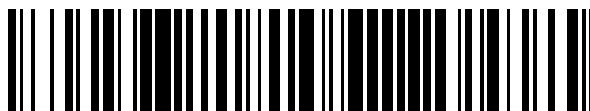


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 877**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123266**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13748983 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2822572**

54 Título: **Macrociclos peptidomiméticos**

30 Prioridad:

15.02.2012 US 201261599328 P
07.06.2012 US 201261656962 P
07.11.2012 US 201261723770 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

73 Titular/es:

AILERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
490 Arsenal Way
Watertown, MA 02472, US

72 Inventor/es:

GUERLAVAIS, VINCENT;
ELKIN, CARL;
NASH, HUW, M.;
SAWYER, TOMI, K.;
GRAVES, BRADFORD, J. y
FEYFANT, ERIC

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 817 877 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

Macrociclos peptidomiméticos

5 Antecedentes de la invención

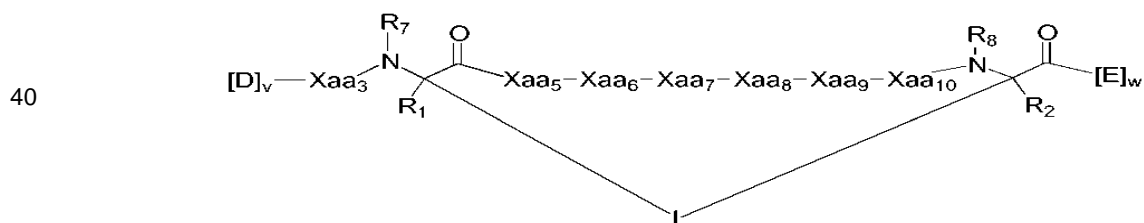
La proteína p53 factor de transcripción humano induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño del ADN y al estrés celular, y por lo tanto juega un papel crítico en la protección de las células de la transformación maligna. La ubiquitina ligasa E3 MDM2 (también conocida como HDM2) regula negativamente la función de p53 a través de una interacción de unión directa que neutraliza la actividad de transactivación de p53, conduce a la exportación de la proteína p53 desde el núcleo, y dirige a p53 para su degradación a través de la vía de ubiquitilación-proteosomal. La pérdida de la actividad de p53, ya sea por delección, mutación, o sobreexpresión de MDM2, es el defecto más común en los cánceres humanos. Los tumores que expresan p53 de tipo silvestre son vulnerables a agentes farmacológicos que estabilizan o aumentan la concentración de p53 activa. En este contexto, la inhibición de las actividades de MDM2 ha surgido como un enfoque validado para restaurar la actividad de p53 y sensibilizar nuevamente a las células cancerosas a la apoptosis *in vitro* e *in vivo*. MDMX (MDM4) se ha identificado más recientemente como un regulador negativo de p53 similar, y los estudios han revelado una homología estructural significativa entre las interfaces de unión a p53 de MDM2 y MDMX. Las interacciones proteína-proteína p53-MDM2 y p53-MDMX están mediadas por el mismo dominio de transactivación de hélice alfa de 15 residuos de p53, que se inserta en hendiduras hidrófobas en la superficie de MDM2 y MDMX. Tres residuos dentro de este dominio de p53 (F19, W23, y L26) son esenciales para la unión a MDM2 y MDMX.

Persiste una necesidad considerable de compuestos capaces de unirse y modular la actividad de p53, MDM2 y/o MDMX. En la presente descripción se describen macrociclos peptidomiméticos basados en p53 que modulan una actividad de p53. Además, en la presente descripción se describen macrociclos peptidomiméticos basados en p53 que inhiben las interacciones entre las proteínas p53, MDM2 y/o MDMX. Además, en la presente descripción se describen macrociclos peptidomiméticos basados en p53 que pueden usarse para tratar enfermedades que incluyen, pero no se limitan a cáncer y a otras enfermedades hiperproliferativas.

30 El documento WO2008/095063 describe compuestos peptidomacrocíclicos.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona peptidomacrociclos, su uso en el tratamiento del cáncer y sus composiciones farmacéuticas en donde los peptidomacrociclos son de la Fórmula



45 o una sal aceptable farmacéuticamente de este, en donde:

50 cada uno de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 es independientemente un aminoácido, en donde al menos tres de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 son los mismos aminoácidos que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe3-X4-His5-Tyr6-Trp7-Ala8-Gln9-Leu10-X11-Ser12 (SEQ ID NO: 8), en donde cada X4 y X11 es independientemente un aminoácido;

55 cada D es independientemente un aminoácido;

cada E es independientemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (alanina), D-Ala (D-alanina), Aib (ácido α -aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina), y Ser (serina);

R1 y R2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

60 cada R3 es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R5;

L y L' son independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula L1-L2-;

65 cada L1 y L2 es independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, heteroarileno, o [-R4-K-R4]n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R5;

cada R4 es independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno,

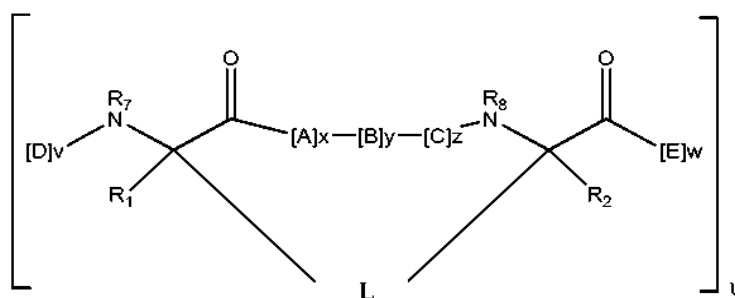
heterocicloalquileo, arileno, o heteroarileno;
 cada K es independientemente O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;
 cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción
 fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;
 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una
 porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;
 R₇ es -H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo,
 arilo, o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;
 R₈ es -H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo,
 arilo, o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;
 v es un número entero de 1-1000;
 w es un número entero de 3-1000; y
 n es un número entero de 1-5.

