



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 027**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99924431 .2**

(96) Fecha de presentación : **21.05.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1079859**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2001**

(54) Título: **Moléculas bifuncionales y terapias basadas en las mismas.**

(30) Prioridad: **22.05.1998 US 86451 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2010

(73) Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland
Stanford Junior University
Suite 350, 900 Welch Road
Palo Alto, California 94304, US**

(72) Inventor/es: **Briesewitz, Roger;
Crabtree, Gerald, R.;
Wandless, Thomas;
Ray, Gregory, Thomas y
Vogel, Kurt, William**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 347 027 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas bifuncionales y terapias basadas en las mismas.

5 Admisión

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos con el N° de concesión CA39612 otorgada por National Institutes of Health. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

10 Introducción

Campo técnico

15 El campo de esta invención es la farmacología.

Antecedentes de la invención

20 Cualquier agente químico que afecte a cualquier proceso de la vida es un fármaco. Los fármacos son una herramienta crítica para los facultativos de asistencia sanitaria, ya que se usarán en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. A causa de su criticidad para la profesión de asistencia sanitaria, la inversión mundial anual en la investigación y desarrollo de nuevos agentes químicos con potencial terapéutico alcanza hasta billones de dólares. Como resultado, se ha desarrollado una gran cantidad de fármacos hasta la fecha y frecuentemente se descubren nuevos agentes químicos que tienen utilidad terapéutica potencial. Los agentes químicos que encuentran, o han encontrado, 25 uso como fármacos incluyen moléculas pequeñas de origen natural y sintéticas, así como moléculas más grandes, tales como compuestos proteicos.

La mayoría de los fármacos de molécula pequeña causan un efecto farmacológico uniéndose a una proteína diana y alterando la actividad farmacológica de la diana de algún modo. Para un fármaco de molécula pequeña dado, es deseable que el fármaco tenga al menos uno de elevada afinidad y especificidad por su diana. Si una molécula pequeña 30 tiene elevada afinidad por su diana, se caracteriza porque tiene buena unión a su diana. Si una molécula pequeña tiene especificidad por su diana, se caracteriza porque tiene afinidad diferencial entre su diana y otras proteínas no diana. Además de presentar elevada afinidad y/o especificidad, una molécula pequeña dada debe ser selectiva con respecto a la célula o tejido en que afecta a una actividad biológica. La selectividad asegurará que la diana del fármaco estará 35 afectada por el fármaco solamente en las células implicadas en la patología.

Exploraciones de fármacos de molécula pequeña raramente identifican ligandos de elevada afinidad, ligandos de baja afinidad con elevada especificidad o ligandos selectivos. Mucho más a menudo, se identifican compuestos que 40 tienen actividad biológica pero afinidad relativamente baja y baja especificidad por sus dianas. Además, los compuestos identificados habitualmente carecen de selectividad por sus dianas con respecto al tipo celular o tisular. A causa de esta baja afinidad, especificidad, o selectividad o combinación de las mismas, estos ligandos identificados nunca encuentran uso clínico.

Por tanto, sería de gran interés para la industria farmacéutica y los campos relacionados el desarrollo de un método para aumentar al menos uno de la afinidad, especificidad y selectividad de estos agentes biológicamente activos 45 previamente identificados, de modo que agentes que de otro modo carecen de suficiente afinidad y/o especificidad a pesar de todo puedan encontrar utilidad clínica.

50 Bibliografía relevante

Las publicaciones de patente de interés incluyen: WO 91/01743; WO 94/18317; WO 95/02684; WO 95/10302; WO 96/06111; WO 96/12796; WO 96/13613; WO 97/25074; WO 97/29372; WO 98/11437; WO 98/47916; patente de Estados Unidos N° 5.830.462; patente de Estados Unidos N° 5.843.440; y patente de Estados Unidos N° 5.871.753. Las 55 referencias de interés incluyen: Briesewitz *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (marzo de 1999) 96: 1953-1958; Clardy, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (marzo de 1999) 1826-1827; Crabtree & Schreiber, Elsevier Trends Journal (noviembre de 1996) 418-422; Spencer *et al.*, Curr. Biol. (julio de 1996) 6:839-847; Spencer *et al.*, Science (1993) 262: 1019; Chakraborty *et al.*, Chem. & Biol. (marzo de 1995) 2:157-161; Ho *et al.*, Nature (1996) 382: 822; Riviera *et al.*, Nature Medicine (1996) 2: 1028; Klemm *et al.*, Current Biology (1997) 7: 638; Belshaw *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1996) 93: 4604; Livnah *et al.*, Science (1996) 273: 464; Johnson *et al.*, Chemistry y Biology, (1997) 4: 939; Garboczi *et al.*, Nature (1996) 384:134; Kissenger *et al.*, Nature (1995) 378:641; Griffith *et al.*, Cell (1995) 82: 507; Choi *et al.*, Science (1996) 273:239. También son de interés Kramer *et al.*, J. Biol. Chem. (1992) 267:18598-18604; y Varshavsky, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (marzo de 1998) 95: 2094-2099; Varshavsky, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (abril de 1995) 92:3663-3667; y Mu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. (1999) 255:75-79. Brochu *et al.* 65 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992, 36:2166-2175) describe dos conjugados de un sideróforo y una b-lactama cuya actividad inhibidora contra *E. coli* X580 se estudió.

Sumario de la invención

Se proporcionan moléculas bifuncionales capaces de producir al menos un complejo binario con una proteína presentadora endógena hospedadora. En los presentes métodos, se sintetiza una molécula bifuncional uniendo covalentemente un ligando de proteína presentadora endógeno con un resto de fármaco, directamente o a través de un grupo de unión. Se administra una cantidad eficaz de una molécula bifuncional al hospedador, donde la molécula bifuncional se une a la proteína presentadora endógena para producir el complejo binario. El complejo binario resultante modula (por ejemplo, agranda) el área superficial de unión a la diana del resto de fármaco, es decir, el área superficial disponible para la unión con la diana, de un modo tal que se observe al menos uno de afinidad, especificidad o selectividad potenciada en comparación con la observada con el fármaco libre.

En una realización en la que el complejo binario provoca una afinidad potenciada, se produce un complejo tripartito en el que están presentes interacciones de unión entre el presentador y la diana así como el resto de fármaco y la diana. En una segunda realización en la que el complejo binario provoca una especificidad potenciada, el suministro del fármaco como molécula bifuncional provoca una afinidad diferencial con respecto a sus dianas potenciales de modo que el resto de fármaco se une más a su diana deseable que a sus dianas no deseables en comparación con una situación de control de fármaco libre, por ejemplo, cuando los complejos tripartitos producidos entre el complejo binario y las dianas no deseadas se caracterizan por la presencia de interacciones no favorables mientras que los complejos tripartitos producidos entre el complejo binario y la diana deseada se caracterizan por la presencia de ninguna interacción, interacciones neutras o interacciones favorables. En una tercera realización en la que el complejo binario provoca una selectividad potenciada, los complejos tripartitos producidos con dianas no deseadas en un primer tipo celular o tisular se caracterizan por la presencia de interacciones no favorables mientras que la molécula bifuncional afecta a la diana deseada en un segundo tipo celular o tisular, por ejemplo, un segundo tipo de célula o tejido en el mismo organismo o un microorganismo en un organismo hospedador, sin la formación de un complejo binario entre la molécula bifuncional y una proteína presentadora debido a la ausencia de la proteína presentadora.

Los presentes métodos y composiciones encuentran uso en una diversidad de aplicaciones terapéuticas.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a moléculas bifuncionales de origen no natural de menos de aproximadamente 5000 dalton que constan de un resto de fármaco y un ligando de proteína presentadora, donde dicho resto de fármaco se une a una diana del fármaco y dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína presentadora que no es dicha diana de fármaco, donde dicho resto de fármaco y dicho ligando de proteína presentadora se unen opcionalmente por un grupo de unión y dicho resto de fármaco muestra al menos uno de afinidad, especificidad o selectividad potenciada por su diana en comparación con un control de fármaco libre cuando dicha molécula se une simultáneamente a la diana y la proteína presentadora.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una ilustración del concepto general de la presente invención.

La Figura 2 proporciona las estructuras de FKpYEEI y SLFpYEEI.

La Figura 3 proporciona una representación de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI y FKpYEEI más FKBP52.

La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI y FKpYEEI más FKBP52.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI, FKpYEEI más FKBP52 y FKpYEEI más FKBP52 más FK506.

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI a diversas concentraciones de pYEEI y FKpYEEI en presencia y ausencia de FKBP52.

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI y FKpYEEI más FKBP12.

La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 PLCg a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI y FKpYEEI más FKBP12.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 PLCg a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI, FKpYEEI más FKBP12 y FKpYEEI más FKBP12 más FK506.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva de los dominios SH2 Fyn, Lck y PLCg a perlas pYEEI en presencia de FKpYEEI, FKpYEEI más FKBP12 y FKpYEEI más FKBP12 más FK506.

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn en presencia de SLFpYEEI y SLFpYEEI más FKBP12.

La Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI en presencia de SLFPYEEI, SLFPYEEI más FKBP12 y SLFPYEEI más FKBP12 más FK506.

La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI a concentraciones crecientes de SLFPYEEI en presencia y ausencia de FKBP12.

La Figura 14 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva de los dominios SH2 Fyn, Lck y PLCg en presencia de SLFPYEEI, SLFPYEEI más FKBP12 y SLFPYEEI más FKBP12 más FK506.

Definiciones

El término “afinidad” se refiere a la naturaleza de la unión de una primera molécula con una segunda molécula, por ejemplo un resto de fármaco a su diana, un ligando de proteína presentadora a su proteína presentadora, etc. En otras palabras, afinidad se usa para describir cómo de fuerte se une una primera molécula a una segunda molécula. La afinidad de una molécula bifuncional de la presente invención por su diana y su proteína presentadora puede determinarse fácilmente por ensayos de unión competitiva o métodos termodinámicos, como se describe en la sección experimental *infra*.

La expresión “molécula bifuncional” se refiere a una molécula de origen no natural que incluye un ligando de proteína presentadora y un resto de fármaco, donde estos dos componentes pueden unirse covalentemente entre sí directamente o a través de un grupo de unión.

La expresión “complejo binario” se refiere a un complejo que está compuesto por una molécula bifuncional y su proteína presentadora correspondiente, es decir, el complejo que se produce por la unión del ligando de proteína presentadora de la molécula bifuncional a la proteína presentadora.

El término “fármaco” se refiere a cualquier agente activo que afecta a cualquier proceso biológico. Los agentes activos que se consideran fármacos para los propósitos de esta solicitud son agentes que muestran una actividad farmacológica. Los ejemplos de fármacos incluyen agentes activos que se usan en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de una patología.

Por “actividad farmacológica” se entiende una actividad que modula o altera un proceso biológico para provocar un cambio fenotípico, por ejemplo, muerte celular, proliferación celular etc.

El término “especificidad” se usa para describir el perfil de afinidad de un fármaco con respecto a sus dianas potenciales, es decir, caracteriza la afinidad diferencial de un fármaco por sus dianas potenciales. La especificidad de un fármaco puede averiguarse fácilmente determinando la afinidad de un fármaco por cada una de sus dianas potenciales (es decir, cómo de bien se une el fármaco a cada una de sus dianas potenciales) y comparando las afinidades observadas para obtener un perfil de afinidad del fármaco.

El término “selectividad” se usa para caracterizar el perfil de actividad de un agente activo con respecto a dos o más tipos celulares diferentes. En otras palabras, la selectividad describe colectivamente la actividad comparativa de un fármaco en dos o más tipos diferentes de células.

La expresión “complejo tripartito” se refiere a un complejo que está compuesto por una diana de fármaco, una molécula bifuncional y una proteína presentadora.

Descripción de las realizaciones específicas

Se proporcionan moléculas bifuncionales, métodos de síntesis y exploración, y métodos para su uso en la producción de al menos complejos binarios en un hospedador. Las moléculas bifuncionales tienen un resto de fármaco unido covalentemente a un ligando de proteína presentadora, directamente o a través de un grupo de unión. En los presentes métodos, se administra una cantidad eficaz de la molécula bifuncional al hospedador. Después de la administración, la molécula bifuncional se une a la proteína presentadora para producir el complejo binario. El complejo binario tiene un área superficial de unión a la diana agrandada en comparación con el fármaco libre de modo que se observe al menos uno de afinidad, especificidad o selectividad potenciada en comparación con el fármaco libre. En una primera realización en la que se observa afinidad aumentada, el complejo binario se une a la diana para formar un complejo tripartito caracterizado por la presencia de interacciones de unión presentador-diana así como interacciones de unión fármaco-diana. Los presentes métodos y composiciones encuentran uso en una diversidad de aplicaciones terapéuticas. Para describir adicionalmente la presente invención, se describirán primero las moléculas bifuncionales y los métodos para su producción, seguido de un análisis de aplicaciones en que encuentran uso las moléculas bifuncionales.

Antes de describir adicionalmente la presente invención, tiene que entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones particulares de la invención descrita a continuación, ya que pueden hacerse variaciones de realizaciones particulares y aún estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. También tiene que entenderse que la terminología empleada es para el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante. En lugar de eso, el alcance de la presente invención se establecerá por las reivindicaciones adjuntas.

En esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención.

Aunque sin el deseo de limitarse por ninguna teoría particular, la presente invención proporciona un medio para mejorar al menos uno de la afinidad o especificidad o selectividad de un fármaco de molécula pequeña por su diana deseada agrandando el área superficial de unión a la diana del resto de fármaco en comparación con el fármaco libre. La afinidad, especificidad o selectividad potenciada del fármaco se consigue presentándolo a su diana de fármaco como un complejo binario compuesto por una molécula bifuncional del fármaco y el ligando de proteína presentadora unido a una proteína presentadora. Las interacciones entre la proteína presentadora y la diana de fármaco, tales como interacciones favorables, interacciones neutras o interacciones de repulsión, en combinación con interacciones entre el resto de fármaco y su diana, provocan una modulación del perfil de unión global del resto de fármaco por sus diversas dianas, en comparación con un control de fármaco libre. Por tanto, administrando un fármaco de molécula pequeña como una molécula bifuncional de acuerdo con la presente invención, pueden conseguirse resultados mejorados en comparación con los resultados que se pueden obtener por la administración del fármaco de molécula pequeña por sí mismo. Véase la Fig. 1.

Molécula bifuncional

Un elemento crítico de la presente invención es la molécula bifuncional. La molécula bifuncional es un compuesto de origen no natural o sintético. La molécula bifuncional se caracteriza adicionalmente porque el ligando de proteína presentadora y el resto de fármaco son diferentes, de modo que la molécula bifuncional pueda verse como un compuesto heterodimérico producido por la unión de dos restos diferentes. En muchas realizaciones, el ligando de proteína presentadora y el resto de fármaco se eligen de modo que la diana de fármaco correspondiente y la proteína presentadora no se asocien de forma natural entre sí para producir un efecto biológico. Las moléculas bifuncionales son capaces de unirse simultáneamente a dos compuestos distintos, es decir, una diana y una proteína presentadora, para formar un complejo tripartito. La molécula bifuncional tiene un resto de fármaco unido a un ligando para una proteína presentadora, directamente o a través de un grupo de unión. El peso molecular de la molécula bifuncional es generalmente de al menos aproximadamente 100 D, habitualmente de al menos aproximadamente 400 D y más habitualmente de al menos aproximadamente 500 D, y puede ser tan grande como 2000 D o mayor, pero no excede de aproximadamente 5000 D.

La molécula bifuncional se caracteriza adicionalmente porque el resto de fármaco tiene actividad mejorada en comparación con el fármaco libre. Por actividad mejorada se entiende que el resto de fármaco tiene un efecto más deseable con respecto a la afección que se está tratando, en comparación con el fármaco libre correspondiente del que deriva el resto de fármaco de la molécula bifuncional. En muchas realizaciones, la molécula bifuncional se caracteriza porque tiene afinidad mejorada por su diana en comparación con su fármaco correspondiente, es decir, un control. La magnitud de la afinidad y/o especificidad potenciada será al menos aproximadamente 2 veces, habitualmente al menos aproximadamente 5 veces y en muchas realizaciones al menos 10 veces. En muchas realizaciones, la afinidad de la molécula bifuncional por su diana será al menos aproximadamente 10⁻⁴ M, habitualmente al menos aproximadamente 10⁻⁶ M. Además y/o como alternativa, la molécula bifuncional muestra especificidad mejorada por su diana en comparación con un control de fármaco libre. Además y/o como alternativa, la molécula bifuncional muestra selectividad mejorada por su diana en comparación con un control de fármaco libre.

Las moléculas bifuncionales generalmente se describen por la fórmula:



en la que

X es un resto de fármaco;

L es un enlace o grupo de unión; y

Z es un ligando para una proteína presentadora endógena; con la condición de que X y Z sean diferentes.

Resto de fármaco: X

El resto de fármaco X puede ser cualquier molécula, así como una parte de unión o fragmento de la misma, que sea capaz de modular un proceso biológico en un hospedador vivo, por sí misma o en el contexto del complejo binario proteína presentadora/molécula bifuncional. Generalmente, X es una molécula orgánica pequeña que es capaz de unirse a la diana de interés. Como el resto de fármaco de la molécula bifuncional es una molécula pequeña, generalmente tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 50 D, habitualmente de al menos aproximadamente 100 D, donde el peso molecular puede ser tan elevado como 500 D o mayor, pero habitualmente no excederá de aproximadamente 2000 D.

El resto de fármaco es capaz de interactuar con una diana en el hospedador en el que se administra la molécula bifuncional durante la práctica de los presentes métodos. La diana puede ser de varios tipos diferentes de estructuras de origen natural, donde las dianas de interés incluyen dianas tanto intracelulares como extracelulares, donde dichas dianas pueden ser proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y similares, donde las proteínas son de particular interés. Las dianas proteicas específicas de interés incluyen, sin limitación, enzimas, por ejemplo quinasas, fosfatasa, reductasas, ciclooxigenasas, proteasas y similares, comprendiendo las dianas dominios implicados en interacciones proteína-proteína, tales como los dominios SH2, SH3, PTB y PDZ, proteínas estructurales, por ejemplo, actina, tubulina, etc., receptores de membrana, inmunoglobulinas, por ejemplo, IgE, receptores de adhesión celular, tales como integrinas, etc., canales de iones, bombas transmembrana, factores de transcripción, proteínas de señalización, y similares.

El resto de fármaco del compuesto bifuncional incluirá uno o más grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con la diana, por ejemplo, grupos necesarios para interacciones hidrófobas, hidrófilas, electrostáticas o incluso covalentes, dependiendo del fármaco particular y su diana pretendida. Cuando la diana es una proteína, el resto de fármaco incluirá grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas-hidrófilas, interacciones electrostáticas, etc., y típicamente incluirán al menos un grupo amina, amida, sulfhidrilo, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Como se describe en mayor detalle a continuación, el resto de fármaco también comprenderá una región que puede modificarse y/o participar en enlaces covalentes con los otros componentes de la molécula bifuncional, tal como el ligando de proteína presentadora o enlazador, sin afectar sustancialmente de forma adversa a la capacidad del resto de unirse a su diana.

Los restos de fármaco a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los anteriores grupos funcionales. También son de interés como restos de fármaco, estructuras encontradas entre biomoléculas, incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Dichos compuestos pueden explorarse para identificar aquellos de interés, donde se conoce en la técnica una diversidad de diferentes protocolos de exploración.

El resto de fármaco de la molécula bifuncional puede obtenerse de un compuesto de origen natural o sintético que puede obtenerse de una amplia diversidad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la preparación de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, se modifican fácilmente bibliotecas y compuestos naturales o producidos sintéticamente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales.

Por tanto, el resto de fármaco puede obtenerse de una biblioteca de moléculas de origen natural o sintéticas, incluyendo una biblioteca de compuestos producidos a través de medios combinatorios, es decir, una biblioteca combinatoria de diversidad de compuestos. Cuando se obtiene de dichas bibliotecas, el resto de fármaco empleado habrá demostrado alguna actividad deseable en un ensayo de exploración apropiado para la actividad. Las bibliotecas combinatorias, así como los métodos para su producción y exploración, se conocen en la técnica y se describen en los documentos: 5.741.713; 5.734.018; 5.731.423; 5.721.099; 5.708.153; 5.698.673; 5.688.997; 5.688.696; 5.684.711; 5.641.862; 5.639.603; 5.593.853; 5.574.656; 5.571.698; 5.565.324; 5.549.974; 5.545.568; 5.541.061; 5.525.735; 5.463.564; 5.440.016; 5.438.119; 5.223.409.

Los fármacos específicos de interés de los que puede obtenerse el resto de fármaco incluyen, aunque sin limitación: agentes psicofarmacológicos, tales como (1) depresores del sistema nervioso central, por ejemplo anestésicos generales (barbituratos, benzodiazepinas, esteroides, derivados de ciclohexanona, y agentes diversos), sedantes-hipnóticos (benzodiazepinas, barbituratos, piperidinadionas y trionas, derivados de quinazolina, carbamatos, aldehídos y derivados, amidas, ureidas acíclicas, benzazepinas y fármacos relacionados, fenotiazinas, etc.), fármacos modificadores del tono muscular voluntario central (anticonvulsivos, tales como hidantoínas, barbituratos, oxazolidinadionas, succinimidas, acilureidas, glutarimidias, benzodiazepinas, alcoholes secundarios y terciarios, derivados de dibenzazepina, ácido valproico y derivados, análogos GABA, etc.), analgésicos (morfina y derivados, derivados de oripavina, derivados de morfina, fenilpiperidinas, derivados de 2,6-metano-3-benzazocaina, difenilpropilaminas e isómeros, salicilatos, derivados de p-aminofenol, derivados de 5-pirazolona, derivados de ácido arilacético, fenamatos e isómeros, etc.) y antieméticos (anticolinérgicos, antihistaminas, antidopaminérgicos, etc.), (2) estimulantes del sistema nervioso central, por ejemplo, analépticos (estimulantes respiratorios, estimulantes convulsivos, estimulantes psicomotores), antagonistas narcótico (derivados de morfina, derivados de oripavina, derivados de 2,6-metano-3-benzoxacina, derivados de morfina), nootrópicos, (3) psicofarmacológicos, por ejemplo, sedantes ansiolíticos (benzodiazepinas, carbamatos de propanodiol), antipsicóticos (derivados de fenotiazina, derivados de tioxantina, otros compuestos tricíclicos, derivados de butirofenona e isómeros, derivados de difenilbutilamina, benzamidas sustituidas, derivados de arilpiperazina, derivados de indol, etc.), antidepresivos (compuestos tricíclicos, inhibidores de la MAO, etc.), (4) fármacos del tracto respiratorio, por ejemplo, antitusivos centrales (alcaloides de opio y sus derivados);

agentes farmacodinámicos, tales como (1) fármacos del sistema nervioso periférico, por ejemplo, anestésicos locales (derivados de éster, derivados de amida), (2) fármacos que actúan en sitios de unión sináptica o neuroefectora, por ejemplo, agentes colinérgicos, agentes de bloqueo colinérgico, agentes de bloqueo neuromuscular, agentes adrenérgicos, agentes antiadrenérgicos, (3) fármacos activos en el músculo liso, por ejemplo, espasmolíticos (anticolinérgicos, espasmolíticos musculotrópicos), vasodilatadores, estimulantes del músculo liso, (4) histaminas y antihistaminas, por ejemplo, histamina y derivados de la misma (betazol), antihistaminas (antagonistas H1, antagonistas H2), fármacos del metabolismo de histamina, (5) fármacos cardiovasculares, por ejemplo cardiotónicos (extractos vegetales, butenolidas, pentadienolidas, alcaloides de especies *erythrophleum*, ionóforos, estimulantes de adrenoceptores, etc.), fármacos antiarrítmicos, agentes antihipertensivos, agentes antilipídicos (derivados de ácido clofíbrico, derivados de ácido nicotínico, hormonas y análogos, antibióticos, ácido salicílico y derivados), fármacos antivaricosos, hemostáticos, (6) fármacos del sistema sanguíneo y hemopoyético, por ejemplo, fármacos antianemia, fármacos para la coagulación de la sangre (hemostáticos, anticoagulantes, antitrombóticos, trombolíticos, proteínas sanguíneas y sus fracciones), (7) fármacos del tracto gastrointestinal, por ejemplo, digestivos (estomáticos, coleréticos), fármacos antiúlceras, agentes antidiarreicos, (8) fármacos de acción local;

agentes quimioterapéuticos, tales como (1) agentes anti-infecciosos, por ejemplo ectoparasiticidas (hidrocarburos clorados, piretinas, compuestos sulfurados), antihelmínticos, agentes antiprotozoarios, agentes antimalaria, agentes antiamébicos, fármacos antileishmania, agentes antitricomonas, agentes antitripanosómicos, sulfonamidas, fármacos antimicobacterianos, quimioterapéuticos antivirales, etc., y (2) citostáticos, es decir, agentes antineoplásicos o fármacos citotóxicos, tales como agentes alquilantes, por ejemplo, clorhidrato mecloretamina (mostaza de nitrógeno, Mustargen, HN2), Ciclofosfamida (Cytovan, Endoxana), Ifosfamida (IFEX), Clorambucilo (Leukeran), Melfalán (mostaza de fenilalanina, L-sarcosina, Alkeran, L-PAM), Busulfán (Myleran), Tiotepa (trietilenotiofosforamida), Carmustina (BiCNU, BCNU), Lomustina (CeeNU, CCNU), Estreptozocina (Zanosar) y similares; alcaloides vegetales, por ejemplo, Vincristina (Oncovin), Vinblastina (Velban, Velbe), Paclitaxel (Taxol), y similares; antimetabolitos, por ejemplo, Metotrexato (MTX), Mercaptopurina (Purinethol, 6-MP), Tioguanina (6-TG), Fluorouracilo (5-FU), Citarabina (Cytosar-U, Ara-C), Azacitidina (Mylosar, 5-AZA) y similares; antibióticos, por ejemplo, Dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegen), Doxorubicina (Adriamicina), Daunorubicina (duanomicina, Cerubidina), Idarubicina (Idamycin), Bleomicina (Blenoxane), Picamicina (Mitramicina, Mithracin), Mitomicina (Mutamicina) y similares, y otros agentes anti-proliferación celular, por ejemplo, Hidroxiurea (Hydrea), Procarbazona (Mitalane), Dacarbazina (DTIC-Dome), Cisplatina (Platinol), Carboplatino (Paraplatino), Asparaginasa (Elspar), Etopósido (VePesid, VP-16-213), Amsarcrina (AMSA, m-AMSA), Mitotano (Lysodren), Mitoxantrona (Novatrone), y similares;

