadamente 17 membros a 25 membros, aproximadamente 19 membros a 23 membros, ou aproximadamente 21 membros. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 25 aproximadamente 2 voltas da hélice α , o macrociclo resultante forma um anel que contém aproximadamente 29 membros a 37 membros, aproximadamente 31 membros a 35 membros, ou 30 aproximadamente 33 membros. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 voltas da hélice α , o macrociclo resultante forma um anel que contém aproximadamente 44 membros a 52 membros, aproximadamente 46 membros a 50 membros, ou aproximadamente 48 membros. Quando o ligante formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 voltas da hélice α , o macrociclo resultante forma um anel que contém aproximadamente 59 membros a 67 membros, aproximadamente 61 membros a 65 membros, ou aproximadamente 63 membros. Quando o ligante formador de macrociclo abarca 35 aproximadamente 5 voltas da hélice α , o macrociclo resultante forma um anel que contém aproximadamente 74 membros a 82 membros, aproximadamente 76 membros a 80 membros, ou aproximadamente 78 membros.

As modalidades explicativas do ligante formador de macrociclo

L estão ilustradas abaixo:





Em outras modalidades, D e/ou E são ainda modificados para facilitar a absorção celular. Em algumas modalidades, lipidar ou "PEGuilação" um macrociclo peptidomimético facilita a absorção celular, aumenta a biodisponibilidade, aumenta a circulação sanguínea, altera a farmacocinética, diminui a imunogenicidade e/ou diminui a frequência necessária de administração.

Em uma modalidade, um macrociclo peptidomimético apresenta melhores propriedades biológicas tais como estabilidade estrutural, afinidade aumentada por um alvo, maior resistência à degradação proteolítica e/ou penetrabilidade celular aumentada quando comparado com um polipeptídeo

não-macrocíclico correspondente. Em outra modalidade, um macrociclo peptidomimético compreende uma ou mais hélices α em soluções aquosas e/ou apresenta um maior grau de helicidade α em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, um ligante formador de macrociclo aumenta a permeabilidade celular do macrociclo peptidomimético. Sem desejar ficar ligado a qualquer teoria, conjectura-se que o ligante formador de macrociclo pode aumentar o caráter hidrofóbico global do macrociclo peptidomimético em relação a um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

Qualquer proteína ou polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos primária conhecida que contém uma estrutura secundária que supostamente confere atividade biológica é o tema da presente invenção. Por exemplo, a sequência do polipeptídeo pode ser analisada e os análogos de aminoácidos que contêm azida e que contêm alquino da invenção podem ser susbtituídos nas posições apropriadas. As posições apropriadas são determinadas averiguando qual superfície (ou superfícies) molecular(es) da estrutura secundária é (são) necessária(s) para a atividade biológica e, portanto, através das quais outra(s) superfície(s) os ligantes formadores de macrociclos da invenção podem formar um macrociclo sem bloquear estericamente a(s) superfície(s) necessárias para a atividade biológica. Tais determinações são feitas usando métodos tais como cristalografia a raios X de complexos entre a estrutura secundária e um parceiro de ligação natural para visualizar resíduos (e superfícies) críticos para a atividade; por mutagênese sequencial de resíduos na estrutura secundária para identificar funcionalmente resíduos (e superfícies) críticos para a atividade; ou por outros métodos. Por tais determinações, os aminoácidos apropriados são substituídos pelos análogos de aminoácidos e ligante formador de macrociclos da invenção. Por exemplo, para uma estrutura secundária helicóide α , uma superfície da hélice (por exemplo, uma superfície molecular que se estende longitudinalmente ao longo do eixo da hélice e radialmente 45-135° ao redor do eixo da hélice) pode ser necessária para fazer contato com outra biomolécula *in vivo* ou *in vitro* para a atividade biológica. Nesse caso, um ligante formador

de macrociclo é desenhado para ligar dois carbonos α da hélice, e ao mesmo tempo, estendendo-se longitudinalmente ao longo da superfície da hélice na parte da superfície não diretamente necessária para a atividade.

Em algumas modalidades da invenção, a sequência peptídica é derivada da família BCL-2 de proteínas. A família BCL-2 é definida pela presença de até quatro domínios de homologia (BH) de BCL-2 conservados designados BH1, BH2, BH3, e BH4, todos os quais incluem segmentos helicoides α (Chittenden *et al.*, *EMBO* 14:5589 (1995); Wang *et al.*, *Genes Dev.* 10:2859 (1996)). As proteínas antiapoptóticas, tais como BCL-2 e BCL-X_L, apresentam conservação de sequência em todos domínios BH. As proteínas pró-apoptóticas são divididas em membros da família "multidomínio" (por exemplo, BAK, BAX), que possuem homologia nos domínios BH1, BH2, e BH3, e membros da família "apenas domínio BH3" (por exemplo, BID, BAD, BIM, BIK, NOXA, PUMA), que contêm homologia de sequência exclusivamente no segmento helicóide α anfipático BH3. Os membros da família BCL-2 têm a capacidade de formar homodímeros e heterodímeros, sugerindo que a ligação competitiva e a relação entre os níveis de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas dita a suscetibilidade a estímulos de morte. As proteínas antiapoptóticas funcionam para proteger células contra excesso pró-apoptótico, isto é, morte celular programada excessiva. As medidas de "segurança" adicional incluem regular a transcrição de proteínas pró-apotóticas e mantê-las como confôrmeros inativos, requerendo ativação proteolítica, desfosforilação, ou mudança conformacional induzida por ligantes para ativar funções pró-morte. Em certos tipos de células, os sinais de morte recebidos na membrana plasmática disparam apoptose por intermédio da via mitocondrial. As mitocôndrias podem servir como "gatekeeper" da morte celular sequestrando o citocromo c, um componente crítico de um complexo citosólico que ativa caspase 9, levando a episódios proteolíticos fatais a jusante. As proteínas multidomínios tais como BCL-2/BCL-X_L e BAK/BAX desempenham papéis duelísticos de guardiãs e executoras na membrana mitocondrial, sendo suas atividades reguladas ainda mais por membros apenas BH3 a montante da família BCL-2. Por exemplo, BID é um membro da

família do domínio apenas BH3 de proteínas pró-apoptóticas, e transmite sinais de morte recebidos na membrana plasmática para proteínas efetoras pró-apoptóticas na membrana mitocondrial. BID tem a capacidade de interagir com proteínas pró-apoptóticas e também antiapoptóticas, e depois da ativação por caspase 8, dispara a liberação do citocromo c e apoptose mitocondrial. Estudos de deleção e mutagênese determinaram que o segmento BH3 helicóide α anfipático de membros da família pró-apoptótica podem funcionar como um domínio de morte, e assim sendo, podem representar um modelo estrutural crítico para interagir com proteínas apoptóticas multidomínio. Estudos estruturais demonstraram que a hélice BH3 pode interagir com proteínas antiapoptóticas inserindo em um sulco hidrofóbico formado pela interface dos domínios BH1, 2 e 3. BID ativado pode ser ligado e sequestrado por proteínas antiapoptótica (por exemplo, BCL-2 e BCL-X_L) e pode disparar a ativação das proteína pró-apoptóticas BAX e BAK, levando à liberação do citocromo c e um programa de apoptose mitocondrial. BAD é também um membro da família pró-apoptótica apenas do domínio BH3, cuja expressão dispara a ativação de BAX/BAK. Em contraste com BID, entretanto, BAD apresenta ligação preferencial a membros da família antiapoptótica, BCL-2 e BCL-X_L. Embora o domínio BAD BH3 apresente alta ligação por afinidade ao peptídeo BCL-2, BAD BH3 é incapaz de ativar a liberação do citocromo c a partir de mitocôndrias *in vitro*, sugerindo que BAD não é um ativador direto de BAX/BAK. As mitocôndrias que superexpressam BCL-2 são resistentes à liberação do citocromo c induzida por BID, mas o cotratamento com BAD pode restaurar a sensibilidade de BID. A indução da apoptose mitocondrial por BAD parece resultar de: (1) deslocamento de ativadores de BAX/BAK tais como BID e proteínas semelhantes a BID, a partir da bolsa de ligação de BCL-2/BCL-XL, ou (2) ocupação seletiva da bolsa de ligação de BCL-2/BCL-XL por BAD para impedir o sequestro de proteínas semelhantes a BID por proteínas antiapoptóticas. Assim sendo, duas classes de proteínas apenas de domínio BH3 emergiram, proteínas semelhantes a BID que ativam diretamente a apoptose mitocondrial, e proteínas semelhantes a BAD que têm a capacidade de sensibilizar mitocôndrias para pró-apoptóticas semelhantes a

ocupando as bolsas de ligação de proteínas antiapoptóticas multidomínio. Vários domomínio helicoides α de proteínas-membros da família BCL-2 suscetíveis à metodologia aqui descrita foram descritas (Walensky *et al.* (2004), *Science* 305:1466; e Walensky *et al.*, publicação de patente nº US 5 2005/0250680, cujos teores inteiros são aqui incorporados como referência).

Em outras modalidades, a sequência peptídica é derivada da propteína p53 supressora de tumores que se liga à proteína oncogene MDM2. O sítio de ligação de MDM2 fica localizado dentro de uma região do supressor de tumor p53 que forma uma hélice α. Na patente nº US 10 7.083.983, cujo teor inteiro é aqui incorporado como referência, Lane *et al.* descrevem que a região de p53 responsável pela ligação a MDM2 é representada aproximadamente pelos aminoácidos 13-31 (PLSQETFSDLWKLL-PENNV) da proteína P53 humana madura. Outras sequências modificadas descritas por Lane também estão contempladas na presente invenção. Além 15 disso, a interação de p53 e MDM2 foi discutida por Shair *et al.* (1997), *Chem. & Biol.* 4:791, cujo teor inteiro é aqui incorporado como referência, e mutações no gene de p53 foram identificadas em virtualmente metade de todos casos relatados de câncer. Como tensões são impostas sobre uma célula, acredita-se que p53 orquestre uma resposta que leva à detenção do ciclocelular e reparo do DNA, ou morte celular programada. Da mesma forma que as mutações no gene de p53 que alteram a função da proteína p53 diretamente, p53 pode ser alterada por mudanças em MDM2. A proteína MDM2 demonstrou ligar-se a p53 e romper a ativação transcripcional associando-se 20 com o domínio de transativação de p53. Por exemplo, um peptídeo com 11 aminoácidos derivado do domínio de transativação de p53 forma uma hélice α anfipática de 2,5 voltas que se insere dentro da fenda de MDM2. Assim sendo, em algumas modalidades, as estruturas inusitadas da hélice α geradas pelo método da presente invenção são arquitetadas para gerar estruturas que se ligam firmemente ao acceptor da hélice e rompem as interações 25 proteína nativa-proteína. Estas estruturas são então triadas usando técnicas de alto volume de produção para identificar peptídeos de moléculas pequenas ideais. As estruturas inusitadas que rompem a interação de MDM2 são 30

úteis para muitas aplicações, incluindo, porém sem limitações, controle de sarcomas de tecidos mols (que superexpressa MDM2 na presença de p53 do tipo selvagem). Estes cânceres são então, em algumas modalidades, mantidos em cheque com moléculas pequenas que interceptam MDM2, impedindo desta forma a supressão de p53. Adicionalmente, em algumas modalidades, os rompedores de moléculas pequenas de interações MDM2-p53 são usados como terapia adjuvante para ajudar a controlar e modular o grau da resposta de apoptose dependente de p53 em quimioterapia convencional.

Uma lista exemplificativa não-limitativa de sequências peptídicas 10 apropriadas para uso na presente invenção é fornecida abaixo:

Tabela 1

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência Reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIPP	QEDIIRNIARHLAXVGDXMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYAR	DNRPEIWIAQELRXIGDXFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	NLWAAQRYGRELRXMSDXFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREIGAQLRXMADXLNQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKALGDELHQRTM	RSSAAQLTAARLKXLGDXLHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRQUIGDKVYCTW	AELPPEFAAQLRXIGDXVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLRQKL	VPADLKDECAQLRXIGDXVNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHRLHT	QHRAEVQIARKLQXIADXFHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKALGDELHQRT	SSAAQLTAARLKXLGDXLHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIGDEMDSLRA	CMEGSDALALRLAXIGDXMDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILKKNSDWIWDWSS	DIERRKEVESILKXNSDXIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCVALLRLGDELEMIRP	GRLAEVCVALLXLGDXLEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIGDELDNSMEL	PQDASTKKSECLKXIGDXLDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAIIGDDINRR	PSSTMGQVGRQLAXIGDXINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAGDEFELR	KQALRXAGDXFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAGDDFSRR	LSPPVVHLALALRXAGDXFSRR

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência Reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos		
BH3		
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAVKQALRXAGDXFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPLHQAMR XAGDX FETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLRRVGDGVQRNHETA	ATSRKLET L RXVG D X V QRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRLGDELEQIR	LAEVCTVLL X G D X LEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGSLDP	MTVGELSRAL G X E N G X LD P
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKEVEALK X S A D X VSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRILVIQGDDRMKL	SMARDPQRILV X Q G D X RMKL

Tabela 1 lista sequências humanas que assestam o sítio de ligação de BH3 e estão implicadas em cânceres, distúrbios autoimunes, doenças metabólicas e outras condições de doenças humanas.

Tabela 2

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos		
BH3		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIPP	QEDIIRN I RHL X QVGDSMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYAR	DNRPEIW I X QEL R I G DEFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAQQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	NLWAQQRY X R E L R M S DEFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREI X A Q L R M A D D L N A Q Y E R
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL G DELHQRTM	RSSAAQL T X A R L X A L G DELHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRQUI G DKVYCTW	AELPPEF X A Q L X Q U I G D K V Y C T W
NOXAB-BH3	VPADLKDEC A QLRRIG D KVNL R QKL	VPADLK D E X A Q L X R I G D K V N L R Q K L
BMF-BH3	QHRAEVQIARKL Q CI A DQFHRLHT	QHRAEVQ I X R K L X C I A D Q F H R L H T
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL G DELHQRT	SSAAQL T X A R L X A L G DELHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG D EMDVSLRA	CMEGSDAL X R L X C I G D E M D V S L R A
Bnip3	DIERRKEVESILKKNSDWIWDWSS	DIERRKEV X S I L X K N S D W I W D W S S

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos BH3		
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRLGDELEMIRP	GRLAEV XAVLXRLGDELEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIGDELDNSMEL	PQDASTKK XECLXRIGDELDNSMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAIIGDDINRR	PSSTM GQVRQLXIIGDDINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAGDEFELR	XQALXEAGDEFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAGDDFSRR	LSPPVVHL XLALXQAGDDFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAV XQALXEAGDEFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPL XQAMXAAGDEFETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLRRVG DGVQRN HETA	ATSRK XETLXRVGDGVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GDELEQIR	LAEV XTVLXRLGDELEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGSLDP	MTVGEL XRALXHENGSLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKE XEALXKSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRI LVIQGDDRMKL	SMARDP XRILXIQGDDRMKL

Tabela 2 lista sequências humanas que assestam o sítio de ligação de BH3 e estão implicadas em cânceres, distúrbios auto-imunes, doenças metabólicas e outras condições de doenças humanas.

Tabela 3

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência Reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos P53		
hp53 peptídeo_muitocurto	LSQET FSDLW KLLPEN	XSQEXFSDLW KLLPEN
hp53 peptídeo_curto	PPLSQET FSDLW KLLPENN	PPXSQEXFSDLW KLLPENN
hp53-P27S peptídeo-curto	PPLSQET FSDLW KLLSENN	PPXSQEXFSDLW KLLSENN
hp53 peptídeo_Longo	DPSVEPPLSQET FSDLW KLLPENN-VLSPLP	DPSVEPP XSQEXFSDLW KLLPENN-VLSPLP
hp53-P27S peptídeo_Longo	DPSVEPPLSQET FSDLW KLLSENN-VLSPLP	DPSVEPP XSQEXFSDLW KLLSENN-VLSPLP
hp53 peptídeo_muitocurto	LSQET FSDLW KLLPEN	LSQET FSDLW <u>X</u> LLP <u>X</u> N
hp53 peptídeo_curto	PPLSQET FSDLW KLLPENN	PPLSQET FSDLW <u>X</u> LLP <u>X</u> NN

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência Reticulada (X = resíduo x-link)
Peptídeos P53		
hp53-P27S peptídeo-curto	PPLSQETFSDL W KLLSENN	PPLSQETFSDL W XLLSXNN
hp53 peptídeo_Longo	DPSVEPPLSQETFSDL W KLLPENN-VLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDL W XLLPXNN-VLSPLP
hp53-P27S peptídeo_Longo	DPSVEPPLSQETFSDL W KLLSENN-VLSPLP	DPSVEPPLSQETFSDL W XLLSXNN-VLSPLP

Tabela 3 lista sequências humanas que assestam o sítio de ligação de p53 de MDM2/X e estão implicadas em cânceres.

Tabela 4

Nome	Sequência (negrito = resíduos críticos)	Sequência reticulada (X = resíduo -link)
Ligantes de peptídeo GPCR		
Angiotensina II	DRVYIHPF	DR X Y X HPF
Bombesina	EQRLGNQWAVGHLM	EQRLGN X WAVGHL X
Bradiquinina	RPPGFSPFR	RPP X FSPFRX
C5a	ISHKDMQLGR	ISHKDM X LGRX
C3a	ARASHLGLAR	ARASHL X LARX
Hormônio estimulante de α-melanócitos	SYSMEHFRWGKPV	SYSM X HFRWX X KPV

Tabela 4 lista sequências que assestam receptores acoplados à proteína G

- 5 humana e estão implicadas em inúmeras condições doentias humanas (Tyndall *et al.* (2005), *Chem. Rev.* 105:793-826).

Métodos para Preparar os Macro ciclos Peptidomiméticos da Invenção

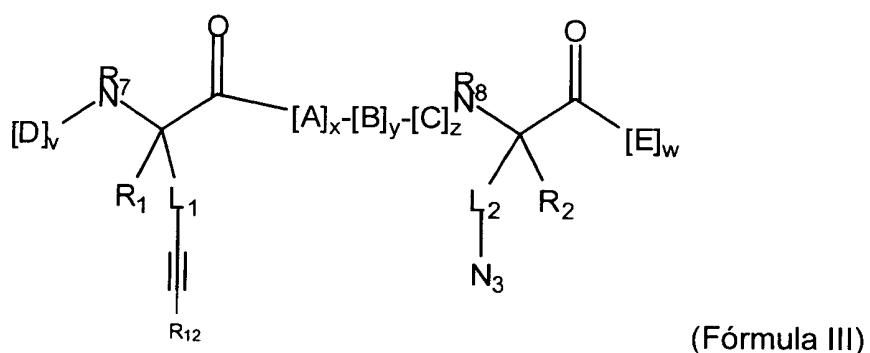
Os métodos para sintetizar os macrociclos peptidomiméticos da invenção estão aqui descritos. Em algumas modalidades, a síntese destes 10 macrociclos peptidomiméticos envolve um processo em múltiplas etapas que efetua a síntese de um precursor peptidomimético que contém um grupamento azida e um grupamento alquino; em seguida, colocando em contato o precursor peptidomimético com um reagente de macrociclagem para gerar um macrociclo peptidomimético ligado a triazol. Os macrociclos ou 15 precursores de macrociclos são sintetizados, por exemplo, por métodos em fase de solução ou fase sólida, e podem conter aminoácidos de ocorrência natural e

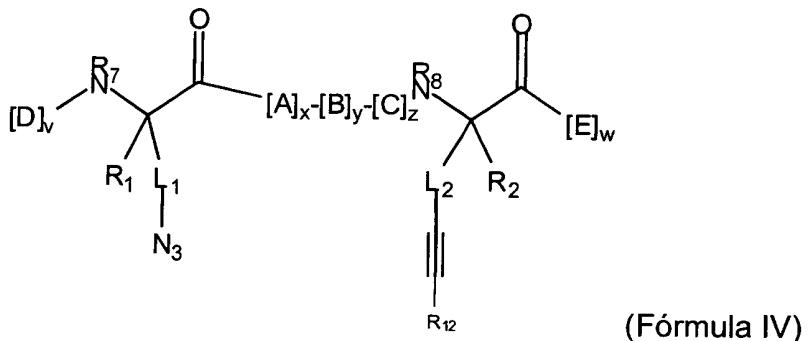
também ocorrência não-natural. Vide, por exemplo, Hunt, "The Non-Protein Aminoácidos" em "Chemistry and Biochemistry of the Aminoacids", editado por G.C. Barrett, Chapman and Hall, 1985.