En la presente descripción se describen péptidos reticulados de forma estable relacionados con una porción de p53
 humana ("macrociclos peptidomiméticos de p53"). Estos péptidos reticulados contienen al menos dos aminoácidos
 modificados que juntos forman una reticulación intramolecular que puede ayudar a estabilizar la estructura secundaria
 alfa helicoidal de una porción de p53 que se cree que es importante para la unión de p53 a MDM2 y para la unión de
 p53 a MDMX. Por consiguiente, un polipéptido reticulado descrito en la presente descripción puede tener una actividad
 biológica mejorada en relación con un polipéptido correspondiente que no está reticulado. Se cree que los macrociclos
 peptidomiméticos de p53 interfieren con la unión de p53 a MDM2 y/o de p53 a MDMX, de esa manera se libera la p53
 funcional y se inhibe su destrucción. Los macrociclos peptidomiméticos de p53 descritos en la presente descripción
 pueden usarse terapéuticamente, por ejemplo, para tratar cánceres y otros trastornos caracterizados por un nivel
 indeseablemente bajo o una baja actividad de p53, y/o para tratar cánceres y otros trastornos caracterizados por un
 nivel o actividad indeseablemente alto de MDM2 o MDMX. Los macrociclos peptidomiméticos de p53 pueden ser,
 además, útiles para el tratamiento de cualquier trastorno asociado con la interrupción de la regulación de la vía
 transcripcional de p53, lo que conduce a condiciones de exceso de supervivencia y proliferación celular tal como
 cáncer y autoinmunidad, además de condiciones de detención inapropiada del ciclo celular y apoptosis tal como
 neurodegeneración e inmunodeficiencias. En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos de p53 se unen a
 MDM2 (por ejemplo, núm. de acceso del GenBank®: 228952; GI:228952) y/o MDMX (también denominado MDM4;
 núm. de acceso del GenBank®: 88702791; GI:88702791).

En la presente descripción se describe un macrociclo peptidomimético que comprende una secuencia de aminoácidos
 que es al menos aproximadamente 60 %, 80 %, 90 %, o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que se elige
 del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de la Tabla 1, Tabla 1a, Tabla 1b, o Tabla 1c.
 Alternativamente, se elige una secuencia de aminoácidos de dicho macrociclo peptidomimético del grupo que consiste
 en las secuencias de aminoácidos de la Tabla 4. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético no es un péptido
 como se muestra en la Tabla 2a o 2b. En otros casos, el macrociclo peptidomimético no comprende una estructura
 como se muestra en la Tabla 2a o 2b. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una secuencia de
 aminoácidos que se elige de la Tabla 1. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una secuencia de
 aminoácidos que se elige de la Tabla 1a. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una secuencia de
 aminoácidos que se elige de la Tabla 1b. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una secuencia de
 aminoácidos que se elige de la Tabla 1c.

Alternativamente, se elige una secuencia de aminoácidos de dicho macrociclo peptidomimético como anteriormente,
 y además, en donde el macrociclo no incluye un tioéter o un triazol. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético
 comprende una hélice, tal como una hélice α . En otros casos, el macrociclo peptidomimético comprende un α , α -
 aminoácido disustituido. Un macrociclo peptidomimético puede comprender un reticulante que une las posiciones α
 de al menos dos aminoácidos. Al menos uno de dichos dos aminoácidos puede ser un α , α -aminoácido disustituido.

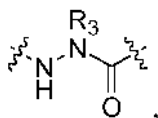
En la presente descripción se describen el macrociclo peptidomimético de la fórmula:



Fórmula I

en donde:

5 cada A, C, D, y E es independientemente un aminoácido;
B es un aminoácido,



10 [-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], o [-NH-L₃-];

15 R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

20 cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-;

L₁ y L₂ y L₃ son independientemente alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;

25 cada R₄ es alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

30 cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

35 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

40 v y w son independientemente números enteros de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20, o 1-10;

u es un número entero de 1-10, por ejemplo, 1-5, 1-3 o 1-2;

x, y, y z son independientemente números enteros de 0-10, por ejemplo, la suma de x+y+z es 2, 3, o 6; y

n es un número entero de 1-5.

45 En algunos casos, w > 2 y cada uno de los dos primeros aminoácidos representados por E comprende una cadena lateral sin carga o una cadena lateral con carga negativa.

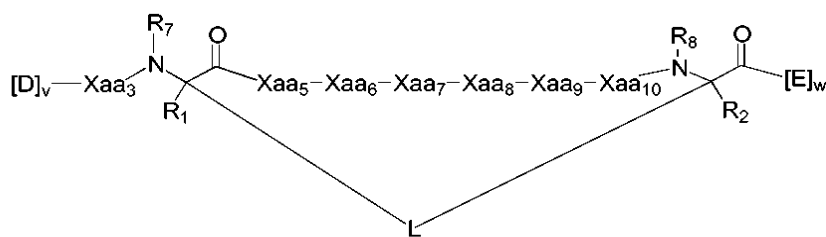
En algunos casos, el primer aminoácido C-terminal y/o el segundo aminoácido C-terminal representado por E comprenden una cadena lateral hidrófoba. Por ejemplo, el primer aminoácido C-terminal y/o el segundo aminoácido C-terminal representado por E comprenden una cadena lateral hidrófoba, por ejemplo, una cadena lateral hidrófoba grande.

50 En algunos casos, w está entre 3 y 1000. Por ejemplo, el tercer aminoácido representado por E comprende una cadena lateral hidrófoba grande.

55 En otros casos, el macrociclo peptidomimético como se reivindica excluye la secuencia de:
Ac-RTQATF\$r8NQWAibANle\$TNAibTR-NH₂, Ac-RTQATF\$r8NQWAibANle\$TNAibTR-NH₂,
Ac-\$r8SQQTFS\$LWRLAibQN-NH₂, Ac-QSQ\$r8TFSNLW\$LLAibQN-NH₂,
Ac-QS\$r5QTFStNLW\$LLAibQN-NH₂, o Ac-QSQQ\$r8FNSLWR\$LAibQN-NH₂.

En otros casos, el macrociclo peptidomimético como se reivindica excluye la secuencia de:
Ac-Q\$r8QQTFSN\$WRLAibQN-NH₂.