Antibióticos, tales como: aminoglucósidos, por ejemplo amikacina, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, dihidroestreptomicina, fortimicina, gentamicina, isepamicina, kanamicina, micronomicina, neomicina, netilmicina, paromicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomicina, estreptomicina, tobramicina, trospectomicina; anfenícoles, por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol, y teimafernicol; ansamicinas, por ejemplo, rifamida, rifampina, rifamicina, rifapentina, rifaximina; b-lactamas, por ejemplo, carbacefems, carbapenems, cefalosporinas, cefamicinas, monobactamas, oxafems, penicilinas; lincosamidas, por ejemplo, clinamicina, lincomicina; macrólidos, por ejemplo, claritromicina, diritromicina, eritromicina, etc.; polipéptidos, por ejemplo, amfomicina, bacitracina, capreomicina, etc.; tetraciclinas, por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, etc.; agentes antibacterianos sintéticos, tales como 2,4-diaminopirimidinas, nitrofuranos, quinolonas y análogos de las mismas, sulfonamidas, sulfonas;

Agentes antifúngicos, tales como: polienos, por ejemplo, amfotericina B, candicidina, dermostatina, filipina, fungicromina, hachimicina, hamicina, lucensomicina, mepartricina, natamicina, nistatina, pecilocina, perimicina; antifúngicos sintéticos, tales como alilaminas, por ejemplo, butenafina, naftifina, terbinafina; imidazoles, por ejemplo, bifonazol, butoconazol, clordantoína, clormidazol, etc., tiocarbamatos, por ejemplo, tolclclato, triazoles, por ejemplo, fluconazol, itraconazol, terconazol;

Antihelmínticos, tales como: arecolina, aspidina, aspidinol, diclorofeno, embelina, kosina, naftaleno, niclosamida, peletierina, quinacrina, alantolactona, amocarcina, amoscanato, ascaridol, befenio, bitoscanato, tetracloruro de carbono, carvacrol, ciclobendazol, dietilcarbamazina, etc.;

Antimaláricos, tales como: acedapsona, amodiaquina, arteether, artemether, artemisinina, artesunato, atovaquona, bebeerina, berberina, chirata, clorguanida, cloroquina, clorprogaunilo, cinchona, cinchonidina, cinchonina, cicloguanilo, gentiopirina, halofantrina, hidroxicloquina, clorhidrato de mefloquina, 3-metilarsacetina, pamaquina, plasmo-cid, primaquina, pirimetamina, quinacrina, quinidina, quinina, quinocida, quinolina, arsenato sódico dibásico;

Agentes antiprotozoarios, tales como: acranil, tinidazol, ipronidazol, etilstibamina, pentamidina, acetarsona, aminitrozol, anisomicina, nifuratel, tinidazol, benzidazol, suramin, y similares.

Los fármacos con marca de fábrica de interés incluyen, aunque sin limitación: RezulinTM, LovastatinTM, EnalaprilTM, ProzacTM, PrilosecTM, LipitorTM, ClaritinTM, ZocorTM, CiprofloxacinaTM, ViagraTM, CrixivanTM, RitalinTM, y similares.

Los compuestos de fármaco de interés de los que pueden obtenerse los restos de fármaco también se enumeran en: Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9ª Ed) (Goodman *et al.* eds) (McGraw-Hill) (1996); y 1999 Physician's Desk Reference (1998).

ES 2 347 027 T3

- Los compuestos específicos de interés también incluyen, aunque sin limitación: agentes antineoplásicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5880161, 5877206, 5786344, 5760041, 5753668, 5698529, 5684004, 5665715, 5654484, 5624924, 5618813, 5610292, 5597831, 5530026, 5525633, 5525606, 5512678, 5508277, 5463181, 5409893, 5358952, 5318965, 5223503, 5214068, 5196424, 5109024, 5106996, 5101072, 5077404, 5071848, 5066493, 5019390, 4996229, 4996206, 4970318, 4968800, 4962114, 4927828, 4892887, 4889859, 4886790, 4882334, 4882333, 4871746, 4863955, 4849563, 4845216, 4833145, 4824955, 4785085, 476925, 4684747, 4618685, 4611066, 4550187, 4550186, 4544501, 4541956, 4532327, 4490540, 4399283, 4391982, 4383994, 4294763, 4283394, 4246411, 4214089, 4150231, 4147798, 4056673, 4029661, 4012448;
- agentes psicofarmacológicos/psicotrópicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5192799, 5036070, 4778800, 4753951, 4590180, 4690930, 4645773, 4427694, 4424202, 4440781, 5686482, 5478828, 5461062, 5387593, 5387586, 5256664, 5192799, 5120733, 5036070, 4977167, 4904663, 4788188, 4778800, 4753951, 4690930, 4645773, 4631285, 4617314, 4613600, 4590180, 4560684, 4548938, 4529727, 4459306, 4443451, 4440781, 4427694, 4424202, 4397853, 4358451, 4324787, 4314081, 4313896, 4294828, 4277476, 4267328, 4264499, 4231930, 4194009, 4188388, 4148796, 4128717, 4062858, 4031226, 4020072, 4018895, 4018779, 4013672, 3994898, 3968125, 3939152, 3928356, 3880834, 3668210;
- agentes cardiovasculares, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 4966967, 5661129, 5552411, 5332737, 5389675, 5198449, 5079247, 4966967, 4874760, 4954526, 5051423, 4888335, 4853391, 4906634, 4775757, 4727072, 4542160, 4522949, 4524151, 4525479, 4474804, 4520026, 4520026, 5869478, 5859239, 5837702, 5807889, 5731322, 5726171, 5723457, 5705523, 5696111, 5691332, 5679672, 5661129, 5654294, 5646276, 5637586, 5631251, 5612370, 5612323, 5574037, 5563170, 5552411, 5552397, 5547966, 5482925, 5457118, 5414017, 5414013, 5401758, 5393771, 5362902, 5332737, 5310731, 5260444, 5223516, 5217958, 5208245, 5202330, 5198449, 5189036, 5185362, 5140031, 5128349, 5116861, 5079247, 5070099, 5061813, 5055466, 5051423, 5036065, 5026712, 5011931, 5006542, 4981843, 4977144, 4971984, 4966967, 4959383, 4954526, 4952692, 4939137, 4906634, 4889866, 4888335, 4883872, 4883811, 4847379, 4835157, 4824831, 4780538, 4775757, 4774239, 4771047, 4769371, 4767756, 4762837, 4753946, 4752616, 4749715, 4738978, 4735962, 4734426, 4734425, 4734424, 4730052, 4727072, 4721796, 4707550, 4704382, 4703120, 4681970, 4681882, 4670560, 4670453, 4668787, 4663337, 4663336, 4661506, 4656267, 4656185, 4654357, 4654356, 4654355, 4654335, 4652578, 4652576, 4650874, 4650797, 4649139, 4647585, 4647573, 4647565, 4647561, 4645836, 4639461, 4638012, 4638011, 4632931, 4631283, 4628095, 4626548, 4614825, 4611007, 4611006, 4611005, 4609671, 4608386, 4607049, 4607048, 4595692, 4593042, 4593029, 4591603, 4588743, 4588742, 4588741, 4582854, 4575512, 4568762, 4560698, 4556739, 4556675, 4555571, 4555570, 4555523, 4550120, 4542160, 4542157, 4542156, 4542155, 4542151, 4537981, 4537904, 4536514, 4536513, 4533673, 4526901, 4526900, 4525479, 4524151, 4522949, 4521539, 4520026, 4517188, 4482562, 4474804, 4474803, 4472411, 4466979, 4463015, 4456617, 4456616, 4456615, 4418076, 4416896, 4252815, 4220594, 4190587, 4177280, 4164586, 4151297, 4145443, 4143054, 4123550, 4083968, 4076834, 4064259, 4064258, 4064257, 4058620, 4001421, 3993639, 3991057, 3982010, 3980652, 3968117, 3959296, 3951950, 3933834, 3925369, 3923818, 3898210, 3897442, 3897441, 3886157, 3883540, 3873715, 3867383, 3873715, 3867383, 3691216, 3624126;
- agentes antimicrobianos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5902594, 5874476, 5874436, 5859027, 5856320, 5854242, 5811091, 5786350, 5783177, 5773469, 5762919, 5753715, 5741526, 5709870, 5707990, 5696117, 5684042, 5683709, 5656591, 5643971, 5643950, 5610196, 5608056, 5604262, 5595742, 5576341, 5554373, 5541233, 5534546, 5534508, 5514715, 5508417, 5464832, 5428073, 5428016, 5424396, 5399553, 5391544, 5385902, 5359066, 5356803, 5354862, 5346913, 5302592, 5288693, 5266567, 5254685, 5252745, 5209930, 5196441, 5190961, 5175160, 5157051, 5096700, 5093342, 5089251, 5073570, 5061702, 5037809, 5036077, 5010109, 4970226, 4916156, 4888434, 4870093, 4855318, 4784991, 4746504, 4686221, 4599228, 4552882, 4492700, 4489098, 4489085, 4487776, 4479953, 4477448, 4474807, 4470994, 4370484, 4337199, 4311709, 4308283, 4304910, 4260634, 4233311, 4215131, 4166122, 4141981, 4130664, 4089977, 4089900, 4069341, 4055655, 4049665, 4044139, 4002775, 3991201, 3966968, 3954868, 3936393, 3917476, 3915889, 3867548, 3865748, 3867548, 3865748, 3783160, 3764676, 3764677;
- agentes anti-inflamatorios, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5872109, 5837735, 5827837, 581250, 5814648, 5780026, 5776946, 5760002, 5750543, 5741798, 5739279, 5733939, 5723481, 5716967, 5688949, 5686488, 5686471, 5686434, 5684204, 5684041, 5684031, 5684002, 5677318, 5674891, 5672620, 5665752, 5656661, 5635516, 5631283, 5622948, 5618835, 5607959, 5593980, 5593960, 5580888, 5552424, 5552422, 5516764, 5510361, 5508026, 5500417, 5498405, 5494927, 5476876, 5472973, 5470885, 5470842, 5464856, 5464849, 5462952, 5459151, 5451686, 5444043, 5436265, 5432181, RE034918, 5393756, 5380738, 5376670, 5360811, 5354768, 5348957, 5347029, 5340815, 5338753, 5324648, 5319099, 5318971, 5312821, 5302597, 5298633, 5298522, 5298498, 5290800, 5290788, 5284949, 5280045, 5270319, 5266562, 5256680, 5250700, 5250552, 5248682, 5244917, 5240929, 5234939, 5234937, 5232939, 5225571, 5225418, 5220025, 5212189, 5212172, 5208250, 5204365, 5202350, 5196431, 5191084, 5187175, 5185326, 5183906, 5177079, 5171864, 5169963, 5155122, 5143929, 5143928, 5143927, 5124455, 5124347, 5114958, 5112846, 5104656, 5098613, 5095037, 5095019, 5086064, 5081261, 5081147, 5081126, 5075330, 5066668, 5059602, 5043457, 5037835, 5037811, 5036088, 5013850, 5013751, 5013736, 500654, 4992448, 4992447, 4988733, 4988728, 4981865, 4962119, 4959378, 4954519, 4945099, 4942236, 4931457, 4927835, 4912248, 4910192, 4904786, 4904685, 4904674, 4904671, 4897397, 4895953, 4891370, 4870210, 4859686, 4857644, 4853392, 4851412, 4847303, 4847290, 4845242, 4835166, 4826990, 4803216, 4801598, 4791129, 4788205, 4778818, 4775679, 4772703, 4767776, 4764525, 4760051, 4748153, 4725616, 4721712, 4713393, 4708966, 4695571, 4686235, 4686224, 4680298, 4678802, 4652564, 4644005, 4632923, 4629793, 4614741, 4599360, 4596828, 4595694, 4595686, 4594357, 4585755, 4579866, 4578390, 4569942, 4567201, 4563476, 4559348, 4558067, 4556672, 4556669, 4539326, 4537903, 4536503, 4518608,

ES 2 347 027 T3

4514415, 4512990, 4501755, 4495197, 4493839, 4465687, 4440779, 4440763, 4435420, 4412995, 4400534, 4355034, 4335141, 4322420, 4275064, 4244963, 4235908, 4234593, 4226887, 4201778, 4181720, 4173650, 4173634, 4145444, 4128664, 4125612, 4124726, 4124707, 4117135, 4027031, 4024284, 4021553, 4021550, 4018923, 4012527, 4011326, 3998970, 3998954, 3993763, 3991212, 3984405, 3978227, 3978219, 3978202, 3975543, 3968224, 3959368, 3949082, 3949081, 3947475, 3936450, 3934018, 3930005, 3857955, 3856962, 3821377, 3821401, 3789121, 3789123, 3726978, 3694471, 3691214, 3678169, 3624216;

agentes inmunosupresores, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 4450159, 4450159, 5905085, 5883119, 5880280, 5877184, 5874594, 5843452, 5817672, 5817661, 5817660, 5801193, 5776974, 5763478, 5739169, 5723466, 5719176, 5696156, 5695753, 5693648, 5693645, 5691346, 5686469, 5686424, 5679705, 5679640, 5670504, 5665774, 5665772, 5648376, 5639455, 5633277, 5624930, 5622970, 5605903, 5604229, 5574041, 5565560, 5550233, 5545734, 5540931, 5532248, 5527820, 5516797, 5514688, 5512687, 5506233, 5506228, 5494895, 5484788, 5470857, 5464615, 5432183, 5431896, 5385918, 5349061, 5344925, 5330993, 5308837, 5290783, 5290772, 5284877, 5284840, 5273979, 5262533, 5260300, 5252732, 5250678, 5247076, 5244896, 5238689, 5219884, 5208241, 5208228, 5202332, 5192773, 5189042, 5169851, 5162334, 5151413, 5149701, 5147877, 5143918, 5138051, 5093338, 5091389, 5068323, 5068247, 5064835, 5061728, 5055290, 4981792, 4810692, 4410696, 4346096, 4342769, 4317825, 4256766, 4180588, 4000275, 3759921;

agentes analgésicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5292736, 5688825, 5554789, 5455230, 5292736, 5298522, 5216165, 5438064, 5204365, 5017578, 4906655, 4906655, 4994450, 4749792, 4980365, 4794110, 4670541, 4737493, 4622326, 4536512, 4719231, 4533671, 4552866, 4539312, 4569942, 4681879, 4511724, 4556672, 4721712, 4474806, 4595686, 4440779, 4434175, 4608374, 4395402, 4400534, 4374139, 4361583, 4252816, 4251530, 5874459, 5688825, 5554789, 5455230, 5438064, 5298522, 5216165, 5204365, 5030639, 5017578, 5008264, 4994450, 4980365, 4906655, 4847290, 4844907, 4794110, 4791129, 4774256, 4749792, 4737493, 4721712, 4719231, 4681879, 4670541, 4667039, 4658037, 4634708, 4623648, 4622326, 4608374, 4595686, 4594188, 4569942, 4556672, 4552866, 4539312, 4536512, 4533671, 4511724, 4440779, 4434175, 4400534, 4395402, 4391827, 4374139, 4361583, 4322420, 4306097, 4252816, 4251530, 4244955, 4232018, 4209520, 4164514, 4147872, 4133819, 4124713, 4117012, 4064272, 4022836, 3966944;

agentes colinérgicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5219872, 5219873, 5073560, 5073560, 5346911, 5424301, 5073560, 5219872, 4900748, 4786648, 4798841, 4782071, 4710508, 5482938, 5464842, 5378723, 5346911, 5318978, 5219873, 5219872, 5084281, 5073560, 5002955, 4988710, 4900748, 4798841, 4786648, 4782071, 4745123, 4710508;

agentes adrenérgicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5091528, 5091528, 4,835157, 5708015, 5594027, 5580892, 5576332, 5510376, 5482961, 5334601, 5202347, 5135926, 5116867, 5091528, 5017618, 4835157, 4829086, 4579867, 4568679, 4469690, 4395559, 4381309, 4363808, 4343800, 4329289, 4314943, 4311708, 4304721, 4296117, 4285873, 4281189, 4278608, 4247710, 4145550, 4145425, 4139535, 4082843, 4011321, 4001421, 3982010, 3940407, 3852468, 3832470;

agentes antihistamínicos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5874479, 5863938, 5856364, 5770612, 5702688, 5674912, 5663208, 5658957, 5652274, 5648380, 5646190, 5641814, 5633285, 5614561, 5602183, 4923892, 4782058, 4393210, 4180583, 3965257, 3946022, 3931197;

agentes esteroideos, como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5863538, 5855907, 5855866, 5780592, 5776427, 5651987, 5346887, 5256408, 5252319, 5209926, 4996335, 4927807, 4910192, 4710495, 4049805, 4004005, 3670079, 3608076, 5892028, 5888995, 5883087, 5880115, 5869475, 5866558, 5861390, 5861388, 5854235, 5837698, 5834452, 5830886, 5792758, 5792757, 5763361, 5744462, 5741787, 5741786, 5733899, 5731345, 5723638, 5721226, 5712264, 5712263, 5710144, 5707984, 5705494, 5700793, 5698720, 5698545, 5696106, 5677293, 5674861, 5661141, 5656621, 5646136, 5637691, 5616574, 5614514, 5604215, 5604213, 5599807, 5585482, 5565588, 5563259, 5563131, 5561124, 5556845, 5547949, 5536714, 5527806, 5506354, 5506221, 5494907, 5491136, 5478956, 5426179, 5422262, 5391776, 5382661, 5380841, 5380840, 5380839, 5373095, 5371078, 5352809, 5344827, 5344826, 5338837, 5336686, 5292906, 5292878, 5281587, 5272140, 5244886, 5236912, 5232915, 5219879, 5218109, 5215972, 5212166, 5206415, 5194602, 5166201, 5166055, 5126488, 5116829, 5108996, 5099037, 5096892, 5093502, 5086047, 5084450, 5082835, 5081114, 5053404, 5041433, 5041432, 5034548, 5032586, 5026882, 4996335, 4975537, 4970205, 4954446, 4950428, 4946834, 4937237, 4921846, 4920099, 4910226, 4900725, 4892867, 4888336, 4885280, 4882322, 4882319, 4882315, 4874855, 4868167, 4865767, 4861875, 4861765, 4861763, 4847014, 4774236, 4753932, 4711856, 4710495, 4701450, 4701449, 4689410, 4680290, 4670551, 4664850, 4659516, 4647410, 4634695, 4634693, 4588530, 4567000, 4560557, 4558041, 4552871, 4552868, 4541956, 4519946, 4515787, 4512986, 4502989, 4495102.

El resto de fármaco de la molécula bifuncional puede ser el compuesto completo o un fragmento de unión o parte del mismo que retiene su afinidad y especificidad por la diana de interés teniendo al mismo tiempo un sitio de unión para el enlace covalente al ligando de proteína presentadora o enlazador.

Ligando de proteína presentadora: Z

Z es un ligando para una proteína presentadora presente en el hospedador en el que tiene que administrarse la molécula. El ligando de proteína presentadora de las presentes moléculas bifuncionales se une a una proteína presen-

tadora específica presente en el hospedador. La interacción de unión entre la proteína presentadora y el ligando de proteína presentadora es no covalente, de modo que se producen enlaces no covalentes entre la molécula bifuncional y la proteína presentadora después de la unión de las dos entidades. El ligando de proteína presentadora es pequeño, donde el tamaño del ligando de proteína presentadora no excede de aproximadamente 4950 dalton, habitualmente no excede de aproximadamente 4925 dalton y más habitualmente no excede de aproximadamente 4900 dalton, donde el tamaño del ligando de proteína presentadora es generalmente de al menos aproximadamente 50 dalton y más habitualmente de al menos aproximadamente 100 dalton. El ligando de proteína presentadora, en el contexto de la molécula bifuncional, sustancialmente no tiene actividad farmacológica a su concentración eficaz más allá de la unión a la proteína presentadora, es decir, no causa directamente la aparición de un acontecimiento farmacológico mediado por la proteína presentadora después de la unión a su concentración eficaz a la proteína presentadora, donde un acontecimiento farmacológico mediado por la proteína presentadora es un acontecimiento farmacológicamente relevante que está directamente modulado por la proteína presentadora en ausencia de las presentes moléculas bifuncionales. Como se usa en este documento, acontecimiento farmacológico es un acontecimiento que es distinto de un acontecimiento bioquímico (por ejemplo, la inhibición de una actividad prolil isomerasa) o un acontecimiento biológico (por ejemplo, la inducción en una célula para que exprese nuevos genes).

La proteína presentadora a la que se une el ligando de la molécula bifuncional puede ser cualquier proteína que esté presente en el hospedador en el momento en el que se introduce la molécula bifuncional en el hospedador, es decir, la proteína presentadora será endógena al hospedador. La proteína presentadora puede tener o no uno o más restos modificados, por ejemplo, restos que estén glucosilados, de modo que la proteína presentadora puede ser o no una glucoproteína. Además, la proteína presentadora que se recluta por la molécula bifuncional puede ser o no parte de un complejo o estructura de una pluralidad de moléculas biológicas, por ejemplo, lípidos, donde dichos complejos o estructuras pueden incluir lipoproteínas, bicapas lipídicas, y similares. Sin embargo, en muchas realizaciones, la proteína presentadora que se recluta por el ligando de proteína presentadora de la molécula bifuncional será en sí misma, es decir, no será parte de una estructura más grande de una pluralidad de moléculas biológicas. Aunque la proteína presentadora puede ser una proteína que no sea nativa para el hospedador pero que se haya introducido en algún momento antes de la introducción de la molécula bifuncional, por ejemplo, a través de administración previa de la proteína o una composición de ácido nucleico que codifique la misma, tal como a través de terapia génica, la proteína presentadora será, en muchas realizaciones, una proteína que es nativa y se expresa de forma natural por al menos alguna de las células del hospedador, es decir, una proteína de origen natural en el hospedador. La proteína presentadora es una proteína que está presente en la región del hospedador ocupada por la diana de fármaco. Por tanto, cuando la diana de fármaco es una diana de fármaco intracelular, la proteína presentadora será una proteína intracelular presente en la célula que comprende la diana, típicamente expresada en la célula que comprende la diana, es decir, la proteína presentadora y la diana se co-expresan en la misma célula. Asimismo, cuando la diana de fármaco es una diana de fármaco extracelular, la proteína presentadora será una proteína extracelular que se encuentra en las cercanías de la diana.