Em algumas modalidades, uma azida é ligada ao carbono α de um resíduo e um alquino é anexado ao carbono α de outro resíduo. Em algumas modalidades, os grupamentos azida são azido-análogos dos aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina, alfa-metil-D-lisina, L-ornitina, D-ornitina, alfa-metil-L-ornitina ou alfa-metil-D-ornitina. Em outra modalidade, o grupamento alquino é L-propargilglicina. Em ainda outras modalidades, o 10 grupamento alquino é um aminoácido selecionado no grupo que consiste em L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninóico, e ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninóico.

15

Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para sintetizar um macrociclo peptidomimético, sendo que o método compreende as etapas de colocar em contato um precursor peptidomimético da Fórmula 20 III ou Fórmula IV:





Com um reagente de macrociclagão;

- em que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ e L₂ são como definidos acima; R₁₂ é -H quando o reagente de macrociclagão é um reagente de Cu e R₁₂ é -H ou alquila quando o reagente de macrociclagão é um reagente de Ru; e ainda onde a dita etapa de colocar em contato resulta em uma ligação covalente ser formada entre o grupamento alquino e azida na Fórmula III ou Fórmula IV. Por exemplo, R₁₂ pode ser metila quando o reagente de macrociclagão é um reagente de Ru.

Em algumas modalidades do método da invenção, pelo menos um entre R₁ e R₂ é alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₁ e R₂ são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterociclo-alquila, não-substituída ou substituída com halo-.

Por exemplo, pelo menos um entre R₁ e R₂ pode ser alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em outro exemplo, R₁ e também R₂ são independentemente alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em algumas modalidades, pelo menos um entre R₁ e R₂ é metila. Em outras modalidades, R₁ e R₂ são metila. O reagente de macrociclagão pode ser um reagente de Cu ou um reagente de Ru.

Em algumas modalidades, o precursor peptidomimético é purificado antes da etapa de colocar em contato. Em outras modalidades, o macrociclo peptidomimético é purificado depois da etapa de colocar em contato. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético é redobrado de-

pois da etapa de colocar em contato. O método pode ser realizado em solução, ou, alternativamente, o método pode ser realizado sobre um suporte sólido.

Está previsto também nesta invenção realizar o método da invenção na presença de uma macromolécula-alvo que se liga ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação. Em algumas modalidades, o método é realizado na presença de uma macromolécula-alvo que se liga preferencialmente ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação. O método pode ser aplicado também para sintetizar uma biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

O macrociclo peptidomimético resultante de um método da invenção pode compreender uma hélice α em solução aquosa. Por exemplo, o macrociclo peptidomimético pode apresentar maior estrutura helicóide α em solução aquosa em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior estabilidade térmica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior atividade biológica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior resistência contra degradação proteolítica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em ainda outras modalidades, o macrociclo peptidomimético apresenta maior capacidade de penetrar em células vivas, em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

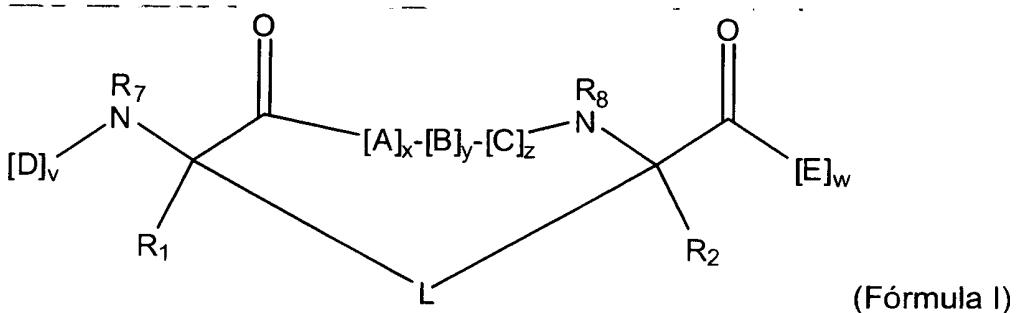
Em algumas modalidades, o grupamento alquino do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionada no grupo que consiste em L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (R)-

2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninóico e o grupamento azida do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionado no grupo que consiste em ε -azido-L-lisina, ε -azido-D-lisina, ε -azido-alfa-metil-L-lisina, δ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alpha-metil-L-ornitina, e δ -azido-alfa-metil-D-ornitina.

Em algumas modalidades, $x+y+z$ é 3, e A, B e C são independentemente aminoácidos naturais ou não-naturais. Em outras modalidades, $x+y+z$ é 6, e A, B e C são independentemente aminoácidos naturais ou não-naturais.

Em algumas modalidades, a etapa de colocar em contato é realizada em um solvente selecionado no grupo que consiste em solvente prótico, solvente aquoso, solvente orgânico, e misturas deles. Por exemplo, o solvente pode ser escolhido no grupo que consiste em H_2O , THF/ H_2O , tBuOH/ H_2O , DMF, DIPEA, CH_3CN , CH_2Cl_2 , $CICH_2CH_2Cl$ ou uma mistura deles. O solvente pode ser um solvente que favorece a formação de hélices.

Em algumas modalidades, o macrociclo peptidomimético resultante da realização do método da invenção tem a Fórmula (I):



em que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, e L são como definidos acima.

Grupos protetores, grupos de saída ou reagentes alternativos porém equivalentes são substituídos, e certas etapas de síntese são realizadas em sequências ou ordens alternativas para produzir os compostos desejados. As transformações da química de síntese e as metodologias de grupos protetores (proteção e desproteção) úteis para sintetizar os compostos aqui

descritos incluem, por exemplo, aquelas descritas em Larock, "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers (1989); Greene e Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2^a Edição, John Wiley & Sons (1991); Fieser e Fieser, "Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis", John Wiley & Sons (1994); e Paquette, editor, "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", John Wiley & Sons (1995), e suas edições subsequentes.

Os macrociclos peptidomiméticos da invenção são fabricados, por exemplo, por métodos de síntese química, tais como descritos em Fields et al., Capítulo 3 em "Synthetic Peptides: A User's Guide", editor Grant, W. H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, página 77. Assim sendo, por exemplo, os peptídeos são sintetizados usando as técnicas automatizadas de Merrifield de síntese em fase sólida com a amina protegida por química de tBoc ou Fmoc usando aminoácidos protegidos na cadeia lateral em, por exemplo, um sintetizador de peptídeos automatizado (por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), Modelo 430A, 431, ou 433).

Uma maneira para produzir os precursores peptidomiméticos e macrociclos peptidomiméticos aqui descritos usa síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS). O aminoácido do terminal C é afixado a uma resina de poliestireno reticulada por intermédio de uma ligação lábil a ácidos com uma molécula ligante. Esta resina é insolúvel nos solventes usados para a síntese, tornando relativamente simples rápido remover por lavagem reagentes em excesso e subprodutos. O terminal N é protegido com o grupo Fmoc, que é estável em ácido, mas removível por base. Os grupos funcionais da cadeia lateral são protegidos conforme necessário com grupos estáveis a bases, e lábeis a ácidos.

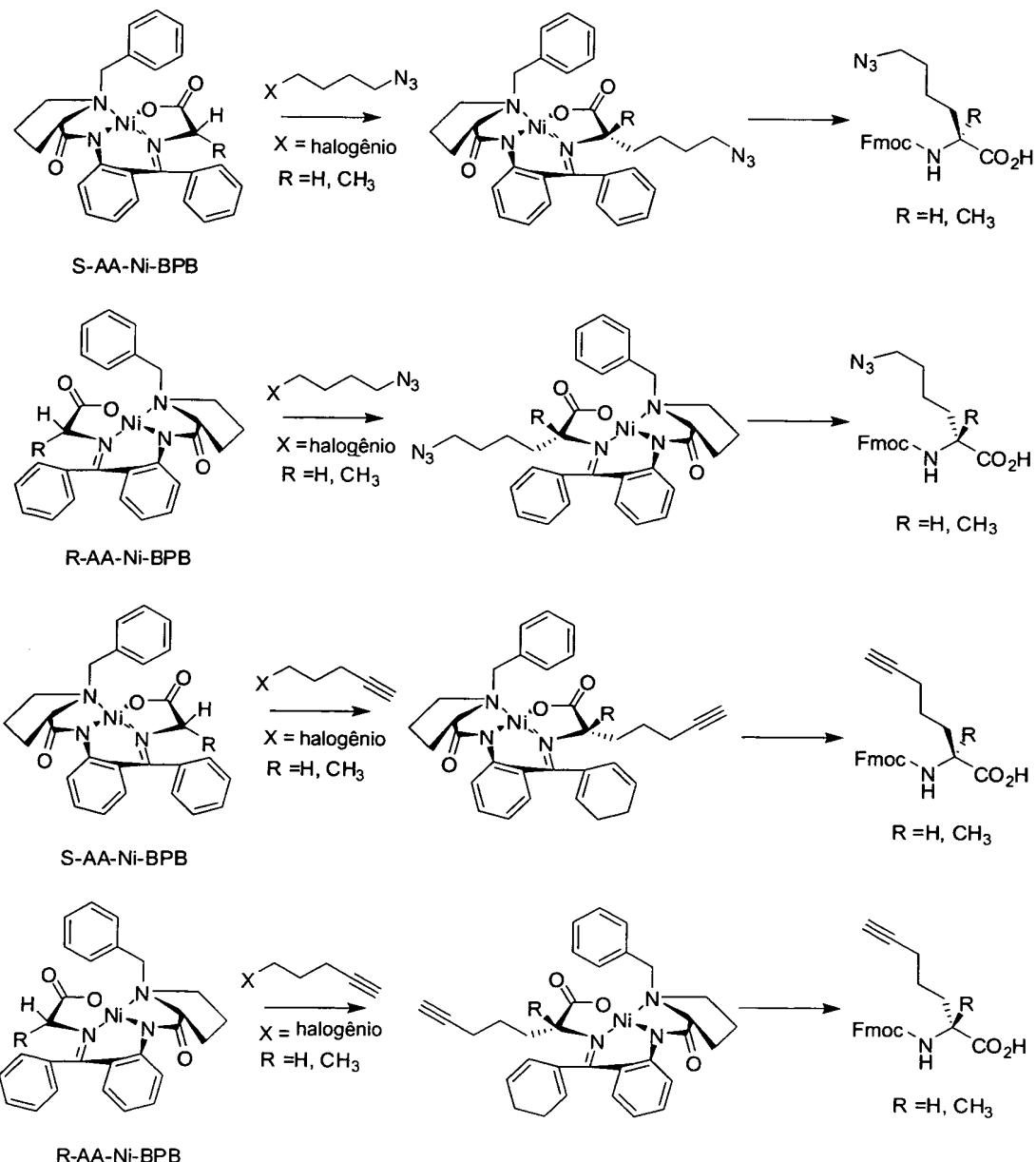
Precursors peptidomiméticos mais longos são produzidos, por exemplo, conjuntando peptídeos sintéticos individuais, usando ligação química nativa. Alternativamente, os peptídeos sintéticos mais longos são biosintetizados por técnicas bem conhecidas de DNA recombinante e expressão de proteínas. Tais técnicas são fornecidas em manuais padronizados bem conhecidos com protocolos detalhados. Para construir um gene que

codifica um precursor peptidomimético desta invenção, a sequência de aminoácidos é traduzida inversamente para obter uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos, de preferência com códons que são ótimos para o organismo no qual o gene vai ser expressado. A seguir, um gene sintético é produzido, tipicamente sintetizando oligonucleotídeos que codificam o peptídeo e quaisquer elementos reguladores, caso necessário. O gene sintético é inserido em um vetor de clonagem apropriado e transfetado em uma célula hospedeira. O peptídeo é então expressado sob condições apropriadas para o sistema de expressão e hospedeiro selecionado. O peptídeo é purificado e caracterizado por métodos padronizados.

Os precursores peptidomiméticos são produzidos, por exemplo, de uma maneira combinatorial em um alto volume de produção, usando, por exemplo, um sintetizador combinatório policanais de alto volume de produção (por exemplo, o sintetizador de peptídeos multicanais Modelo Apex 396 da AAPTEC, Inc., Louisville, KY).

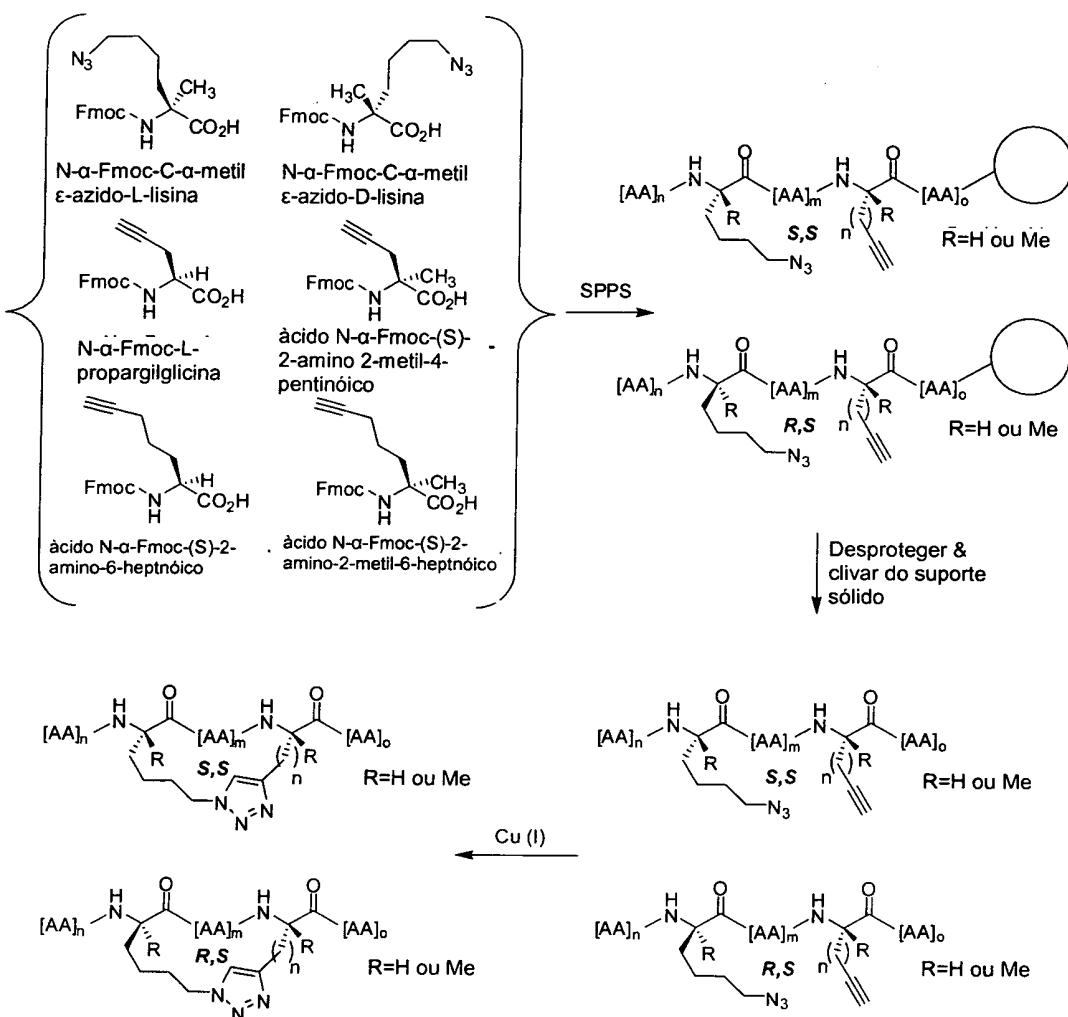
Os esquemas de síntese que se seguem são fornecidos unicamente para ilustrar a presente invenção e não pretendem limitar o âmbito da invenção, como aqui descrita. Para simplificar os desenhos, os esquemas ilustrativos representam análogos de azido-aminoácidos ϵ -azido- α -metil-L-lisina e ϵ -azido- α -metil-D-lisina, e análogos de alquino-aminoácidos L-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, e ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico. Assim sendo, nos esquemas de síntese que se seguem, cada R_1 , R_2 , R_7 e R_8 é -H; cada L_1 é $-(CH_2)_4-$; e cada L_2 é $-(CH_2)-$. Entretanto, como assinalado na descrição detalhada inteira acima, podem ser empregados muitos outros análogos de aminoácidos nos quais R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , L_1 e L_2 podem ser selecionados independentemente entre as várias estruturas aqui descritas.

Esquema de Síntese 1:



O Esquema de Síntese 1 descreve a preparação de vários compostos da invenção. Complexos de Ni(II) de bases de Schiff derivados da (S)-2-[N-(N'-benzilprolil)-amino]-benzofenona (BPB) quiral auxiliar e aminoácidos tais como glicina ou alanina são preparados como descrito em Belokon et al. (1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252. Os complexos resultantes são subsequentemente reagidos com reagentes alquilantes que compreendem um grupo azida ou alquinila para produzir compostos enriquecidos em termos enantioméricos da invenção. Caso desejado, os compostos resultantes podem ser protegidos para uso na síntese de peptídeos.