60 En la presente descripción se describen macrociclos peptidomiméticos de la fórmula:



5

10

en donde:

15

cada uno de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 es individualmente un aminoácido, en donde al menos tres de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe3-X4-His5-Tyr6-Trp7-Ala8-Gln9-Leu10-X11-Ser12, donde cada X es un aminoácido;

20

cada D y E es independientemente un aminoácido;

R1 y R2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R1 y R2 forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

25

cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L1-L2-;

L1 y L2 son independientemente alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R4-K-R4]n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R5;

30

R3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R5;

cada R4 es alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, arileno, o heteroarileno;

35

cada K es O, S, SO, SO2, CO, CO2, o CONR3;

cada R5 es independientemente halógeno, alquilo, -OR6, -N(R6)2, -SR6, -SOR6, -SO2R6, -CO2R6, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

40

cada R6 es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R7 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R5, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R8 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R5, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

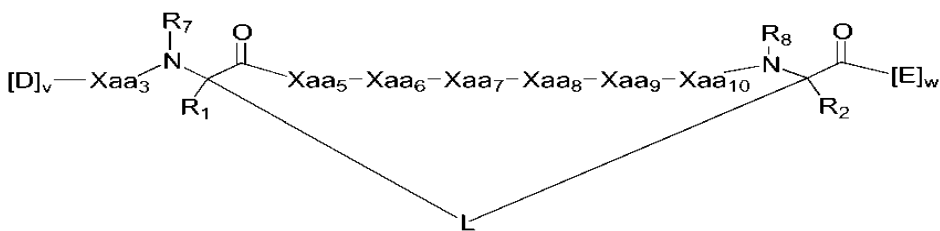
45

v es un número entero de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20, o 1-10;

w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10; y

n es un número entero de 1-5.

En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene la Fórmula:



45

50

en donde:

55

cada uno de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 es individualmente un aminoácido, en donde al menos tres de Xaa3, Xaa5, Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, y Xaa10 son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe3-X4-Glu5-Tyr6-Trp7-Ala8-Gln9-Leu10/Cba10-X11-Ala12, donde cada X es un aminoácido; cada D es independientemente un aminoácido;

60

cada E es independientemente un aminoácido, por ejemplo, un aminoácido seleccionado de Ala (alanina), D-Ala (D-alanina), Aib (ácido a-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina), y Ser (serina);

R1 y R2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R1 y R2 forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

65

cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L1-L2-;

L1 y L2 son independientemente alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquilenilo, cicloalquilenilo,

heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno, o $[-R_4-K-R_4]_n$, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R_5 ;

R_3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 ;

cada R_4 es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , o $CONR_3$;

cada R_5 es independientemente halógeno, alquilo, $-OR_6$, $-N(R_6)_2$, $-SR_6$, $-SOR_6$, $-SO_2R_6$, $-CO_2R_6$, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R_6 es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R_7 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

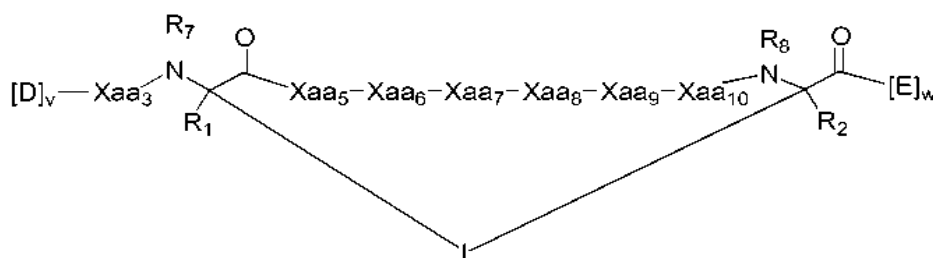
R_8 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

v es un número entero de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20, o 1-10;

w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10; y

n es un número entero de 1-5.

En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene la Fórmula:



en donde:

cada uno de Xaa_3 , Xaa_5 , Xaa_6 , Xaa_7 , Xaa_8 , Xaa_9 , y Xaa_{10} es individualmente un aminoácido, en donde al menos dos de Xaa_3 , Xaa_5 , Xaa_6 , Xaa_8 , Xaa_9 , y Xaa_{10} son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂, donde cada X es un aminoácido;

cada D y E es independientemente un aminoácido;

R_1 y R_2 son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R_1 y R_2 forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula $-L_1-L_2-$, donde L comprende al menos un doble enlace en la configuración E;

L_1 y L_2 son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno, o $[-R_4-K-R_4]_n$, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R_5 ;

R_3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 ;

cada R_4 es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO_2 , CO, CO_2 , o $CONR_3$;

cada R_5 es independientemente halógeno, alquilo, $-OR_6$, $-N(R_6)_2$, $-SR_6$, $-SOR_6$, $-SO_2R_6$, $-CO_2R_6$, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R_6 es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R_7 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R_8 es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

v es un número entero de 1-1000; w es un número entero de 3-1000;

n es un número entero de 1-5; y

Xaa_7 es triptófano protegido con Boc.

En algunos casos de cualquiera de las Fórmulas descritas en la presente descripción, $[D]_v$ es -Leu₁-Thr₂. En otros casos de las Fórmulas descritas en la presente descripción, cada E distinto del tercer aminoácido representado por E

es un aminoácido seleccionado de Ala (alanina), D-Ala (D-alanina), Aib (ácido a-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina) y Ser (serina).

5 En algunos casos, w es un número entero de 3-10, por ejemplo, 3-6, 3-8, 6-8, o 6-10. En algunos casos, w es 3. En otros casos, w es 6. En algunos casos, v es un número entero del 1-10, por ejemplo, 2-5. En algunos casos, v es 2.

10 En algunos casos, los péptidos descritos en la presente descripción se unen a un sitio de unión definido al menos en parte por las cadenas laterales de los aminoácidos L17, V46, M50, Y96 (que forman el borde del bolsillo) y L99 de MDMX. Sin estar atado por la teoría, la unión a tal sitio de unión mejora una o más propiedades tales como la afinidad de unión, inducción de apoptosis, eficacia antitumoral *in vitro* o *in vivo*, o la relación de afinidades de unión a MDMX reducida con respecto a MDM2.

15 En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una afinidad de unión mejorada a MDM2 o MDMX en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En otros casos, el macrociclo peptidomimético tiene una relación de afinidades de unión a MDMX reducida con respecto a MDM2 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. Aun en otros casos, el macrociclo peptidomimético tiene una eficacia antitumoral *in vitro* mejorada contra líneas celulares tumorales positivas para p53 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético muestra una inducción de apoptosis *in vitro* mejorada en líneas de células tumorales positivas para p53 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En otros casos, el macrociclo peptidomimético de la reivindicación 1, en donde el macrociclo peptidomimético tiene una relación de eficacia antitumoral *in vitro* mejorada para las líneas de células tumorales positivas de p53 con respecto a las negativas o mutantes de p53 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En algunos casos, la relación de eficacia mejorada *in vitro* es 1-29, $\geq 30-49$, o ≥ 50 . Aún en otros casos, el macrociclo peptidomimético ha mejorado la eficacia antitumoral *in vivo* contra tumores positivos para p53 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En algunos casos, la relación de eficacia mejorada *in vivo* es -29, $\geq 30-49$, o ≥ 50 . Aún en otros casos, el macrociclo peptidomimético ha mejorado la inducción de apoptosis *in vivo* en tumores positivos para p53 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una permeabilidad celular mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2. En otros casos, el macrociclo peptidomimético tiene una solubilidad mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde w es 0, 1 o 2.