Aunque no es un requisito en ciertas realizaciones, en muchas realizaciones preferidas, la proteína presentadora es una que está presente en el hospedador en cantidades suficientes de modo que, después de la unión de al menos una parte de la proteína presentadora presente en el hospedador a la molécula bifuncional, no sucedan acontecimientos farmacológicos adversos. En otras palabras, la proteína presentadora en estas realizaciones preferidas, es una en la que su actividad biológica nativa y deseable, si la hay, no disminuye en una cantidad inaceptable después de la unión de la parte de la población de proteína presentadora a la molécula bifuncional. La cantidad de actividad disminuida de la proteína presentadora que es aceptable en una situación dada se determina con respecto a la afección que se está tratando en vista de los beneficios de tratamiento frente a la reducción de actividad global de la proteína presentadora, si la hay. En ciertas situaciones, puede ser aceptable una gran disminución en la actividad global de la proteína presentadora, por ejemplo, cuando la actividad de la proteína presentadora agrava la afección que se está tratando.

Las proteínas presentadoras específicas de interés incluyen proteínas intracelulares y extracelulares. Las proteínas intracelulares de interés incluyen: peptidil-prolil isomerasas, por ejemplo FKBP y ciclofilinas; chaperonas moleculares expresadas de forma ubicua, por ejemplo, la proteína de choque térmico 90 (Hsp90); receptores de hormonas esteroideas, por ejemplo, receptores de estrógenos, receptores de glucocorticoides, receptores de andrógenos; la proteína de unión a ácido retinoico, proteínas del citoesqueleto, tales como tubulina y actina; etc.

Son de particular interés como proteínas presentadoras intracelulares las cis-trans peptidil-prolil isomerasas que interaccionan con muchas proteínas a causa de su actividad chaperonina/isomerasa, por ejemplo FKBP y ciclofilinas. Las peptidil-prolil isomerasas de interés incluyen FKBP. Se conocen varias FKBP diferentes en la técnica, e incluyen las descritas en: Sabatini *et al.*, Mol. Neurobiol. (octubre de 1997) 15:223-239; Marks, Physiol. Rev. (julio de 1996) 76:631-649; Kay, Biochem J. (marzo de 1996) 314: 361-385; Braun *et al.*, FASEB J. (enero de 1995) 9:63-72; Fruman *et al.*, FASEB J. (abril de 1994) 8:391-400; y Hacker *et al.*, Mol. Microbiol. (noviembre de 1993) 10:445-456. Las FKBP de interés incluyen FKBP 12, FKBP 52, FKBP 14.6 (descritas en la patente de Estados Unidos N° 5.525.523); FKBP 12.6 (descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.457.182); FKBP 13 (descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.498.597); y HCB (descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.196.352); donde FKBP 12 y FKBP 52 son de particular interés como proteínas presentadoras intracelulares.

También son de interés específico como proteínas presentadoras las ciclofilinas. Se conocen varias ciclofilinas en la técnica y se describen en Trandinh *et al.*, FASEB J. (diciembre de 1992) 6: 3410-3420; Harding *et al.*, Transplantation

(agosto de 1988) 46: 29S-35S. Las ciclofilinas específicas de interés como proteínas presentadoras intracelulares incluyen ciclofilina A, B, C, D, E, y similares, donde la ciclofilina A es de particular interés.

En lugar de ser una proteína intracelular, la proteína presentadora endógena puede ser una proteína extracelular o sérica. Las proteínas presentadoras séricas de interés particular son aquellas que son relativamente abundantes en el suero del hospedador y cumplen los criterios anteriores para proteínas presentadoras endógenas adecuadas. Por relativamente abundante se entiende que la concentración de la proteína presentadora sérica es de al menos aproximadamente 1 ng/ml, habitualmente de al menos aproximadamente 10 mg/ml y más habitualmente de al menos aproximadamente 15 mg/ml. Las proteínas séricas específicas de interés como proteínas presentadoras incluyen: albúmina, proteínas de unión a vitamina A y proteínas de unión a vitamina D, b-2 macroglobulina, siendo la albúmina una proteína presentadora particularmente preferida.

El resto Z de las presentes moléculas bifuncionales por lo tanto se elegirán en vista de la proteína presentadora endógena que tiene que reclutarse para producir el complejo al menos binario y, en algunas realizaciones, el complejo tripartito. Por tanto, el resto Z puede ser varios ligandos, dependiendo de la proteína presentadora endógena particular a la que se pretende que se una. En muchas realizaciones preferidas, el resto Z tiene una afinidad por su proteína presentadora de al menos aproximadamente 10⁻⁴ M, habitualmente de al menos aproximadamente 10⁻⁶ molar y más habitualmente de al menos aproximadamente 10⁻⁸ M, donde en muchas realizaciones el resto Z tiene una afinidad por su proteína presentadora entre aproximadamente 10⁻⁹ y 10⁻¹² M. La parte de resto Z de la molécula bifuncional también debe ser específica para la proteína presentadora en el contexto de su actividad de unión cuando está presente en la molécula bifuncional, porque no se une significativamente o afecta sustancialmente a proteínas no presentadoras cuando está presente en la molécula bifuncional.

Los ligandos representativos capaces de servir como resto Z de la molécula bifuncional incluyen ligandos para proteínas intracelulares, tales como: ligandos de peptidil-prolil isomerasa, por ejemplo, FK506, rapamicina, ciclosporina A y similares; ligandos de Hsp90, por ejemplo, geldanamycin; ligandos del receptor de hormonas esteroides, por ejemplo, hormonas esteroides de origen natural, tales como, estrógeno, progestina, testosterona, y similares, así como derivados y miméticos sintéticos de las mismas, particularmente los que se unen con elevada especificidad y afinidad pero no activan sus receptores respectivos; moléculas pequeñas que se unen a proteínas del citoesqueleto, por ejemplo, agentes antimitóticos, tales como taxanos, colchicina, colcemid, nocadazol, vinblastina, y vincristina, agentes de unión a actina, tales como citocalasina, latrunculina, faloidina, y similares.

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas presentadoras intracelulares preferidas son miembros de la familia de la peptidil-prolil isomerasa, particularmente los subconjuntos de FKBP y ciclofilina de esta familia. Cuando se emplean proteínas presentadoras de peptidil-prolil isomerasa, el complejo molécula bifuncional/peptidil-prolil isomerasa preferiblemente no se unirá sustancialmente a la peptidil-prolil isomerasa natural/diana de ligando calcineurina para provocar inmunosupresión significativa. Se conoce una diversidad de ligandos que se unen a FKBP y pueden usarse en la presente invención. Los ligandos deben unirse específicamente a una FKBP y tener una afinidad por la FKBP que esté entre aproximadamente 10⁻⁶ y 10⁻¹⁰ M. Son de interés ambos ligandos de origen natural de FKBP, incluyendo FK506 y rapamicina. También son de interés los ligandos sintéticos de FKBP, incluyendo los descritos en las patentes de Estados Unidos N°: 5.665.774; 5.622.970; 5.516.797; 5.614.547; y 5.403.833.

También son de interés los ligandos de ciclofilina, donde dichos ligandos deben unirse específicamente a ciclofilina con una afinidad que está entre aproximadamente 10⁻⁶ y 10⁻⁹ M. También se conoce una diversidad de ligandos que se unen a ciclofilinas, donde dichos ligandos incluyen las ciclosporinas de origen natural, tales como ciclosporina A, así como derivados y miméticos sintéticos de las mismas, incluyendo los descritos en las patentes de Estados Unidos N°: 5.401.649; 5.318.901; 5.236.899; 5.227.467; 5.214.130; 5.122.511; 5.116.816; 5.089.390; 5.079.341; 5.017.597; 4.940.719; 4.914.188; 4.885.276; 4.798.823; 4.771.122; 4.703.033; 4.554.351; 4.396.542; 4.289.851; 4.288.431; 4.220.61 y 4.210.581.

Los ligandos representativos para su uso como resto Z en la molécula bifuncional también incluyen ligandos que se unen a proteínas presentadoras extracelulares. Dichos ligandos deben unirse específicamente a su proteína presentadora respectiva con una afinidad de al menos aproximadamente 10⁻⁴ M. Los ligandos de interés para su uso en la unión a proteínas presentadoras extracelulares incluyen: ligandos de albúmina, tales como araquidonato, bilirrubina, hemina, aspirina, ibuprofeno, ácido para-amino salicílico, miristilato, palmitato, linoleato, warfarina etc.; vitamina A y derivados de la misma, vitamina D y derivados de la misma, y similares.

Resto de unión: L

Los restos Z y X de la molécula bifuncional se unen juntos a través del resto de unión L, donde L puede ser un enlace o un grupo de unión. Cuando se emplean grupos de unión, dichos grupos se eligen para proporcionar unión covalente de los restos de fármaco y ligando a través del grupo de unión, así como la relación estructural deseada de la molécula bifuncional con respecto a su proteína presentadora pretendida. Los grupos de unión de interés pueden variar ampliamente dependiendo de la naturaleza de los restos de fármaco y ligando. El grupo de unión, cuando está presente, debe ser preferiblemente inerte biológicamente. Los enlazadores apropiados pueden identificarse fácilmente usando los ensayos de afinidad, especificidad o selectividad descritos *supra*. Los especialistas en la técnica conocen una diversidad de grupos de unión y estos encuentran uso en las presentes moléculas bifuncionales. Los grupos enlazadores deben ser suficientemente pequeños para proporcionar una molécula bifuncional que tenga las caracte-

rísticas de tamaño global que se han descrito anteriormente, el tamaño del grupo enlazador, cuando está presente, es generalmente de al menos aproximadamente 50 dalton, habitualmente de al menos aproximadamente 100 dalton y puede ser tan grande como de 1000 dalton o más, pero generalmente no excederá de aproximadamente 500 dalton y habitualmente no excederá de aproximadamente 300 dalton. Generalmente, dichos enlazadores comprenderán un grupo espaciador terminado en cada extremo con una funcionalidad reactiva capaz de unirse covalentemente a los restos de fármaco o ligando. Los grupos espaciadores de interés posiblemente incluyen cadenas de hidrocarburo alifático e insaturado, espaciadores que contienen heteroátomos tales como oxígeno (éteres tales como polietilenglicol) o nitrógeno (poliaminas), péptidos, carbohidratos, sistemas cíclicos o acíclicos que pueden contener posiblemente heteroátomos. Los grupos espaciadores también pueden estar compuestos por ligandos que se unen a metales de modo que la presencia de un ión metálico coordina dos o más ligandos para formar un complejo. Los elementos espaciadores específicos incluyen: 1,4-diaminohexano, xililenodiamina, ácido tereftálico, ácido 3,6-dioxaoctanodioico, ácido etilendiamina-N,N-diacético, ácido 1,1'-etilenobis(5-oxo-3-pirrolidinacarboxílico), 4,4'-etilenodipiperidina. Las funcionalidades reactivas potenciales incluyen grupos funcionales nucleófilos (aminas, alcoholes, tioles, hidrazidas), grupos funcionales electrófilos (aldehídos, ésteres, vinil cetonas, epóxidos, isocianatos, maleimidas), grupos funcionales con capacidad para reacciones de cicloadición, formación de enlaces disulfuro, o unión a metales. Los ejemplos específicos incluyen aminas primarias y secundarias, ácidos hidroxámicos, ésteres de N-hidroxisuccinimidilo, carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo, oxicarbonilimidazoles, ésteres de nitrofenilo, ésteres de trifluoroetilo, ésteres de glicidilo, vinilsulfonas, y maleimidas. Grupos enlazadores específicos que pueden encontrar uso en las presentes moléculas bifuncionales incluyen compuestos heterofuncionales, tales como azidobenzoil hidrazida, N-[4-(p-azidosalicilamino)butil]-3'-[2'-piridilditio]propionamida), suberato de bis-sulfosuccinimidilo, dimetiladipimidato, disuccinimidiltartrato, éster de N-maleimidobutiriloxisuccinimida, N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato, [4-azidofenil]-1,3'-di-tiopropionato de N-succinimidilo, [4-yodoacetil]aminobenzoato de N-succinimidilo, glutaraldehído, y 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (SPDP), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico (SMCC), y similares.

Métodos para fabricar moléculas bifuncionales

Las moléculas bifuncionales de la presente invención pueden prepararse usando cualquier metodología conveniente. En muchas realizaciones de la presente invención, la invención se usa para mejorar uno o más aspectos de un fármaco de molécula pequeña identificado y al menos parcialmente caracterizado. Generalmente, primero se identifica un fármaco de molécula pequeña de interés pero que carece de alguna de las actividades biológicas deseadas, tales como afinidad, especificidad o selectividad. El fármaco puede ser un agente o compuesto biológicamente activo previamente identificado que tiene la actividad de unión a la diana deseada, o uno que se ha descubierto recientemente usando una o más técnicas de descubrimiento de fármacos. La molécula bifuncional después se produce generalmente a partir del fármaco usando un enfoque racional o combinatorio.

En un enfoque racional, las moléculas bifuncionales se construyen a partir de sus componentes individuales, por ejemplo, ligando, enlazador y fármaco. Los componentes pueden unirse covalentemente entre sí a través de grupos funcionales, como se sabe en la técnica, donde dichos grupos funcionales pueden estar presentes en los componentes o introducirse en los componentes usando una o más etapas, por ejemplo, reacciones de oxidación, reacciones de reducción, reacciones de escisión y similares. Los grupos funcionales que pueden usarse en la unión covalente de los componentes juntos para producir la molécula bifuncional incluyen: hidroxilo, sulfhidrilo, amino, y similares. Las partes particulares de los diferentes componentes que se modifican para proporcionar el enlace covalente se elegirán para no interferir de forma sustancialmente adversa con la actividad de unión deseada de esos componentes, por ejemplo, para el resto de fármaco, se modificará una región que no afecta a la actividad de unión a la diana, de modo que se conserve una cantidad suficiente de la actividad deseada del fármaco. Cuando sea necesario y/o se desee, pueden protegerse ciertos restos en los componentes usando grupos de bloqueo, como se sabe en la técnica, véase, por ejemplo, Green & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons) (1991).

El enfoque anterior de componentes para la producción de la molécula bifuncional es el más adecuado para situaciones en las que se conocen las estructuras cristalinas de la proteína presentadora, ligando, fármaco y diana, de modo que pueda usarse modelado molecular para determinar el tamaño óptimo del enlazador, si lo hay, a emplear para unir los diferentes componentes.

Como alternativa, la molécula bifuncional puede producirse usando métodos combinatorios para producir grandes bibliotecas de moléculas bifuncionales potenciales que después pueden explorarse para la identificación de una molécula bifuncional con la afinidad y/o especificidad de unión deseada. Los métodos para producir y explorar bibliotecas combinatorias de moléculas incluyen los documentos: 5.741.713; 5.734.018; 5.731.423; 5.721.099; 5.708.153; 5.698.673; 5.688.997; 5.688.696; 5.684.711; 5.641.862; 5.639.603; 5.593.853; 5.574.656; 5.571.698; 5.565.324; 5.549.974; 5.545.568; 5.541.061; 5.525.735; 5.463.564; 5.440.016; 5.438.119; 5.223.409.

Como alternativa, la molécula bifuncional puede producirse usando química médica y relaciones estructura-actividad conocidas para el ligando de proteína presentadora y el fármaco. En particular, este enfoque proporcionará una comprensión en cuanto a donde unir los dos restos al enlazador.

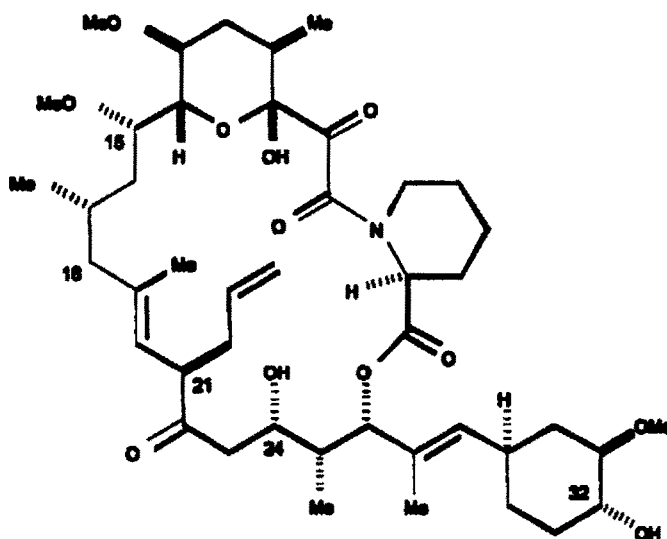
Exploración de compuestos bifuncionales

Las moléculas bifuncionales resultantes después se exploran para aquellas moléculas que muestran al menos uno de afinidad, especificidad o selectividad potenciada en comparación con lo observado para el fármaco libre. Puede emplearse cualquier ensayo de exploración conveniente, donde el ensayo de exploración particular puede ser uno conocido para los especialistas en la técnica o uno desarrollado en vista de la molécula específica y la propiedad que se está estudiando. Típicamente, el ensayo de exploración implicará observar la actividad de unión de la molécula bifuncional a la diana en presencia de una proteína presentadora apropiada. Por ejemplo, cuando se tiene interés en identificar aquellas moléculas bifuncionales que muestran afinidad potenciada por sus dianas en comparación con el fármaco libre, pueden realizarse ensayos de unión y seleccionar aquellas moléculas bifuncionales que muestren afinidad potenciada, donde la afinidad generalmente será al menos aproximadamente 2 veces mayor que la observada para el fármaco libre, como se ha descrito anteriormente. Para la especificidad, puede usarse un ensayo que se centre en la unión de la molécula bifuncional a dianas tanto deseables como indeseables. Por ejemplo, cuando se tiene interés en identificar aquellas moléculas bifuncionales que muestran especificidad mejorada en comparación con el fármaco libre correspondiente, donde el fármaco libre se une tanto a la diana deseable A como a la diana indeseable B, puede explorarse la biblioteca para aquellas moléculas bifuncionales que, en presencia de la proteína presentadora, se unen a la diana A pero con cantidades reducidas, si las hay, a la diana B, ya que dichas moléculas bifuncionales son más específicas para la diana deseada que el fármaco libre. Para la selectividad, puede usarse un ensayo para comparar la actividad de una molécula bifuncional en el tipo celular o tisular diana con la actividad de la molécula bifuncional en células o tejidos en los que no se desea la actividad del fármaco. Una molécula bifuncional selectiva afectará a la diana en las células deseadas, por ejemplo, células implicadas en una patología, pero no afectarán (o al menos afectarán en un menor grado) a la diana en células indeseadas, por ejemplo, células no implicadas en la patología. Por ejemplo, un fármaco prospectivo puede unirse a la diana A tanto en el hospedador como en un microorganismo patógeno. Añadiendo un ligando para una proteína presentadora al fármaco, la diana A en el hospedador es incapaz de unirse al fármaco debido a las interacciones con la proteína presentadora, mientras que el fármaco retiene su potencia en el microorganismo.

Métodos para fabricar moléculas bifuncionales para proteínas presentadoras de peptidil-prolil isomerasa

Como se ha mencionado anteriormente, una clase de realizaciones preferidas de la presente invención es aquellas realizaciones en las que las moléculas bifuncionales se unen específicamente a proteínas presentadoras de peptidil-prolil isomerasa endógenas presentes en el hospedador en el que se introduce la molécula bifuncional. Por tanto, las moléculas bifuncionales de interés incluyen aquellas en las que la proteína presentadora endógena es una FKBP o una ciclofilina.

En la preparación de moléculas bifuncionales a partir de FK506, se identifica un sitio de unión adecuado sobre la estructura de FK506, se modifica según sea necesario, y después se une covalentemente al enlazador o el resto de fármaco. La estructura de FK506 (también conocido como tacrolimus) es:



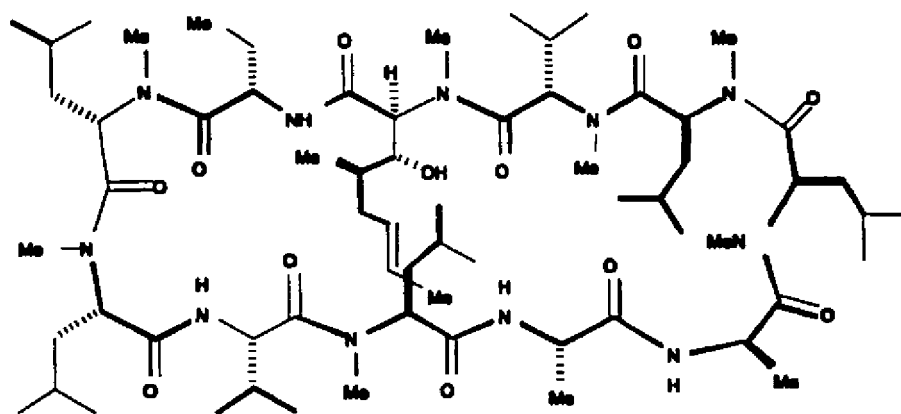
El sitio al que se une covalentemente el enlazador/resto de fármaco es uno que, después de la unión covalente, no elimina la afinidad y/o especificidad de FK506 por su proteína presentadora de FKBP, por ejemplo FKBP 12 o FKBP 52. Por tanto, las posiciones adecuadas para su uso como sitios de unión covalente incluyen átomos localizados entre el carbono 15 y el carbono 25 y los sustituyentes unidos a estos átomos. Por ejemplo, la oxidación del grupo alilo o la oxidación del grupo metileno del carbono 18; la modificación de la cetona del carbono 22 o el grupo hidroxilo del carbono 24 o la alquilación en el carbono 21 o el carbono 23; así como el grupo hidroxilo secundario localizado en el anillo ciclohexilo (carbono 32); son sitios potenciales de unión covalente específica.

Con FK506, dependiendo del resto de fármaco y/o enlazador a unir, puede ser deseable introducir uno o más restos funcionales en la estructura FK506. Los restos funcionales de interés que pueden introducirse incluyen: grupos hidroxilo, grupos amino, grupos carboxilo, aldehídos, carbonatos, carbamatos, azidas, tioles, y ésteres, etc. Dichos grupos pueden introducirse usando protocolos conocidos, tales como reacciones de oxidación, reacciones de reducción, reacciones de escisión y similares, con o sin el uso de uno o más grupos de bloqueo para evitar reacciones secundarias indeseadas.

En algunos casos, es deseable unir covalentemente el resto de fármaco directamente a FK506, a menudo FK506 activado. En dichos casos, el o los grupos funcionales reactivos introducidos en la estructura FK506 dependerán principalmente de la naturaleza del resto de fármaco a unir. Por tanto, para restos de fármaco peptídicos, los pares específicos de interés incluyen: carbonatos de FK506 para reaccionar con grupos amino de péptidos; ácidos carboxílicos de FK506 para reaccionar con grupos amino de péptidos; aminas de FK506 para reaccionar con grupos ácido carboxílico de péptidos; maleimida de FK506 para reaccionar con grupos tiol de péptidos; y similares. Como alternativa, cuando el resto de fármaco es un esteroide, los pares potenciales de interés incluyen: carbonato de N-hidroxisuccinimidilo de FK506 y la amina compañera; aldehído de FK506 y la amina compañera; aldehído de FK506 y la hidrazida compañera; grupo hidroxilo de FK506 y el haluro de OR alquilo del ácido carboxílico compañera; tiol de FK506 y la maleimida compañera y similares.

Después de la introducción del o los grupos funcionales reactivos en la estructura de FK506, el FK506 activado después se combina con el resto de fármaco/enlazador en condiciones suficientes para que suceda la unión covalente.