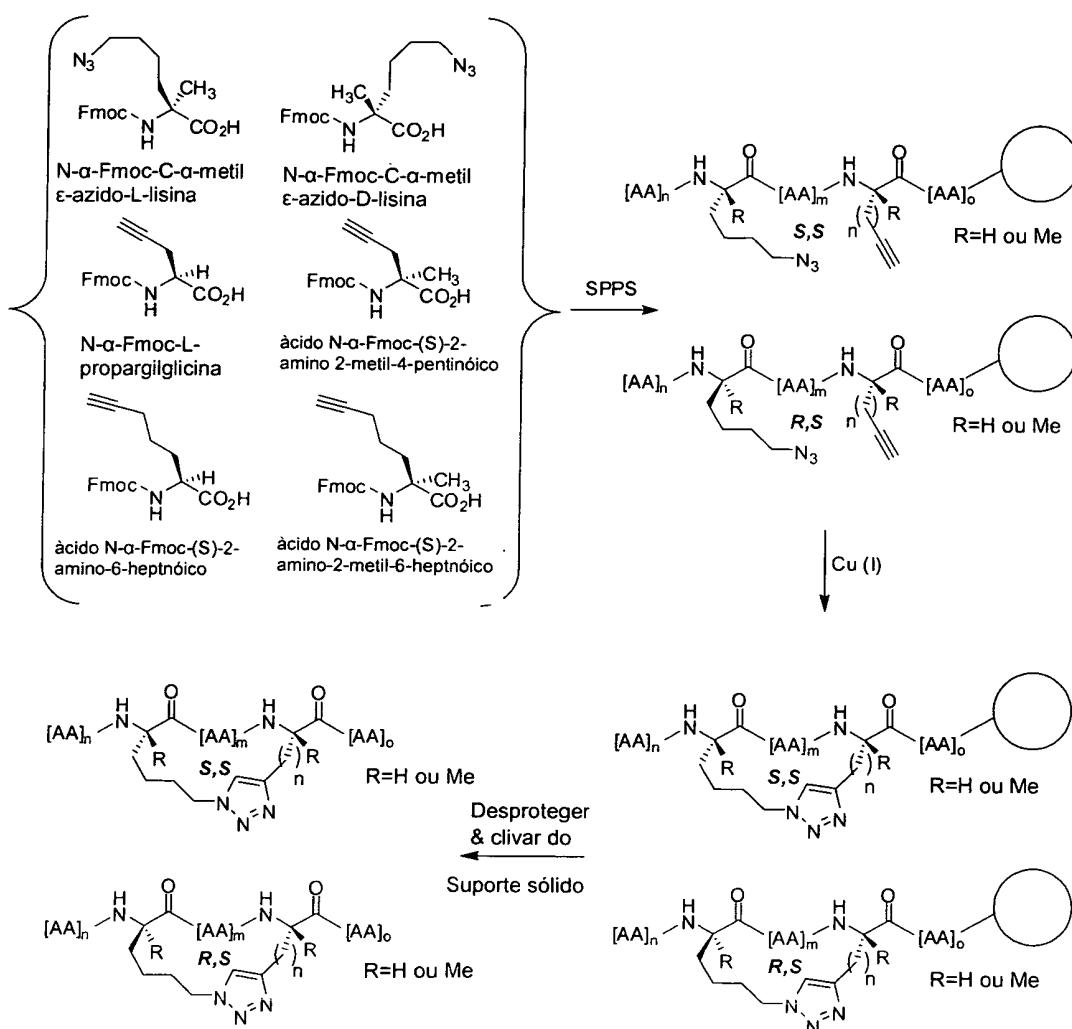
Esquema de Síntese 2:



No método genérico para a síntese de macrociclos peptidomiméticos, ilustrado no Esquema de Síntese 2, o precursor peptidomimético contém um grupamento azida e um grupamento alquino e é sintetizado por síntese de peptídeos em fase de solução ou fase sólida (SPPS) usando o aminoácido disponível comercialmente N- α -Fmoc-L-propargilglicina e as formas N- α -Fmoc-protégidas dos aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, N-metil- ϵ -azido-L-lisina, e N-metil- ϵ -azido-D-lisina. O precursor peptidomimético é então desprotegido e clivado da resina em fase sólida por condições padronizadas (por exemplo, ácido forte, tal como TFA a 95%). O precursor peptidomimético é reagido como uma mistura bruta ou é purificado

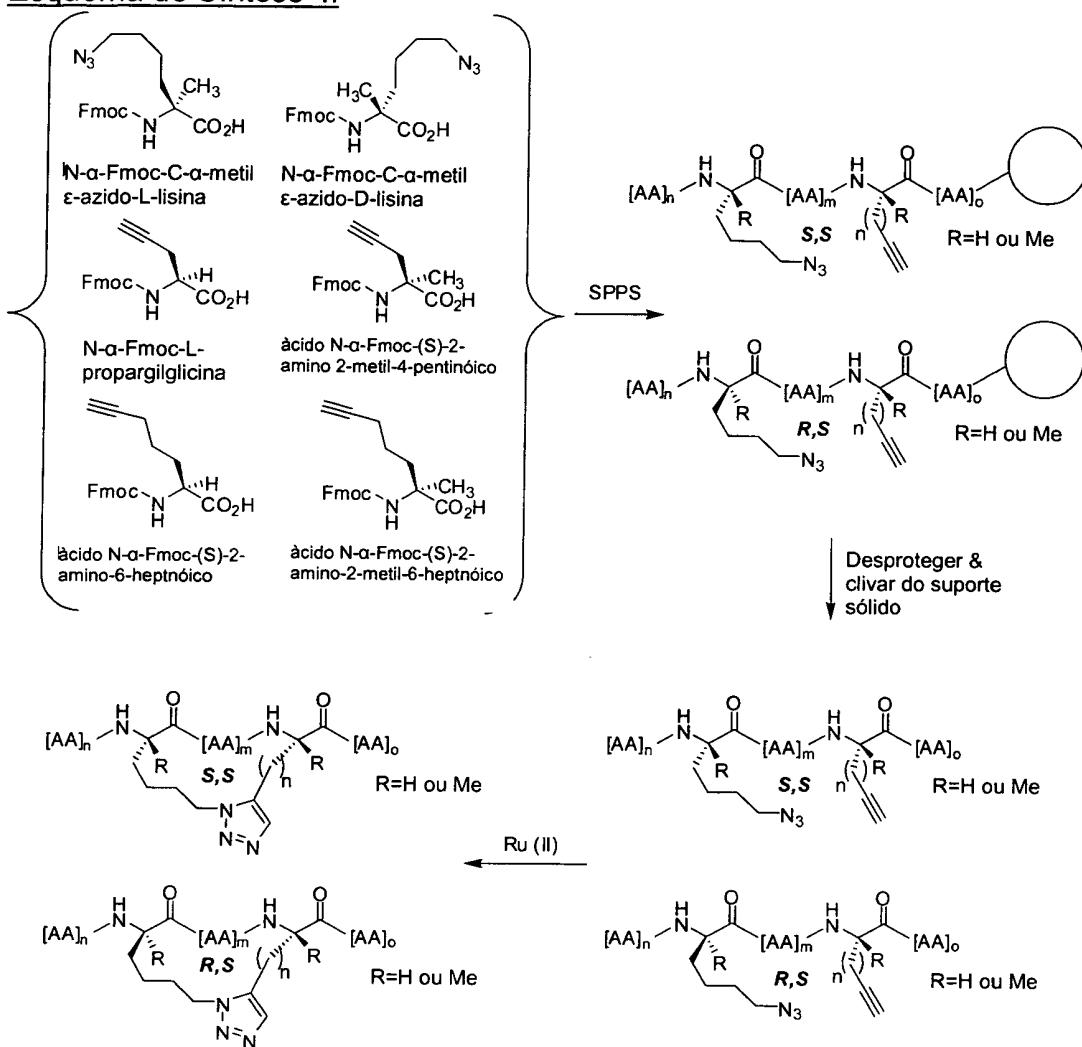
antes da reação com um reagente de macrociclagem, tal como Cu(I), em soluções orgânicas ou aquosas (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tornoe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Punna *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). Em uma modalidade, a reação formadora de triazol é realizada sob condições que favorecem a formação de hélice α . Em uma modalidade, a etapa de macrociclagem é realizada em um solvente escolhido no grupo que consiste em H_2O , THF, CH_3CN , DMF, DIPEA, tBuOH ou uma mistura deles. Em outra modalidade, a etapa de macrociclagem é realizada em DMF. Em algumas modalidades, a etapa de macrociclagem é realizada em um solvente aquoso ou parcialmente aquoso tampornado.

Esquema de Síntese 3:



No método genérico para a síntese de macrociclos peptidomiméticos, ilustrado no Esquema de Síntese 3, o precursor peptidomimético contém um grupamento azida e um grupamento alquino e é sintetizado por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), usando o aminoácido disponível comercialmente N- α -Fmoc-L-propargilglicina e as formas N- α -Fmoc-protectedas dos aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, N-metil- ε -azido-L-lisina, e N-metil- ε -azido-D-lisina. O precursor peptidomimético é reagido com um reagente de macrociclagem, tal como um reagente de Cu(I) sobre a resina como uma mistura bruta (Rostovtsev *et al.* (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; Tornoe *et al.* (2002), *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; Deiters *et al.* (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783; Punna *et al.* (2005), *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:2215-2220). O macrociclo peptidomimético que contém triazol resultante é então desprotectedo e clivado da resina em fase sólida por condições padronizadas (por exemplo, ácido forte, tal como TFA a 95%). Em algumas modalidades, a etapa de macrociclagem é realizada em um solvente escolhido no grupo que consiste em CH₂Cl₂, Cl-CH₂CH₂Cl, DMF, THF, NMP, DIPEA, 2,6-lutidina, piridina, DMSO, H₂O ou uma mistura deles. Em algumas modalidades, a etapa de macrociclagem é realizada em um solvente aquoso ou parcialmente aquoso tamponado.

Esquema de Síntese 4:

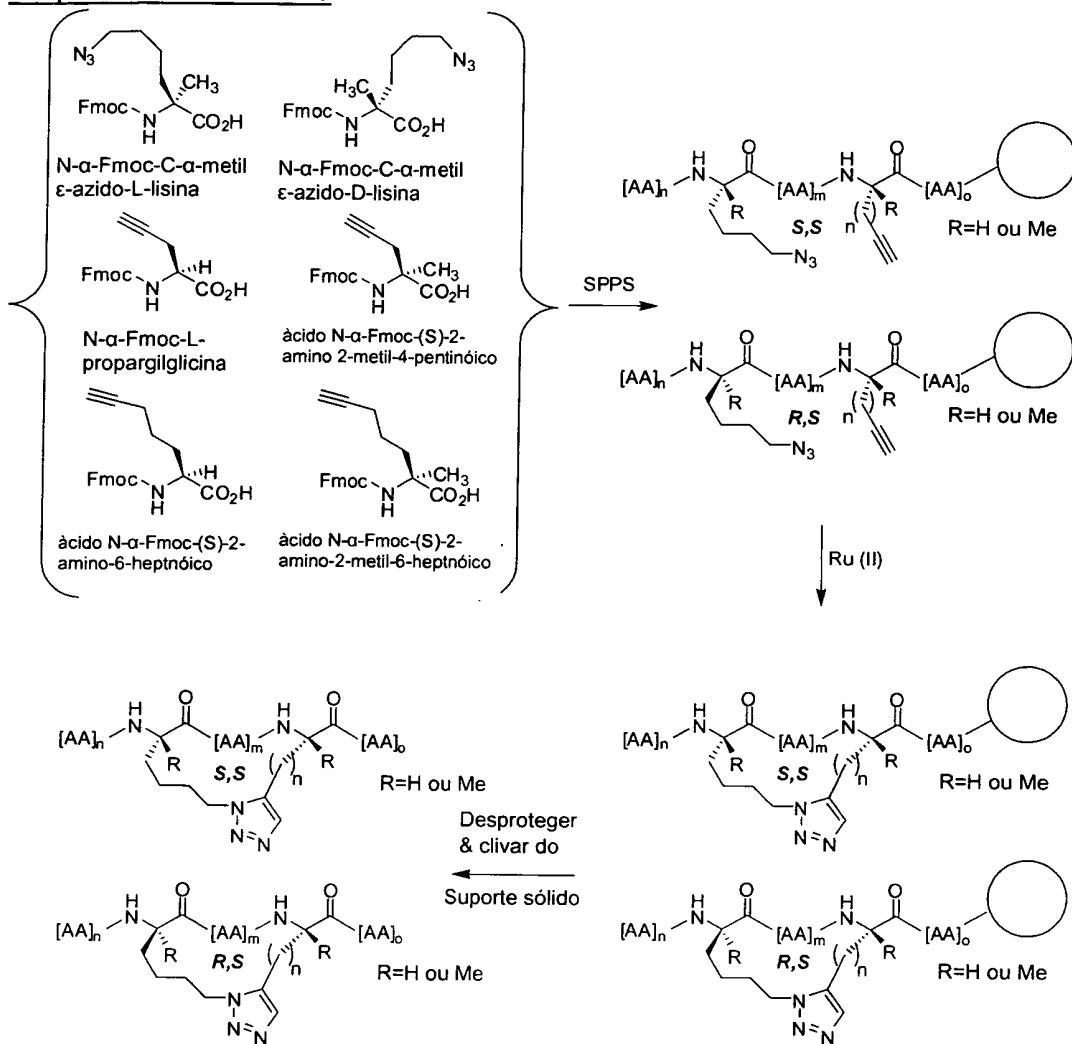


No método genérico para a síntese de macrociclos peptidomiméticos, ilustrado no Esquema de Síntese 4, o precursor peptidomimético contém um grupamento azida e um grupamento alquino e é sintetizado por síntese de peptídeos em fase de solução ou fase sólida (SPPS), usando o aminoácido disponível comercialmente N- α -Fmoc-L-propargylglicina e as formas N- α -Fmoc-protégidas dos aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico acid, N-metil- ϵ -azido-L-lisina, e N-metil- ϵ -azido-D-lisina. O precursor peptidomimético é então desprotegido e clivado da resina em fase sólida por condições padronizadas (por exemplo, ácido forte, tal como TFA a 95%). O precursor peptidomimético é reagido como uma mistura bruta ou é purificado antes da reação com um reagente de macrociclização, tais como rea-

gentes de Ru(II), por exemplo, $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ or $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen et al. (2007), *Org. Lett.* 9:5337-5339; Zhang et al. (2005), *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). Em algumas modalidades, a etapa de macrociclização é realizada em um solvente escolhido no grupo que consiste em DMF, CH_3CN e THF.

5 e THF.

Esquema de Síntese 5:



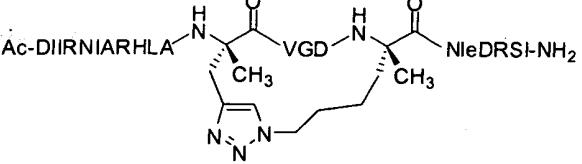
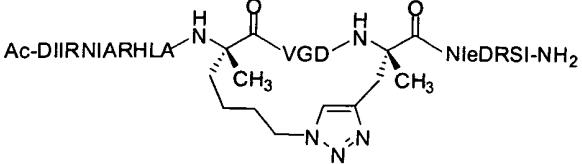
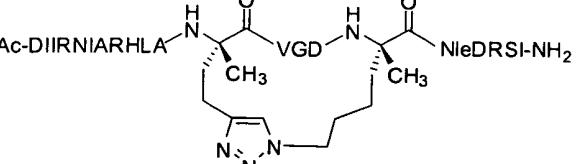
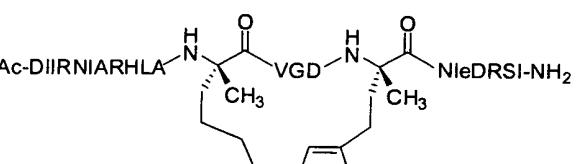
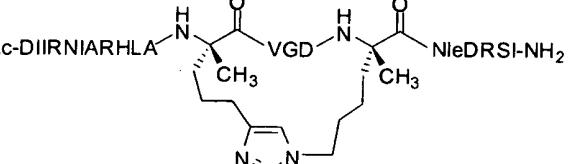
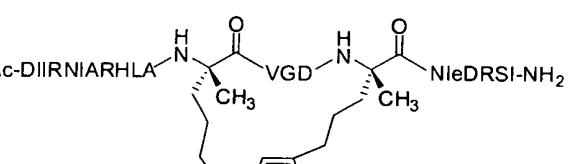
No método genérico para a síntese de macrociclos peptidomiméticos, ilustrado no Esquema de Síntese 5, o precursor peptidomimético contém um grupamento azida e um grupamento alquino e é sintetizado por síntese de peptídeos em fase de solução ou fase sólida (SPPS), usando o aminoácido disponível comercialmente N- α -Fmoc-L-propargilglicina e as formas N- α -Fmoc-protégidas dos aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-

10 tese de peptídeos em fase de solução ou fase sólida (SPPS), usando o aminoácido disponível comercialmente N- α -Fmoc-L-propargilglicina e as formas N- α -Fmoc-protégidas dos aminoácidos ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-

heptinóico, N-metil- ϵ -azido-L-lisina, e N-metil- ϵ -azido-D-lisina. O precursor peptidomimético é reagido com um reagente de macrociclagem, tais como um reagente de Ru(II) sobre a resina como uma mistura bruta. Por exemplo, o reagente pode ser Cp*RuCl(PPh₃)₂ ou [Cp*RuCl]₄ (Rasmussen *et al.* 5 (2007), *Org. Lett.* 9:5337-5339; Zhang *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.* 127:15998-15999). Em algumas modalidades, a etapa de macrociclagem é realizada em um solvente escolhido no grupo que consiste em CH₂Cl₂, Cl-CH₂CH₂Cl, CH₃CN, DMF, e THF.

Vários macrociclos peptidomiméticos exemplificativos estão indicados na Tabela 5. Para estes macrociclos, um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente é o fragmento de sequência de polipeptídeo BID BH3, DIIRNIARHLAQVGDSMDRSI. "Nle" representa norleucina e substitui um resíduo de metionina. Prevê-se que ligantes similares são usados para sintetizar macrociclos peptidomiméticos basados em sequências de 10 polipeptídeos descritas na Tabela 1 até Tabela 4.

TABELA 5

	MW = 2464
	MW = 2464
	MW = 2478
	MW = 2478
	MW = 2492
	MW = 2492

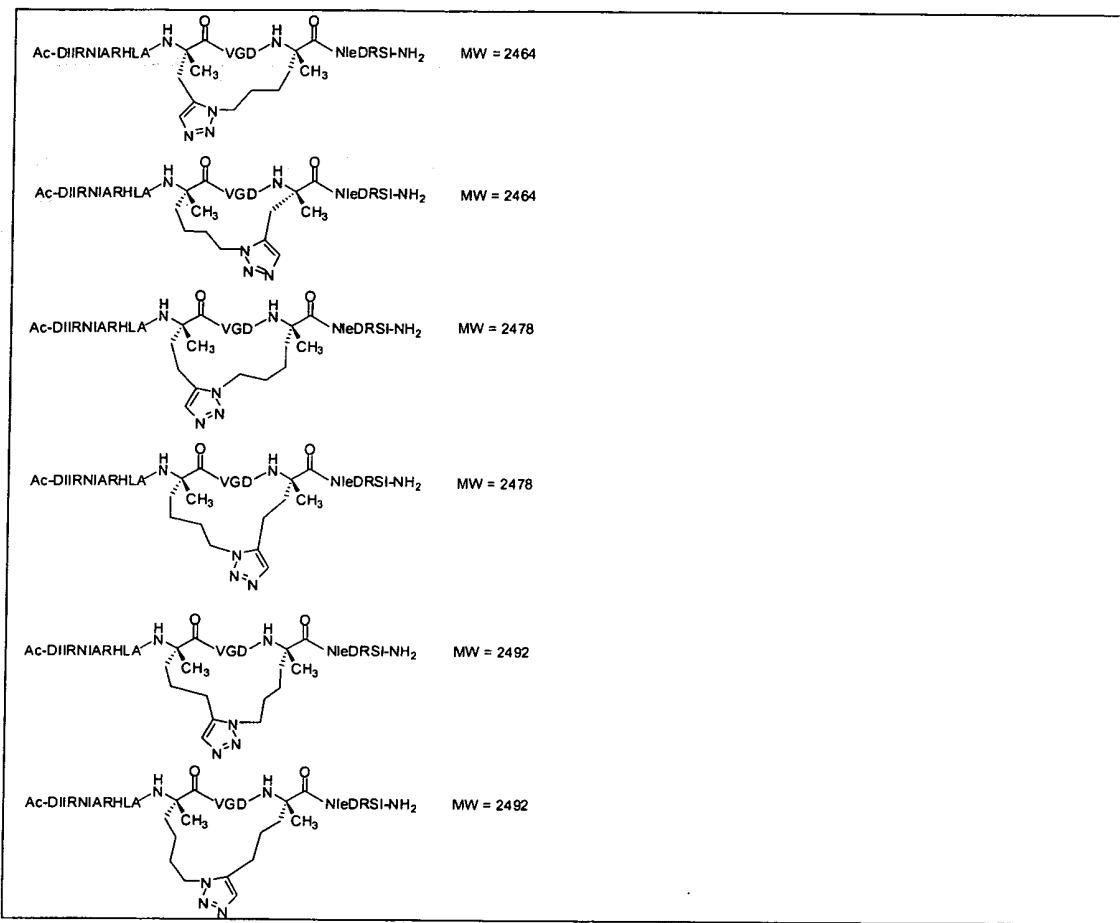


Tabela 5 ilustra macrociclos peptidomiméticos exemplificativos da invenção.
"Nle" representa norleucina.