35 En algunos casos, Xaa₄ es Glu o un aminoácido análogo de este. En algunos casos, Xaa₅ es Glu o un aminoácido análogo de este y en donde el macrociclo peptidomimético tiene una propiedad mejorada, tal como afinidad de unión mejorada, solubilidad mejorada, eficacia celular mejorada, permeabilidad celular mejorada, eficacia antitumoral *in vivo* o *in vitro* mejorada, o inducción de apoptosis mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde Xaa₅ es Ala.

40 En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una afinidad de unión mejorada a MDM2 o MDMX en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente en donde Xaa₅ es Ala. En otros casos, el macrociclo peptidomimético tiene una relación de afinidades de unión a MDMX reducida con respecto a MDM2 en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde Xaa₅ es Ala. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una solubilidad mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde Xaa₅ es Ala, o el macrociclo peptidomimético tiene una eficacia celular mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde Xaa₅ es Ala.

50 En algunos casos, Xaa₅ es Glu o un aminoácido análogo de este y en donde el macrociclo peptidomimético tiene actividad biológica mejorada, tal como afinidad de unión mejorada, solubilidad mejorada, eficacia celular mejorada, helicidad mejorada, permeabilidad celular mejorada, eficacia antitumoral *in vivo* o *in vitro* mejorada, o inducción de apoptosis mejorada en relación con un macrociclo peptidomimético correspondiente donde Xaa₅ es Ala.

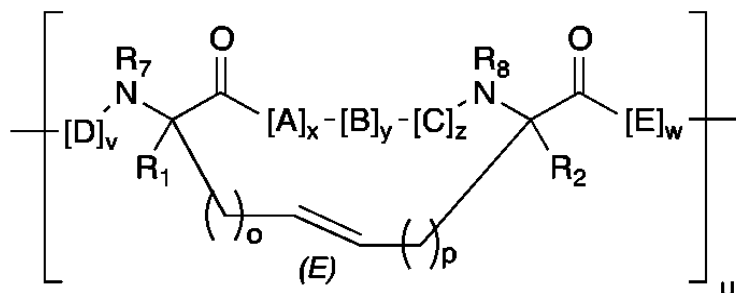
55 En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una actividad contra una línea celular p53+/+ que es al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 70 veces, o 100 veces mayor que su afinidad de unión contra una línea celular p53-/. En algunos casos, el macrociclo peptidomimético tiene una actividad contra una línea celular p53+/+ que es entre 1 y 29 veces, entre 30 y 49 veces, o ≥ 50 veces mayor que su afinidad de unión contra una línea celular p53-/. La actividad puede medirse, por ejemplo, como un valor de IC50. Por ejemplo, la línea celular p53+/+ es SJS-1, RKO, HCT-116, o MCF-7 y la línea celular p53-/- es RKO-E6 o SW-480. En algunos casos, el péptido tiene una IC50 contra la línea celular p53 +/+ de menos de 1 μ M.

60 En algunos casos, Xaa₅ es Glu o un aminoácido análogo de este y el macrociclo peptidomimético tiene una actividad contra una línea celular p53+/+ que es al menos 10 veces mayor que su afinidad de unión contra una línea celular p53-/-.

65 Además, se describe un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un macrociclo peptidomimético. En algunos casos, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, o glioma.

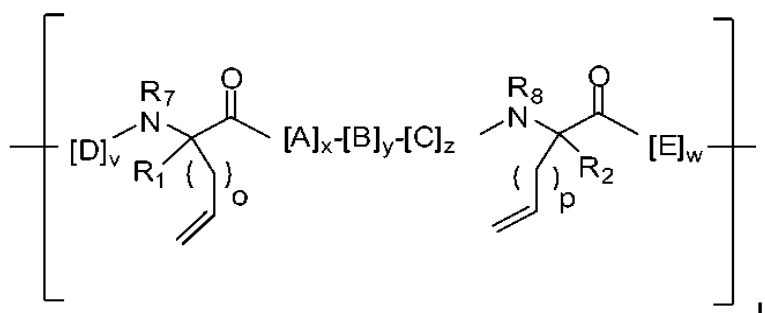
Además, se describe un método para modular la actividad de p53 o MDM2 o MDMX en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un macrociclo peptidomimético, o un método para antagonizar la interacción entre las proteínas p53 y MDM2 y/o MDMX en un sujeto, que comprende administrar al sujeto tal macrociclo peptidomimético.

En la presente descripción se describe un método para preparar una composición que comprende un macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I):



Fórmula (I),

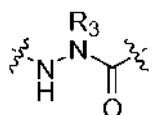
que comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos en la Tabla 1, Tabla 1a, Tabla 1b, o Tabla 1c, el método que comprende tratar un compuesto de la Fórmula (II)



Fórmula (II),

con un catalizador para dar como resultado el compuesto de la Fórmula I en donde en el compuesto(s) de las Fórmulas (I) y (II)

cada A, C, D, y E es independientemente un aminoácido;
 cada B es independientemente un aminoácido,



[-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], o [-NH-L₃-];

cada R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halógeno; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de los aminoácidos D o E; cada R₃ es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

cada L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-;

cada L₁, L₂ y L₃ son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno o [-R₄-K-R₄']_n, cada uno está opcionalmente sustituido con R₅; cada R₄ y R₄' es independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, o heteroarileno;

cada K es independientemente O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción

fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R_6 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

5 cada R_7 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo D; cada R_8 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R_5 , o parte de una estructura cíclica con un residuo E; cada v y w son independientemente números enteros de 1-1000;

10 u es un número entero de 1-10;

cada x , y , y z son independientemente números enteros de 0-10;

cada n es independientemente un número entero de 1-5;

cada o es independientemente un número entero de 1 a 15;

cada p es independientemente un número entero de 1 a 15;

15 "(E)" indica un doble enlace trans; y

uno o más de los aminoácidos A, C y/o B cuando B es un aminoácido, presente en los compuestos de las Fórmulas (I) y (II), tiene una cadena lateral que porta un grupo protector.

20 En algunos casos, el grupo protector es un grupo protector del átomo de nitrógeno.

En algunos casos, el grupo protector es un grupo Boc.