Otra realización de interés particular son moléculas bifuncionales de ciclosporina A o análogos de la misma. La estructura de ciclosporina A es:



Como con las moléculas bifuncionales de FK506, la ciclosporina A se conjugará con el resto de fármaco de un modo que la ciclosporina A no pierda sustancialmente su afinidad por ciclofilina. Las posiciones preferidas en la estructura de la ciclosporina A que pueden servir como sitios de enlace covalente incluyen: los restos 4, 5, 6, 7, 8; mientras que los restos menos preferidos pero aún posibles incluyen: 1, 2, 3, 9, 10 y 11. Cuando sea necesario, pueden introducirse funcionalidades reactivas en la estructura de ciclosporina, donde dichas funcionalidades incluyen: grupos hidroxilo, grupos amino, grupos carboxilo, aldehídos, carbonatos, carbamatos, azidas, tioles, y ésteres, etc., eligiéndose la funcionalidad particular de interés con respecto al enlazador o resto de fármaco específico a unir.

Mejoras específicas en comparación con el fármaco libre

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas bifuncionales de la presente invención proporcionan mejoras específicas sobre la actividad global observada en el fármaco libre correspondiente, es decir, las moléculas bifuncionales muestran al menos uno de afinidad, especificidad o selectividad potenciada en comparación con el fármaco libre, es decir, un control de fármaco libre. Aunque sin el deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que la actividad mejorada en comparación con el fármaco libre es el resultado de una superficie de unión a la diana agrandada presente en el complejo binario o la optimización de interacciones favorables en comparación con las encontradas en el fármaco libre. En otras palabras, la presentación del fármaco como un complejo binario de la molécula bifuncional y su proteína presentadora modula el perfil de unión global del resto de fármaco con respecto a sus dianas de un modo que mejora al menos uno de la afinidad, especificidad o selectividad del fármaco en comparación con un control de fármaco libre. Esta modulación del perfil de unión puede ser el resultado de la combinación de interacciones fármaco-diana e interacciones proteína presentadora-diana de fármaco, donde las interacciones proteína presentadora-diana de fármaco pueden ser atractivas, repulsivas o neutras. Véase la Fig. 1.

La Fig. 1A proporciona una representación de cómo se consigue la afinidad potenciada con la presente invención. Como se muestra, la diana de fármaco establece interacciones proteína-proteína favorables o atractivas con una proteína presentadora que presenta el resto de fármaco del compuesto bifuncional. Estas interacciones favorables entre la

proteína presentadora y la diana de fármaco potencian la afinidad del fármaco por su diana. La Fig. 1B proporciona una representación de cómo se consigue la especificidad potenciada con los presentes compuestos bifuncionales. En la Fig. 1B, una proteína de unión a fármaco no específica (es decir, una diana indeseable) no puede unirse al resto de fármaco en el contexto de la proteína presentadora a causa de interacciones proteína-proteína desfavorables entre la proteína presentadora y la proteína de unión a fármaco no específica. Por tanto, se observa especificidad potenciada ya que el fármaco solamente puede unirse a su auténtica diana de fármaco. La Fig. 1C proporciona una representación de cómo se consigue selectividad potenciada con los presentes compuestos bifuncionales, donde la actividad del fármaco está limitada a un tipo de célula u otra dentro de un organismo.

Por tanto, en una primera realización preferida, la molécula bifuncional proporciona afinidad potenciada o mayor por la diana en comparación con el fármaco libre. La afinidad potenciada está provocada por interacciones positivas, es decir, atractivas, entre el presentador y la diana así como entre el fármaco y la diana. Por tanto, la afinidad mejorada está provocada por la producción de un complejo tripartito caracterizado por la presencia tanto de interacciones de unión fármaco/diana como interacciones de unión presentador/diana.

En una segunda realización preferida de la presente invención, la molécula bifuncional proporciona especificidad potenciada en comparación con el fármaco libre. En dichas situaciones, el complejo binario de molécula bifuncional/proteína presentadora muestra interacciones negativas o repulsivas con al menos algunas, sino todas, las dianas del fármaco libre pero no para la diana deseada, donde cualquier interacción repulsiva o negativa que surja de la presentación del resto de fármaco en el contexto de la proteína presentadora es insuficiente para evitar una cantidad adecuada de unión del fármaco a la diana deseada. Por tanto, los complejos tripartitos producidos entre el complejo binario y dianas indeseadas, se caracterizan, en al menos algunos casos, por la presencia de interacciones negativas o repulsivas. La administración del fármaco como una molécula bifuncional de acuerdo con la presente invención proporciona la actividad deseada, sin la actividad indeseable que surge de la baja especificidad del fármaco libre.

En una tercera realización de la presente invención, la molécula bifuncional proporciona selectividad potenciada en comparación con el fármaco libre. En esta realización, la molécula bifuncional muestra actividad en un primer tipo de célula pero no en un segundo tipo de célula. Esta actividad selectiva se basa en la formación de un complejo binario entre la molécula bifuncional y un ligando de proteína presentadora que está presente en un primer tipo de célula pero no en un segundo tipo de célula. Dependiendo de la molécula bifuncional y la diana de fármaco particulares, el resto de fármaco puede mostrar actividad solamente cuando se presenta a la diana en forma de un complejo binario con la proteína presentadora. A la inversa, el resto de fármaco puede mostrar actividad solamente cuando se presenta a la diana de fármaco como la molécula bifuncional en sí misma.

Por tanto, en ciertas realizaciones, la molécula bifuncional se diseña para que tenga un ligando de proteína presentadora que se una a una proteína presentadora presente solamente en aquellas células que albergan la diana de fármaco deseada, donde la actividad del resto de fármaco está al menos potenciada cuando se presenta a la diana de fármaco por la proteína presentadora. Aquellas células que albergan la diana indeseada también carecen de la proteína presentadora. Por tanto, el resto de fármaco de la molécula bifuncional muestra menos actividad en estas células ya que no se presenta por una proteína presentadora a la diana de fármaco. De este modo, la actividad del resto de fármaco se ha potenciado selectivamente en el primer tipo de célula que comprende la diana de fármaco deseada y la proteína presentadora en comparación con el segundo tipo de célula que alberga la diana de fármaco indeseada y carece de la proteína presentadora.

En otras realizaciones, el fármaco de interés es uno que se une en su estado de fármaco libre a la diana deseada en un primer tipo de célula pero también a una diana indeseada en un segundo tipo de célula. Los ejemplos de dichos fármacos incluyen agentes antimicrobianos, tales como antibióticos, que se unen a dianas deseables en microorganismos pero dianas indeseables en otros tipos de células, tales como células hospedadoras en las que está presente el microorganismo. En esta realización, la molécula bifuncional es una que comprende un ligando para una proteína presentadora que está presente en esas células que comprenden la diana o dianas indeseables pero no está presente en aquellas células que albergan la diana deseada. En otras palabras, el ligando presentador Z de la molécula bifuncional puede ser cualquier ligando que se une a una proteína presente en aquellas células que comprenden la diana indeseable pero no presente en aquellas células que tienen la diana deseada. El ligando presentador particular que se emplea dependerá necesariamente de la naturaleza de los dos tipos de células entre los que se desea la diferenciación en la actividad del fármaco. Por ejemplo, cuando los dos tipos de células son células microbianas y humanas, el ligando de proteína presentadora puede ser una que se une a una proteína que está presente en las células humanas pero no presente en las células microbianas, por ejemplo, FKBP, y similares. El complejo binario de molécula bifuncional/proteína presentadora es incapaz de unirse a dianas indeseables en aquellas células que no comprenden la diana deseada. Al mismo tiempo, la molécula bifuncional libre es capaz de unirse a la diana deseada en aquellas células que comprenden la diana deseada a causa de las interacciones repulsivas entre el complejo binario y la diana indeseable. Por ejemplo, cuando el resto de fármaco es un antibiótico particular que muestra actividad deseada en células bacterianas pero actividad indeseable en células humanas, la molécula bifuncional es capaz de unirse a la diana bacteriana pero la molécula bifuncional/complejo binario no es capaz de unirse a la diana o dianas humanas. Véase la Fig. 1C. Por tanto, la molécula bifuncional proporciona selectividad potenciada en comparación con el fármaco libre.

Los fármacos preferidos en esta tercera realización son moléculas que muestran efectos secundarios considerables y toxicidad en células humanas además de una actividad deseada en células diana. Muchas de estas moléculas abordan vías metabólicas y actividades biológicas que son habituales para la célula diana así como para células no diana, tales

como: inhibidores de la ARN polimerasa II como a-aminitina, rifamicina, rifampicina y actinomicina D; inhibidores de la síntesis de proteínas como cicloheximida, estreptomina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina o puromicina; inhibidores de la dihidrofolato reductasa como metotrexato; inhibidores de la topoisomerasa II como novobiocina y ciprofloxacina, inhibidores del proteasoma como lactacistina; inhibidores de canales.

Esta realización encuentra uso particular en el direccionamiento de un fármaco a un patógeno microbiano reduciendo al mismo tiempo la toxicidad al hospedador en el que está presente el patógeno microbiano. Los patógenos microbianos que pueden abordarse incluyen *Legionella sp.*, *Chlamydia sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.*, *Rickettsia sp.*, *Coxiella sp.*, *Neurospora sp.*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* así como patógenos protozoarios como *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*.

En una realización particular de interés, el fármaco se selecciona entre el grupo compuesto por metotrexato y puromicina que se unen a un ligando presentador de modo que la DHFR y la síntesis de proteínas, respectivamente, se vean menos afectadas en células que contienen la proteína presentadora (por ejemplo, FKBP), por ejemplo, células hospedadoras, que en células que carecen del presentador, por ejemplo, células patógenas.

Métodos de uso, preparaciones farmacéuticas y kits

Las presentes moléculas bifuncionales encuentran uso en la producción de al menos complejos binarios *in vivo*, donde la producción de estos complejos es deseable para el hospedador en que sucede, por ejemplo, es beneficioso para el hospedador. La expresión complejo binario se usa en toda esta memoria descriptiva para hacer referencia a cualquier complejo producido por la unión no covalente de dos moléculas distintas, es decir, la molécula bifuncional y la proteína presentadora o la molécula bifuncional y la diana proteica. Los complejos tripartitos se producen con las presentes moléculas bifuncionales. La expresión complejo tripartito se usa en toda esta memoria descriptiva para hacer referencia a complejos de unión de tres entidades distintas, es decir, diana de fármaco proteica, la molécula bifuncional y la proteína presentadora.

En los métodos de la presente invención, se administra una cantidad eficaz de la molécula bifuncional al hospedador, donde "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir el resultado deseado, por ejemplo, una mejora en una patología o los síntomas asociados con la misma. La molécula bifuncional puede administrarse al hospedador usando cualquier medio conveniente capaz de producir el resultado deseado. Por tanto, la molécula bifuncional puede incorporarse en una diversidad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, la molécula bifuncional de la presente invención puede formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes apropiados, farmacéuticamente aceptables, y puede formularse en preparaciones en forma sólida, semi-sólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles. Por tanto, la administración de la molécula bifuncional puede conseguirse de diversos modos, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratecal, etc. En formas de dosificación farmacéuticas, la molécula bifuncional puede administrarse sola o en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ejemplares y no son de ningún modo limitantes.

Para preparaciones orales, las moléculas bifuncionales pueden usarse solas o en combinación con aditivos apropiados para fabricar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábica, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

Las moléculas bifuncionales pueden formularse en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

Las moléculas bifuncionales pueden utilizarse en formulación de aerosol a administrar mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, las moléculas bifuncionales pueden prepararse en supositorios con una diversidad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, ceras carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, pero se solidifican a temperatura ambiente.

Las formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires, y suspensiones pueden proporcionarse cuando cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene el agente activo. Asimismo, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el agente activo en

una composición en forma de solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión “forma de dosificación unitaria”, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, medio o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedador.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, medios o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

Los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado las pueden determinar fácilmente los especialistas en la técnica por una diversidad de medios.

Los presentes métodos encuentran uso en el tratamiento de una diversidad de diferentes patologías. En ciertas realizaciones, es de particular interés el uso de los presentes métodos en patologías en las que se ha identificado que un agente activo o fármaco tiene actividad deseada, pero dicho agente activo o fármaco no se une a su diana con afinidad y/o especificidad deseada. Con dichos agentes activos o fármacos, los presentes métodos pueden usarse para potenciar la afinidad y/o especificidad de unión del agente por su diana.

Las patologías específicas que se pueden tratar con los presentes compuestos bifuncionales son tan variadas como los tipos de restos de fármaco que pueden estar presentes en la molécula bifuncional. Por tanto, las patologías incluyen enfermedades proliferativas celulares, tales como enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades de anormalidad hormonal, enfermedades infecciosas, y similares.

Por tratamiento se entiende al menos una mejora de los síntomas asociados con la patología que afecta al hospedador, donde la mejora se usa en un sentido amplio para hacer referencia a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma, asociado con la afección patológica que se está tratando, tal como la inflamación y el dolor asociados con la misma. Por tanto, el tratamiento también incluye situaciones en las que la afección patológica, o al menos los síntomas asociados con la misma, se inhiben completamente, por ejemplo, se evita que aparezcan, o se detienen, por ejemplo, terminan, de modo que el hospedador ya no sufra la afección patológica, o al menos los síntomas que caracterizan la afección patológica.

Se puede tratar una diversidad de hospedadores de acuerdo con los presentes métodos. Generalmente dichos hospedadores son “mamíferos”, donde dicho término se usa ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase mamíferos, incluyendo los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores serán seres humanos.

Se proporcionan kits con dosis unitarias de la molécula bifuncional, habitualmente en dosis orales o inyectables y a menudo en una formulación estable en almacenamiento. En dichos kits, además de los recipientes que contienen las dosis unitarias habrá un prospecto de información que describe el uso y beneficios consiguientes de los fármacos en el tratamiento de la afección patológica de interés. Los compuestos y dosis unitarias preferidas son los descritos en este documento anteriormente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Parte experimental

Ejemplo I

Moléculas Bifuncionales de pYEEI

Se usaron dominios SH2 de las tirosina quinasas Fyn y Lck así como el dominio SH2 N-terminal de PLCg para demostrar que la afinidad y la especificidad de un ligando que se une por múltiples proteínas puede mejorarse a través del uso de proteínas presentadoras. Aunque Fyn, Lck y PLCg tienen propiedades bioquímicas similares, se mejoraron en diferentes procesos de señalización que afectan a diferentes puntos finales biológicos. El ligando estudiado fue un péptido de fosfotirosina con la secuencia NH₂-pYEEI-COOH. Este péptido se une a los tres dominios SH2, Fyn, Lck y PLCg [Songyang *et al.* Cell (1993) 72, 767].

A. Síntesis de la Molécula Bifuncional

1. Síntesis de FKpYEEI

El péptido pYEEI se unió químicamente a FK506 para crear el ligando bifuncional, FKpYEEI (Figura 2). El resto FK506 puede unirse por la familia de proteínas de unión a FK506, las FKBP, que sirven como proteínas presentadoras en los experimentos descritos a continuación. La síntesis de FKpYEEI se basa en hacer reaccionar una forma activada de FK506, un carbonato mixto, con el grupo amino primario de pYEEI. La preparación del carbonato mixto implica varias etapas de oxidación. Para proteger los dos grupos hidroxilo de la oxidación, se hizo reaccionar una muestra de FK506 con triflato de terc-butildimetilsililo (TBSOTf) en la primera reacción. Un vial de 10 ml se cargó con FK506 (32 mg, 40 mmol), 2,6-lutidina (47 ml, 400 mmol, 10 equiv.), TBSOTf (47 ml, 200 mmol, 5 equiv.) y 3 ml de diclorometano destilado. La reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 45 min., empezando a 0°C y dejando que se calentara hasta temperatura ambiente. Para inactivar cualquier exceso de TBSOTf, se añadieron 25 equiv. de metanol (40 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 25 minutos. La reacción se extrajo dos veces con 10 ml de DCM en presencia de 10 ml bicarbonato sódico acuoso. La fase orgánica, que contenía 24,32-bis[(terc-butildimetilsilil)oxi]-FK506 (FK506-TBS2), se secó con sulfato de magnesio y posteriormente, se filtró y se evaporó hasta un aceite. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida usando una mezcla de hexano y acetato de etilo (5:1 a 3:1). Las fracciones que contenían FK506-TBS2 se combinaron y se evaporaron. El rendimiento fue de 35 mg.

2. Osmilación y Escisión Oxidativa

Un matraz de 10 ml se cargó con FK506-TBS2 (32 mg, 31 mmol), N-óxido de 4-metilmorfolina (21 mg, 155 mmol), agua (50 ml) y tetrahidrofurano (THF) (2 ml). Se añadió tetróxido de osmio (26 ml, 3,1 mmol, solución 0,12 M en agua) mediante una jeringa. La solución incolora transparente se agitó a temperatura ambiente durante 4,0 h. La reacción se diluyó con metanol acuoso al 50% (1 ml) y se añadió peryodato sódico (66 mg) en una porción. La mezcla turbia se agitó 25 min. a temperatura ambiente, se diluyó con éter (10 ml), y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (10 ml). Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con éter (2x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y sulfato sódico sólido (50 mg). La fase orgánica después se filtró y se concentró.

3. Reducción

El aldehído 1 se disolvió inmediatamente en THF (2 ml) y se enfrió hasta -78°C en una atmósfera de nitrógeno, y se trató con hidruro de tris[(3-etil-3-pentil)oxi]aluminio y litio (63 ml, 8,8 mmol, 1 equiv.). La solución transparente se agitó durante 60 min. a -78°C, después se inactivó con éter (3 ml) y cloruro de amonio acuoso saturado (200 ml). La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se añadió sulfato sódico sólido para secar la solución. La mezcla se agitó 20 min., se filtró, se concentró, y el aceite resultante se disolvió inmediatamente en acetonitrilo (2 ml).

4. Carbonato Mixto

A la solución del alcohol primario 2 en acetonitrilo (2 ml) se añadió 2,6-lutidina (36 ml, 0,31 mmol, 10 equiv.) y carbonato de N,N'-disuccinimidilo (40 mg, 0,16 mmol, 5 equiv.). La mezcla heterogénea se agitó a temperatura ambiente durante 19 h, momento en el cual la solución se diluyó con éter (10 ml) y se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado (5 ml). La solución acuosa se extrajo de nuevo con éter (2x10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron (MgSO₄), se concentraron y se sometieron a cromatografía ultrarrápida (hexano/acetato de etilo 3:1 a 2:1 a 1:1). El carbonato mixto deseado 3 se aisló en forma de un aceite incoloro, transparente (7,1 mg, 6 mmol).

5. Acoplamiento del péptido pYEEI

Un vial de 1 ml se cargó con el carbonato mixto (7 mg, 5,95 mmol), péptido pYEEI (7,7 mg, 11,9 mmol, 2 equiv.) y trietilamina (21 ml, 119 mmol, 20 equiv.) junto con dimetilformamida (400 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Para la desprotección de TBS2-FKpYEEI, la reacción se transfirió en un tubo eppendorf de polipropileno de 1,5 ml. Se añadió acetonitrilo (100 ml) para llevar el volumen de reacción a 500 ml. Después, se pipeteó ácido fluorhídrico (55 ml) en la reacción. La reacción se agitó durante 16 h y, después, se interrumpió con trietilamina (160 ml). La mezcla de reacción se liofilizó hasta un aceite amarillo. El aceite se recogió en acetonitrilo acuoso al 33% y ácido trifluoroacético al 0,1%. La separación de FKpYEEI del péptido sin reaccionar se consiguió por HPLC (columna: Supelco LC-18 CI8, 100Å). Por análisis de aminoácidos se descubrió que el rendimiento de la síntesis era de 1 mg de FKpYEEI.

B. *Síntesis de SLFpYEEI*

Se sintetizó SLF de acuerdo con los procedimientos de Holt *et al.* [J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 9925]. SLF se acopló al extremo N-terminal del péptido pYEEI protegido unido a la resina usando PyBOP. El SLFpYEEI heterodimérico se desprotegió y se escindió de la resina Novasyn TGT (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, Ca.) usando ácido trifluoroacético al 25% y triisopropil silano al 2,5% en cloruro de metileno y el producto deseado se aisló usando HPLC de fase inversa.

C. *FKBP Recombinantes*

Como proteínas presentadoras, se usaron FKBP12 y FKBP52, dos FKBP que se unen a FK506 con elevada afinidad (0,4 nM y 44 nM, respectivamente). FKBP12 o FKBP52 recombinantes se unen al resto FK506 de FKpYEEI, creando de este modo una superficie de unión agrandada. FKBP12 recombinante se expresó como una proteína de fusión a GST y unida a perlas de glutatión (Pharmacia). Usando trombina (Sigma) para escindir la proteína de fusión GST-FKBP12 en un sitio de escisión de trombina en el enlazador entre GST y FKBP12, podía liberarse FKBP12 recombinante de las perlas de glutatión mientras GST permanecía unido. FKBP52 se expresó con una marca de seis restos de histidina en su extremo N-terminal (vector de expresión pET28c, Novagen). La proteína recombinante se unió mediante la marca de histidina a perlas de Ni²⁺ NTA agarosa (Qiagen), se lavó extensivamente y se eluyó con imidazol. El tampón de elución de FKBP52 se dializó durante una noche frente al tampón usado en las reacciones de unión (Tris 20 mM pH 7,2, NaCl 150 mM). Para establecer la afinidad del complejo FKBP-FKpYEEI por los tres dominios SH2, se desarrolló el ensayo de competición.

D. *El Ensayo*

El péptido pYEEI se acopló a perlas Affi-Gel 10 (Biorad) mediante su grupo amino. Los dominios SH2 Fyn, Lck y PLCg se expresaron en bacterias como proteínas de fusión a GST. El enlazador entre la proteína GST y el dominio SH2 contenía un sitio de escisión de trombina y un sitio de fosforilación de proteína quinasa A (PKA). La proteína de fusión en perlas de glutatión se marcó radiativamente en el sitio de fosforilación de PKA usando PKA (Sigma). Después de lavado extensivo de las perlas, se liberó el dominio SH2 radiactivo por escisión con trombina (Sigma). En un ensayo de unión típico, se incubaron 7,5 ml de una suspensión de péptido-perlas 1:1 con el dominio SH2 radiactivo (200 nM) durante 2 horas en 100 ml de tampón de unión (Tris 20 mM pH 7,2; NaCl 150 mM). Para separar la proteína radiactiva unida a las perlas, la reacción de unión se transfirió a un tubo de PCR (USA Scientific Plastic), cuya parte inferior se había perforado con una aguja de calibre 26. El tubo de PCR se puso en un tubo Eppendorf de 0,5 ml que a su vez se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml convencional. Los tubos se centrifugaron durante 1 segundo a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf provocando la separación de las perlas restantes en el tubo de PCR y el sobrenadante, que se recogió en el tubo Eppendorf de 0,5 ml. Las perlas se resuspendieron en 100 ml de PBS y se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido después de la adición de 3 ml de fluido de centelleo. La radiactividad restante en los 100 ml de sobrenadante se contó del mismo modo. Se determinó que en las condiciones descritas se unió el 65% de los dominios SH2 Fyn, el 25% de PLCg y el 15% de Lck a las perlas. Aumentando la cantidad de perlas, se podía unir hasta el 80% de Fyn, el 40% de PLCg y el 25% de Lck. Estas cantidades reflejan la fracción activa de dominios SH2 en las diferentes preparaciones de proteína. No había indicios de que la proteína inactiva interfiriera en el ensayo de unión.

1. *Experimentos*

SLFpYEEI y FKpYEEI son moléculas bifuncionales que pueden unirse a FKBP12 y FKBP52 así como al dominio SH2 Fyn (Figura 2). Las constantes de unión (valores K_d) de las moléculas bifuncionales para las tres proteínas se midieron usando calorimetría de valoración isotérmica (ITC) (Tabla 1).