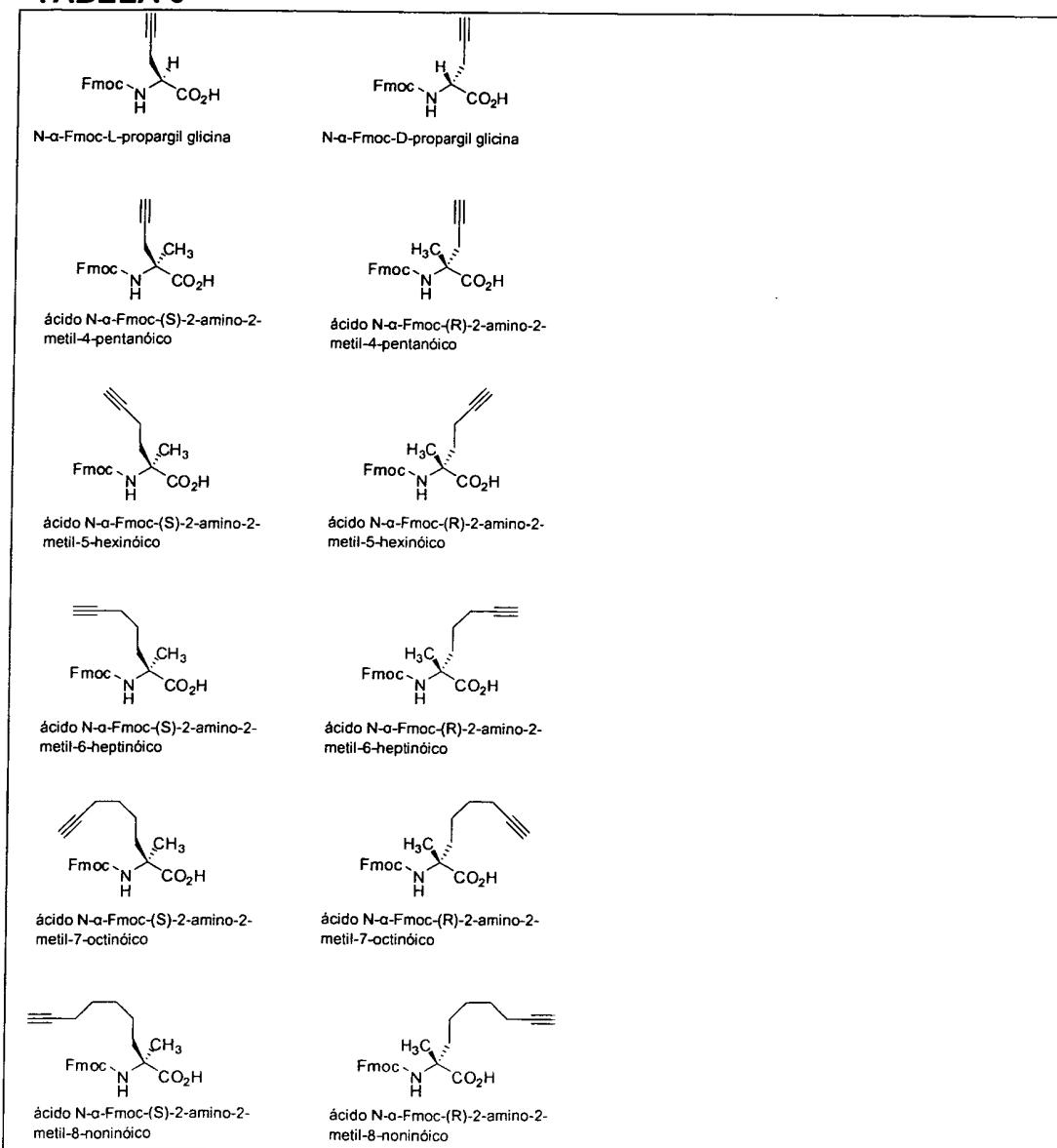
Análogos de Aminoácidos

A presente invenção contempla o uso de aminoácidos de ocorrência não-natural e análogos de aminoácidos na síntese dos macrociclos peptidomiméticos aqui descritos. Qualquer aminoácido ou análogo de aminoácido suscetível aos métodos de síntese empregados para a síntese de macrociclos peptidomiméticos que contêm triazol estáveis pode ser usado na presente invenção. Por exemplo, L-propargilglicina está contemplada como um aminoácido útil na presente invenção. Entretanto, outros aminoácidos que contêm alquino, contendo uma cadeia lateral de aminoácido diferente 5 também são úteis na invenção. Por exemplo, L-propargilglicina contém uma unidade metileno no carbono α do aminoácido e o alquino da cadeia lateral do aminoácido. A invenção contempla também o uso de aminoácidos com múltiplas unidades metileno o carbono α e o alquino. Além disso, os azido-

10

análogos de aminoácidos L-lisina, D-lisina, alfa-metil-L-lisina, e alfa-metil-D-lisina estão contemplados como aminoácidos úteis na presente invenção. Entretanto, outros azido-aminoácidos que contêm uma cadeia lateral de aminoácido diferente também são úteis na invenção. Por exemplo, o azido-análogo de L-lisina contém quatro unidades metíleno entre o carbono α do aminoácido e o terminal azida da cadeia lateral do aminoácido. A invenção contempla também o uso de aminoácidos com menos ou mais do que quarto unidades metíleno entre o carbono α e a azida terminal. A Tabela 6 indica alguns aminoácidos úteis na preparação de macrociclos peptidomiméticos da invenção.

TABELA 6



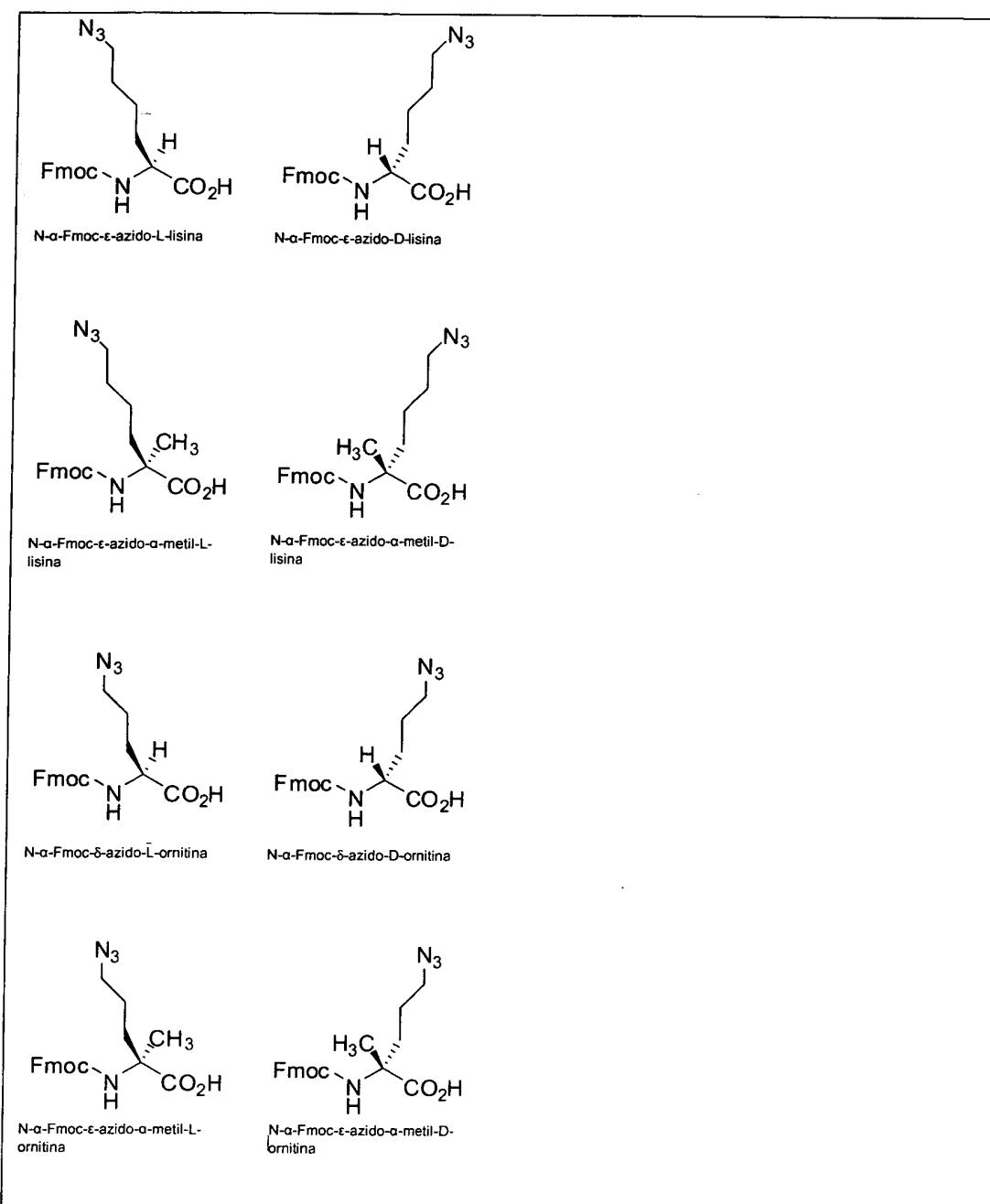


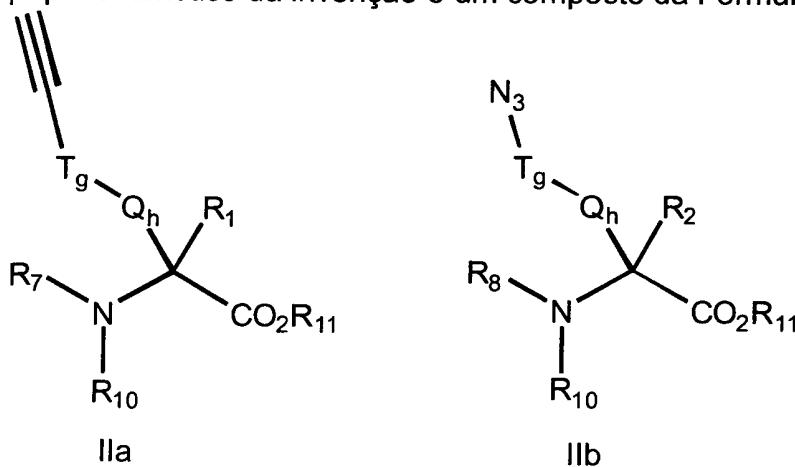
Tabela 6 indica aminoácidos exemplificativos úteis na preparação de macrociclos peptidomiméticos da invenção.

Em algumas modalidades, os aminoácidos e anaálogos de aminoácidos têm a configuração D. Em outras modalidades, eles têm a configuração L. Em algumas modalidades, alguns dos aminoácidos e análogos de aminoácidos contidos no peptidomimético têm a configuração D, enquanto 5 que alguns dos aminoácidos e análogos de aminoácidos têm a configuração L. Em algumas modalidades, os análogos de aminoácidos são α,α -

dissubstituídos, tais como α -metil-L-propargilglicina, α -metil-D-propargilglicina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, e ϵ -azido-alfa-metil-D-lisina. Em algumas modalidades, os análogos de aminoácidos são N-alquilados, por exemplo, N-metil-L-propargilglicina, N-metil-D-propargilglicina, N-metil- ϵ -azido-L-lisina, e N-metil- ϵ -azido-D-lisina.

Em algumas modalidades, o grupamento $-NH$ do aminoácido é protegido usando um grupo protetor, incluindo sem limitações -Fmoc e -Boc. Em outras modalidades, o aminoácido não é protegido antes da síntese do macrociclo peptidomimético.

Em algumas modalidades, um aminoácido útil na síntese do macrociclo peptidomimético da invenção é um composto da Fórmula IIa ou IIb:



em que

R_1 e R_2 são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-;

15 cada Q e T é selecionado independentemente no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e $[-R_4-K-R_4]_n$, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R_5 ;

cada Q e T é selecionado independentemente no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e $[-R_4-K-R_4]_n$, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R_5 ;

K é O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , ou $CONR_3$;

20 R_3 é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R_5 ;

R_4 é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterociclo-alquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

cada R_5 é independentemente halogênio, alquila, $-OR_6$, $-N(R_6)_2$, $-SR_6$, $-SOR_6$, $-SO_2R_6$, $-CO_2R_6$, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

5 cada R_6 é independentemente $-H$, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

R_7 e R_8 são independentemente $-H$, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquilalquila, ou heterocicloalquila;

10 R_{10} e R_{11} são independentemente $-H$ ou qualquer grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos;

g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5, onde $g+h$ é maior do que 1; e

n é um número inteiro entre 1 e 5.

15 Em algumas modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIa e R_1 é alquila, não-substituída ou substituída com halo $-$. Em outras modalidades, o composto é um composto da

Fórmula IIb e R_2 é alquila, não-substituída ou substituída com halo $-$. Em ainda outras modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIa e R_1 é alquila não-substituída. Por exemplo, R_1 pode ser metila. Em 20 ainda outras modalidades, o composto é um composto da Fórmula IIb e R_2 é alquila não-substituída. Por exemplo, R_2 pode ser metila.

Em algumas modalidades dos compostos da invenção, pelo menos um entre R_9 e R_{10} é um grupo protegido apropriado para a síntese de peptídeos.

25 Kits

Em outro aspecto, a presente invenção fornece ainda *kits* que compreendem compostos da invenção ou outros análogos de aminoácidos úteis na preparação dos macrociclos peptidomiméticos da invenção junto com reagentes de macrociclização, como aqui descritos.

30 Em algumas modalidades, a invenção fornece um *kit* que comprehende:

a) pelo menos um composto selecionado no grupo que consiste

g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5, onde g+h é maior do que 1; e

n é um número inteiro entre 1 e 5; e

b) um reagente de macrociclização.

5 Em algumas modalidades, o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₁ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₁ pode ser metila. Em outras modalidades, o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila, não-substituída ou substituída com halo-. Em modalidades afins, R₂ é alquila não-substituída. Por exemplo, R₂ pode ser metila.

10 Em algumas modalidades, um *kit* comprehende pelo menos um composto da Fórmula IIa e pelo menos um composto da Fórmula IIb. Um *kit* da invenção pode compreender também um composto da Fórmula IIa ou Fórmula IIb onde pelo menos um entre R₉ e R₁₀ é um grupo protegido para a 15 síntese de peptídeos. Em modalidades específicas do *kit* da invenção, o reagente de macrociclização é um reagente de Cu ou um reagente de Ru. Em algumas modalidades, o *kit* contém uma pluralidade de compostos da Fórmula IIa e/ou Fórmula IIb. Em algumas modalidades, o *kit* comprehende um ou mais recipientes que mantêm um ou mais análogos de aminoácidos como 20 aquí descritos. Em outras modalidades, o *kit* comprehende um ou mais recipientes que mantêm um ou mais reagentes de macrociclização como aquí descritos. Em ainda outras modalidades, o *kit* comprehende um ou mais recipientes que mantêm um ou mais análogos de aminoácidos como aquí descritos, bem como um ou mais recipientes que mantêm um ou mais reagentes 25 de macrociclização como aquí descritos.

Por exemplo, em algumas modalidades, o *kit* comprehende um recipiente que mantém pelo menos dois análogos de aminoácidos, como descritos acima, pelo menos um que tem uma cadeia lateral alquino e pelo menos um que tem um grupamento azida no terminal da cadeia lateral, sendo o análogo de aminoácido opcionalmente protegido e apropriado para as 30 sínteses aqui descritas. Em algumas modalidades, o análogo de aminoácido é selecionado no grupo que consiste em L-propargilglicina, D-

propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (R)-

- 5 2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninóico, ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, δ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alfa-metil-L-ornitina, e δ -azido-alfa-metil-D-ornitina, e todas formas adequadamente protegidas para a síntese de peptídeos em fase líquida ou sólida.

- 10 Em algumas modalidades, o *kit* comprehende um recipiente que mantém pelo menos um aminoácido de ocorrência não-natural, ou análogo de aminoácido, ligado a um suporte sólido compatível com as sínteses aqui descritas para macrociclos peptidomiméticos. Em algumas modalidades, o *kit* comprehende um recipiente que mantém um análogo de aminoácido da 15 invenção que inclui um grupamento alquino terminal em combinação com um recipiente que mantém um análogo de aminoácido da invenção que inclui um grupamento azida terminal em combinação com um reagente de macrociclagem da invenção.

Ensaios

- 20 As propriedades dos macrociclos peptidomiméticos da invenção são testadas, por exemplo, usando os métodos descritos abaixo. Em algumas modalidades, um macrociclo da invenção tem propriedades intensificadas em relação a um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente é, por exemplo, um precursor de 25 um macrociclo peptidomimético, tal como um composto da Fórmula III ou IV que é convertido no dito macrociclo. Alternativamente, um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente é uma sequência de polipeptídeo, tal como uma sequência de polipeptídeo natural que tem substancial sobreposição de sequências com o macrociclo da invenção. Inúmeros exemplos de polipeptídeos naturais correspondentes ao polipeptídeo macrocíclico são conhecidos 30 nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Em geral, um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente po-

de ser também um polipeptídeo natural marcado ou precursor peptidomimético marcado. Essa marcação, por exemplo, por marcação fluorescente ou radioativa, é usada caso necessário em alguns dos ensaios descritos abaixo. Em tais ensaios, o macrociclo e também o polipeptídeo não-macrocíclico correspondente são tipicamente marcados por métodos similares ou funcionalmente equivalentes.

Ensaio para Determinar Helicidade α

Em solução, a estrutura secundária dos polipeptídeos com domínios helicoides α atingirão um equilíbrio dinâmico entre estruturas helicoidais aleatórias e estruturas helicoides α, frequentemente expressado como "helicidade percentual". Assim sendo, por exemplo, os domínios BH3 pró-apoptóticos não-modificados são predominantemente espirais aleatórias em solução, com teor helicóide α usualmente abaixo de 25%. Os macrociclos peptidomiméticos com ligantes otimizados, por outro lado, possuem, por exemplo, uma helicidade alfa que é pelo menos duas vezes maior do que um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, os macrociclos da invenção possuirão uma helicidade alfa maior do que 50%.

Para testar a helicidade de macrociclos peptidomiméticos da invenção, tais como macrociclos baseados em domínios BH3, os compostos são dissolvidos em uma solução aquosa (por exemplo, solução de fosfato de potássio 50 mM em pH 7, ou H₂O destilada, até concentrações 25-50 μM). Os espectros de dicroísmo circular (CD) são obtidos em spectropolarímetro (por exemplo, Jasco J-710), usando parâmetros de medição padronizados (por exemplo, temperatura, 20 °C; comprimento de onda, 190-260 nm; resolução da etapa, 0,5 nm; velocidade, 20 nm/s; acumulações, 10; resposta, 1 s; largura da banda, 1 nm; comprimento do trajeto, 0,1 cm). O Teor helicóide α de cada peptídeo é calculado dividindo a elipticidade média do resíduo (por exemplo, [Φ]222obs) pelo valor relatado para um modelo helicóide decapeptídeo (Yang *et al.* (1986), *Métodos Enzymol.* 130:208)).

- 30 Ensaio para Determinar a Temperatura de Fusão (T_m).

Um macrociclo peptidomimético da invenção, que compreende uma estrutura secundária, tal como uma hélice α, apresenta, por exemplo,

uma temperatura de fusão mais alta do que um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Tipicamente, os macrociclos peptidomiméticos da invenção apresentam $T_m > 60 ^\circ C$, representando uma estrutura altamente estável em soluções aquosas. Para testar o efeito da formação de macrociclo sobre a temperatura de fusão, os macrociclos peptidomiméticos ou polipeptídeos não-modificados são dissolvidos em H₂O destilada (por exemplo, em uma concentração final 50 μM) e a T_m é determinada medindo a mudança em elipticidade em uma faixa de temperatura (por exemplo, 4 a 95 °C) em um espectropolarímetro (por exemplo, Jasco J-710), usando parâmetros padronizados (por exemplo, comprimento de onda 222 nm; resolução da etapa, 0,5 nm; velocidade, 20 nm/s; acumulações, 10; resposta, 1 s; largura da banda, 1 nm; taxa de aumento da temperatura: 1°C/min; comprimento do trajeto, 0,1 cm).