En algunos casos, la cadena lateral del aminoácido que porta el grupo protector comprende un indol protegido.

25 En algunos casos, el aminoácido que porta el grupo protector en su cadena lateral es triptófano (W) que está protegido por el grupo protector en su nitrógeno indol. Por ejemplo, el grupo protector es un grupo Boc.

30 En algunos casos, después de la etapa de poner en contacto el compuesto de la Fórmula II con el catalizador, el compuesto de la Fórmula (I) se obtiene en cantidades iguales o mayores que un compuesto correspondiente que es un isómero Z. Por ejemplo, después de la etapa de poner en contacto el compuesto de la Fórmula II con el catalizador, el compuesto de la Fórmula (I) se obtiene en una cantidad 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces mayor que el compuesto correspondiente que es un isómero Z.

35 En algunos casos, el catalizador es un catalizador de rutenio.

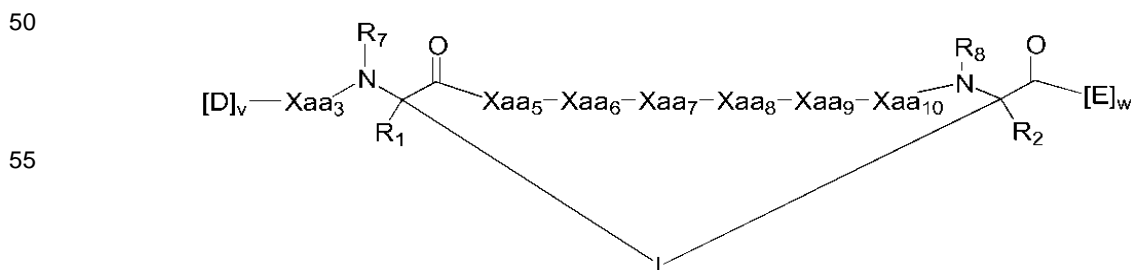
En algunos casos, el método comprende, además, la etapa de tratar los compuestos de la Fórmula (I) con un agente reductor o un agente oxidante.

40 En algunos casos, el compuesto de la Fórmula (II) se une a un soporte sólido. En otros casos, el compuesto de la Fórmula (II) no está unido a un soporte sólido.

En algunos casos, el método comprende, además, eliminar el grupo(s) protector(es) de los compuestos de la Fórmula (I).

45 En algunos casos, la metátesis de cierre del anillo se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C.

En algunos casos, el macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I) tiene la Fórmula:



en donde:

65 cada uno de Xaa_3 , Xaa_5 , Xaa_6 , Xaa_7 , Xaa_8 , Xaa_9 , y Xaa_{10} es individualmente un aminoácido, en donde al menos dos de Xaa_3 , Xaa_5 , Xaa_6 , Xaa_8 , Xaa_9 , y Xaa_{10} son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂, donde cada X es un aminoácido;

cada D y E es independientemente un aminoácido;

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

5 cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-, donde L comprende al menos un doble enlace en la configuración E;

L₁ y L₂ son independientemente alquilenilo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;

10 R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

cada R₄ es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

15 cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

20 R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 3-1000;

25 n es un número entero de 1-5; y

Xaa₇ es triptófano protegido con Boc.

En algunos casos, el macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I) comprende una hélice α .

30 Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención mediante referencia a la siguiente descripción detallada que establece casos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

35 **La Figura 1** muestra una estructura del macrociclo peptidomimético 46 (Tabla 2b), un macrociclo peptidomimético de p53, complejoado con MDMX (número de acceso de SwissProt Primario Q7ZUW7; Entrada MDM4_DANRE).

40 **La Figura 2** muestra las estructuras superpuestas del macrociclo peptidomimético 142 de p53 (Tabla 2b) y SP43 unidos a MDMX (Número de acceso de SwissProt Primario Q7ZUW7; Entrada MDM4_DANRE).

La Figura 3 muestra el efecto de SP154, un macrociclo peptidomimético, sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto MCF-7 en ratón.

45 **La Figura 4** muestra el efecto de SP249, un macrociclo peptidomimético, sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto MCF-7 en ratón.

La Figura 5 muestra el efecto de SP315, un macrociclo peptidomimético, sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto MCF-7 en ratón.

La Figura 6 muestra el efecto de SP252, una mutación puntual de SP154, sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto MCF-7 en ratón.

50 **La Figura 7** muestra un gráfico de solubilidad para macrociclos peptidomiméticos con extensiones C-terminales variables.

Descripción detallada de la invención

55 Como se usa en la presente descripción, el término "macrociclo" se refiere a una molécula que tiene una estructura química que incluye un anillo o ciclo formado por al menos 9 átomos unidos covalentemente.

60 Como se usa en la presente descripción, el término "macrociclo peptidomimético" o "polipéptido reticulado" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos por una pluralidad de enlaces peptídicos y al menos un enlazador formador de macrociclo que forma un macrociclo entre un primer residuo de aminoácido (o análogo) de origen natural o no natural y un segundo residuo de aminoácido (o análogo) de origen natural o no natural dentro de la misma molécula. El macrociclo peptidomimético incluye casos donde el enlazador formador de macrociclo conecta el carbono α del primer residuo de aminoácido (o análogo) con el carbono α del segundo residuo de aminoácido (o análogo). Los macrociclos peptidomiméticos incluyen opcionalmente uno o más enlaces no peptídicos entre uno o más residuos de aminoácidos y/o residuos de análogos de aminoácidos, y
65 opcionalmente incluyen uno o más residuos de aminoácidos o residuos de análogos de aminoácidos de origen no natural además de cualquiera que forme el macrociclo. Se entiende que un "polipéptido no reticulado correspondiente"

cuando se hace referencia en el contexto de un macrociclo peptidomimético se refiere a un polipéptido de la misma longitud que el macrociclo y que comprende los aminoácidos naturales equivalentes de la secuencia de tipo silvestre correspondiente al macrociclo.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "estabilidad" se refiere al mantenimiento de una estructura secundaria definida en solución mediante un macrociclo peptidomimético medido mediante dicroísmo circular, NMR u otra medida biofísica, o resistencia a la degradación proteolítica *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos no limitantes de estructuras secundarias contempladas en la presente descripción son α -hélices, 3_{10} hélices, giros β , y las hojas β plegadas.