TABLA 1

Constantes de Unión (Kd) para los Compañeros de Interacción Usados en este Estudio

	FKpYEEI	SLFpYEEI	SLF	FK506
KFBP12	45 nM	61 nM	20 nM	0,4 nM
FKBP52	150 nM	5 µM	3 µM	44-66 nM
Dominio SH2 Fyn	520 nM	183 nM	n.d.	n.d.
Las constantes de unión de KFBP12, KFBP52, y Fyn para SLF, SLFpYEEI y FKpYEEI se determinaron usando un Calorímetro de Valoración Isotérmica Omega (Microcal, Northampton, Ma.). La proteína en el tampón acuoso (20-60 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, Tris 20 mM) se equilibró en la celda microcalorimétrica a 25°C durante 1-2 h después de desgasificarse durante 10 min. El ligando, en tampón idéntico al de la proteína (170-600 mM), se recogió en una jeringa de 250 µl después de desgasificarse durante 10 min. La jeringa se cargó en la celda, se centrifugó a 400 rpm y se dejó equilibrar durante 1-2 h. El ligando se inyectó en la celda (25 x 10 µl, separación de 6 min.) y se cuantificó el calor que se desarrolló. Las constantes de unión se calcularon a partir de un ajuste numérico a los datos experimentales como se describe en (Wiseman et al., Anal. Biochem. (1989), 179, 131). n.d.: no determinado				

Para determinar la afinidad relativa de los dominios SH2 por FKpYEEI o SLFpYEEI solos y FKpYEEI o SLFpYEEI unidos a FKBP12 y FKBP52, se usó el siguiente ensayo de competición. Se incubaron dominios SH2 radiactivos con perlas de péptido pYEEI y FKpYEEI o SLFpYEEI en presencia o ausencia de las proteínas FKBP respectivas. FKpYEEI y FKpYEEI/FKBP así como SLFpYEEI y SLFpYEEI/FKBP compiten por la unión de los dominios SH2 con las perlas de péptido. Cuanto mayor es la afinidad del ligando FKpYEEI o SLFpYEEI en el sobrenadante, menos dominios SH2 se unen a las perlas de péptido (Figura 3).

Los siguientes experimentos sugieren que la formación de un complejo binario entre una proteína endógena como FKBP y una molécula bifuncional como FKpYEEI o SLFpYEEI puede potenciar la afinidad, la especificidad y la selectividad de un ligando de molécula pequeña tal como el péptido pYEEI.

a. Potenciación de la afinidad

i. En presencia de FKBP52, FKpYEEI puede unirse al dominio SH2 Fyn con mayor afinidad

Usando el ensayo de unión competitiva descrito anteriormente, se añadió FKpYEEI a perlas de péptido y el dominio SH2 Fyn en presencia de concentraciones crecientes de FKBP52 (Figura 4). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 µl, se incubó el dominio SH2 Fyn (200 nM) con 7,5 µl de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron nada de FKpYEEI, FKpYEEI 1,0 mM o FKpYEEI 1,0 mM más concentraciones crecientes de FKBP52 (0,25-4,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante se separó de las perlas por rotación de las reacciones de unión en tubos de PCR perforados durante 1 segundo en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Las perlas se resuspendieron en 100 µl de PBS y se contó la radiactividad unida a las perlas en un vial de centelleo líquido durante 30 segundos. La radiactividad unida a las perlas en presencia de solamente los dominios SH2 Fyn se representó como el 100% de unión máxima del dominio SH2 Fyn a perlas pYEEI. La radiactividad unida en presencia de FKpYEEI y FKBP52 se calculó como el porcentaje de la unión máxima del dominio SH2 Fyn. Cada reacción de unión se hizo por triplicado. Los datos puntuales reflejan el promedio de las tres reacciones de unión. Las barras de error indican el error típico.

Los resultados muestran que cuanto más FKBP52 está presente, menos Fyn se une por las perlas de péptido. FKpYEEI se une a FKBP52 y forma un complejo binario. En el contexto de este complejo binario, FKpYEEI tiene

una afinidad mayor por el dominio SH2 Fyn que se refleja en las cantidades decrecientes de unión del dominio SH2 Fyn a las perlas de péptido.

ii. *FK506 revierte el efecto de FKBP52*

Para verificar que el efecto potenciador de la afinidad se basa en un complejo binario formado por la unión de FKpYEEI al bolsillo de unión a FK506 de FKBP52, se añadieron concentraciones crecientes de FK506 a la reacción de unión que contenía el dominio SH2 Fyn, FKpYEEI y FKBP52 (Figura 5). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 µl, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado radiactivamente (200 nM) con 7,5 µl de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron FKpYEEI (1,0 mM), FKpYEEI (1,0 mM) más FKBP52 (2,0 mM) y FKpYEEI (1,0 mM) más FKBP52 (2,0 mM) más concentraciones crecientes de FK506 (0,25-15,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Los resultados muestran que según aumenta la concentración de FK506, se revierte el efecto potenciador de la afinidad de FKBP52. FK506 libre se une al bolsillo de unión a FK506 de FKBP52 con mayor afinidad que FKpYEEI (véase la Tabla 1). Por lo tanto, la pérdida del efecto potenciador de la afinidad se debe a la disociación del complejo binario formado entre FKBP52 y FKpYEEI.

iii. *La presencia de FKBP52 aumenta la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 Fyn en tres veces*

La Figura 6 es un gráfico de las curvas de unión competitiva para el dominio SH2 Fyn y FKpYEEI así como el dominio SH2 Fyn y el péptido pYEEI en ausencia y presencia de FKBP52. Se incubó el dominio SH2 Fyn con perlas de péptido y concentraciones crecientes de FKpYEEI en ausencia o presencia de FKBP52. Específicamente, en este ensayo, en reacciones de unión de 100 µl, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado radiactivamente (200 nM) con 7,5 µl de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron concentraciones crecientes de FKpYEEI o pYEEI (0,1-20,0 mM) en presencia o ausencia de FKBP52 (4,5 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. La unión mitad de la máxima (IC₅₀) se observa a FKpYEEI 750 nM en ausencia de FKBP52. En presencia de FKBP52, el valor de IC₅₀ es 250 nM. Por tanto, en un complejo con FKBP52, la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 Fyn se potencia en un factor de tres. La IC₅₀ del péptido pYEEI es 1,1 mM. Por tanto, FKpYEEI en el contexto de FKBP52 muestra una potenciación de factor 4,4 de la afinidad con respecto a pYEEI. Usando ITC, se determinó la constante de unión (K_d) para la unión del dominio SH2 Fyn al complejo FKpYEEI-FKBP52. El valor K_d para este acontecimiento de unión es 130 nM. Ésta es una potenciación de factor cuatro sobre la K_d de la unión del dominio SH2 Fyn a FKpYEEI solo (Tabla 1) y este resultado confirma los datos obtenidos del ensayo de unión competitiva.

iv. *La presencia de FKBP12 no aumenta la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 Fyn*

La estructura del dominio de unión a FK506 de FKBP52 es muy similar a la estructura de FKBP12 (Craescu *et al.*, Biochemistry 1996, 35, 11045). Para ensayar si la potenciación de la afinidad observada puede conseguirse por la formación de un complejo binario con FKBP12, se añadieron concentraciones crecientes de FKBP12 a reacciones de unión que contenían el dominio SH2 Fyn y FKpYEEI (Fig. 7). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 µl, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado radiactivamente (200 nM) con 7,5 µl de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron nada de FKpYEEI, FKpYEEI 1,0 mM o FKpYEEI 1,0 mM más concentraciones crecientes de FKBP12 (0,25-4,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados indican que la formación de un complejo binario entre FKpYEEI y FKBP12 no potencia la afinidad de unión por el dominio SH2 Fyn.

En resumen, los experimentos anteriores muestran que un complejo binario de FKBP52 y FKpYEEI se une al dominio SH2 Fyn con una afinidad mayor que FKpYEEI o pYEEI solo. Como FKBP12 se une a FKpYEEI del mismo modo que FKBP52 pero no mantiene este efecto, el aumento en la afinidad debe basarse en interacciones proteína-proteína favorables entre el dominio SH2 Fyn y FKBP52.

b. *Potenciación de la especificidad*

i. *FKBP12 reduce la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 PLCg*

El complejo binario de FKpYEEI y FKBP12 tiene la misma afinidad por el dominio SH2 Fyn que FKpYEEI libre (véase la Figura 7). Para ensayar si el complejo FKpYEEI-FKBP12 tiene un efecto sobre la unión del dominio SH2 PLCg, se añadieron concentraciones crecientes de FKBP12 a reacciones de unión que contenían el dominio SH2 PLCg y FKpYEEI (Figura 8). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 µl, se incubó el dominio SH2 PLCg marcado radiactivamente (400 nM) con 7,5 µl de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron nada de FKpYEEI, FKpYEEI 1,0 mM o FKpYEEI 1,0 mM más concentraciones crecientes de FKBP12 (0,5-4,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que según aumenta la cantidad de FKBP12, más dominios SH2 PLCg se unen a las perlas de péptido. Por tanto, el complejo binario de FKpYEEI-FKBP12 tiene una afinidad disminuida por el dominio SH2 PLCg en comparación con FKpYEEI libre.

ii. *La reducción en la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 PLCg en presencia de FKBP12 se revierte por FK506*

Para ensayar si la reducción de la afinidad se debe a la unión de FKpYEEI en el bolsillo de unión a FK506 de FKBP12, se añadieron concentraciones crecientes de FK506 a las reacciones de unión que contenían el dominio SH2 PLCg, FKpYEEI y FKBP 12 (Figura 9). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubó el dominio SH2 PLCg marcado radiactivamente (400 nM) con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron FKpYEEI (1,5 mM), FKpYEEI (1,5 mM) más FKBP12 (2,0 mM) y FKpYEEI (1,5 mM) más FKBP12 (2,0 mM) más concentraciones crecientes de FK506 (1,0-5,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que según aumenta la concentración de FK506, se revierte la reducción de la afinidad. Por tanto, la pérdida de afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 PLCg depende de la formación del complejo binario con FKBP12. Esto sugiere que contactos proteína-proteína desfavorables entre FKBP12 y el dominio SH2 PLCg son la base para la unión reducida.

iii. *El complejo binario FKBP12-FKpYEEI reduce la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 PLCg pero no por el dominio SH2 Fyn o Lck*

Para ensayar si la presencia de FKBP12 afecta a la afinidad de FKpYEEI por otros dominios SH2 a parte del dominio SH2 PLCg, se añadieron FKpYEEI y FKBP12 a reacciones de unión que contenían los dominios SH2 Fyn, Lck o PLCg (Figura 10). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubó el dominio SH2 PLCg (200 nM), el dominio SH2 Lck (800 nM) y el dominio SH2 Fyn (200 nM) marcado radiactivamente con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron FKpYEEI (1,5 mM), FKpYEEI (1,5 mM) más FKBP12 (2,0 mM) y FKpYEEI (1,5 mM) más FKBP12 (2,0 mM) más FK506 (4,0 mM) a las reacciones del dominio SH2 PLCg. Se añadieron FKpYEEI (1,0 mM), FKpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 (2,0 mM) y FKpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 (2,0 mM) más FK506 (4,0 mM) a los dominios SH2 Lck y Fyn. Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que el complejo FKpYEEI-FKBP12 no afecta a la afinidad de FKpYEEI por el dominio SH2 Fyn o Lck. Por tanto, el complejo FKpYEEI-FKBP12 crea especificidad manteniendo la unión de los dominios SH2 Fyn y Lck reduciendo al mismo tiempo la unión al dominio SH2 PLCg.

En resumen, los experimentos anteriores muestran que la formación de un complejo binario puede conducir a interacciones proteína-proteína desfavorables entre la proteína presentadora y algunas dianas pero no otras dianas del fármaco. Por lo tanto, la formación de un complejo entre una molécula bifuncional y una proteína presentadora puede usarse para crear especificidad.

c. *Potenciación de la selectividad*

i. *FKBP12 reduce la afinidad de SLFpYEEI por el dominio SH2 Fyn*

En comparación con FKpYEEI, SLFpYEEI presenta el péptido pYEEI en una orientación diferente y en una distancia diferente con respecto a la superficie de la proteína FKBP12. Para ensayar si el complejo binario SLFpYEEI-FKBP12 afecta a la unión del dominio SH2 Fyn de forma diferente que SLFpYEEI libre, se añadieron concentraciones crecientes de FKBP12 a las reacciones de unión que contenían SLFpYEEI y el dominio SH2 Fyn (Figura 11). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado radiactivamente (200 nM) con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron SLFpYEEI (1,0 mM) y SLFpYEEI (1,0 mM) más concentraciones crecientes de FKBP12 (0,25-4,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. La adición de FKBP12 aumenta la cantidad de unión del dominio SH2 Fyn a las perlas de péptido. Esto indica que el complejo SLFpYEEI-FKBP12 muestra afinidad reducida por el dominio SH2 Fyn.

ii. *FK506 revierte el efecto de la actividad de unión disminuida del complejo SLFpYEEI-FKBP12*

Para verificar que la afinidad reducida del dominio SH2 Fyn se basa en la unión de SLFpYEEI al bolsillo de unión a FK506 de FKBP12, se añadieron concentraciones crecientes de FK506 a reacciones de unión que contenían el dominio SH2 Fyn, SLFpYEEI y FKBP 12 (Fig. 12). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado radiactivamente (200 nM) con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron SLFpYEEI (1,0 mM) y SLFpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 (2,0 mM) y SLFpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 más concentraciones crecientes de FK506 (1,0-3,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. FK506 revierte el efecto de la afinidad reducida de SLFpYEEI por el dominio SH2 Fyn en presencia de FKBP12. Por tanto, el complejo binario de SLFpYEEI y FKBP12 establece interacciones proteína-proteína desfavorables entre FKBP12 y el dominio SH2 Fyn de modo que se reduce la afinidad con la que tiene lugar el acontecimiento de unión.

iii. *La presencia de FKBP12 disminuye la afinidad de SLFpYEEI por el dominio SH2 Fyn en seis veces*

La Figura 13 es un gráfico de las curvas de unión competitiva para el dominio SH2 Fyn y SLFpYEEI en ausencia y presencia de FKBP12. El dominio SH2 Fyn se incubó con concentraciones crecientes de SLFpYEEI en ausencia o presencia de FKBP12. En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubó el dominio SH2 Fyn marcado

radiactivamente (200 nM) con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron concentraciones crecientes de SLFpYEEI (0,1-20,0 mM) en presencia o ausencia de FKBP12 (20 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. La unión la mitad de la máxima (IC₅₀) se observa a 0,25 mM de SLFpYEEI en ausencia de FKBP12. En presencia de FKBP12, el valor de IC₅₀ es 1,5 mM. Por tanto, en un complejo con FKBP12, se reduce la afinidad de SLFpYEEI por el dominio SH2 Fyn en un factor de seis. Este efecto se confirmó por ITC. La K_d de la unión del dominio SH2 Fyn a SLFpYEEI libre es de 183 nM (Tabla 1) y la K_d para la unión del complejo SLFpYEEI-FKBP12 es de 1,5 mM.

iv. *El complejo SLFpYEEI-FKBP12 muestra unión reducida al dominio SH2 Fyn así como los dominios Lck y PLCg*

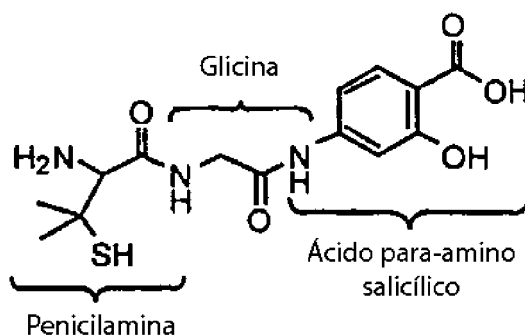
Para ensayar si los dominios SH2 PLCg y Lck se unen a SLFpYEEI-FKBP12 con afinidad reducida, estos dominios SH2 junto con el dominio SH2 Fyn se incubaron con SLFpYEEI solo o SLFpYEEI y FKBP12 (Figura 14). En este ensayo, en reacciones de unión de 100 ml, se incubaron dominios SH2 Fyn, Lck y PLCg marcados radiactivamente (200 nM) con 7,5 ml de una suspensión de perlas pYEEI 1:1. Se añadieron SLFpYEEI (1,0 mM) y SLFpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 (2,0 mM) y SLFpYEEI (1,0 mM) más FKBP12 (2,0 mM) más FK506 (3,0 mM). Las reacciones de unión se rotaron a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente. No solamente el dominio SH2 Fyn, sino también los dominios SH2 Lck y PLCg muestran unión reducida por el complejo binario.

En resumen, los experimentos anteriores muestran que la formación de un complejo binario puede reducir enormemente la unión del fármaco a todas sus dianas en una célula que contiene la molécula presentadora. Si un organismo tiene células que contienen la proteína presentadora y otras células que no contienen el presentador, entonces, las células que carecen de la proteína presentadora se verán más afectadas por la actividad de la molécula bifuncional que las células que expresan el presentador.

Ejemplo II

Actividad de la Molécula Bifuncional Penicilamina Ácido Para-Amino Salicílico

Para determinar si podría conseguirse especificidad de isoforma por unión química de un fármaco a un ligando a una proteína extracelular, se sintetizó el compuesto 1 mostrado a continuación en la figura 1. El compuesto 1 consta de un resto penicilamina acoplado mediante un enlazador de glicina a ácido para-amino salicílico, un ligando conocido para la albúmina con una IC₅₀ de 5 mM. La penicilamina es un inhibidor de la enzima fosfatasa alcalina, con valores de IC₅₀ en el intervalo mM para una amplia diversidad de isoformas de fosfatasa alcalina. Se concluyó que reclutando albúmina a la superficie de la fosfatasa alcalina usando el compuesto bifuncional 1, se podría modular la afinidad eficaz de la penicilamina por su diana, la fosfatasa alcalina.



Estructura del Compuesto Heterodimérico 1

Las reacciones se realizaron en tampón dietanolamina 200 mM, pH 10, con fosfato de metilumbeliferal como sustrato. La reacción se controló registrando la fluorescencia del producto de hidrólisis (excitación a 355 nM, fluorescencia a 460 nM), y el primer 10% de la reacción se usó para determinar la velocidad de la reacción.

Los resultados están dispuestos a modo de tabla en la siguiente tabla 2. En presencia de albúmina sérica humana 100 mM, se observa que el compuesto 1 es un mejor inhibidor para cuatro de las enzimas ensayadas con relación a la inhibición observada en ausencia de albúmina. Para las otras ocho enzimas ensayadas, no se observaron cambios en el valor de IC₅₀ en presencia o ausencia de albúmina. Se observó que los valores de IC₅₀ disminuían casi 2 veces para las isoformas de intestino de anguila y placenta humana de la enzima, y casi 12 veces para las isoformas de intestino de conejo y gamba.

TABLA 2

Valores de IC50 del Compuesto 1 para Isoformas de Fosfatasa Alcalina en Presencia y Ausencia de Albúmina Sérica Humana 100 mM

	Fuente de la Enzima	IC50 (sin albúmina)	IC50 (albúmina 100 µM)
10	Intestino de ternero	20 µM	20 µM
	Intestino de conejo	300 µM	25 µM
15	Bacterias	50 µM	50 µM
	Intestino de perro	20 µM	20 µM
	Riñón porcino	50 µM	50 µM
20	Intestino de cobaya	80 µM	80 µM
	Intestino de anguila	110 µM	70 µM
25	Mucosa intestinal porcina	50 µM	50 µM
	Leche bovina	50 µM	50 µM
30	Placenta humana	300 µM	45 µM
	Gamba	3 mM	80 µM

Ejemplo III

Experimento de Selectividad Usando Moléculas Bifuncionales para Destoxificar Agentes Antimicrobianos

A. Introducción

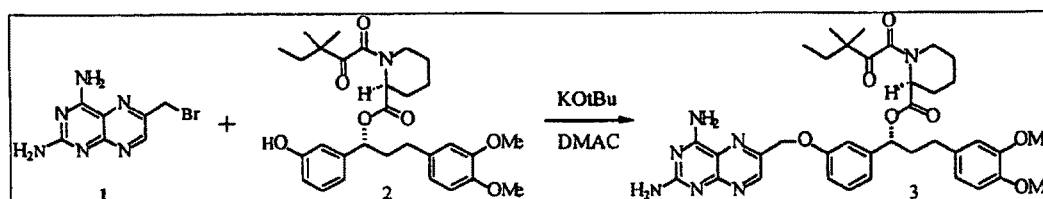
Muchas moléculas que contienen la estructura de anillo bicíclico 2,4-diaminopteridina son inhibidores de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y estas moléculas habitualmente tienen fuerte actividad antimicrobiana. Sin embargo, la estructura pteridina sola no es muy atractiva para uso extendido como anti-infeccioso porque es un inhibidor no selectivo de DHFR: afecta no solamente a la DHFR microbiana sino que también inhibe el homólogo humano. Como resultado, el tratamiento de un paciente con pteridinas a menudo causa efectos secundarios y toxicidad. Para reducir la capacidad del núcleo pteridina de unirse a DHFR humana, un derivado de pteridina se une covalentemente a un ligando de FKBP (por ejemplo, SLF, FK506, etc.). En base a los datos de la relación estructura-actividad (SAR), la pteridina y el ligando de FKBP se unen de tal modo que su unión a DHFR y FKBP, respectivamente, esté lo menos afectaba posible.

B. Síntesis

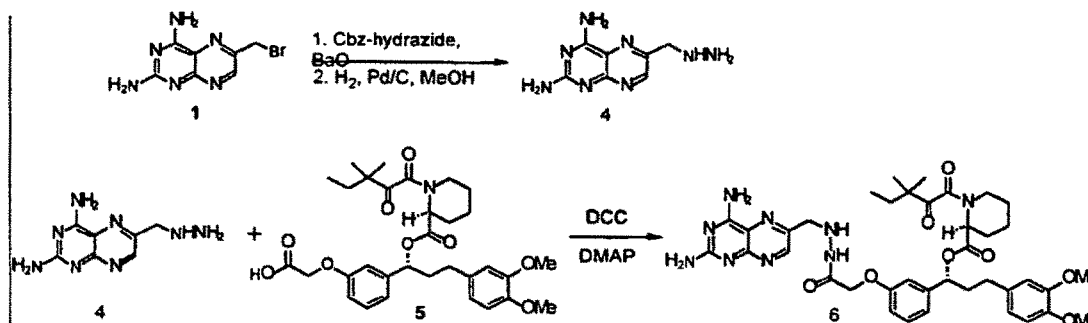
A continuación se proporciona un protocolo de síntesis representativo para la producción de un compuesto bifuncional pteridina-SLF. Se emplean protocolos análogos para producir compuestos bifuncionales de pteridina y otros ligandos de FKBP, tales como FK506.

En el caso de las pteridinas, los datos SAR sugieren que la posición del alquilo en la posición C6 es la mejor para su derivatización para no alterar la unión a DHFR. La estructura co-cristalina de SLF y FKBP junto con los datos SAR revela que la mejor posición para derivatizar SLF es el grupo hidroxilo fenólico. Para obtener una molécula con las propiedades deseadas, se usan diversos enlazadores para conectar la pteridina y SLF. Se muestran dos ejemplos.

La síntesis de dos moléculas bifuncionales pteridina-SLF con dos enlaces diferentes requiere las siguientes reacciones:



Ejemplo 1: Una solución de 2,4-diamino-6-bromometilpteridina (1) en dimetilacetamida (Rosowsky *et al.*, J. Med. Chem., 1985, 28, 660-667) se combina con ligando de FKBP sintético 2 (D. Holt *et al.*, JACS, 1993, 115, 9925) con 2 equivalentes de terc-butoxido potásico y se agita a temperatura ambiente durante 24-48 h. La reacción se controla por cromatografía en capa fina (TLC, cloroformo/metanol 9/1). Cuando la reacción está completa, el disolvente se retira a presión reducida, y el producto se purifica usando cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo/metanol 19/1 como eluyente para proporcionar la molécula bifuncional deseada 3.



Ejemplo 2: Una solución de 2,4-diamino-6-bromometilpteridina (1) (Rosowsky, *et al.*) se disuelve en dimetilacetamida y se combina con 1 equivalente de carbobenzoilhidrazida y 1 equivalente de óxido de bario y se agita en una atmósfera de argón a 46°C durante 24 h. La reacción se controla por TLC con cloroformo/metanol 9/1 y se purifica directamente usando cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo/metanol 9/1 como eluyente. El producto intermedio se reduce usando hidrogenación catalítica con catalizador de Pd al 10%/C y presión de hidrógeno atmosférico en metanol. La reacción se controla por TLC (cloroformo/metanol 4/1) y el producto 4 se aísla filtrando la mezcla a través de celite para retirar el catalizador sólido y eliminando el metanol a presión reducida. El producto 4 se acopla a SLF (5) (Holt *et al.*) usando diciclohexilcarbodiimida y DMAP catalítico en dimetilformamida. La reacción se controla por TLC (cloroformo/metanol 19/1) y el producto 6 se aísla usando cromatografía sobre gel de sílice (cloroformo/metanol 19/1 como eluyente).