Ensaio de Resistência a Proteases

A ligação amida da estrutura principal do peptídeo é suscetível à hidrólise por proteases, tornando desta forma os compostos peptídicos vulneráveis à degradação rápida *in vivo*. A formação de hélice do peptídeo, entretanto, tipicamente esconde a estrutura principal da amida, e portanto, pode blindá-la contra clivagem proteolítica. Os macrociclos peptidomiméticos da presente invenção podem ser submetidos à proteólise *in vitro* por tripsina para avaliar qualquer mudança na taxa de degradação em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Por exemplo, o macrociclo peptidomimético e um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente são incubados com tripsina agarose e as reações são interrompidas rapidamente em vários pontos no tempo por centrifugação e subsequente injeção em HPLC para quantificar o substrato residual por absorção de ultravioleta a 280 nm. Resumidamente, o macrociclo peptidomimético e o precursor peptidomimético (5 mcg) são incubados com tripsina agarose (Pierce) (S/E ~125) por 0, 10, 20, 90, e 180 minutos. As reações são interrompidas rapidamente por centrifugação em bancada em alta velocidade; o substrato remanescente no sobrenadante isolado é quantificado por detecção de picos baseada em HPLC a 280 nm. A reação proteolítica apresenta cinética de primeira ordem

e a constante de taxa, k, é determinada a partir de uma plotagem de $\ln[S]$ versus tempo ($k=-1 \times \text{slope}$).

Ensaio de Estabilidade *Ex Vivo*

Os macrociclos peptidomiméticos com ligantes otimizados possuem, por exemplo, uma meia-vida *ex vivo* que é pelo menos duas vezes maior do que aquela de um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente, e possuem uma meia-vida *ex vivo* de 12 horas ou mais. Para estudos de estabilidade sérica *ex vivo*, uma série de ensaios pode ser usada. Por exemplo, um macrociclo peptidomimético e um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente (em um exemplo específico, o polipeptídeo natural correspondente) (2 mcg) são incubados com soro fresco de camundongo, rato e/ou humano (2 mL) a 37 °C por 0, 1, 2, 4, 8, e 24 horas. Para determinar o nível de compost intacto, o seguinte procedimento pode ser usado: As amostras são extraídas transferindo 100 µL de soros para tubos de centrifugação de 2 mL, e em seguida, adição de 10 µL de ácido fórmico a 50% e 500µL de acetonitrila e centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4 ± 2 °C. Os sobrenadantes são então transferidos para tubos de 2 mL frescos e evaporados em Turbovap sob N₂ < 68,95 kPa (10 psi), 37 °C. As amostras são reconstituídas em 100µL de acetonitrila:água 50:50 e submetidas à nálise por LC-MS/MS.

20 Ensaios de Ligação *In vitro*

Para avaliar a ligação e afinidade de macrociclos peptidomiméticos e precursores peptidomiméticos para proteínas aceitoras, em ensaio de polarização por fluorescência (FPA) é usado, por exemplo. A técnica de FPA mede a orientação molecular e mobilidade usando luz polarizada e traçador fluorescente. Quando excitados com luz polarizada, os traçadores fluorescentes (por exemplo, FITC) afixados a moléculas com pesos moleculares aparentes altos (por exemplo, peptídeos marcados com FITC ligados a uma proteína grande) emitem níveis mais altos de fluorescência polarizada devido a suas velocidades mais lentas de rotação em comparação com traçadores fluorescentes afixados a moléculas menores (por exemplo, peptídeos marcados com FITC que estão livres em solução).

Por exemplo, os macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados

(25 nM) são incubados com a protein acceptora (25-1.000 nM) em tampão de ligação (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) por 30 minutos à temperatuta ambiente. A atividade de ligação é medida, por exemplo, por polarização de fluorescência em um espectrofotômetro de luminescência (por exemplo,

- 5 Perkin-Elmer LS50B). Os valores de Kd podem ser determinados por análise de regressão não-linear usando, por exemplo, o software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Um macrociclo peptidomimético da invenção apresenta, em alguns casos, Kd similar ou mais baixa do que um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

10 As proteínas acceptoras para peptídeos BH3, tais como BCL-2, BCL-X_L, BAX ou MCL1, podem ser, por exemplo, usadas neste ensaio. As proteínas acceptoras para peptídeos p53, tais como MDM2 ou MDMX, também podem ser usadas neste ensaio.

Ensaios de Deslocamento *In vitro* para Caracterizar Antagonistas de Intera-

ções Peptídeo-Proteína

Para avaliar a ligação e afinidade de compostos que antagonizam a interação entre um peptídeo (por exemplo, um peptídeo BH3 ou um peptídeo p53) e uma proteína acceptora, um ensaio de polarização por fluorescência (FPA) que utiliza um macrociclo peptidomimético fluoresceinado

- 20 derivado de uma sequênciia de precursor peptidomimético, é usado, por exemplo. A técnica de FPA mede a orientação molecular e mobilidade usando luz polarizada e traçador fluorescente. Quando excitados com luz polarizada, os traçadores fluorescentes (por exemplo, FITC) afixados a moléculas com pesos moleculares aparentes altos (por exemplo, peptídeos marcados com 25 FITC ligados a uma proteína grande) emitem níveis mais altos de fluorescência polarizada devido a suas velocidades mais lentas de rotação em comparação com traçadores fluorescentes afixados a moléculas menores (por exemplo, peptídeos marcados com FITC que estão livres em solução). Um composto que antagoniza a interação entre o macrociclo peptidomiméti-30 co fluoresceinado e uma proteína acceptora será detectado em um experimento de FPA de ligação competitiva.

Por exemplo, compostos antagonistas putativos (1 nM a 1 mM) e

um macrociclo peptidomimético fluoresceinado (25 nM) são incubados com a proteína acceptora (50 nM) em tampão de ligação (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) por 30 minutos à temperatura ambiente. A atividade de ligação de antagonistas é medida, por exemplo, por polarização com fluorescência 5 em um espectrofotômetro de luminescência (por exemplo, Perkin-Elmer LS50B). Os valores de Kd podem ser determinados por análise de regressão não-linear usando, por exemplo, o software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Qualquer classe de molécula, tais como moléculas orgânicas 10 pequenas, peptídeos, oligonucleotídeos ou proteínas podem ser examinadas como antagonistas putativos neste ensaio. As proteínas acceptoras para peptídeos BH3, tais como BCL2, BCL-XL, BAX ou MCL1, podem ser usadas neste ensaio. As proteínas acceptoras para peptídeos p53, tais como MDM2 ou MDMX, podem ser usadas neste ensaio.

15 Ensaios de Ligação em Células Intactas

É possível medir a ligação de peptídeos ou macrociclos peptidomiméticos aos seus acceptores naturais em células intactas por experimentos de imunoprecipitação. Por exemplo, células intactas são incubadas com compostos fluoresceinados (marcados com FITC) por 4 h na ausência 20 de soro, e em seguida, substituição do soro e incubação adicional que dura 4-18 h. As células são então peletizadas e incubadas em tampão de lise (Tris 50mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, 1% de CHAPS e coquetel de inibidores de proteases) por 10 minutos a 4 °C. Os extratos são centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes são coletados e incubados com 10 25 µL de anticorpo caprino anti-FITC por 2 h, girando a 4 °C, e em seguida, mais 2 h de incubação a 4 °C com proteína A/Sepharose G (50 µL de lama de pérolas a 50%). Depois de rápida centrifugação, os péletes são lavados em tampão de lise contendo concentração crescente de sais (por exemplo, 150, 300, 500 mM). As pérolas são então reequilibradas em NaCl 150 mM 30 antes da adição de tampão de amostras contendo SDS e fervura. Depois da centrifugação, os sobrenadantes passam opcionalmente por eletroforese usando gradiente de 4%-12% de géis de Bis-Tris, e em seguida, transferên-

cia para dentro de membranas Immobilon-P. Depois de bloquear, as manchas são opcionalmente incubadas com um anticorpo que detecta FITC e também com um ou mais anticorpos que detectam proteínas que se ligam ao macrociclo peptidomimético, incluindo BCL2, MCL1, BCL-XL, A1, BAX, BAK,

5 MDM2 ou MDMX.

Ensaio de Permeabilidade Celular

Um macrociclo peptidomimético é, por exemplo, mais permeável a células em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos são mais

10 permeáveis a células do que um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente. Os macrociclos peptidomiméticos com ligantes otimizados possuem, por exemplo, permeabilidade celular que é pelo menos duas vezes maior do que um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente, e frequentemente 20% ou mais do peptide aplicado serão observados como tendo penetrados
15 na célula depois de 4 horas. Para medir a permeabilidade celular de macrociclos peptidomiméticos e polipeptídeos não-macrocíclicos correspondentes, células intactas são incubadas com macrociclos peptidomiméticos ou polipeptídeos não-macrocíclicos correspondentes fluoresceinados (10 µM) por 4 h em meios isentos de soro a 37 °C, lavados com meios e incubados com
20 tripsina (0,25%) por 10 min a 37 °C. As células são lavadas novamente e recolhidas em suspensão em PBS. A fluorescência celular é analisada, por exemplo, usando um citômetro de fluxo FACSCalibur ou a leitora Cellomics' QuineticScan ® HCS Reader.

Ensaio da Eficácia Celular

25 A eficácia de certos macrociclos peptidomiméticos é determinada, por exemplo, em ensaios de extermínio baseados em células, usando uma série de linhagens de células tumorigênicas e não-tumorigênicas e células primárias derivadas de populações de células humanas ou do camundongo. A viabilidade celular é monitorada, por exemplo, durante 24-96 h de
30 incubação com macrociclos peptidomiméticos (0,5 a 50 µM) para identificar aqueles que extermiram em $CE_{50} < 10 \mu\text{M}$. Vários ensaios-padrão que medem a viabilidade celular estão disponíveis comercialmente e são usados

opcionalmente para avaliar a eficácia dos macrociclos peptidomiméticos. Além disso, ensaios que medem a ativação de Anexina V e caspases são opcionalmente usados para avaliar se os macrociclos peptidomiméticos extermíniam células ativando a maquinaria apoptótica.

5 Ensaio de Estabilidade *In Vivo*

Para investigar a estabilidade *in vivo* dos macrociclos peptidomiméticos, os compostos são, por exemplo, administrados a camundongos e/ou ratos belas vias IV, IP, PO ou inalação em concentrações na faixa entre 0,1 e 50 mg/kg e espécimes de sangue são retiradas em 0', 5', 15', 30', 1 h, 4 h, 8 h e 24 horas após a injeção. Os níveis de composto intact em 25 µL de cada soro fresco são então medidos por LC-MS/MS como acima.

Eficácia *In vivo* em Modelos Animais

Para determinar a atividade antioncogênica de macrociclos peptidomiméticos da invenção *in vivo*, os compostos são, por exemplo, dados isoladamente (vias IP, IV, PO, por inalação ou nasal) ou em combinação com doses abaixo da ótima de quimioterapia relevante (por exemplo, ciclofosfamida, doxorrubicina, etoposida). Em um exemplo, 5×10^6 RS4;11 células (estabelecidas a partir da medula óssea de um paciente com leucemia linfoblástica aguda) que expressam de forma estável luciferase recebem injeção pela veia da cauda em camundongos NOD-SCID 3 h depois que eles foram submetidos a irradiação do corpo total. Caso deixada não-tratada, esta forma de leucemia é fatal em 3 semanas neste modelo. A leucemia é facilmente monitorada, por exemplo, injetando os camundongos com D-luciferina (60 mg/kg) e reproduzindo imagens dos animais anestesiados (por exemplo, Xenogen In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). A bioluminescência de corpo total é quantificada por integração de fluxo fotônico (fótons/s) pelo Software de Imagens Vivas (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Os macrociclos peptidomiméticos isoladamente ou em combinação com doses abaixo da ótima de agentes quimioterápicos relevantes são, por exemplo, administrados a camundongos leucêmicos (10 dias depois da injeção/Dia 1 do experimento, em faixa de bioluminescência de 14-16) pela veia da cauda ou IP em doses na faixa entre 0,1mg/kg e 50

mg/kg por 7 a 21 dias. Opcionalmente, os camundongos passam por reprodução de imagens durante o tratamento inteiro a cada dois dias e a sobrevida foi monitorada diariamente durante a duração do experimento. Os camundongos expirados são opcionalmente submetidos a necropsia no final do experimento. Outro modelo animal em implantação em camundongos NOD-SCID de DoHH2, uma linhagem de células derivada de linfoma folicular humano, que expressam de forma estável luciferase. Estes testes *in vivo* geram opcionalmente dados farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos.

10 Ensaios Clínicos

Para determinar a adequabilidade dos macrociclos peptidomiméticos da invenção para tratamento de humanos, são realizados ensaios clínicos. Por exemplo, pacientes diagnosticados com câncer e em necessidade de tratamento são selecionados e separados em tratamento e um ou mais grupos de controle, onde o grupo de tratamento recebe administração de um macrociclo peptidomimético da invenção, enquanto que os grupos de controle recebem placebo ou um fármaco anticâncer conhecido. A segurança e do tratamento e a eficácia dos macrociclos peptidomiméticos da invenção podem ser assim avaliadas realizando comparações de grupos de pacientes com respeito a fatores tais como sobrevida e qualidade de vida. Neste exemplo, o grupo de pacientes tratados com um macrociclo peptidomimético apresenta melhor sobrevida de longo prazo em comparação com um grupo de pacientes de controle tratado com placebo.

Composições Farmacêuticas e Vias de Administração

25 Os macrociclos peptidomiméticos da invenção incluem também seus serivados ou pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis. Um "derivado farmaceuticamente aceitável" significa qualquer sal, éster, sal de um éster, pró-fármaco, ou outro derivado farmaceuticamente aceitável de um composto desta invenção que, após administração a um recebedor, é capaz de produzir (direta ou indiretamente) um composto desta invenção. São derivados farmaceuticamente aceitáveis particularmente favorecidos aqueles que aumentam a biodisponibilidade dos compostos da invenção quando adminis-

trados a um mamífero (por exemplo, aumentando a absorção no sangue de um composto administrado por via oral) ou que aumenta a distribuição do composto ativo para um compartimento biológico (por exemplo, o cérebro ou sistema linfático) em relação à espécie originária. Alguns derivados farmaceuticamente aceitáveis incluem um grupo químico que aumenta a solubilidade aquosa ou o transporte ativo através da mucosa gastrointestinal.

Em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos da invenção são modificados juntando de forma covalente ou não-covalente grupos funcionais apropriados, para melhorar as propriedades biológicas seletivas. Tais modificações incluem aquelas que aumentam a penetração biológica em um dado compartimento biológico (por exemplo, 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 exceção.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos desta invenção incluem aqueles derivados de ácidos e bases inorgânicas e orgânicas farmaceuticamente aceitáveis. Os exemplos de sais de ácidos apropriados incluem acetato, adipato, benzoato, benzenessulfonato, butirato, citrato, digliconato, dodecilsulfato, formiato, 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 e undecanoato. Os sais derivados de bases apropriadas incluem sais de metais alcalinos (por exemplo, sódio), metais alcalino terrosos (por exemplo, magnésio), amônio e sais de N -(alquila)₄⁺.

Para preparar composições farmacêuticas a partir dos compostos da presente invenção, os carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem carreadores sólidos ou líquidos. As preparações na forma sólida incluem pó, comprimidos, pílulas, cápsulas, hóstias, supositórios, e grânulos dispersáveis. Um carreador sólido pode ser uma ou mais substâncias, que atuam também como diluentes, sabores, aglutinantes, conservantes, agentes desintegradores de comprimidos, ou um material de encapsulação. Os

detalhes sobre as técnicas para formulação e administração estão bem descritos na literatura científica e de patentes; vide, por exemplo, a última edição de "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co, Easton, PA.

5 Em pós, o carreador é um sólido finamente dividido, que está em mistura com o componente ativo finamente dividido. Em comprimidos, o componente ativo é misturado com o carreador com as propriedades ligan tes necessárias em proporções apropriadas e compactado no formato e tamанho desejados.

10 Os excipientes sólidos apropriados são cargas de carboidratos ou proteínas incluem, porém sem limitações, açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol, ou sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata, ou outras plantas; celulose tal como metilcelulose, hidroxipropilmetyl-celulose, ou carboximetil-celulose sódica; e gomas, incluindo goma-arábica e tragacanto; 15 bem como proteínas tais como gelatina e colágeno. Caso desejado, agentes desintegradores ou de solubilização são adicionados, tais como poli(vinil-pirrolidona) reticulada, ágar, ácido algínico ou um seu sal, tal como alginato de sódio.

As preparações na forma líquida incluem soluções, suspensões, 20 e emulsões, por exemplo, soluções em água ou água/propilenoglicol. Para injeção parenteral, as preparações líquidas as preparações líquidas podem ser formuladas em solução em solução aquosa de polietilenoglicol.

A preparação farmacêutica está de preferência na forma de dosagem unitária. Nesta forma a preparação é subdividida em doses unitárias 25 que contêm quantidades apropriadas do componente ativo. A forma de dosagem unitária pode ser uma preparação embalada, a embalagem contendo quantidades distintas de preparação, tais como comprimidos, cápsulas, e pós embalados em frascos ou ampolas. Além disso, a forma de dosagem unitária pode ser uma cápsula, comprimido, hóstia, pastilha em si, ou ela 30 pode ser o número apropriado de qualquer deles na forma embalada.

Quando as composições desta invenção compreendem uma combinação de macrociclo peptidomimético e um ou mais agentes terapêuti-

cos ou profiláticos adicionais, o composto e o agente adicional devem estar presentes em níveis de dosagem entre cerca de 1 e 100%, e mais preferivelmente entre cerca de 5 e 95% da dosagem normalmente administrada em um esquema de monoterapia. Em algumas modalidades, os agentes adicionais

- 5 adicionais são administrados separadamente, como parte de um esquema e múltiplas doses, dos compostos desta invenção. Alternativamente, esses agentes são parte de uma forma de dosagem única, misturados com os compostos desta invenção em uma única composição.