10 Como se usa en la presente descripción, el término "estabilidad helicoidal" se refiere al mantenimiento de la estructura α helicoidal mediante un macrociclo peptidomimético como se mide por dicroísmo circular o NMR. Por ejemplo, en algunos casos, un macrociclo peptidomimético exhibe al menos un aumento de 1,25, 1,5, 1,75 o 2 veces en α -helicidad como se determina mediante dicroísmo circular en comparación con un macrociclo no reticulado correspondiente.

15 El término "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, tanto los isómeros D como L de los aminoácidos de origen natural, así como también los aminoácidos de origen no natural preparados mediante síntesis orgánica u otras rutas metabólicas. El término aminoácido, como se usa en la presente descripción, incluye, sin limitación, α -aminoácidos, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y análogos de aminoácidos.

20 El término " α -aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unido a un carbono que se denomina carbono α .

25 El término " β -aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo en una configuración β .

30 El término "aminoácido de origen natural" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos que se encuentran comúnmente en péptidos sintetizados en la naturaleza, y conocidos por las abreviaturas de una letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.

La siguiente tabla muestra un resumen de las propiedades de los aminoácidos naturales:

Aminoácidos	Código de 3 Letras	Código de 1 Letra	Polaridad de cadena lateral	Carga de la cadena lateral (pH 7,4)	Índice de Hidropatía
Alanina	Ala	A	no polar	neutro	1,8

Arginina	Arg	R	polar	positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	polar	neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	polar	negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	-0,4
Histidina	His	H	polar	Positivo (10 %) neutro (90 %)	-3,2
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	4,5
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	3,8
Lisina	Lys	K	polar	positivo	-3,9
Metionina	Met	M	no polar	neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	2,8
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	-0,9

(continuación)

Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	-1,3
Valina	Val	V	no polar	neutro	4,2

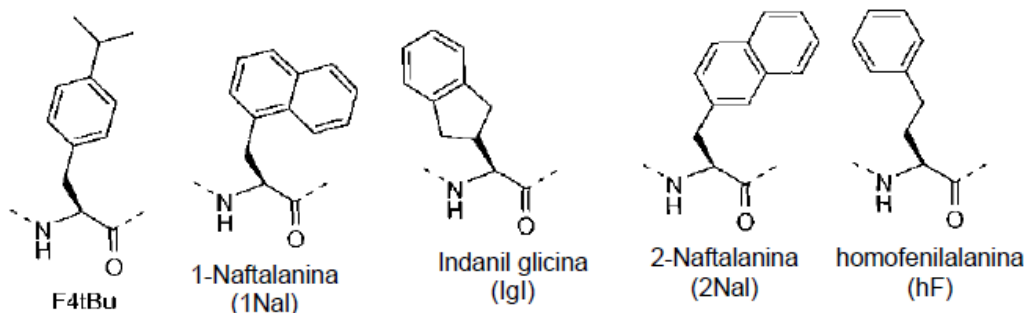
5

10 Los "aminoácidos hidrófobos" incluyen aminoácidos hidrófobos pequeños y aminoácidos hidrófobos grandes. Los "aminoácidos hidrófobos pequeños" son glicina, alanina, prolina, y análogos de estos. Los "aminoácidos hidrófobos grandes" son valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptófano, y análogos de estos. Los "aminoácidos polares" son serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, tirosina, y análogos de estos. Los "aminoácidos cargados" son lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y análogos de estos.

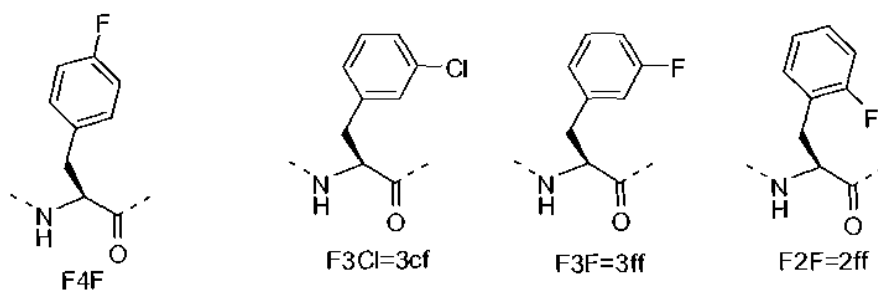
15 El término "análogo de aminoácido" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar a un aminoácido y que puede sustituirse por un aminoácido en la formación de un macrociclo peptidomimético. Los análogos de aminoácidos incluyen, sin limitación, β -aminoácidos y aminoácidos donde el grupo amino o carboxilo están sustituidos por un grupo reactivo similar (*por ejemplo*, sustitución de la amina primaria con una amina secundaria o terciaria, o sustitución del grupo carboxilo con un éster).

20 El término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los veinte aminoácidos que se encuentran comúnmente en los péptidos sintetizados en la naturaleza, y conocido por las abreviaturas de una letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V. Los aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos incluyen, sin limitación, estructuras de acuerdo con lo siguiente:

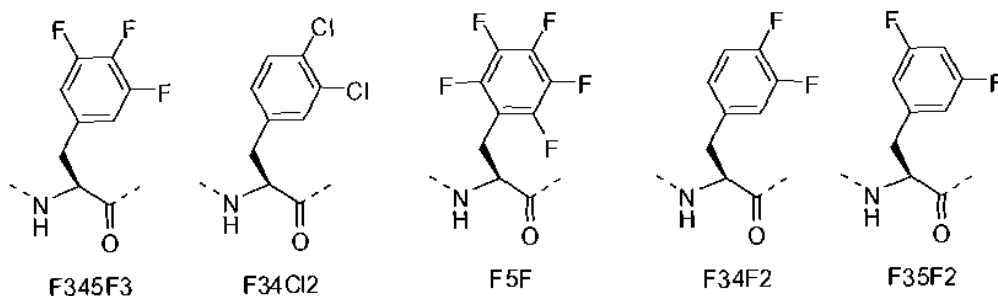
25

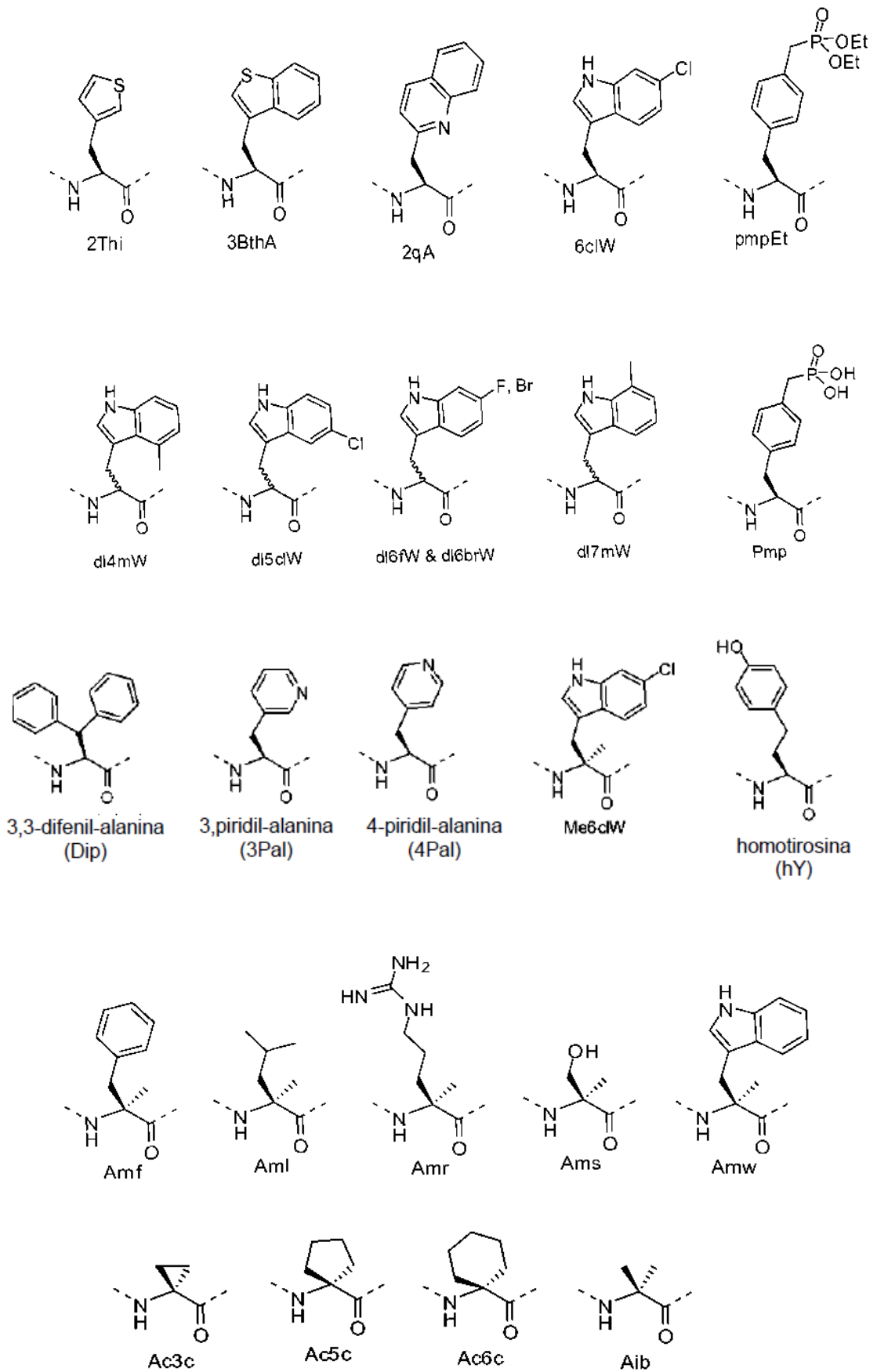


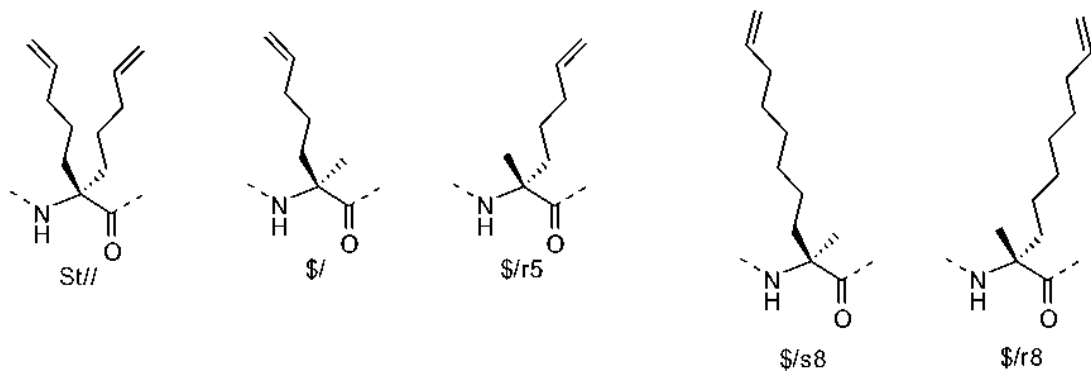
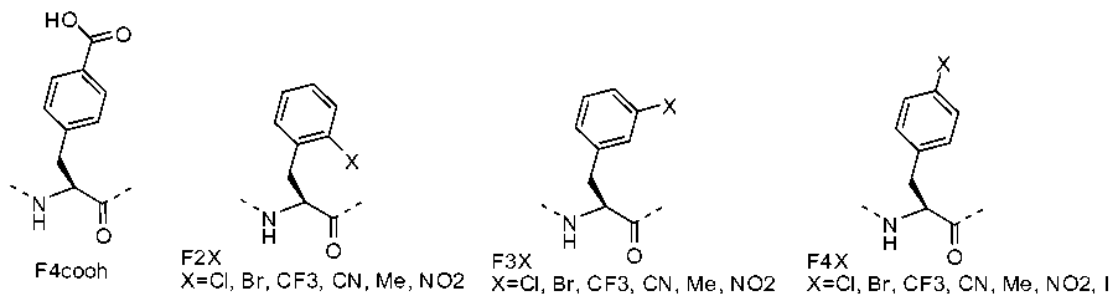
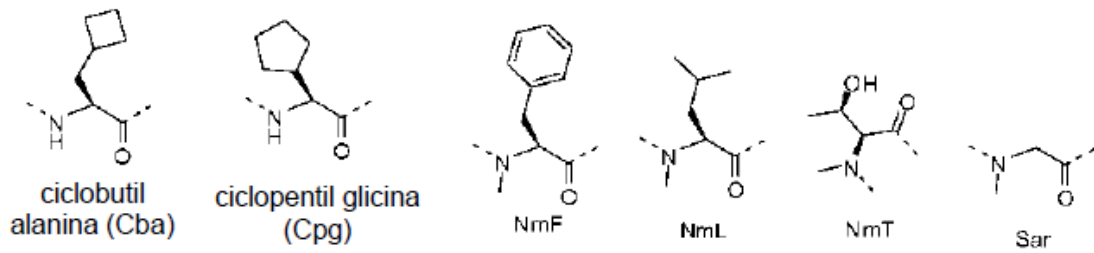
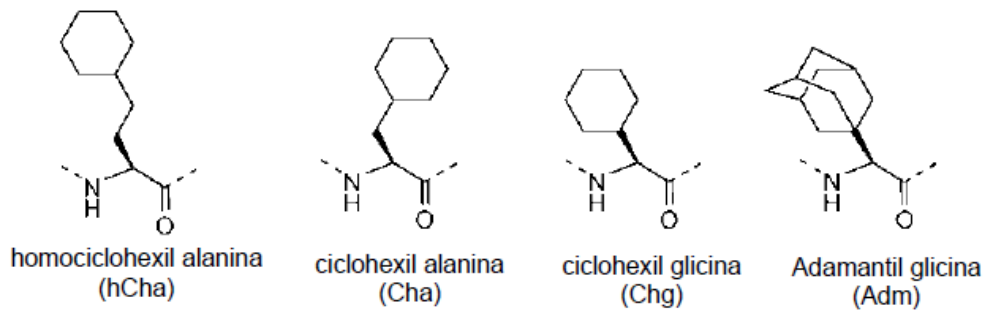
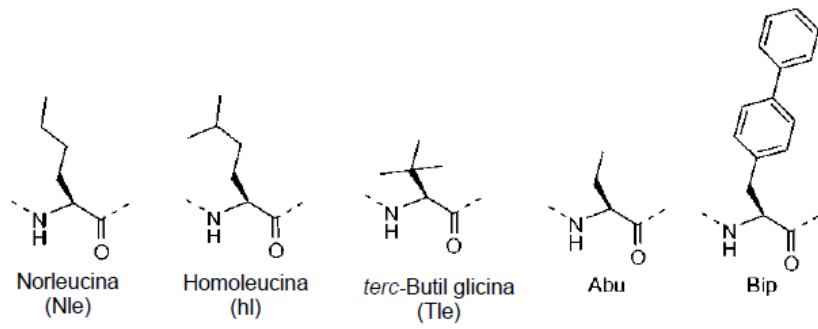
40