C. Ensayos

Ensayo *in vitro*

Las moléculas bifuncionales resultantes de pteridina-ligando de FKBP se ensayan en un ensayo de inhibición de DHFR *in vitro* para seleccionar una molécula con las propiedades deseadas. La molécula deseada cumple los siguientes requisitos:

1. En un ensayo de inhibición de DHFR la molécula bifuncional deseada de pteridina-ligando de FKBP inhibe la actividad de DHFR de un modo dependiente de la concentración. Las moléculas que no son capaces de inhibir DHFR de forma eficaz se descartan. En estas moléculas, el enlazador entre la pteridina y el ligando de FKBP afecta a la actividad de la pteridina.

2. Cuando se repite el ensayo de inhibición de DHFR *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de FKBP, se disminuye la capacidad de la molécula deseada de pteridina-ligando de FKBP de inhibir DHFR en correlación con concentraciones crecientes de FKBP. Las moléculas de pteridina-ligando de FKBP, que pueden inhibir DHFR a pesar de FKBP, se descartan porque los enlazadores de estas moléculas interfieren con la unión de la molécula bifuncional a FKBP o los enlazadores no mantienen los choques estéricos entre las superficies de FKBP y DHFR.

3. La reducción de la actividad de la molécula bifuncional deseada de pteridina-ligando de FKBP en presencia de FKBP se basa en la unión a FKBP mediante el resto de ligando de FKBP. Para demostrar esto, se repite el ensayo en presencia de molécula bifuncional de pteridina-ligando de FKBP, FKBP y concentraciones crecientes de FK506

que compite con el resto de ligando de FKBP de la molécula bifuncional por la unión a FKBP. Según se aumenta la concentración de FK506, se recupera la actividad de la molécula bifuncional de pteridina-ligando de FKBP porque FK506 reemplaza el resto de ligando como ligando para FKBP. La molécula bifuncional pteridina-ligando de FKBP libre puede unirse de nuevo e inhibir la actividad de DHFR.

La molécula bifuncional deseada cumple los tres requisitos indicados. Su uso como inhibidor selectivo se demuestra en los siguientes ensayos basados en células.

Ensayo bacteriano

La molécula bifuncional deseada puede inhibir la actividad DHFR *in vivo*. *E. coli* no expresa FKBP y las células no tienen otra proteína de unión al ligando de FKBP (por ejemplo, SLF o FK506). Cuando se incuban cultivos de *E. coli* con concentraciones crecientes de molécula bifuncional, se inhibe el crecimiento de los cultivos de un modo dependiente de la concentración. Cuando estas células se transforman con un vector que permite la expresión inducible de FKBP humana, las bacterias llegan a ser menos sensibles a la molécula bifuncional cuando se expresa FKBP. Para demostrar que esta destoxificación de la molécula bifuncional se basa en la unión a FKBP, se añaden concentraciones crecientes de FK506 al medio de cultivo. FK506 compite con la molécula bifuncional por la unión a FKBP de modo que están presentes concentraciones crecientes de molécula bifuncional libre que pueden inhibir DHFR. FK506 por sí misma no tiene efecto sobre el crecimiento de los cultivos bacterianos en presencia o ausencia de FKBP.

Este ensayo demuestra que la presencia de FKBP protege a las células de la actividad inhibidora de DHFR de la molécula bifuncional pteridina-ligando de FKBP. Esta observación es la base para crear agentes anti-microbianos selectivos de células que muestren toxicidad reducida en seres humanos.

Es evidente, a partir de los resultados anteriores y el análisis que proporciona la presente invención, una herramienta potente para mejorar la afinidad y/o especificidad y selectividad de fármacos. Por tanto, el presente método proporciona la mejora de fármacos actualmente en uso, por ejemplo, reduciendo efectos secundarios indeseados. Además, los presentes métodos pueden usarse para mejorar fármacos que han sido, hasta ahora, clínicamente inservibles debido a la considerable toxicidad en seres humanos y animales. Por lo tanto, la invención proporciona utilidad potencial de una diversidad de compuestos biológicamente activos previamente descubiertos y descartados. Por consiguiente, la invención proporciona un avance importante en la ciencia farmacológica.

La mención de cualquier publicación es para su descripción previa a la fecha de presentación y no debe entenderse como una admisión de que la presente invención no está facultada a antedatar dicha publicación en virtud de la invención previa.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| • WO 9101743 A [0007] | • US 5358952 A [0042] |
| • WO 9418317 A [0007] | • US 5318965 A [0042] |
| • WO 9502684 A [0007] | • US 5223503 A [0042] |
| • WO 9510302 A [0007] | • US 5214068 A [0042] |
| • WO 9606111 A [0007] | • US 5196424 A [0042] |
| • WO 9612796 A [0007] | • US 5109024 A [0042] |
| • WO 9613613 A [0007] | • US 5106996 A [0042] |
| • WO 9725074 A [0007] | • US 5101072 A [0042] |
| • WO 9729372 A [0007] | • US 5077404 A [0042] |
| • WO 9811437 A [0007] | • US 5071848 A [0042] |

ES 2 347 027 T3

	• WO 9847916 A [0007]	• US 5066493 A [0042]
	• US 5830462 A [0007]	• US 5019390 A [0042]
5	• US 5843440 A [0007]	• US 4996229 A [0042]
	• US 5871753 A [0007]	• US 4996206 A [0042]
	• US 5880161 A [0042]	• US 4970318 A [0042]
10	• US 5877206 A [0042]	• US 4968800 A [0042]
	• US 5786344 A [0042]	• US 4962114 A [0042]
15	• US 5760041 A [0042]	• US 4927828 A [0042]
	• US 5753668 A [0042]	• US 4892887 A [0042]
	• US 5698529 A [0042]	• US 4889859 A [0042]
20	• US 5684004 A [0042]	• US 4886790 A [0042]
	• US 5665715 A [0042]	• US 4882334 A [0042]
25	• US 5654484 A [0042]	• US 4882333 A [0042]
	• US 5624924 A [0042]	• US 4871746 A [0042]
	• US 5618813 A [0042]	• US 4863955 A [0042]
30	• US 5610292 A [0042]	• US 4849563 A [0042]
	• US 5597831 A [0042]	• US 4845216 A [0042]
35	• US 5530026 A [0042]	• US 4833145 A [0042]
	• US 5525633 A [0042]	• US 4824955 A [0042]
	• US 5525606 A [0042]	• US 4785085 A [0042]
40	• US 5512678 A [0042]	• US 476925 A [0042]
	• US 5508277 A [0042]	• US 4684747 A [0042]
45	• US 5463181 A [0042]	• US 4618685 A [0042]
	• US 5409893 A [0042]	• US 4611066 A [0042]
	• US 4550187 A [0042]	• US 4459306 A [0042]
50	• US 4550186 A [0042]	• US 4443451 A [0042]
	• US 4544501 A [0042]	• US 4397853 A [0042]
55	• US 4541956 A [0042]	• US 4358451 A [0042]
	• US 4532327 A [0042]	• US 4324787 A [0042]
	• US 4490540 A [0042]	• US 4314081 A [0042]
60	• US 4399283 A [0042]	• US 4313896 A [0042]
	• US 4391982 A [0042]	• US 4294828 A [0042]
65	• US 4383994 A [0042]	• US 4277476 A [0042]
	• US 4294763 A [0042]	• US 4267328 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4283394 A [0042]	• US 4264499 A [0042]
	• US 4246411 A [0042]	• US 4231930 A [0042]
5	• US 4214089 A [0042]	• US 4194009 A [0042]
	• US 4150231 A [0042]	• US 4188388 A [0042]
	• US 4147798 A [0042]	• US 4148796 A [0042]
10	• US 4056673 A [0042]	• US 4128717 A [0042]
	• US 4029661 A [0042]	• US 4062858 A [0042]
15	• US 4012448 A [0042]	• US 4031226 A [0042]
	• US 5192799 A [0042]	• US 4020072 A [0042]
	• US 5036070 A [0042]	• US 4018895 A [0042]
20	• US 4778800 A [0042]	• US 4018779 A [0042]
	• US 4753951 A [0042]	• US 4013672 A [0042]
25	• US 4590180 A [0042]	• US 3994898 A [0042]
	• US 4690930 A [0042]	• US 3968125 A [0042]
	• US 4645773 A [0042]	• US 3939152 A [0042]
30	• US 4427694 A [0042]	• US 3928356 A [0042]
	• US 4424202 A [0042]	• US 3880834 A [0042]
35	• US 4440781 A [0042]	• US 3668210 A [0042]
	• US 5686482 A [0042]	• US 4966967 A [0042]
	• US 5478828 A [0042]	• US 5661129 A [0042]
40	• US 5461062 A [0042]	• US 5552411 A [0042]
	• US 5387593 A [0042]	• US 5332737 A [0042]
45	• US 5387586 A [0042]	• US 5389675 A [0042]
	• US 5256664 A [0042]	• US 5198449 A [0042]
	• US 5120733 A [0042]	• US 5079247 A [0042]
50	• US 4977167 A [0042]	• US 4874760 A [0042]
	• US 4904663 A [0042]	• US 4954526 A [0042]
55	• US 4788188 A [0042]	• US 5051423 A [0042]
	• US 4631285 A [0042]	• US 4888335 A [0042]
	• US 4617314 A [0042]	• US 4853391 A [0042]
60	• US 4613600 A [0042]	• US 4906634 A [0042]
	• US 4560684 A [0042]	• US 4775757 A [0042]
65	• US 4548938 A [0042]	• US 4727072 A [0042]
	• US 4529727 A [0042]	• US 4542160 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4522949 A [0042]	• US 5070099 A [0042]
	• US 4524151 A [0042]	• US 5061813 A [0042]
5	• US 4525479 A [0042]	• US 5055466 A [0042]
	• US 4474804 A [0042]	• US 5036065 A [0042]
	• US 4520026 A [0042]	• US 5026712 A [0042]
10	• US 5869478 A [0042]	• US 5011931 A [0042]
	• US 5859239 A [0042]	• US 5006542 A [0042]
15	• US 5837702 A [0042]	• US 4981843 A [0042]
	• US 5807889 A [0042]	• US 4977144 A [0042]
	• US 5731322 A [0042]	• US 4971984 A [0042]
20	• US 5726171 A [0042]	• US 4959383 A [0042]
	• US 5723457 A [0042]	• US 4952692 A [0042]
25	• US 5705523 A [0042]	• US 4939137 A [0042]
	• US 5696111 A [0042]	• US 4889866 A [0042]
	• US 5691332 A [0042]	• US 4883872 A [0042]
30	• US 5679672 A [0042]	• US 4883811 A [0042]
	• US 5654294 A [0042]	• US 4847379 A [0042]
35	• US 5646276 A [0042]	• US 4835157 A [0042]
	• US 5637586 A [0042]	• US 4824831 A [0042]
	• US 5631251 A [0042]	• US 4780538 A [0042]
40	• US 5612370 A [0042]	• US 4774239 A [0042]
	• US 5612323 A [0042]	• US 4771047 A [0042]
45	• US 5574037 A [0042]	• US 4769371 A [0042]
	• US 5563170 A [0042]	• US 4767756 A [0042]
	• US 5552397 A [0042]	• US 4762837 A [0042]
50	• US 5547966 A [0042]	• US 4753946 A [0042]
	• US 5482925 A [0042]	• US 4752616 A [0042]
55	• US 5457118 A [0042]	• US 4749715 A [0042]
	• US 5414017 A [0042]	• US 4738978 A [0042]
	• US 5414013 A [0042]	• US 4735962 A [0042]
60	• US 5401758 A [0042]	• US 4734426 A [0042]
	• US 5393771 A [0042]	• US 4734425 A [0042]
65	• US 5362902 A [0042]	• US 4734424 A [0042]
	• US 5310731 A [0042]	• US 4730052 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 5260444 A [0042]	• US 4721796 A [0042]
	• US 5223516 A [0042]	• US 4707550 A [0042]
5	• US 5217958 A [0042]	• US 4704382 A [0042]
	• US 5208245 A [0042]	• US 4703120 A [0042]
	• US 5202330 A [0042]	• US 4681970 A [0042]
10	• US 5189036 A [0042]	• US 4681882 A [0042]
	• US 5185362 A [0042]	• US 4670560 A [0042]
15	• US 5140031 A [0042]	• US 4670453 A [0042]
	• US 5128349 A [0042]	• US 4668787 A [0042]
	• US 5116861 A [0042]	• US 4663337 A [0042]
20	• US 4663336 A [0042]	• US 4556739 A [0042]
	• US 4661506 A [0042]	• US 4556675 A [0042]
25	• US 4656267 A [0042]	• US 4555571 A [0042]
	• US 4656185 A [0042]	• US 4555570 A [0042]
	• US 4654357 A [0042]	• US 4555523 A [0042]
30	• US 4654356 A [0042]	• US 4550120 A [0042]
	• US 4654355 A [0042]	• US 4542157 A [0042]
35	• US 4654335 A [0042]	• US 4542156 A [0042]
	• US 4652578 A [0042]	• US 4542155 A [0042]
	• US 4652576 A [0042]	• US 4542151 A [0042]
40	• US 4650874 A [0042]	• US 4537981 A [0042]
	• US 4650797 A [0042]	• US 4537904 A [0042]
45	• US 4649139 A [0042]	• US 4536514 A [0042]
	• US 4647585 A [0042]	• US 4536513 A [0042]
	• US 4647573 A [0042]	• US 4533673 A [0042]
50	• US 4647565 A [0042]	• US 4526901 A [0042]
	• US 4647561 A [0042]	• US 4526900 A [0042]
55	• US 4645836 A [0042]	• US 4521539 A [0042]
	• US 4639461 A [0042]	• US 4517188 A [0042]
	• US 4638012 A [0042]	• US 4482562 A [0042]
60	• US 4638011 A [0042]	• US 4474803 A [0042]
	• US 4632931 A [0042]	• US 4472411 A [0042]
65	• US 4631283 A [0042]	• US 4466979 A [0042]
	• US 4628095 A [0042]	• US 4463015 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4626548 A [0042]	• US 4456617 A [0042]
	• US 4614825 A [0042]	• US 4456616 A [0042]
5	• US 4611007 A [0042]	• US 4456615 A [0042]
	• US 4611006 A [0042]	• US 4418076 A [0042]
	• US 4611005 A [0042]	• US 4416896 A [0042]
10	• US 4609671 A [0042]	• US 4252815 A [0042]
	• US 4608386 A [0042]	• US 4220594 A [0042]
15	• US 4607049 A [0042]	• US 4190587 A [0042]
	• US 4607048 A [0042]	• US 4177280 A [0042]
	• US 4595692 A [0042]	• US 4164586 A [0042]
20	• US 4593042 A [0042]	• US 4151297 A [0042]
	• US 4593029 A [0042]	• US 4145443 A [0042]
25	• US 4591603 A [0042]	• US 4143054 A [0042]
	• US 4588743 A [0042]	• US 4123550 A [0042]
	• US 4588742 A [0042]	• US 4083968 A [0042]
30	• US 4588741 A [0042]	• US 4076834 A [0042]
	• US 4582854 A [0042]	• US 4064259 A [0042]
35	• US 4575512 A [0042]	• US 4064258 A [0042]
	• US 4568762 A [0042]	• US 4064257 A [0042]
	• US 4560698 A [0042]	• US 4058620 A [0042]
40	• US 4001421 A [0042]	• US 5595742 A [0042]
	• US 3993639 A [0042]	• US 5576341 A [0042]
45	• US 3991057 A [0042]	• US 5554373 A [0042]
	• US 3982010 A [0042]	• US 5541233 A [0042]
	• US 3980652 A [0042]	• US 5534546 A [0042]
50	• US 3968117 A [0042]	• US 5534508 A [0042]
	• US 3959296 A [0042]	• US 5514715 A [0042]
55	• US 3951950 A [0042]	• US 5508417 A [0042]
	• US 3933834 A [0042]	• US 5464832 A [0042]
	• US 3925369 A [0042]	• US 5428073 A [0042]
60	• US 3923818 A [0042]	• US 5428016 A [0042]
	• US 3898210 A [0042]	• US 5424396 A [0042]
65	• US 3897442 A [0042]	• US 5399553 A [0042]
	• US 3897441 A [0042]	• US 5391544 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 3886157 A [0042]	• US 5385902 A [0042]
	• US 3883540 A [0042]	• US 5359066 A [0042]
5	• US 3873715 A [0042]	• US 5356803 A [0042]
	• US 3867383 A [0042]	• US 5354862 A [0042]
	• US 3691216 A [0042]	• US 5346913 A [0042]
10	• US 3624126 A [0042]	• US 5302592 A [0042]
	• US 5902594 A [0042]	• US 5288693 A [0042]
15	• US 5874476 A [0042]	• US 5266567 A [0042]
	• US 5874436 A [0042]	• US 5254685 A [0042]
	• US 5859027 A [0042]	• US 5252745 A [0042]
20	• US 5856320 A [0042]	• US 5209930 A [0042]
	• US 5854242 A [0042]	• US 5196441 A [0042]
25	• US 5811091 A [0042]	• US 5190961 A [0042]
	• US 5786350 A [0042]	• US 5175160 A [0042]
	• US 5783177 A [0042]	• US 5157051 A [0042]
30	• US 5773469 A [0042]	• US 5096700 A [0042]
	• US 5762919 A [0042]	• US 5093342 A [0042]
35	• US 5753715 A [0042]	• US 5089251 A [0042]
	• US 5741526 A [0042]	• US 5073570 A [0042]
	• US 5709870 A [0042]	• US 5061702 A [0042]
40	• US 5707990 A [0042]	• US 5037809 A [0042]
	• US 5696117 A [0042]	• US 5036077 A [0042]
45	• US 5684042 A [0042]	• US 5010109 A [0042]
	• US 5683709 A [0042]	• US 4970226 A [0042]
	• US 5656591 A [0042]	• US 4916156 A [0042]
50	• US 5643971 A [0042]	• US 4888434 A [0042]
	• US 5643950 A [0042]	• US 4870093 A [0042]
55	• US 5610196 A [0042]	• US 4855318 A [0042]
	• US 5608056 A [0042]	• US 4784991 A [0042]
	• US 5604262 A [0042]	• US 4746504 A [0042]
60	• US 4686221 A [0042]	• US 5814648 A [0042]
	• US 4599228 A [0042]	• US 5780026 A [0042]
65	• US 4552882 A [0042]	• US 5776946 A [0042]
	• US 4492700 A [0042]	• US 5760002 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4489098 A [0042]	• US 5750543 A [0042]
	• US 4489085 A [0042]	• US 5741798 A [0042]
5	• US 4487776 A [0042]	• US 5739279 A [0042]
	• US 4479953 A [0042]	• US 5733939 A [0042]
	• US 4477448 A [0042]	• US 5723481 A [0042]
10	• US 4474807 A [0042]	• US 5716967 A [0042]
	• US 4470994 A [0042]	• US 5688949 A [0042]
15	• US 4370484 A [0042]	• US 5686488 A [0042]
	• US 4337199 A [0042]	• US 5686471 A [0042]
	• US 4311709 A [0042]	• US 5686434 A [0042]
20	• US 4308283 A [0042]	• US 5684204 A [0042]
	• US 4304910 A [0042]	• US 5684041 A [0042]
25	• US 4260634 A [0042]	• US 5684031 A [0042]
	• US 4233311 A [0042]	• US 5684002 A [0042]
	• US 4215131 A [0042]	• US 5677318 A [0042]
30	• US 4166122 A [0042]	• US 5674891 A [0042]
	• US 4141981 A [0042]	• US 5672620 A [0042]
35	• US 4130664 A [0042]	• US 5665752 A [0042]
	• US 4089977 A [0042]	• US 5656661 A [0042]
	• US 4089900 A [0042]	• US 5635516 A [0042]
40	• US 4069341 A [0042]	• US 5631283 A [0042]
	• US 4055655 A [0042]	• US 5622948 A [0042]
45	• US 4049665 A [0042]	• US 5618835 A [0042]
	• US 4044139 A [0042]	• US 5607959 A [0042]
	• US 4002775 A [0042]	• US 5593980 A [0042]
50	• US 3991201 A [0042]	• US 5593960 A [0042]
	• US 3966968 A [0042]	• US 5580888 A [0042]
55	• US 3954868 A [0042]	• US 5552424 A [0042]
	• US 3936393 A [0042]	• US 5552422 A [0042]
	• US 3917476 A [0042]	• US 5516764 A [0042]
60	• US 3915889 A [0042]	• US 5510361 A [0042]
	• US 3867548 A [0042]	• US 5508026 A [0042]
65	• US 3865748 A [0042]	• US 5500417 A [0042]
	• US 3783160 A [0042]	• US 5498405 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 3764676 A [0042]	• US 5494927 A [0042]
	• US 3764677 A [0042]	• US 5476876 A [0042]
5	• US 5872109 A [0042]	• US 5472973 A [0042]
	• US 5837735 A [0042]	• US 5470885 A [0042]
	• US 5827837 A [0042]	• US 5470842 A [0042]
10	• US 5821250 A [0042]	• US 5464856 A [0042]
	• US 5464849 A [0042]	• US 5212172 A [0042]
15	• US 5462952 A [0042]	• US 5208250 A [0042]
	• US 5459151 A [0042]	• US 5204365 A [0042]
	• US 5451686 A [0042]	• US 5202350 A [0042]
20	• US 5444043 A [0042]	• US 5196431 A [0042]
	• US 5436265 A [0042]	• US 5191084 A [0042]
25	• US 5432181 A [0042]	• US 5187175 A [0042]
	• US RE034918 E [0042]	• US 5185326 A [0042]
	• US 5393756 A [0042]	• US 5183906 A [0042]
30	• US 5380738 A [0042]	• US 5177079 A [0042]
	• US 5376670 A [0042]	• US 5171864 A [0042]
35	• US 5360811 A [0042]	• US 5169963 A [0042]
	• US 5354768 A [0042]	• US 5155122 A [0042]
	• US 5348957 A [0042]	• US 5143929 A [0042]
40	• US 5347029 A [0042]	• US 5143928 A [0042]
	• US 5340815 A [0042]	• US 5143927 A [0042]
45	• US 5338753 A [0042]	• US 5124455 A [0042]
	• US 5324648 A [0042]	• US 5124347 A [0042]
	• US 5319099 A [0042]	• US 5114958 A [0042]
50	• US 5318971 A [0042]	• US 5112846 A [0042]
	• US 5312821 A [0042]	• US 5104656 A [0042]
55	• US 5302597 A [0042]	• US 5098613 A [0042]
	• US 5298633 A [0042]	• US 5095037 A [0042]
	• US 5298522 A [0042]	• US 5095019 A [0042]
60	• US 5298498 A [0042]	• US 5086064 A [0042]
	• US 5290800 A [0042]	• US 5081261 A [0042]
65	• US 5290788 A [0042]	• US 5081147 A [0042]
	• US 5284949 A [0042]	• US 5081126 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 5280045 A [0042]	• US 5075330 A [0042]
	• US 5270319 A [0042]	• US 5066668 A [0042]
5	• US 5266562 A [0042]	• US 5059602 A [0042]
	• US 5256680 A [0042]	• US 5043457 A [0042]
	• US 5250700 A [0042]	• US 5037835 A [0042]
10	• US 5250552 A [0042]	• US 5037811 A [0042]
	• US 5248682 A [0042]	• US 5036088 A [0042]
15	• US 5244917 A [0042]	• US 5013850 A [0042]
	• US 5240929 A [0042]	• US 5013751 A [0042]
	• US 5234939 A [0042]	• US 5013736 A [0042]
20	• US 5234937 A [0042]	• US 500654 A [0042]
	• US 5232939 A [0042]	• US 4992448 A [0042]
25	• US 5225571 A [0042]	• US 4992447 A [0042]
	• US 5225418 A [0042]	• US 4988733 A [0042]
	• US 5220025 A [0042]	• US 4988728 A [0042]
30	• US 5212189 A [0042]	• US 4981865 A [0042]
	• US 4962119 A [0042]	• US 4680298 A [0042]
35	• US 4959378 A [0042]	• US 4678802 A [0042]
	• US 4954519 A [0042]	• US 4652564 A [0042]
	• US 4945099 A [0042]	• US 4644005 A [0042]
40	• US 4942236 A [0042]	• US 4632923 A [0042]
	• US 4931457 A [0042]	• US4629793 A [0042]
45	• US 4927835 A [0042]	• US 4614741 A [0042]
	• US 4912248 A [0042]	• US 4599360 A [0042]
	• US 4910192 A [0042]	• US 4596828 A [0042]
50	• US 4904786 A [0042]	• US 4595694 A [0042]
	• US 4904685 A [0042]	• US 4595686 A [0042]
55	• US 4904674 A [0042]	• US 4594357 A [0042]
	• US 4904671 A [0042]	• US 4585755 A [0042]
	• US 4897397 A [0042]	• US 4579866 A [0042]
60	• US 4895953 A [0042]	• US 4578390 A [0042]
	• US 4891370 A [0042]	• US 4569942 A [0042]
65	• US 4870210 A [0042]	• US 4567201 A [0042]
	• US 4859686 A [0042]	• US 4563476 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4857644 A [0042]	• US 44559348 B [0042]
	• US 4853392 A [0042]	• US 4558067 A [0042]
5	• US4851412 A [0042]	• US4556672 A [0042]
	• US 4847303 A [0042]	• US 4556669 A [0042]
	• US 4847290 A [0042]	• US 4539326 A [0042]
10	• US 4845242 A [0042]	• US 4537903 A [0042]
	• US 4835166 A [0042]	• US 4536503 A [0042]
15	• US 4826990 A [0042]	• US 4518608 A [0042]
	• US 4803216 A [0042]	• US 4514415 A [0042]
	• US 4801598 A [0042]	• US 4512990 A [0042]
20	• US 4791129 A [0042]	• US 4501755 A [0042]
	• US 4788205 A [0042]	• US 4495197 A [0042]
25	• US 4778818 A [0042]	• US 4493839 A [0042]
	• US 4775679 A [0042]	• US 4465687 A [0042]
	• US 4772703 A [0042]	• US 4440779 A [0042]
30	• US 4767776 A [0042]	• US 4440763 A [0042]
	• US 4764525 A [0042]	• US 4435420 A [0042]
35	• US 4760051 A [0042]	• US 4412995 A [0042]
	• US 4748153 A [0042]	• US 4400534 A [0042]
	• US 4725616 A [0042]	• US 4355034 A [0042]
40	• US 4721712 A [0042]	• US 4335141 A [0042]
	• US 4713393 A [0042]	• US 4322420 A [0042]
45	• US 4708966 A [0042]	• US 4275064 A [0042]
	• US 4695571 A [0042]	• US 4244963 A [0042]
	• US 4686235 A [0042]	• US 4235908 A [0042]
50	• US 4686224 A [0042]	• US 4234593 A [0042]
	• US 4226887 A [0042]	• US 3678169 A [0042]
55	• US 4201778 A [0042]	• US 3624216 A [0042]
	• US 4181720 A [0042]	• US 4450159 A [0042]
	• US 4173650 A [0042]	• US 5905085 A [0042]
60	• US 4173634 A [0042]	• US 5883119 A [0042]
	• US 4145444 A [0042]	• US 5880280 A [0042]
65	• US 4128664 A [0042]	• US 5877184 A [0042]
	• US 4125612 A [0042]	• US 874594 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4124726 A [0042]	• US 5843452 A [0042]
	• US 4124707 A [0042]	• US 5817672 A [0042]
5	• US 4117135 A [0042]	• US 5817661 A [0042]
	• US 4027031 A [0042]	• US 5817660 A [0042]
	• US 4024284 A [0042]	• US 5801193 A [0042]
10	• US 4021553 A [0042]	• US 5776974 A [0042]
	• US 4021550 A [0042]	• US 5763478 A [0042]
15	• US4018923 A [0042]	• US 5739169 A [0042]
	• US 4012527 A [0042]	• US 5723466 A [0042]
	• US 4011326 A [0042]	• US 5719176 A [0042]
20	• US 3998970 A [0042]	• US 5696156 A [0042]
	• US 3998954 A [0042]	• US 5695753 A [0042]
25	• US 3993763 A [0042]	• US 5693648 A [0042]
	• US 3991212 A [0042]	• US 5693645 A [0042]
	• US 3984405 A [0042]	• US 5691346 A [0042]
30	• US 3978227 A [0042]	• US 5686469 A [0042]
	• US 3978219 A [0042]	• US 5686424 A [0042]
35	• US 3978202 A [0042]	• US 5679705 A [0042]
	• US 3975543 A [0042]	• US 5679640 A [0042]
	• US 3968224 A [0042]	• US 5670504 A [0042]
40	• US 3959368 A [0042]	• US 5665774 A [0042] [0053]
	• US 3949082 A [0042]	• US 5665772 A [0042]
45	• US 3949081 A [0042]	• US 5648376 A [0042]
	• US 3947475 A [0042]	• US 5639455 A [0042]
	• US 3936450 A [0042]	• US 5633277 A [0042]
50	• US 3934018 A [0042]	• US 5624930 A [0042]
	• US 3930005 A [0042]	• US 5622970 A [0042]
55	• US 3857955 A [0042]	• US 5605903 A [0042]
	• US 3856962 A [0042]	• US 5604229 A [0042]
	• US 3821377 A [0042]	• US 5574041 A [0042]
60	• US 3821401 A [0042]	• US 5565560 A [0042]
	• US 3789121 A [0042]	• US 5550233 A [0042]
65	• US 3789123 A [0042]	• US 5545734 A [0042]
	• US 3726978 A [0042]	• US 5540931 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 3694471 A [0042]	• US 5532248 A [0042]
	• US 3691214 A [0042]	• US 5527820 A [0042]
5	• US 5516797 A [0042] [0053]	• US 5068247 A [0042]
	• US 5514688 A [0042]	• US 5064835 A [0042]
	• US 5512687 A [0042]	• US 5061728 A [0042]
10	• US 5506233 A [0042]	• US 5055290 A [0042]
	• US 5506228 A [0042]	• US 4981792 A [0042]
15	• US 5494895 A [0042]	• US 4810692 A [0042]
	• US 5484788 A [0042]	• US 4410696 A [0042]
	• US 5470857 A [0042]	• US 4346096 A [0042]
20	• US 5464615 A [0042]	• US 4342769 A [0042]
	• US 5432183 A [0042]	• US 4317825 A [0042]
25	• US 5431896 A [0042]	• US 4256766 A [0042]
	• US 5385918 A [0042]	• US 4180588 A [0042]
	• US 5349061 A [0042]	• US 4000275 A [0042]
30	• US 5344925 A [0042]	• US 3759921 A [0042]
	• US 5330993 A [0042]	• US 5292736 A [0042]
35	• US 5308837 A [0042]	• US 5688825 A [0042]
	• US 5290783 A [0042]	• US 5554789 A [0042]
	• US 5290772 A [0042]	• US 5455230 A [0042]
40	• US 5284877 A [0042]	• US 5216165 A [0042]
	• US 5284840 A [0042]	• US 5438064 A [0042]
45	• US 5273979 A [0042]	• US 5017578 A [0042]
	• US 5262533 A [0042]	• US 4906655 A [0042]
	• US 5260300 A [0042]	• US 4994450 A [0042]
50	• US 5252732 A [0042]	• US 4749792 A [0042]
	• US 5250678 A [0042]	• US 4980365 A [0042]
55	• US 5247076 A [0042]	• US 4794110 A [0042]
	• US 5244896 A [0042]	• US 4670541 A [0042]
	• US 5238689 A [0042]	• US 4737493 A [0042]
60	• US 5219884 A [0042]	• US 4622326 A [0042]
	• US 5208241 A [0042]	• US 4536512 A [0042]
65	• US 5208228 A [0042]	• US 4719231 A [0042]
	• US 5202332 A [0042]	• US 4533671 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 5192773 A [0042]	• US 4552866 A [0042]
	• US 189042 A [0042]	• US 4539312 A [0042]
5	• US 5169851 A [0042]	• US 4681879 A [0042]
	• US 5162334 A [0042]	• US 4511724 A [0042]
	• US 5151413 A [0042]	• US 4474806 A [0042]
10	• US 5149701 A [0042]	• US 4434175 A [0042]
	• US 5147877 A [0042]	• US 4608374 A [0042]
15	• US 143918 A [0042]	• US 4395402 A [0042]
	• US 5138051 A [0042]	• US 4374139 A [0042]
	• US 5093338 A [0042]	• US 4361583 A [0042]
20	• US 50913 89 A [0042]	• US 4252816 A [0042]
	• US 5068323 A [0042]	• US 4251530 A [0042]
25	• US 5874459 A [0042]	• US 5708015 A [0042]
	• US 5030639 A [0042]	• US 5594027 A [0042]
	• US 5008264 A [0042]	• US 5580892 A [0042]
30	• US 4844907 A [0042]	• US 5576332 A [0042]
	• US 4774256 A [0042]	• US 5510376 A [0042]
35	• US 4667039 A [0042]	• US 5482961 A [0042]
	• US 4658037 A [0042]	• US 5334601 A [0042]
	• US 4634708 A [0042]	• US 5202347 A [0042]
40	• US 4623648 A [0042]	• US 5135926 A [0042]
	• US 4594188 A [0042]	• US 5116867 A [0042]
45	• US 4440534 A [0042]	• US 5017618 A [0042]
	• US 4391827 A [0042]	• US 4829086 A [0042]
	• US 4306097 A [0042]	• US 4579867 A [0042]
50	• US 4244955 A [0042]	• US 4568679 A [0042]
	• US 4232018 A [0042]	• US 4469690 A [0042]
55	• US 4209520 A [0042]	• US 4395559 A [0042]
	• US 4164514 A [0042]	• US 4381309 A [0042]
	• US 4147872 A [0042]	• US 4363808 A [0042]
60	• US 4133819 A [0042]	• US 4343800 A [0042]
	• US 4124713 A [0042]	• US 4329289 A [0042]
65	• US 4117012 A [0042]	• US 4314943 A [0042]
	• US 4064272 A [0042]	• US 4311708 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 4022836 A [0042]	• US 4304721 A [0042]
	• US 3966944 A [0042]	• US 4296117 A [0042]
5	• US 5219872 A [0042]	• US 4285873 A [0042]
	• US 5219873 A [0042]	• US 4281189 A [0042]
	• US 5073560 A [0042]	• US 4278608 A [0042]
10	• US 5346911 A [0042]	• US 4247710 A [0042]
	• US 5424301 A [0042]	• US 4145550 A [0042]
15	• US 4900748 A [0042]	• US 4145425 A [0042]
	• US 4786648 A [0042]	• US 4139535 A [0042]
	• US 4798841 A [0042]	• US 4082843 A [0042]
20	• US 4782071 A [0042]	• US 4011321 A [0042]
	• US 4710508 A [0042]	• US 3940407 A [0042]
25	• US 5482938 A [0042]	• US 3852468 A [0042]
	• US 5464842 A [0042]	• US 3832470 A [0042]
	• US 5378723 A [0042]	• US 5874479 A [0042]
30	• US 5318978 A [0042]	• US 5863938 A [0042]
	• US 5084281 A [0042]	• US 5856364 A [0042]
35	• US 5002955 A [0042]	• US 5770612 A [0042]
	• US 4988710 A [0042]	• US 5702688 A [0042]
	• US 4745123 A [0042]	• US 5674912 A [0042]
40	• US 5091528 A [0042]	• US 5663208 A [0042]
	• US 48835157 B [0042]	• US 5658957 A [0042]
45	• US 5652274 A [0042]	• US 5792757 A [0042]
	• US 5648380 A [0042]	• US 5763361 A [0042]
	• US 5646190 A [0042]	• US 5744462 A [0042]
50	• US 5641814 A [0042]	• US 5741787 A [0042]
	• US 5633285 A [0042]	• US 5741786 A [0042]
55	• US 5614561 A [0042]	• US 5733899 A [0042]
	• US 5602183 A [0042]	• US 5731345 A [0042]
	• US 4923892 A [0042]	• US 5723638 A [0042]
60	• US 4782058 A [0042]	• US 5721226 A [0042]
	• US 4393210 A [0042]	• US 5712264 A [0042]
65	• US 4180583 A [0042]	• US 5712263 A [0042]
	• US 3965257 A [0042]	• US 5710144 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 3946022 A [0042]	• US 5707984 A [0042]
	• US 3931197 A [0042]	• US 5705494 A [0042]
5	• US 5863538 A [0042]	• US 5700793 A [0042]
	• US 5855907 A [0042]	• US 5698720 A [0042]
	• US 5855866 A [0042]	• US 5698545 A [0042]
10	• US 5780592 A [0042]	• US 5696106 A [0042]
	• US 5776427 A [0042]	• US 5677293 A [0042]
15	• US 5651987 A [0042]	• US 5674861 A [0042]
	• US 5346887 A [0042]	• US 5661141 A [0042]
	• US 5256408 A [0042]	• US 5656621 A [0042]
20	• US 5252319 A [0042]	• US 5646136 A [0042]
	• US 5209926 A [0042]	• US 5637691 A [0042]
25	• US 4996335 A [0042]	• US 5616574 A [0042]
	• US 4927807 A [0042]	• US 5614514 A [0042]
	• US 4710495 A [0042]	• US 5604215 A [0042]
30	• US 4049805 A [0042]	• US 5604213 A [0042]
	• US 4004005 A [0042]	• US 5599807 A [0042]
35	• US 3670079 A [0042]	• US 5585482 A [0042]
	• US 3608076 A [0042]	• US 5565588 A [0042]
	• US 5892028 A [0042]	• US 5563259 A [0042]
40	• US 5888995 A [0042]	• US 5563131 A [0042]
	• US 5883087 A [0042]	• US 5561124 A [0042]
45	• US 5880115 A [0042]	• US 5556845 A [0042]
	• US 5869475 A [0042]	• US 5547949 A [0042]
	• US 5866558 A [0042]	• US 5536714 A [0042]
50	• US 5861390 A [0042]	• US 5527806 A [0042]
	• US 5861388 A [0042]	• US 5506354 A [0042]
55	• US 5854235 A [0042]	• US 5506221 A [0042]
	• US 5837698 A [0042]	• US 5494907 A [0042]
	• US 5834452 A [0042]	• US 5491136 A [0042]
60	• US 5830886 A [0042]	• US 5478956 A [0042]
	• US 5792758 A [0042]	• US 5426179 A [0042]
65	• US 5422262 A [0042]	• US 4975537 A [0042]
	• US 5391776 A [0042]	• US 4970205 A [0042]