Métodos de Uso

- 10 Em um aspecto, a presente invenção fornece macrociclos peptidomiméticos inusitados que são úteis em ensaios de ligação competitiva para identificar agentes que se ligam ao(s) ligante(s) natural(ais) das proteínas ou peptídeos sobre os quais os macrociclos peptidomiméticos são modelados. Por exemplo, no sistema de p53 MDM2, os macrociclos peptidomiméticos estabilizados marcados baseados na p53 são usados em um ensaio de ligação de MDM2 junto com moléculas pequenas que se ligam competitivamente a MDM2. Estudos de ligação competitiva permitem a rápida avaliação *in vitro* e determinação de candidatos a fármacos específicos para o sistema p53/MDM2. Similarmente, no sistema antiapoptótico BH3/BCL-X_L, os macrociclos peptidomiméticos marcados baseados em BH3 podem ser usados em um ensaio de ligação de BCL-X_L junto com moléculas pequenas que se ligam competitivamente a BCL-X_L. Estudos de ligação competitiva permitem a rápida avaliação *in vitro* e determinação de candidatos a fármacos específicos para o sistema BH3/BCL-X_L. A invenção fornece ainda a geração de anticorpos contra os macrociclos peptidomiméticos. Em algumas modalidades, estes anticorpos se ligam especificamente ao macrociclo peptidomimético e também ao precursor de p53 ou BH3 peptidomimético após o que os macrociclos peptidomiméticos são derivados. Tais anticorpos, por exemplo, rompem os sistemas p53/MDM2 ou BH3/BCL-X_L, respectivamente.
- 15
- 20
- 25

- 30 Em outros aspectos, a presente invenção fornece métodos profiláticos e também terapêuticos para tratar um indivíduo em risco de (ou suscetível a) um distúrbio ou que tem um distúrbio associado à expressão de

membro da família de BCL-2 aberrante (por exemplo, insuficiente ou excessiva) ou atividade (por exemplo, anormalidades da via apoptótica extrínseca ou intrínseca). Acredita-se que alguns distúrbios do tipo BCL-2 são causados, pelo menos em parte, por um nível anormal de um ou mais membros da 5 família BCL-2 (por exemplo, superexpressão ou subexpressão), ou pela presença de um ou mais mebros da família BCL-2, que apresentam atividade anormal. Assim sendo, a redução no nível e/ou atividade do membro da família BCL-2 ou a intensificação do nível e/ou atividade do membro da família BCL-2, é usada, por exemplo, para melhorar ou reduzir os sintomas adversos 10 do distúrbio.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos para tratar ou prevenir doença hiperproliferativa interferindo com a interação ou ligação entre p53 e MDM2 em células tumorosas. Estes métodos compreendem administrar uma quantidade eficaz de um composto da invenção a um 15 animal homeotermo, incluindo um humano, ou às células tumorosas que contêm p53 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a administração dos compostos da presente invenção induz a detenção do crescimento celular ou apoptose. Em outras modalidades, a presente invenção é usada para tratar doença e/ou células tumorosas que compreendem níveis elevados de 20 MDM2. O termo "níveis elevados de MDM2", como aqui utilizado, refere-se a níveis de MDM2 maiores do que aqueles encontrados em células que contêm um número de cópias mais do que o normal (2) de *mdm2* ou acima cerca de 10.000 moléculas de MDM2 por célula, medido por ELISA e ensaios similares (Picksley *et al.* (1994), *Oncogene* 9, 2523 2529).

Como aqui utilizado, o termo "tratamento" é definido como a aplicação ou administração de um agente terapêutico a um paciente, ou aplicação ou administração de um agente terapêutico a uma célula ou linhagem de células isolada a partir de um paciente, que tem uma doença, um sintoma de doença ou uma predisposição para uma doença, com o propósito de curar, cicatrizar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, melhorar, amenizar ou afetar 30 a doença, os sintomas da doença ou a predisposição para a doença.

Em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos da

invenção são usados para tratar, prevenir, e/ou diagnosticar cânceres e condições neoplásicas. Como aqui utilizados, os termos "câncer", "hiperproliferativa" e "neoplásica" referem-se a células que têm a capacidade de crescimento autônomo, isto é, um estado ou condição anormal caracterizada por

5 crescimento celular rapidamente proliferante. Os estados doentios hiperproliferativos e neoplásicos podem ser classificados como patológicos, isto é, caracterizando ou constituindo um estado doentio, ou podem ser classificados como não-patológicos, isto é, um desvio do normal, mas não associado com um estado doentio. O termo pretende incluir todos tipos de crescimentos cancerosos ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células, tecidos ou órgãos transformados de forma maligna, independentemente do tipo ou estágio histopatológico de invasão. Um tumor metastático pode advir de uma multiplicidade de tipos de tumores primários, incluindo, porém sem limitações, aqueles de origem mamária, pulmonar, hepática, colônica e ovariana.

10 As células "patológicas hiperproliferativas" ocorrem em estados doentios caracterizados por crescimento de tumores malignos. Os exemplos de células não-patológicas hiperproliferativas incluem a proliferação de células associadas ao reparo de feridas. Os exemplos de distúrbios celulares proliferativos e/ou diferenciadores incluem câncer, por exemplo, carcinoma, sarcoma, ou distúrbios metastáticos. Em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos são agentes terapêuticos inusitados para controlar câncer de mama, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de pulmão, metástases de tais cânceres e similares.

15

20

Os exemplos de cânceres ou condições neoplásicas incluem, porém sem limitações, um fibrossarcoma, miossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossalcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, câncer gástrico, câncer esofágico, câncer retal, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer prostático, câncer uterino, câncer da cabeça e pescoço, câncer cutâneo, câncer cerebral, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarci-

25

30

noma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer testicular, carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinoma pulmonar de células não-pequenas, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma de acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, ou sarcoma de Kaposi.

Os exemplos de distúrbios proliferativos incluem distúrbios neoplásicos hematopoieticos. Como aqui utilizado, o termo "distúrbios neoplásicos hematopoieticos" inclui doenças que envolvem células hiperplásicas/neoplásicas de origem hematopoiética, por exemplo, advindas de linhagens mielóde, linfóide ou eritróide, ou células precursoras delas. De preferência, as doenças advêm de leucemias agudas deficientemente diferenciadas, por exemplo, leucemia eritroblástica e leucemia aguda megacarioblástica. Os distúrbios mielóides exemplificativos adicionais incluem, porém sem limitações, leucemia promielóide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) e leucemia mielógena crônica (CML) (revisado em Vaickus (1991), *Crit Rev. Oncol./Hemtol.* 11:267-97); as malignidades linfóides incluem, porém sem limitações, leukemia linfoblástica aguda (ALL) que inclui ALL de linhagem B e ALL de linhagem T, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) e macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). As formas adicionais de linfomas malignos incluem, porém sem limitações, linfoma não-Hodgkin e variantes dele, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma de células T cutâneas (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), doença de Hodgkin e doença de Reed-Sternberg.

Os exemplos de distúrbios celulares proliferativoss e/ou de diferenciação da mama incluem, porém sem limitações, doença mamária proliferativa, incluindo, por exemplo, hiperplasia epitelial, adenose esclerosante, e papilomas de dutos pequenos; tumores, por exemplo, tumores estromais tais como fibroadenoma, tumor filodes, e sarcomas, e tumores epiteliais tais co-

mo papiloma de dutos grandes; 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, porém sem limitações, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma colóide (mucinoso), carcinoma tubular, e carcinoma papilar invasivo, e neoplasmas malignos miscelâneos. Os distúrbios na mama masculina incluem, porém sem limitações, ginecomastia e carcinoma.

Os exemplos de distúrbios celulares proliferativos e/ou de diferenciação do pulmão incluem, porém sem limitações, carcinoma broncogênico, incluindo síndromes paraneoplásicas, carcinoma bronquioalveolar, tumores neuroendócrinos, tais como carcinóide brônquico, tumores miscelâneos, e tumores metastáticos; patologias da pleura, incluindo efusões pleurais inflamatórias, efusões pleurais não-inflamatórias, pneumotórax, e tumores pleurais, incluindo tumores fibrosos solitários (fibroma pleural) e mesotelioma maligno.

Os exemplos de distúrbios celulares proliferativos e/ou de diferenciação do cólon incluem, porém sem limitações, pólipos não-neoplásicos, adenomas, síndromes familiais, carcinogênese colorretal, carcinoma colorretal, e tumores carcinóides.

Os exemplos de distúrbios celulares proliferativos e/ou de diferenciação do fígado incluem, porém sem limitações, hiperplasias nodulares, adenomas, e tumores malignos, incluindo carcinoma primário do fígado e tumores metastáticos.

Os exemplos de distúrbios celulares proliferativos e/ou de diferenciação do ovário incluem, porém sem limitações, tumores ovarianos tais como epitélio celômico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliais superficiais; tumores de células germinativas tais como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos imaturos, disgerminoma, tumores do seio endodérmico, coriocarcinoma; tumores dos cordões sexuais-estoma tais como tumores de células

da granulosa-teca, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células hilares, e gonadoblastoma; e tumores metastáticos tais como tumores de Krukenberg.

Em outras modalidades, os macrociclos peptidomiméticos aqui descritos são usados para tratar, prevenir ou diagnosticar condições caracterizadas por morte celular hiperativa ou morte celular devido a insulto fisiológico, etc. Alguns exemplos de condições caracterizadas por morte celular prematura ou indesejada são proliferações celular alternativamente indesejada ou excessiva incluem, porém sem limitações, condições hipocelulares/hipoplásicas, acelulares/aplásicas, ou hipercelulares/hiperplásicas. Alguns exemplos incluem distúrbios hematológicos, incluindo, porém sem limitações, anemia de Fanconi, anemia aplásica, talaessemia, neutropenia congênita, mielodisplasia

Em outras modalidades, os macrociclos peptidomiméticos da invenção, que atuam para diminuir apoptose, são usados para tratar distúrbios associados a um nível indesejado de morte celular. Assim sendo, em algumas modalidades, os macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos da invenção são usados para tratar distúrbios tais como aqueles que levam à morte celular associada a infecção viral, por exemplo, infecção associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Várias doenças neurológicas são caracterizadas pela perda gradual de conjuntos específicos de neurônios, e os macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos da invenção são usados, em algumas modalidades, no tratamento destes distúrbios. Tais distúrbios incluem doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ALS), retinite pigmentosa, atrofia muscular espinhal, e várias formas de degeneração cerebelar. A perda de células nestas doenças não induz uma resposta inflamatória, e a apoptose parece ser um mecanismo de morte celular. Além disso, inúmeras doenças hematológicas estão associadas a uma produção diminuída de células sanguíneas. Estes distúrbios incluem anemia associada a doença crônica, anemia aplásica, neutropenia crônica, e síndromes mielodisplásicas. Os distúrbios de produção células sanguíneas, tais como síndrome mielodisplásica e algumas formas de anemia aplásica,

estão associados à maior morte celular apoptótica dentro da medula óssea. Estes distúrbios poderiam resultar da ativação de genes promovem apoptose, deficiências adquiridas em células do estroma ou fatores de sobrevivência hematopoiéticos, ou os efeitos diretos de toxinas e mediadores de respostas imunes. Dois distúrbios comuns associados à morte celular são infartos do miocárdio e acidente vascular cerebral. Em ambos distúrbios, as células dentro da área central da isquemia, que é produzida no caso de perda aguda de fluxo sanguíneo, parecem morrer rapidamente como resultado de necrose. Entretanto, fora da zona isquêmica central, as células morrem durante um período de tempo mais prolongado e morfologicamente parecem morrer por apoptose. Em outras modalidades, os macrociclos peptidomiméticos antiapoptóticos da invenção são usados para tratar todas as doenças associadas à morte celular indesejável.

Alguns exemplos de distúrbios imunológicos que são tratados com os macrociclos peptidomiméticos aqui descritos incluem, porém sem limitações, rejeição a transplantes de órgãos, artrite, lúpus, IBD, doença de Crohn, asma, esclerose múltipla, diabetes, etc.

Alguns exemplos de distúrbios neurológicos que são tratados com os macrociclos peptidomiméticos aqui descritos incluem, porém sem limitações, doença de Alzheimer, síndrome de Down, Amiloidose de Hemorragia Cerebral Hereditária do Tipo Holandês, Amiloidose Reativa, Nefropatia Amilóide Familiar com Urticária e Surdez, Síndrome de Muckle-Wells, Mieloma Idiopático; Mieloma Associado a Macroglobulinemia, Polineuropatia Amilóide Familiar, Cardiompatia Amilóide Familiar, Amilóide Cardíaco Isolado, Amiloidose Senil Sistêmica, Diabetes de Início no Adulto, Insulinoma, Amilóide Atrial Isolado, Carcinoma Medular da Tireóide, Amiloidose Familiar, Hemorragia Cerebral Hereditária Com Amiloidose, Polineuropatia Amiloidótica Familiar, *Scrapie*, Doença de Creutzfeldt-Jacob, Síndrome de Gerstmann Straussler-Scheinker, Encefalite Espongiforme Bovina, uma doença mediada por príons, e Doença de Huntington.

Alguns exemplos de distúrbios endocrinológicos que são trata-

dos com os macrociclos peptidomiméticos aqui descritos incluem, porém sem limitações, diabetes, hipotireoidismo, hipopituitarismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, etc.

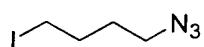
Os exemplos de distúrbios cardiovasculares (por exemplo, distúrbios inflamatórios) que são tratados ou prevenidos com os macrociclos peptidomiméticos da invenção incluem, porém sem limitações, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose, aneurisma, insuficiência cardíaca, doença cardíaca isquêmica, angina do peito, morte cardíaca repentina, doença cardíaca hipertensiva; doença de vaso não-coronário, tais como arteriolosclerose, doença de vasos pequenos, nefropatia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, xantomatose, asma, hipertensão, enfesima e doença pulmonar crônica; ou uma condição cardiovascular associada a procedimentos de intervenção ("traumatismo vascular procedural"), tais como restenose após angioplastia, colocação de um desvio, sonda, enxertos de excisão sintéticos ou naturais, sonda de demora, válvula ou outros dispositivos implantáveis. Os distúrbios cardiovasculares preferidos incluem aterosclerose, infarto do miocárdio, aneurisma, e acidente vascular cerebral.

Exemplos

20 A seção que se segue fornece exemplos ilustrativos da presente invenção.

Exemplo 1. Preparação de Aminoácidos Alfa,Alfa-Dissubstituídos

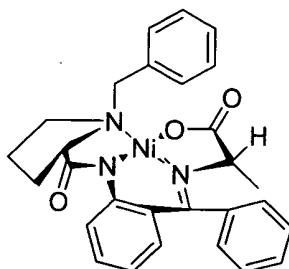
Composto 1



O Composto 1 foi preparado por uma sequência de duas etapas 25 de acordo com Yao *et al.* (2004) *J. Org. Chem.*, 69:1720-1722. Adicionou-se azida de sódio (0,53 g, 8,2 mmol) a 1-iodo-4-cloro-butano (1 mL, 8,2 mmol) em dimetil-formamida (10 mL), e a reação foi agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro. A reação foi então diluída com acetato de etila e água. A camada orgânica foi lavada com água (3 vezes), secada com sulfato de magnésio e concentrada sob vácuo para dar 1-azido-4-cloro-butano com rendimento de 80%. A azida foi diluída com acetona (38 mL), e iodeto de

sódio (1,98 g, 13,00 mmol) foi adicionado, e a reação foi aquecida no refluxo de um dia para o outro. Depois disso, a reação foi diluída com água e o produto foi extraído com éter (três vezes). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com bicarbonato de sódio e salmoura. Os extratos orgânicos foram secados com sulfato de magnésio e contrados sob vácuo. O produto 1 foi purificado passando-o através de um leito de alumina neutra. O rendimento foi 89%.

Composto 2



S-Ala-Ni-BPB

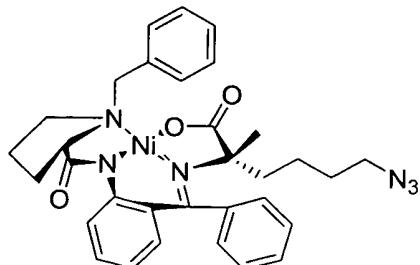
O Composto 2 foi preparado por uma sequência de três etapas de acordo com Belokon *et al.* (1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252. Uma solução de S-prolina (100 g, 0,869 mol) e KOH (172 g, 2,61 mol) em isopropanol (600 mL) foi preparada sob agitação a 40 °C. Tão logo a solução ficou transparente, adicionou-se cloreto de benzila (156 mL, 1,34 mol) na mesma temperatura. Depois de completada a adição (3,5 h), a reação foi agitada de um dia para o outro a 40 °C. A reação foi neutralizada com HCl concentrado (110 mL) até pH 5, e depois adicionou-se clorofórmio (400 mL) à mistura da reação e a mistura foi deixada agitando de um dia para o outro. A mistura foi então filtrada e o precipitado foi lavado com CHCl₃. As soluções em CHCl₃ foram combinadas e evaporadas, o resíduo foi tratado com acetona e o precipitado do produto bruto foi filtrado e lavado adicionalmente com acetona. O produto benzil-prolina foi isolado com rendimento de 75%.

Adicionou-se cloreto de tionila (18,34 mL, 0,25 mmol) uma solução de benzil-prolina (41 g, 0,2 mol) em cloreto de metileno (200 mL) sob agitação a -20 °C a -30 °C durante um período de 10 min. A agitação foi continuada a -10 °C até a mistura reativa ficar quase transparente. Depois, uma solução de 2-amino-benzofenona (25 g, 0,125 mol) em cloreto de metileno

(100 mL) foi adicionada à mistura da reação a -30 °C sob agitação. A agitação foi continuada à temperatura ambiente por mais 10 h e uma solução de carbonato de sódio (40 g) em água (150 mL) foi adicionada à mistura da reação sob agitação a 0 °C. A camada orgânica foi separada, a camada aquosa foi extraída várias vezes com cloreto de metileno e as soluções orgânicas foram combinadas e evaporadas. O produto (aduto de benzil-prolina/amino-benzofenona) foi cristalizado em etanol e foi isolado com rendimento de 85%.

Uma solução de KOH (23,1 g, 0,35 mol) em metanol (75 ml) foi vertida para dentro de uma mistura sob agitação do aduto de benzil-prolina/amino-benzofenona (19,5 g, 0,05 mol) e nitrato de níquel hexahidratado (29,1 g, 0,1 mol), L-Ala (8,9 g, 0,1 mol) em metanol (175) sob nitrogênio a 40-50 °C. A mistura reativa foi agitada a 55C-65 °C por 2 h e depois neutralizada com ácido acético (20 mL). O volume da reção foi diluído com água (500 mL). Depois de 6 h, o sólido cristalino separado foi filtrado e lavado com água (2x) para dar o composto **2** puro (sólido vermelho, 22 g). M+H obs. 512.4, M+H calc. 512.1.

Composto 3



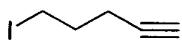
Ao composto **2** (5,122g, 10,0 mmols) adicionou-se dimetilformamida (45 mL), que foi desgaseificada por intermédio de um ciclo de congelamento-descongelamento. A solução foi resfriada até 4 °C com um banho de gelo e adicionou-se KOH em pó (6,361g, 100 mmols) em uma parcela. O banho gelado foi removido e o composto **1** (3,375 g, 15 mmols) dissolvido em dimetilformamida (4,0 mL) foi adicionado por intermédio de uma seringa.

25 A reação foi agitada à temperatura ambiente por 40 min. A reação foi então interrompida rapidamente adicionando-a lentamente a uma solução aquosa gelada de ácido acético a 5 % (200 mL). O produto bruto foi coletado por

filtração e lavado três vezes com água gelada. O produto foi purificado por cromatografia rápida usando uma coluna de sílica Biotage e hexano/acetato de etila como eluente. O Composto 3 foi obtido como um sólido vermelho (51% de rendimento), M+H calc.609.2, M+H obs.609.37. A pureza foi determinada como sendo 98% por UV 254 nm.

5

Composto 4

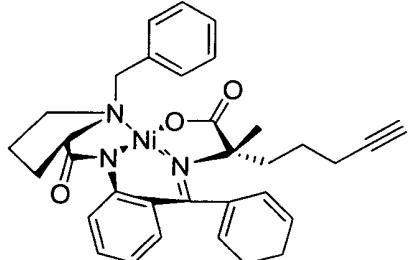


Adicionou-se iodeto de sódio (14,321 g, 95,54 mmols) a uma solução de 5-cloro-pentino (5 g, 47,8 mmols) em acetona (80 mL). A reação foi aquecida no refluxo de um dia para o outro. Depois disso, a reação foi diluída com água e o produto foi extraído com éter (três vezes). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com bicarbonato de sódio e salmoura. Os extratos orgânicos foram secados com sulfato de magnésio e concentrados sob vácuo. O produto 4 foi purificado passando-o através de um leito de alumina neutra. O rendimento foi de 92%.