ES 2 347 027 T3

	• US 5382661 A [0042]	• US 4954446 A [0042]
	• US 5380841 A [0042]	• US 4950428 A [0042]
5	• US 5380840 A [0042]	• US 4946834 A [0042]
	• US 5380839 A [0042]	• US 4937237 A [0042]
	• US 5373095 A [0042]	• US 4921846 A [0042]
10	• US 5371078 A [0042]	• US 4920099 A [0042]
	• US 5352809 A [0042]	• US 4910226 A [0042]
15	• US 5344827 A [0042]	• US 4900725 A [0042]
	• US 5344826 A [0042]	• US 4892867 A [0042]
	• US 5338837 A [0042]	• US 4888336 A [0042]
20	• US 5336686 A [0042]	• US 4885280 A [0042]
	• US 5292906 A [0042]	• US 4882322 A [0042]
25	• US 5292878 A [0042]	• US 4882319 A [0042]
	• US 5281587 A [0042]	• US 4882315 A [0042]
	• US 5272140 A [0042]	• US 4874855 A [0042]
30	• US 5244886 A [0042]	• US 4868167 A [0042]
	• US 5236912 A [0042]	• US 4865767 A [0042]
35	• US 5232915 A [0042]	• US 4861875 A [0042]
	• US 5219879 A [0042]	• US 4861765 A [0042]
	• US 5218109 A [0042]	• US 4861763 A [0042]
40	• US 5215972 A [0042]	• US 4847014 A [0042]
	• US 5212166 A [0042]	• US 4774236 A [0042]
45	• US 5206415 A [0042]	• US 4753932 A [0042]
	• US 5194602 A [0042]	• US 4711856 A [0042]
	• US 5166201 A [0042]	• US 4701450 A [0042]
50	• US 5166055 A [0042]	• US 4701449 A [0042]
	• US 5126488 A [0042]	• US 4689410 A [0042]
55	• US 5116829 A [0042]	• US 4680290 A [0042]
	• US 5108996 A [0042]	• US 4670551 A [0042]
	• US 5099037 A [0042]	• US 4664850 A [0042]
60	• US 5096892 A [0042]	• US 4659516 A [0042]
	• US 5093502 A [0042]	• US 4647410 A [0042]
65	• US 5086047 A [0042]	• US 4634695 A [0042]
	• US 5084450 A [0042]	• US 4634693 A [0042]

ES 2 347 027 T3

- US 5082835 A [0042]
- US 5081114 A [0042]
- 5 • US 5053404 A [0042]
- US 5041433 A [0042]
- US 5041432 A [0042]
- 10 • US 5034548 A [0042]
- US 5032586 A [0042]
- 15 • US 5026882 A [0042]
- US 4512986 A [0042]
- US 4502989 A [0042]
- 20 • US 4495102 A [0042]
- US 5457182 A [0048]
- 25 • US 5525523 A [0048]
- US 5498597 A [0048]
- US 5196352 A [0048]
- 30 • US 5622910 A [0053]
- US 5614547 A [0053]
- 35 • US 5403833 A [0053]
- US 5401649 A [0054]
- US 5318901 A [0054]
- 40 • US 5236899 A [0054]
- US 5227467 A [0054]
- 45 • US 5214130 A [0054]
- US 5122511 A [0054]
- US 5116816 A [0054]
- 50 • US 5089390 A [0054]
- US 5079341 A [0054]
- 55 • US 5017597 A [0054]
- US 4940719 A [0054]
- US4914188 A [0054]
- 60 • US 4885276 A [0054]
- US 4798823 A [0054]
- 65 • US 4771122 A [0054]
- US 4703033 A [0054]
- US 4588530 A [0042]
- US 4567000 A [0042]
- US 4560557 A [0042]
- US 4558041 A [0042]
- US 4552871 A [0042]
- US 4552868 A [0042]
- US 4519946 A [0042]
- US 4515787 A [0042]

- US 4554351 A [0054]
- US 4396542 A [0054]
- 5 • US 4289851 A [0054]
- US 4288431 A [0054]
- US 422061 A [0054]
- 10 • US 4210581 A [0054]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 15 • **Briesewitz et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, March 1999, vol. 96, 1953-1958 [0007]
- **Clardy.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, March 1999, 1826-1827 [0007]
- **Crabtree; Schreiber.** *Elsevier Trends Journal*, November 1996, 418-422 [0007]
- 20 • **Spencer et al.** *Curr. Biol.*, July 1996, vol. 6, 839-847 [0007]
- **Spencer et al.** *Science*, 1993, vol. 262, 1019 [0007]
- 25 • **Chakraborty et al.** *Chem. & Biol.*, March 1995, vol. 2, 157-161 [0007]
- **Ho et al.** *Nature*, 1996, vol. 382, 822 [0007]
- **Riviera et al.** *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 1028 [0007]
- 30 • **Klemm et al.** *Current Biology*, 1997, vol. 7, 638 [0007]
- **Belshaw et al.** *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 4604 [0007]
- 35 • **Livnah et al.** *Science*, 1996, vol. 273, 464 [0007]
- **Johnson et al.** *Chemistry and Biology*, 1997, vol. 4, 939 [0007]
- **Garboczi.** *Nature*, 1996, vol. 384, 134 [0007]
- 40 • **Kissenger et al.** *Nature*, 1995, vol. 378, 641 [0007]
- **Griffith et al.** *Cell*, 1995, vol. 82, 507 [0007]
- 45 • **Choi et al.** *Science*, 1996, vol. 273, 239 [0007]
- **Kramer et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 18598-18604 [0007]
- **Varshavsky.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, March 1998, vol. 95, 2094-2099 [0007]
- 50 • **Varshavsky.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, April 1995, vol. 92, 3663-3667 [0007]
- **Mu et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1999, vol. 255, 75-79 [0007]
- 55 • **Brochu et al.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, vol. 36, 2166-2175 [0007]
- **Goodman & Gilman's**, The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, 1996 [0041]
- **Sabatini et al.** *Mol. Neurobiol.*, October 1997, vol. 15, 223-239 [0048]
- 60 • **Marks.** *Physiol. Rev.*, July 1996, vol. 76, 631-649 [0048]
- **Kay.** *Biochem J.*, March 1996, vol. 314, 361-385 [0048]
- 65 • **Braun et al.** *FASEB J.*, January 1995, vol. 9, 63-72 [0048]
- **Fruman et al.** *FASEB J.*, April 1994, vol. 8, 391-400 [0048]

ES 2 347 027 T3

- **Hacker** *et al. Mol. Microbiol.*, November 1993, vol. 10, 445-456 [0048]
- **Trandinh** *et al. FASEB J.*, December 1992, vol. 6, 3410-3420 [0049]
- 5 • **Harding** *et al. Transplantation*, August 1988, vol. 46, 29S-35S [0049]
- **Green; Wuts.** Protective Groups in Organic Synthesis. *John Wiley & Sons*, 1991 [0058]
- **Songyang** *et al. Cell*, 1993, vol. 72, 767 [0097]
- 10 • **Holt** *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, 9925 [0103]
- **Wiseman** *et al. Biochem.*, 1989, vol. 179, 131 [0106]
- 15 • **Craescu** *et al. Biochemistry*, 1996, vol. 35, 11045 [0114]
- **Rosowsky** *et al. J. Med. Chem.*, 1985, vol. 28, 660-667 [0132]
- D. **Holt** *et al. JACS*, 1993, vol. 115, 9925 [0132]
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Molécula bifuncional de origen no natural de menos de aproximadamente 5000 dalton que consiste en un resto de fármaco y un ligando de proteína presentadora, en la que dicho resto de fármaco se une a un fármaco diana y dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína presentadora que no es dicho fármaco diana, en la que dicho resto de fármaco y dicho ligando de proteína presentadora están opcionalmente unidos por un grupo de unión y dicho resto de fármaco muestra al menos una entre afinidad, especificidad o selectividad potenciada por su diana en comparación con un fármaco libre de control cuando la molécula bifuncional se une a la proteína presentadora.

2. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha molécula bifuncional comprende un grupo de unión.

3. Molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicha proteína presentadora tiene interacciones de unión con dicho fármaco diana.

4. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho resto de fármaco se une a una proteína diana.

5. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína extracelular.

6. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína intracelular.

7. Molécula bifuncional de la reivindicación 4, en la que dicho ligando de proteína presentadora es un ligando para una peptidil prolil isomerasa, Hsp90, receptor de hormonas esteroides, una proteína del citoesqueleto, albúmina o un receptor de vitaminas.

8. Molécula bifuncional sintética de menos de aproximadamente 5000 dalton de fórmula:



en la que:

X es un resto de fármaco;

L es un enlace o un grupo de unión; y

Z es un ligando para una proteína presentadora endógena;

en la que X y Z son diferentes, dicho resto de fármaco se une a un fármaco diana y dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína presentadora que no es dicho fármaco diana y dicho resto de fármaco muestra al menos una entre afinidad, especificidad o selectividad potenciada por su diana en comparación con un fármaco libre de control cuando la molécula bifuncional se une a la proteína presentadora en comparación con un fármaco libre de control.

9. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha proteína presentadora tiene interacciones de unión con dicho fármaco diana.

10. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho resto de fármaco tiene un peso molecular de aproximadamente 50 a 2000 D.

11. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho resto de fármaco se une a una proteína diana.

12. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína extracelular.

13. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho ligando de proteína presentadora se une a una proteína intracelular.

14. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho ligando de proteína presentadora es un ligando para una peptidil prolil isomerasa.

15. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho ligando de proteína presentadora no tiene sustancialmente actividad farmacológica aparte de la unión a una proteína presentadora.

ES 2 347 027 T3

16. Molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula bifuncional libre tiene la capacidad de unirse a una diana deseada en células que comprenden la diana deseada pero no comprende la proteína presentadora y no tiene la capacidad de unirse a una diana indeseable en células que comprenden la presente proteína debido a las interacciones repulsivas entre el complejo binario de la molécula bifuncional unida a la proteína presentadora y la diana indeseable.

17. Preparación farmacéutica que comprende una molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

18. Molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para el uso en un método de tratamiento de un sujeto mamífero.

19. Molécula bifuncional para usarse de acuerdo con la reivindicación 18, en la que dicho método da lugar a un complejo binario o tripartito que se forma en dicho sujeto.

20. Kit que comprende la preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 e instrucciones para su uso en un método terapéutico.

21. Molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8, en la que dicha proteína presentadora es una proteína sérica.

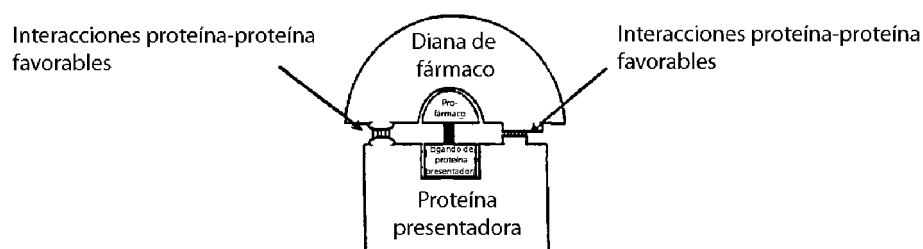


Fig. 1A

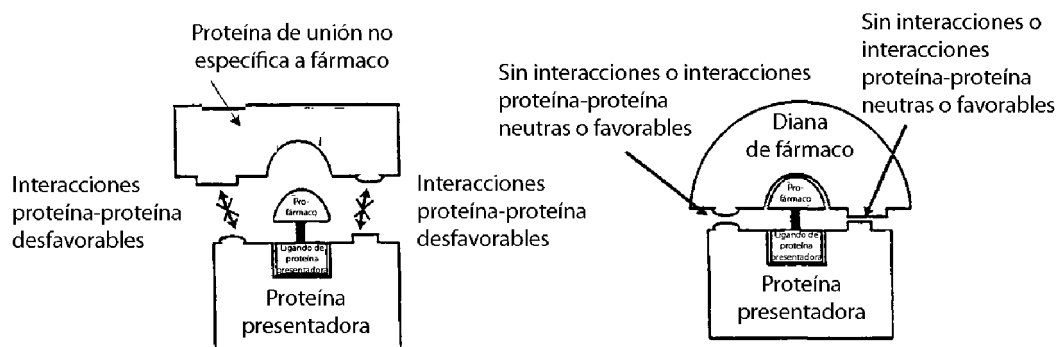


Fig. 1B

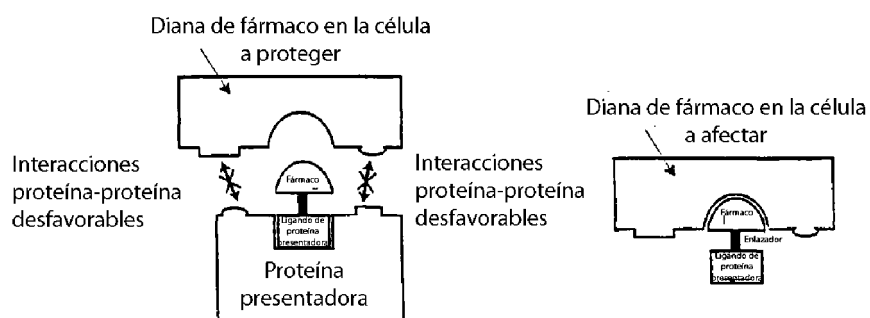


Fig. 1C

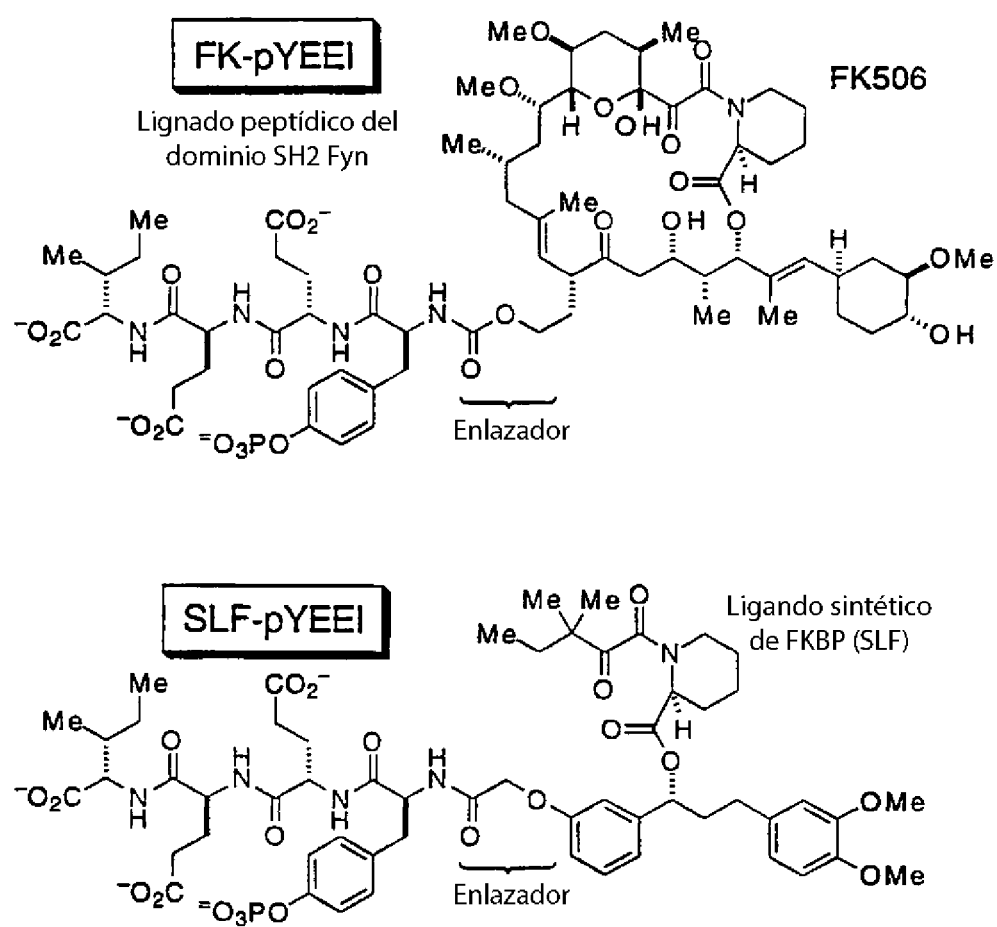


Fig. 2

Ensayo de Unión Competitiva

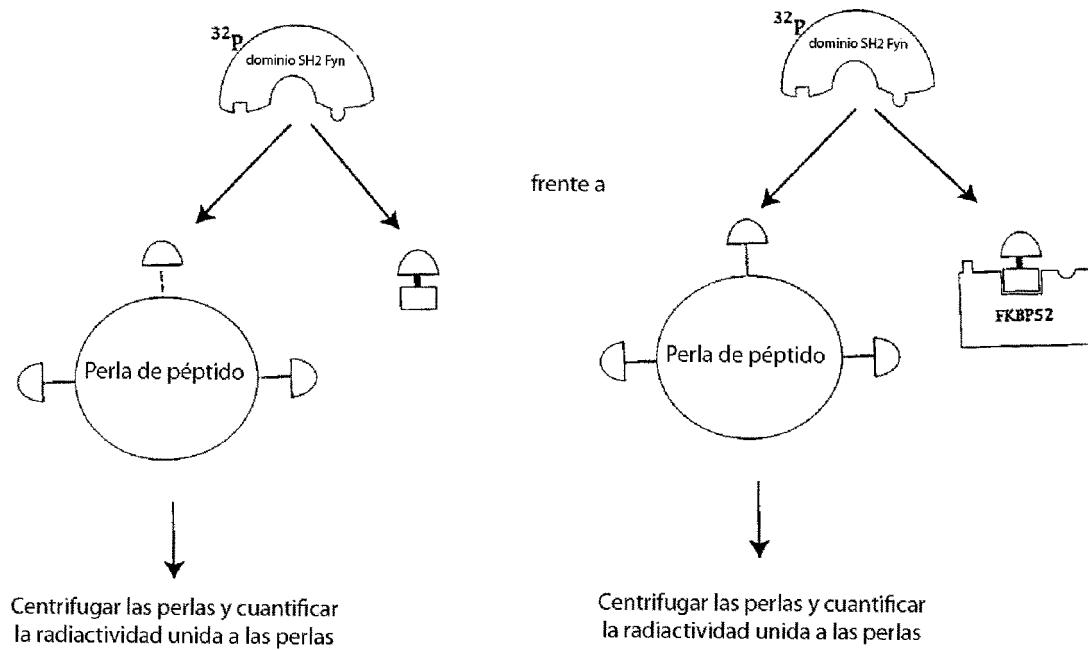


Fig. 3

Componentes de la reacción de unión:

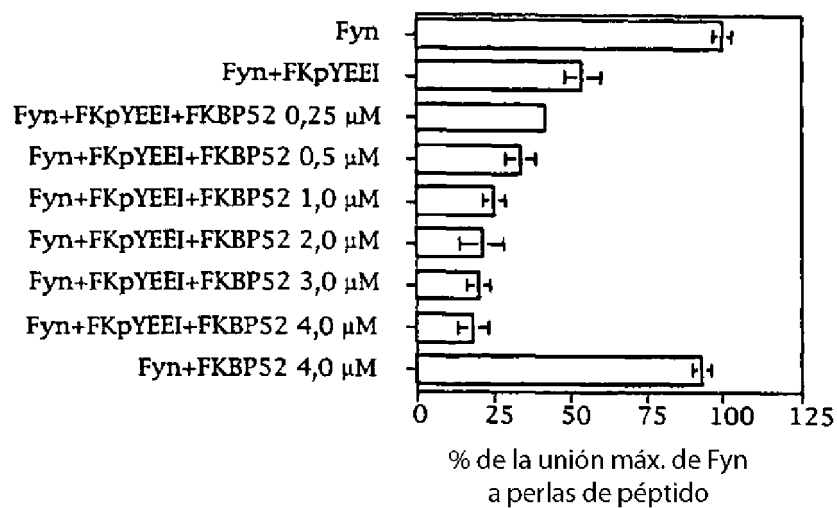


Fig. 4

Componentes de la reacción de unión:

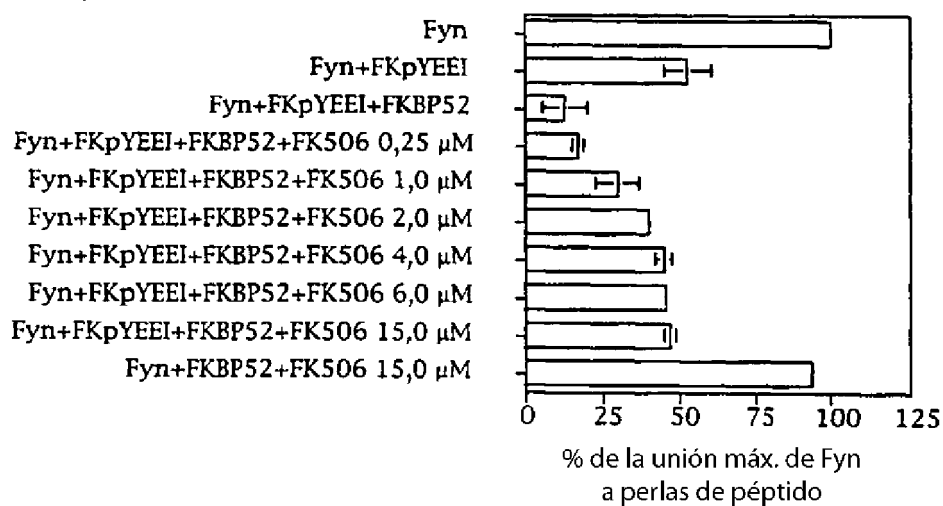


Fig. 5

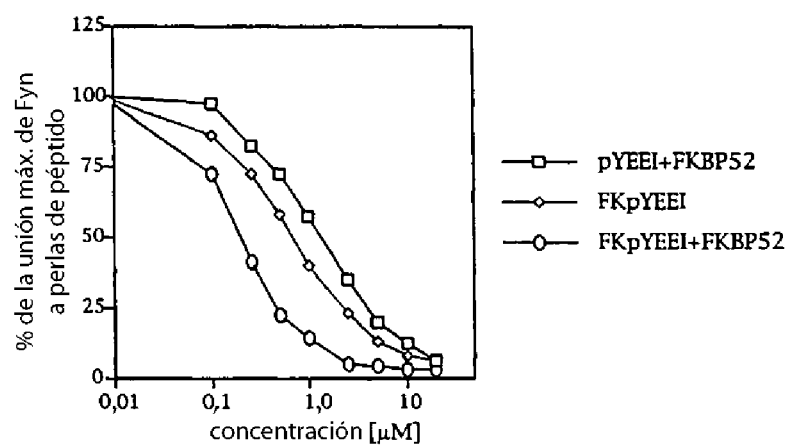


Fig. 6

Componentes de la reacción de unión:

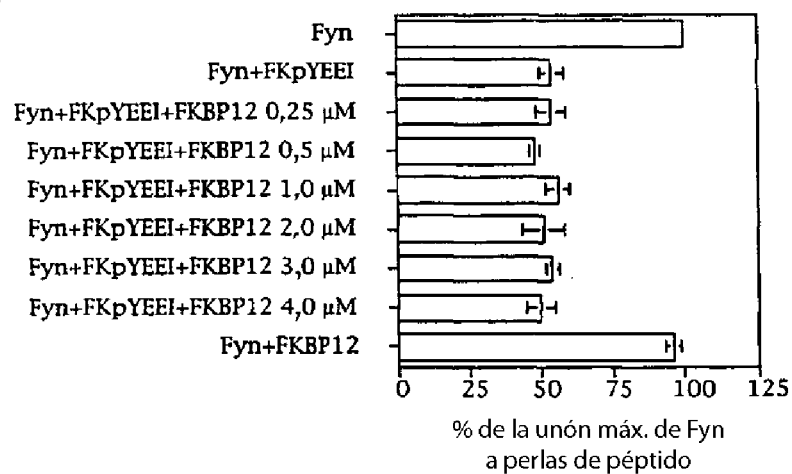


Fig. 7

Componentes de la reacción de unión:

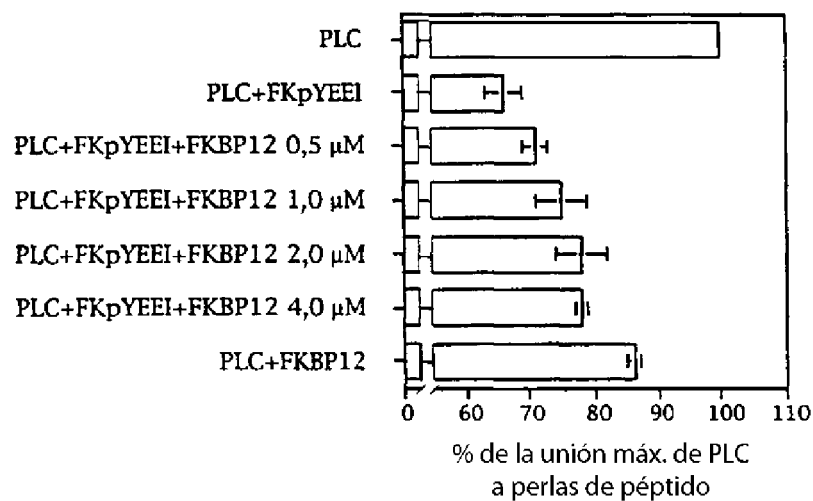


Fig. 8

Componentes de la reacción de unión:

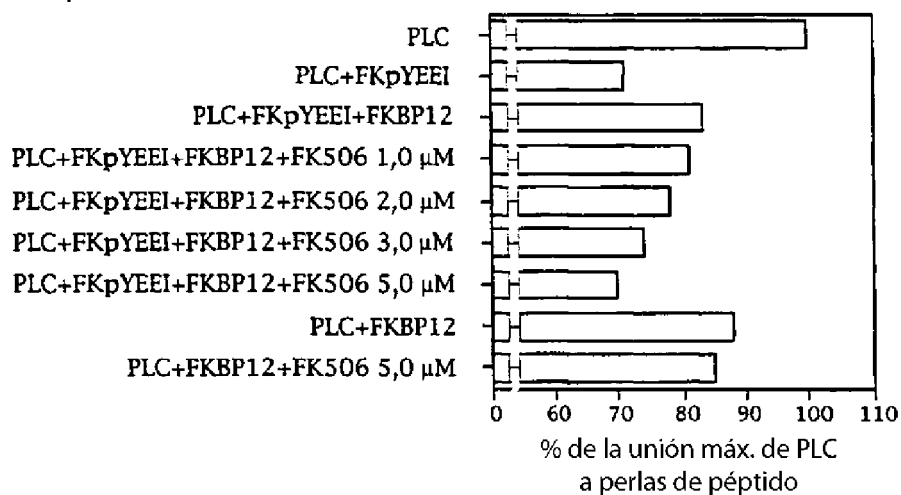


Fig. 9

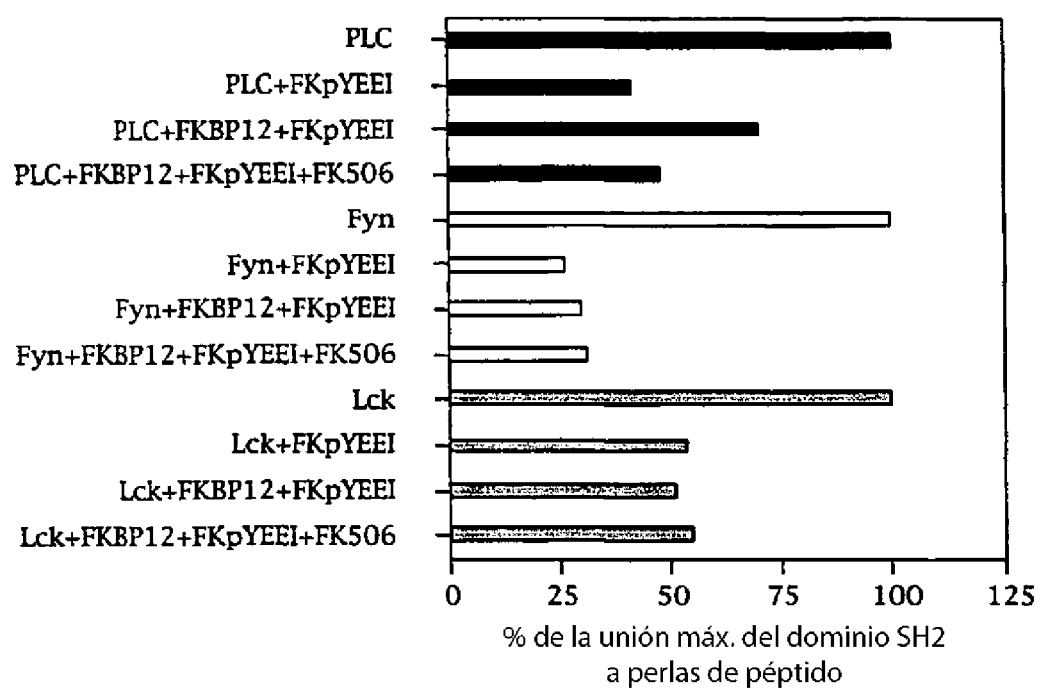


Fig. 10

Componentes de la reacción de unión:

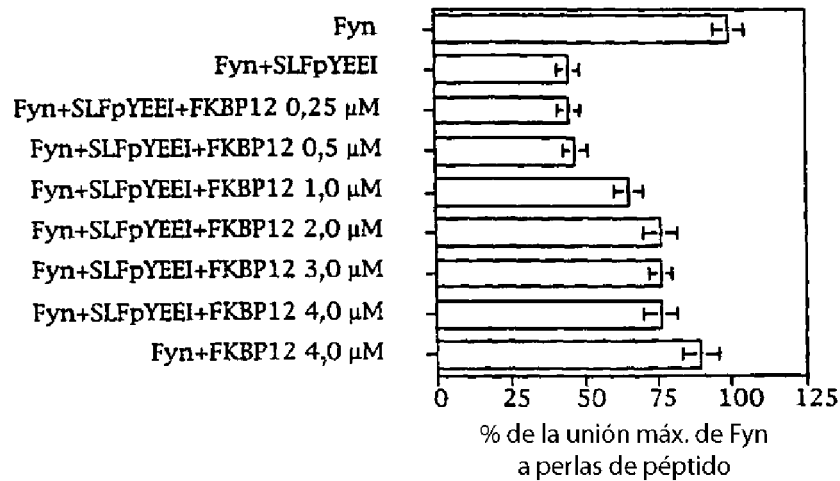


Fig. 11

Componentes de la reacción de unión:

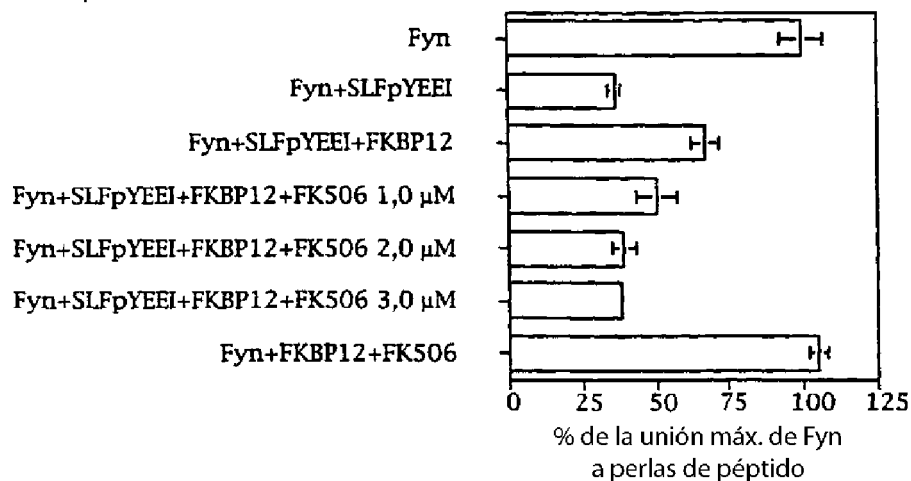


Fig. 12

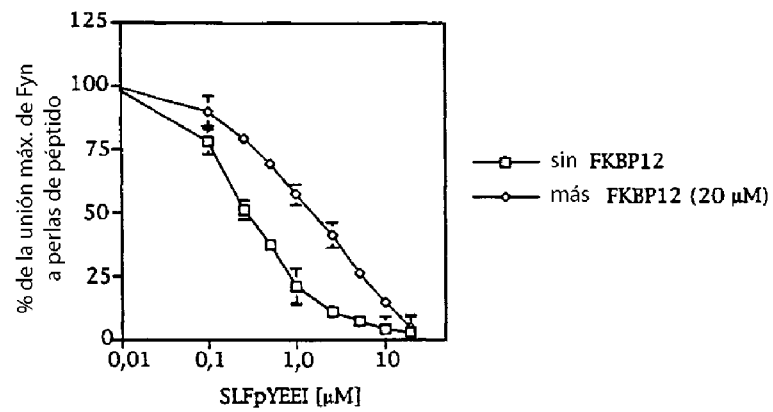


Fig. 13

Componentes de la reacción de unión:

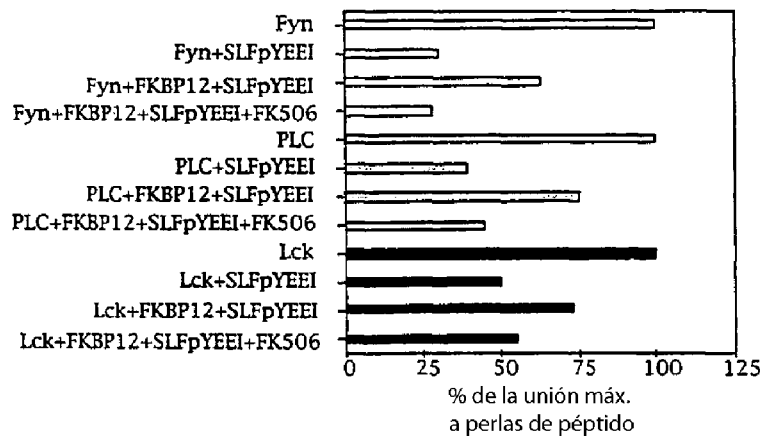


Fig. 14