10

15

Composto 5



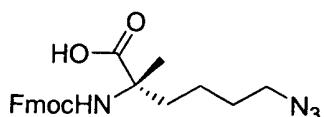
Adicionou-se dimetilformamida (23 mL) ao composto 2 (2,561 g, 5,0 mmols), que foi desgaseificada por intermédio de um ciclo de congelamento-descongelamento. A solução foi resfriada até 4 °C com um banho de gelo e adicionou-se KOH em pó (3,181 g, 50 mmols) em uma parcela. O banho gelado foi removido e o composto 4 (1,94 g, 10 mmols) dissolvido em dimetil-formamida (2,0 mL) foi adicionado por intermédio de uma seringa. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 40 min. A reação foi então interrompida rapidamente adicionando-alentamente a uma solução aquosa gelada de ácido acético a 5% (100 mL). O produto bruto foi coletado por filtração e lavado três vezes com água gelada. O produto foi purificado por cromatografia rápida usando uma coluna de sílica Biotage e hexano/acetato

20

25

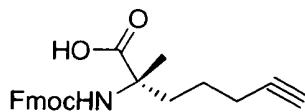
de etila como eluente. O Composto 5 é um sólido vermelho, 1,4 g (rendimento 48%). M+H calc. 578.19, M+H obs. 578.69. A pureza foi determinada como sendo 97% por UV 254 nm.

Composto 6



- 5 Uma solução do Composto 3 (1 g, 1,65 mmol) em MeOH (3 mL) foi adicionada a uma solução (12 mL) de HCl/MeOH 1/13 N a 70 °C sob a forma de gotas. O material de partida desapareceu dentro de 5-10 min. A mistura reativa foi então concentrada sob vácuo e o solvente residual foi removido em uma bomba de alto vácuo. O resíduo bruto foi diluído com solução aquosa a 10% de Na₂CO₃ (16 mL) resfriada até 0 °C com um banho de gelo. Fmoc-OSu (0,84 g, 2,5 mmol) dissolvido em dioxano (16 mL) foi adicionado e a reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente sob agitação de um dia para o outro. Depois disso, a reação foi diluída com acetato de etila e HCl 1 N. A camada orgânica foi lavada com HCl 1 N (3 vezes). A 10 camada orgânica foi então secada com sulfato de magnésio e concentrada sob vácuo. O produto puro foi isolado depois de uma purificação por cromatografia rápida com uma coluna de sílica Biotage e acetato de etila/hexano e cloreto de metileno/metanol como eluentes, para dar um óleo viscoso com rendimento global de 36% para ambas etapas. M+Na obs 431.89, M+H calc (409.18). A pureza foi determinada como sendo 98% UV 254 nm.
- 15
- 20

Composto 7

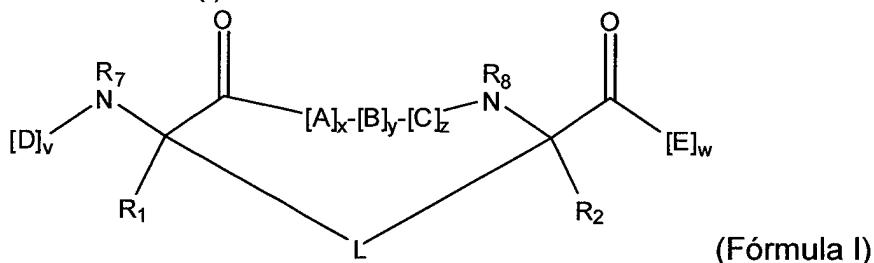


- Adicionou-se uma solução do Composto 5 (1,4 g, 2,4 mmol) em MeOH (4 mL) a uma solução (18 mL) de HCl/MeOH 1/13 N a 70 °C sob a forma de gotas. O material de partida desapareceu dentro de 5-10 min. A 25 mistura reativa foi então concentrada sob vácuo e o solvente residual foi removido em uma bomba de alto vácuo. O resíduo bruto foi diluído com solução aquosa a 10% de Na₂CO₃ (24 mL) resfriada até 0 °C com um banho de gelo. Fmoc-OSu (0,98 g, 2,9 mmol) dissolvido em dioxano (24 mL) foi adi-

- cionado e a reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente sob agitação de um dia para o outro. Depois disso, a reação foi diluída com acetato de etila e HCl 1 N. A camada orgânica foi lavada com HCl 1 N (3 vezes). A camada orgânica foi então secada com sulfato de magnésio e concentrada sob vácuo. O produto puro foi isolado (30% de rendimento para ambas etapas) depois de uma purificação por cromatografia rápida com uma coluna de sílica Biotage e acetato de etila/hexano e cloreto de metileno/metanol como eluentes. O produto foi obtido como um óleo viscoso, que solidifica depois de descansar. M+H calc. 378.16, M+Na obs 400.85.
- 10 Inúmeras modalidades da invenção foram descritas. Contudo, deve-se entender que várias modificações podem ser feitas sem fugir do espírito e âmbito da invenção. Consequentemente, outras modalidades estão dentro do âmbito das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Macroscílico peptidomimético, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (I):



em que:

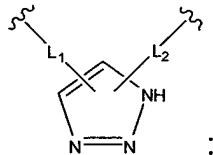
- 5 cada A, C, D, e E é independentemente um aminoácido natural ou não-natural;

B é um aminoácido natural ou não-natural, análogo de aminoácido, , [-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], ou [-NH-L₃-];

- 10 R₁ e R₂ são independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituídos ou substituídos com halo-;

R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅;

- 15 L é um ligante formador de macrocíclos de fórmula



L₁, L₂ e L₃ são independentemente alquíleno, alquenileno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, cicloaríleno, heterocicloaríleno, ou [-R₄-K-R₄-]_n, sendo cada um opcionalmente substituído com R₅;

- 20 cada R₄ é alquíleno, alquenileno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterociclo-alquíleno, aríleno, ou heteroaríleno; cada K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃; cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆,

- SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;
- cada R₆ é independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;
- 5 R₇ é -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, heteroalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅, ou parte de uma estrutura cíclica com um resíduo D;
- 10 R₈ é -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, heteroalquila, cicloalquilalquila, heterocicloalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅, ou parte de uma estrutura cíclica com um resíduo E;
- 15 v é um número inteiro entre 1-1.000;
- 15 w é um número inteiro entre 1-1.000;
- 15 x é um número inteiro entre 0-10;
- 15 y é um número inteiro entre 0-10;
- 15 z é um número inteiro entre 0-10; e
- 15 n é um número inteiro entre 1-5;
- 20 em que o macrociclo peptidomimético compreende uma hélice α ou folha β
2. Macrociclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1,
- caracterizado pelo fato de que L é
3. Macrociclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1,
- 25 caracterizado pelo fato de que L é
4. Macrociclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R₁ e R₂ é alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, cada grupo sendo opcionalmente substituído com halo.
- 30 5. Macrociclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de que R₁ e R₂ são independentemente alquila, al-

quenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, cada grupo sendo opcionalmente substituído com halo.

6. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R₁ e R₂ é alquila, opcionalmente substituída com halo.

7. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R₁ e R₂ são independentemente alquila, opcionalmente substituídos com halo.

8. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R₁ e R₂ é metila.

9. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R₁ e R₂ são metila.

10. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre D e E é um aminoácido natural ou não-natural substituído com um lipídeo ou hidrocarboneto de alto peso molecular.

11. Macroscíclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre D e E é anexado a um ligante formador de macroscíclo adicional.

12. Macroscículo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma estrutura secundária do macroscículo peptidomimético é mais estável do que uma estrutura secundária correspondente de um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

13. Macroscículo peptidomimético de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o macroscículo peptidomimético compreende uma hélice α .

14. Macroscículo peptidomimético de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a hélice α compreende entre 1 volta e 5 voltas.

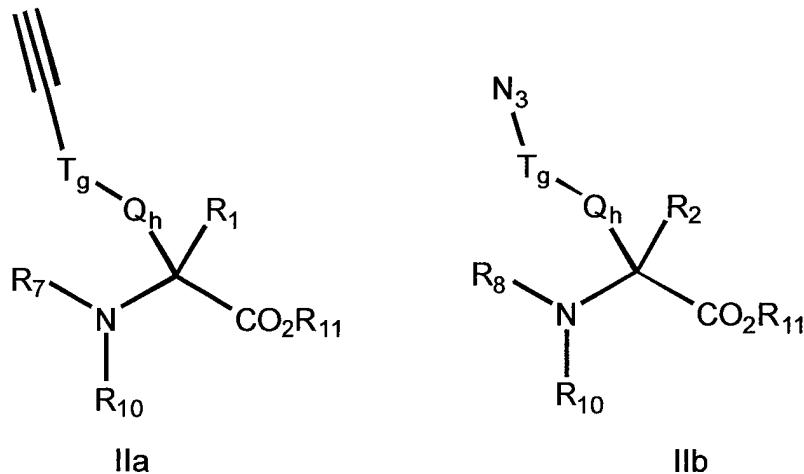
15. Macroscículo peptidomimético de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a hélice α é mais estável do que uma hélice α de um polipeptídeo um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

16. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o ligante formador de macroscílico abarca entre 1 volta e 5 voltas da hélice α .
17. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 5 13, caracterizado pelo fato de que o ligante formador de macroscílico abarca aproximadamente 1, 2, 3, 4 ou 5 voltas da hélice α .
18. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 10 13, caracterizado pelo fato de que o comprimento do ligante formador de macroscílico é cerca de 5 Å a cerca de 9 Å por volta da hélice α .
19. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 15 13, caracterizado pelo fato de que o ligante formador de macroscílico abarca aproximadamente 1 volta da hélice α .
20. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 15 13, caracterizado pelo fato de que o comprimento do ligante formador de macroscílico é aproximadamente igual ao comprimento de entre cerca de 6 ligações carbono-carbono e cerca de 14 ligações carbono-carbono.
21. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 20 19, caracterizado pelo fato de que o comprimento do ligante formador de macroscílico é aproximadamente igual ao comprimento de entre cerca de 8 ligações carbono-carbono e cerca de 12 ligações carbono-carbono.
22. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o macroscílico compreende um anel de cerca de 18 átomos a 26 átomos.
23. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 25 13, caracterizado pelo fato de que a hélice α compreende cerca de 2 voltas.
24. Macroscílico peptidomimético, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o comprimento do ligante formador de macroscílico é aproximadamente igual ao comprimento de entre cerca de 8 ligações carbono-carbono e cerca de 16 ligações carbono-carbono.
- 30 25. Macroscílico peptidomimético de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o comprimento do ligante formador de macroscílico é aproximadamente igual ao comprimento de entre cerca de 10

ligações carbono-carbono e cerca de 13 ligações carbono-carbono.

26. Macro ciclo peptidomimético de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o macrociclo compreende um anel de cerca de 29 átomos a cerca de 37 átomos.

5 27. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula IIa ou IIb:



em que

10 R_1 e R_2 são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída ou substituída com halo-;

cada Q e T é selecionado independentemente no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e $[-R_4-K-R_4]_n$, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R_5 ;

15 K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;

R_3 é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R_5 ;

20 R_4 é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquileno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

cada R_5 é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

cada R_6 é independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila,

25 cicloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioi-

sótopo ou um agente terapêutico;

R_7 e R_8 são independentemente –H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquilalquila, ou heterociclo-alquila;

- 5 R_{10} e R_{11} são independentemente –H ou qualquer grupo protetor
apropriado para a síntese de peptídeos;

g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5, onde g+h é maior do que 1; e

n é um número inteiro entre 1 e 5.

28. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado
10 pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIa e R_1 é alquila, não-substituída ou substituída com halo–.

29. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIb e R_2 é alquila, não-substituída ou substituída com halo–.

- 15 30. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIa e R_1 é alquila não-substituída.

- 20 31. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIb e R_2 é alquila não-substituída.

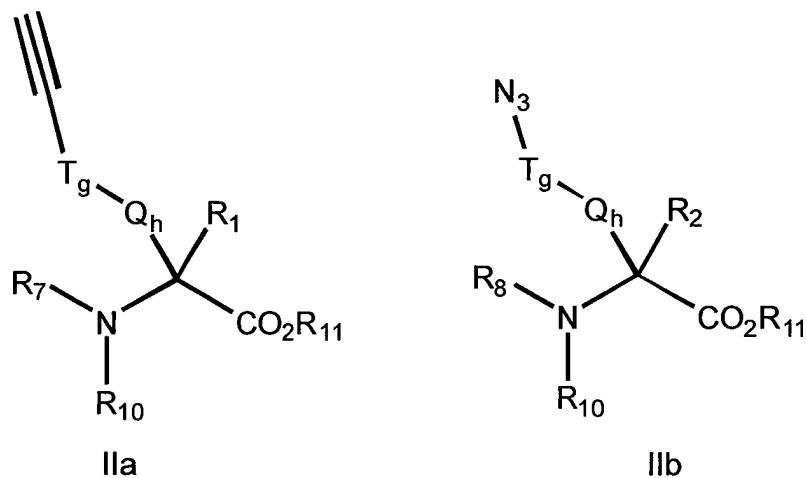
32. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIa e R_1 é metila.

33. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o composto é um composto da Fórmula IIb e R_2 é metila.

- 25 34. Composto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R_9 e R_{10} é um grupo protegido apropriado para a síntese de peptídeos.

35. *Kit*, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 30 a) pelo menos um composto selecionado no grupo que consiste em compostos de Fórmulas IIa e IIb;



em que

R₁ e R₂ são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, não-substituída

5 ou substituída com halo-;

cada Q e T é selecionado independentemente no grupo que consiste em alquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, heteroaríleno e [-R₄-K-R₄-]_n, cada um deles sendo não-substituído ou substituído com R₅;

K é O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, ou CONR₃;

10 R₃ é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, cicloalquilalquila, cicloarila, ou heterocicloarila, opcionalmente substituídos com R₅;

R₄ é alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno, ou heteroaríleno;

15 cada R₅ é independentemente halogênio, alquila, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, um grupamento fluorescente, um radioisótopo ou um agente terapêutico;

cada R₆ é independentemente H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, ci-

20 cloalquilalquila, heterocicloalquila, um grupamento fluorescente, um radioisó-

topo ou um agente terapêutico;

R₇ e R₈ são independentemente -H, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquilalquila, heteroalquilalquila, ou heterocicloalquila;

R₁₀ e R₁₁ são independentemente -H ou qualquer grupo protetor apropriado para a síntese de peptídeos;

25 g e h são independentemente um número inteiro entre 0 e 5, on-

de g+h é maior do que 1; e

n é um número inteiro entre 1 e 5; e

b) um reagente de macrociclização.

36. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
5 de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila, não-
substituída ou substituída com halo.

37. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila, não-
substituída ou substituída com halo.

10 38. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIa e R₁ é alquila não-
substituída.

15 39. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIb e R₂ é alquila não-
substituída.

40. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIa e R₁ é metila.

41. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende um composto da Fórmula IIb e R₂ é metila.

20 42. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que pelo menos um entre R₉ e R₁₀ é um grupo protegido apropriado para
a síntese de peptídeos.

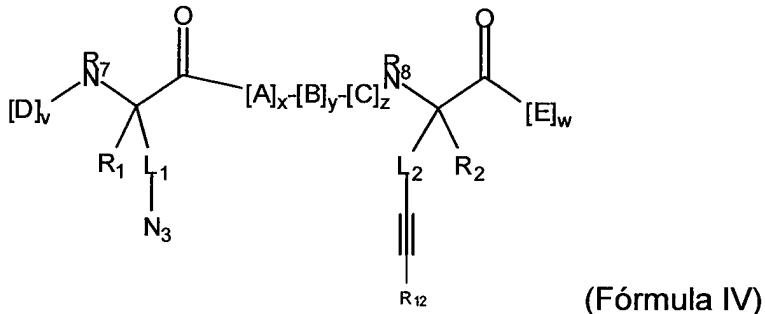
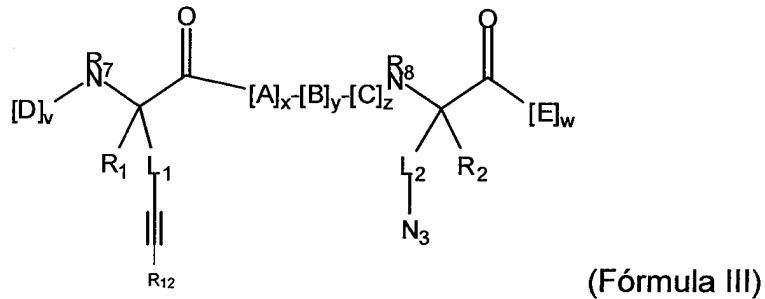
25 43. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o *kit* comprehende pelo menos um composto da Fórmula IIa e pelo
menos um composto da Fórmula IIb.

44. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o reagente de macrociclização é um reagente de Cu.

45. *Kit* de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato
de que o reagente de macrociclização é um reagente de Ru.

30 46. Método para sintetizar um macrociclo peptidomimético com-
preendendo uma hélice α ou folha β, caracterizado pelo fato de que o méto-
do comprehende as etapas de colocar um precursor peptidomimético de Fór-

mula III ou Fórmula IV:



em contato com um reagente de macrociclagão;

em que v , w , x , y , z , A , B , C , D , E , R_1 , R_2 , R_7 , R_8 , L_1 e L_2 são como definidos na reivindicação 1;

- 5 R_{12} é H ou alquila;
 ainda em que R_{12} é H quando o reagente de macrociclagão é um reagente de Cu e R_{12} é –H ou alquila quando o reagente de macrociclagão é um reagente de Ru; e
 a dita etapa de colocar em contato resulta em uma ligação covalente ser
 10 formada entre o grupamento alquino e azida na Fórmula III ou Fórmula IV.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R_1 e R_2 é alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, cada grupo sendo opcionalmente substituído com halo.

- 15 48. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 são independentemente alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, heteroalquila, ou heterocicloalquila, cada grupo sendo opcionalmente substituído com halo.

- 20 49. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R_1 e R_2 é alquila, opcionalmente substituída com halo.

50. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que R₁ e R₂ são independentemente alquila, opcionalmente substituída com halo.
51. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre R₁ e R₂ é metila.
52. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que R₁ e R₂ são metila.
53. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o reagente de macrociclização é um reagente de Cu.
- 10 54. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o reagente de macrociclização é um reagente de Ru.
55. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o precursor peptidomimético é purificado antes da etapa de colocar em contato.
- 15 56. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético é purificado depois da etapa de colocar em contato.
57. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético é redobrado depois da etapa de colocar em contato.
- 20 58. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o método é realizado em solução.
59. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o método é realizado sobre um suporte sólido.
- 25 60. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o método é realizado na presença de uma macromolécula-alvo que se liga ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação.
61. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o método é realizado na presença de uma macromolécula-alvo que se liga preferencialmente ao precursor peptidomimético ou macrociclo peptidomimético sob condições que favorecem a dita ligação.

62. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o método é aplicado para sintetizar uma biblioteca de macrociclos peptidomiméticos.

63. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético compeende uma hélice α em solução aquosa.

64. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético apresenta maior estrutura helicóide α em solução aquosa, em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

65. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético apresenta maior estabilidade térmica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

66. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético apresenta maior atividade biológica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

67. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético apresenta maior resistência à degradação proteolítica em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

68. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético apresenta maior capacidade para penetrar em células vivas, em comparação com um polipeptídeo não-macrocíclico correspondente.

69. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o grupamento alquino do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionado no grupo que consiste em L-propargilglicina, D-propargilglicina, ácido (S)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-4-pentinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-5-hexinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-6-heptinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-6-heptinóico,

ácido (S)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (R)-2-amino-2-metil-7-octinóico, ácido (S)-2-amino-2-metil-8-noninóico, e ácido (R)-2-amino-2-metil-8-noninóico, e o grupamento azida do precursor peptidomimético da Fórmula III ou Fórmula IV é uma cadeia lateral de um aminoácido selecionado no 5 grupo que consiste em ϵ -azido-L-lisina, ϵ -azido-D-lisina, ϵ -azido-alfa-metil-L-lisina, δ -azido-alfa-metil-D-lisina, δ -azido-alpha-metil-L-ornitina, e δ -azido-alfa-metil-D-ornitina.

70. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que $x+y+z$ é 3, e A, B e C são independentemente aminoácidos 10 naturais ou não-naturais.

71. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que $x+y+z$ é 6, e A, B e C são independentemente aminoácidos naturais ou não-naturais.

72. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o reagente de macrociclagem é um reagente de Cu e a etapa de colocar em contato é realizada em um solvente selecionado no grupo que 15 consiste em solvente prótico, solvente aquoso, solvente orgânico, e misturas deles.

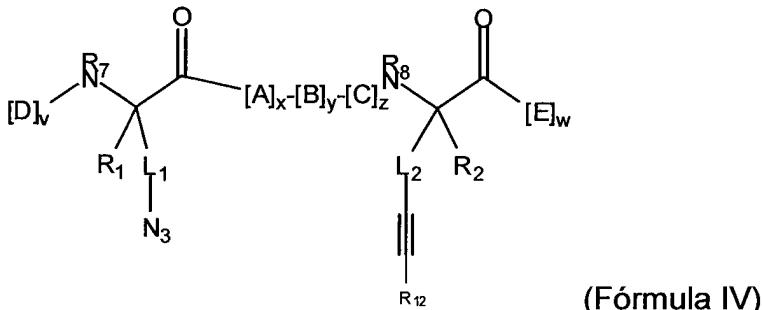
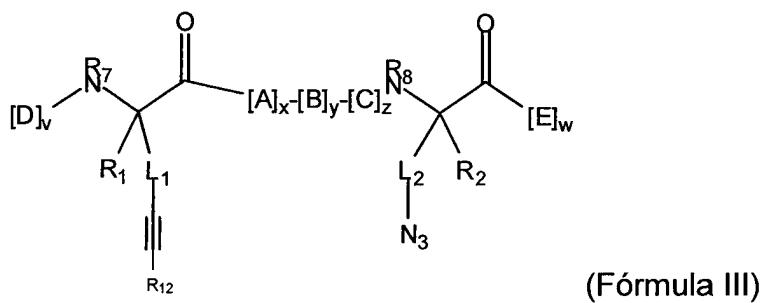
73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o solvente é H_2O , THF/ H_2O , tBuOH/ H_2O , DMF, DIPEA, 20 CH_3CN , CH_2Cl_2 ou $CICH_2CH_2Cl$.

74. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o reagente de macrociclagem é um reagente de Ru e a etapa de colocar em contato é realizada em um solvente orgânico.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que o solvente é DMF, THF, CH_3CN , CH_2Cl_2 ou $CICH_2CH_2Cl$.

76. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o solvente é um solvente que favorece a formação de hélice.

77. Método para sintetizar um macrociclo peptidomimético, caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de colocar um 30 precursor peptidomimético de Fórmula III ou Fórmula IV:



em contato com um reagente de macrociclagão baseado em rutênio;
em que v, w, x, y, z, A, B, C, D, E, R₁, R₂, R₇, R₈, L₁ e L₂ são como definidos na reivindicação 1;

R₁₂ é H ou alquila; e

5 a dita etapa de colocar em contato resulta em uma ligação covalente ser formada entre o grupamento alquina e azida na Fórmula III ou Fórmula IV.

78. Método de acordo com a reivindicação 46 ou 77, caracterizado pelo fato de que o macrociclo peptidomimético compreende uma hélice

10 a.

RESUMO

Patente de Invenção: "**MACROCICLO PEPTIDOMIMÉTICO, COMPOSTO, KIT E MÉTODOS PARA SINTETIZAR UM MACROCICLO PEPTIDOMIMÉTICO**".

A presente invenção refere-se a macrociclos peptidomiméticos inusitados e métodos para sua preparação e uso, bem como análogos de aminoácidos e ligantes formadores de macrociclos, e *kits* úteis na sua produção.

Listagem de Sequênciа

<110> AILERON THERAPEUTICS, INC.

<120> SISTEMAS DE TRIZÓIS MACROCÍCLICOS

<130> 35224-707.601

5 <140> PCT/US08/054922

<141> 2008-02-25

<150> 60/903,073

<151> 2007-02-23

<160> 99

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu

1 5 10 15

Asn Asn Val

20 <210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

25 Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly

1 5 10 15

Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro

20 25

<210> 3

30 <211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly

1 5 10 15

Asp Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg

5 20 25

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 4

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser

1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys

20 25

15 <210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

20 Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala

1 5 10 15

Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg

20 25

<210> 6

25 <211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly

30 1 5 10 15

Asp Glu Leu His Gln Arg Thr Met

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 7

Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ile Gly Asp

1 5 10 15

Lys Val Tyr Cys Thr Trp

20

10 <210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

15 Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Cys Ala Gln Leu Arg Arg Ile Gly

1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu

20 25

<210> 9

20 <211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala

25 1 5 10 15

Asp Gln Phe His Arg Leu His Thr

20

<210> 10

<211> 22

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp
1 5 10 15
Glu Leu His Gln Arg Thr
20
5 <210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
10 Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly
1 5 10 15
Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala
20 25
<210> 12
15 <211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Glu Ser Ile Leu Lys Lys Asn Ser
20 1 5 10 15
Asp Trp Ile Trp Asp Trp Ser Ser
20
<210> 13
<211> 22
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13
Gly Arg Leu Ala Glu Val Cys Ala Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu
1 5 10 15
30 Leu Glu Met Ile Arg Pro
20
<210> 14

<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

5 Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly
1 5 10 15
Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
20 25
<210> 15

10 <211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly
15 1 5 10 15
Asp Asp Ile Asn Arg Arg
20
<210> 16
<211> 14

20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
1 5 10
25 <210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17

30 Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly
1 5 10 15
Asp Asp Phe Ser Arg Arg

20

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr

10 20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 19

Pro Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala Gly Asp Glu Phe

1 5 10 15

Glu Thr Arg Phe

20

20 <210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

25 Ala Thr Ser Arg Lys Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val

1 5 10 15

Gln Arg Asn His Glu Thr Ala

20

<210> 21

30 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Ala Glu Val Cys Thr Val Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ile Arg

5

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 22

Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly His Glu Asn Gly Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Asp Pro

15 <210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

20 Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ala Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Trp Val Ser Asp Trp Ser

20

<210> 24

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Met Lys Leu

20

<210> 25
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Cross linked amino acid residue
 <220>
10 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Cross linked amino acid residue
 <400> 25
 Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly
15 1 5 10 15
 Asp Xaa Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro
 20 25
 <210> 26
 <211> 25
20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
25 <223> Cross linked amino acid residue
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Cross linked amino acid residue
30 <400> 26
 Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Xaa Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Xaa Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg

20 25

<210> 27

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

10 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <400> 27

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Xaa Met Ser

1 5 10 15

Asp Xaa Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys

20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

25 30 <222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 28

Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Xaa Met Ala

1 5 10 15

Asp Xaa Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg

20 25

5 <210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 29

Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Xaa Leu Gly

1 5 10 15

20 Asp Xaa Leu His Gln Arg Thr Met

20

<210> 30

<211> 22

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 30

Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Ala Ala Gln Leu Arg Xaa Ile Gly Asp
1 5 10 15

5 Xaa Val Tyr Cys Thr Trp
20

<210> 31
<211> 25
<212> PRT

10 <213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 31

20 Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Cys Ala Gln Leu Arg Xaa Ile Gly
1 5 10 15

Asp Xaa Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu
20 25

<210> 32
25 <211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES

30 <222> (14)..(14)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

<221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
 <400> 32

5 Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Xaa Ile Ala
 1 5 10 15
 Asp Xaa Phe His Arg Leu His Thr
 20

<210> 33

10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> MOD_RES

15 <222> (13)..(13)
 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)

20 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
 <400> 33

Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Ala Ala Arg Leu Lys Xaa Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Xaa Leu His Gln Arg Thr

25 20

<210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)

5 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 34

Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Ala Leu Arg Leu Ala Xaa Ile Gly
1 5 10 15

Asp Xaa Met Asp Val Ser Leu Arg Ala

10 20 25

<210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

20 <221> MOD_RES
<222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 35

Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Glu Ser Ile Leu Lys Xaa Asn Ser

25 1 5 10 15

Asp Xaa Ile Trp Asp Trp Ser Ser

20

<210> 36
<211> 22

30 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

5 <221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 36
Gly Arg Leu Ala Glu Val Cys Ala Val Leu Leu Xaa Leu Gly Asp Xaa
10 1 5 10 15
Leu Glu Met Ile Arg Pro
20
<210> 37
<211> 25
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
20 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Cross linked amino acid residue
25 <400> 37
Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Ser Glu Cys Leu Lys Xaa Ile Gly
1 5 10 15
Asp Xaa Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
20 25
30 <210> 38
<211> 22
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
5 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
10 <400> 38
Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Xaa Ile Gly
1 5 10 15
Asp Xaa Ile Asn Arg Arg
20
15 <210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
25 <222> (10)..(10)
<223> Cross linked amino acid residue
<400> 39
Lys Gln Ala Leu Arg Xaa Ala Gly Asp Xaa Phe Glu Leu Arg
1 5 10
30 <210> 40
<211> 22
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
5 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
10 <400> 40
Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Ala Leu Arg Xaa Ala Gly
1 5 10 15
Asp Xaa Phe Ser Arg Arg
20
15 <210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
25 <222> (18)..(18)
<223> Cross linked amino acid residue
<400> 41
Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Xaa Ala Gly
1 5 10 15
30 Asp Xaa Phe Glu Leu Arg Tyr
20
<210> 42

<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
5 <221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (15)..(15)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 42
Pro Ala Asp Pro Leu His Gln Ala Met Arg Xaa Ala Gly Asp Xaa Phe
1 5 10 15
15 Glu Thr Arg Phe
20
<210> 43
<211> 23
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 43
30 Ala Thr Ser Arg Lys Leu Glu Thr Leu Arg Xaa Val Gly Asp Xaa Val
1 5 10 15
Gln Arg Asn His Glu Thr Ala

20
<210> 44
<211> 19
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 44
15 Leu Ala Glu Val Cys Thr Val Val Leu Leu Xaa Leu Gly Asp Xaa Leu Glu
1 5 10 15
Gln Ile Arg

<210> 45
20 <211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
25 <222> (12)..(12)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
30 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 45
Met Thr Val Gly Glu Leu Ser Arg Ala Leu Gly Xaa Glu Asn Gly Xaa

<400> 47

Ser Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Xaa Gln Gly Asp Xaa

1 5 10 15

Arg Met Lys Leu

5 20

<210> 48

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 48

Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Xaa Arg His Leu Xaa Gln Val Gly

20 1 5 10 15

Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro

20 25

<210> 49

<211> 25

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

30 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 49

Asp Asn Arg Pro Glu Ile Trp Ile Xaa Gln Glu Leu Xaa Arg Ile Gly

5 1 5 10 15

Asp Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg

20 25

<210> 50

<211> 25

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

15 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

20 <400> 50

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Xaa Arg Glu Leu Xaa Arg Met Ser

1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys

20 25

25 <210> 51

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

30 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

5 <400> 51

Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Xaa Ala Gln Leu Xaa Arg Met Ala

1 5 10 15

Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg

20 25

10 <210> 52

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 52

Arg Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Xaa Ala Arg Leu Xaa Ala Leu Gly

1 5 10 15

25 Asp Glu Leu His Gln Arg Thr Met

20

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (12)..(12)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 53

Ala Glu Leu Pro Pro Glu Phe Xaa Ala Gln Leu Xaa Lys Ile Gly Asp

1 5 10 15

10 Lys Val Tyr Cys Thr Trp

20

<210> 54

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Residuo de aminoácido reticulado

<400> 54

25 Val Pro Ala Asp Leu Lys Asp Glu Xaa Ala Gln Leu Xaa Arg Ile Gly

1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Leu Arg Gln Lys Leu

20 25

<210> 55

30 <211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 55

10 Gln His Arg Ala Glu Val Gln Ile Xaa Arg Lys Leu Xaa Cys Ile Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Gln Phe His Arg Leu His Thr

20

<210> 56

15 <211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (8)..(8)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

25 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 56

Ser Ser Ala Ala Gln Leu Thr Xaa Ala Arg Leu Xaa Ala Leu Gly Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Leu His Gln Arg Thr

30 20

<210> 57

<211> 25

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (9)..(9)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
10 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 57
Cys Met Glu Gly Ser Asp Ala Leu Xaa Leu Arg Leu Xaa Cys Ile Gly
1 5 10 15
Asp Glu Met Asp Val Ser Leu Arg Ala
15 20 25
<210> 58
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 58
Asp Ile Glu Arg Arg Lys Glu Val Xaa Ser Ile Leu Xaa Lys Asn Ser
30 1 5 10 15
Asp Trp Ile Trp Asp Trp Ser Ser

<210> 59
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

10 <221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 59
Gly Arg Leu Ala Glu Val Xaa Ala Val Leu Xaa Arg Leu Gly Asp Glu

15	1	5	10	15
----	---	---	----	----

Leu Glu Met Ile Arg Pro
20
<210> 60
<211> 25

20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

25 <221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado

30 <400> 60
Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Xaa Glu Cys Leu Xaa Arg Ile Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu
20 25

<210> 61
<211> 22

5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)

10 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <400> 61
Pro Ser Ser Thr Met Gly Gln Val Xaa Arg Gln Leu Xaa Ile Ile Gly
1 5 10 15
Asp Asp Ile Asn Arg Arg
20
20 <210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (5)..(5)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 62

Xaa Gln Ala Leu Xaa Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 63
<211> 22

5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)

10 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <400> 63
Leu Ser Pro Pro Val Val His Leu Xaa Leu Ala Leu Xaa Gln Ala Gly
1 5 10 15
Asp Asp Phe Ser Arg Arg
20
20 <210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 64

Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Xaa Gln Ala Leu Xaa Glu Ala Gly

1 5 10 15

- Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr

20

5 <210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (10)..(10)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 65

Pro Ala Asp Pro Leu Xaa Gln Ala Met Xaa Ala Ala Gly Asp Glu Phe

1 5 10 15

20 Glu Thr Arg Phe

20

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 66

Ala Thr Ser Arg Lys Xaa Glu Thr Leu Xaa Arg Val Gly Asp Gly Val

1 5 10 15

5 Gln Arg Asn His Glu Thr Ala

20

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 67

20 Leu Ala Glu Val Xaa Thr Val Leu Xaa Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu

1 5 10 15

Gln Ile Arg

<210> 68

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (7)..(7)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 68

5 Met Thr Val Gly Glu Leu Xaa Arg Ala Leu Xaa His Glu Asn Gly Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Asp Pro

<210> 69

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (8)..(8)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

20 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 69

Val Val Glu Gly Glu Lys Glu Xaa Glu Ala Leu Xaa Lys Ser Ala Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Trp Val Ser Asp Trp Ser

25 20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Residuo de aminoácido reticulado
<220>
- <221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

5 <223> Residuo de aminoácido reticulado
<400> 70
Ser Met Ala Arg Asp Pro Xaa Arg Tyr Leu Xaa Ile Gln Gly Asp Asp
1 5 10 15
Arg Met Lys Leu
10 20
<210> 71
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 71
Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15
<210> 72
• <211> 19
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72
Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro
1 5 10 15
25 Glu Asn Asn

<210> 73
<211> 19
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<400> 73
Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Ser

1	5	10	15
Glu Asn Asn			
<210> 74			
5	<211> 30		
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 74			
Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu			
10	1	5	10
Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro			
20 25 30			
<210> 75			
<211> 30			
15	<212> PRT		
<213> Homo sapiens			
<400> 75			
Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu			
	1	5	10
20	Trp Lys Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro		15
20 25 30			
<210> 76			
<211> 16			
<212> PRT			
25	<213> Homo sapiens		
<220>			
<221> MOD_RES			
<222> (1)..(1)			
<223> Residuo de aminoácido reticulado			
30	<220>		
<221> MOD_RES			
<222> (5)..(5)			

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 76

Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn

1 5 10 15

5 <210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (7)..(7)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 77

Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro

1 5 10 15

20 Glu Asn Asn

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 78

• Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Ser

1 5 10 15

5 Glu Asn Asn

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 79

20 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu

1 5 10 15

Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro

 20 25 30

<210> 80

25 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (8)..(8)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 80

5 Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Xaa Ser Gln Glu Xaa Phe Ser Asp Leu
1 5 10 15
Trp Lys Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
20 25 30

<210> 81

10 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (11)..(11)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)

20 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 81
Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Pro Xaa Asn
1 5 10 15
<210> 82

25 <211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (13)..(13)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

• <221> MOD_RES
 • <222> (17)..(17)
 • • <223> Resíduo de aminoácido reticulado
 . • <400> 82
5 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Xaa Asn Asn

 <210> 83
10 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD_RES
15 <222> (13)..(13)
 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
20 <223> Residuo de aminoácido reticulado
 <400> 83
 Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Xaa Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Xaa Asn Asn
25
 <210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
•
• <220>
• <221> MOD_RES
• <222> (22)..(22)

5 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 84
Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
1 5 10 15
Trp Xaa Leu Leu Pro Xaa Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
10 20 25 30
<210> 85
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>

20 <221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 85
Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu
25 1 5 10 15
Trp Xaa Leu Leu Ser Xaa Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro
20 25 30
<210> 86
<211> 8

30 <212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<400> 86

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

5 <210> 87

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

10 <223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<400> 87

Glu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met

1 5 10

<210> 88

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

20 <400> 88

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5

<210> 89

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<400> 89

30 Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg

1 5 10

<210> 90

<211> 10
•
<212> PRT
•
<213> Seqüência Artificial
<220>
5 <223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético
<400> 90
Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg
1 5 10
<210> 91
10 <211> 13
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético
15 <400> 91
Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5 10
<210> 92
<211> 8
20 <212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético
<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (5)..(5)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 92

Asp Arg Xaa Tyr Xaa His Pro Phe

1 5

<210> 93

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (14)..(14)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

<400> 93

Glu Gln Arg Leu Gly Asn Xaa Trp Ala Val Gly His Leu Xaa

1 5 10

20 <210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

25 <223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 94

- Arg Pro Pro Xaa Phe Ser Pro Phe Arg Xaa

1 5 10

5 <210> 95

 <211> 11

 <212> PRT

 <213> Seqüência Artificial

 <220>

10 <223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

 <220>

 <221> MOD_RES

 <222> (7)..(7)

 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

15 <220>

 <221> MOD_RES

 <222> (11)..(11)

 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

 <400> 95

20 Ile Ser His Lys Asp Met Xaa Leu Gly Arg Xaa

 1 5 10

 <210> 96

 <211> 11

 <212> PRT

25 <213> Seqüência Artificial

 <220>

 <223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

 <220>

 <221> MOD_RES

30 <222> (7)..(7)

 <223> Resíduo de aminoácido reticulado

 <220>

<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
- <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 96

5 Ala Arg Ala Ser His Leu Xaa Leu Ala Arg Xaa
1 5 10
<210> 97
<211> 13
<212> PRT

10 <213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético
<220>
<221> MOD_RES

15 <222> (5)..(5)
<223> Resíduo de aminoácido reticulado
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)

20 <223> Resíduo de aminoácido reticulado
<400> 97
Ser Tyr Ser Met Xaa His Phe Arg Trp Xaa Lys Pro Val
1 5 10
<210> 98

25 <211> 21
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

30 <400> 98
Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser
1 5 10 15

Met Asp Arg Ser Ile

20

<210> 99

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Peptídeo sintético

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> aminoácido desconhecido

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (16)..(16)

<223> aminoácido desconhecido

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Nle

<400> 99

Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Xaa Val Gly Asp Xaa

1

5

10

15

Xaa Asp Arg Ser Ile

25

20