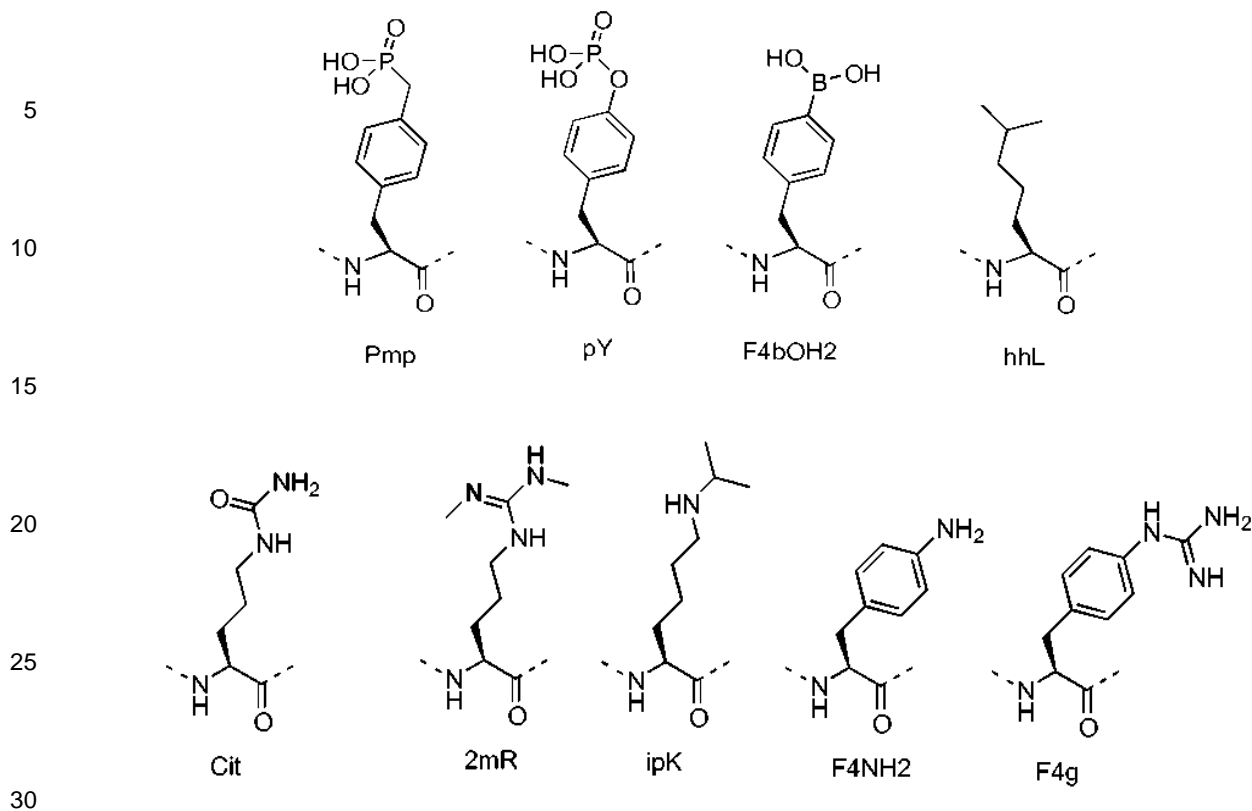


55









Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de β-aminoácidos. Los ejemplos de análogos de β-aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: análogos de β-aminoácidos cíclicos; β - alanina; (R) - β - fenilalanina; ácido (R) - 1,2,3,4 - tetrahydro - isoquinolina - 3 - acético; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (1 - naftil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2,4 - diclorofenil)butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - clorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - cianofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - fluorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - furil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - metilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - naftil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - tienil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (2 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3,4 - diclorofenil) butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3,4 - difluorofenil) butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - benzotienil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - clorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - cianofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - fluorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - metilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - piridil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - tienil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (3 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - bromofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - clorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - cianofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - fluorofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - iodofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - metilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - nitrofenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - piridil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - (4 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (R) - 3 - amino - 4 - pentafluoro - fenilbutírico; ácido (R) - 3 - amino - 5 - hexenoico; ácido (R) - 3 - amino - 5 - hexenoico; ácido (R) - 3 - amino - 5 - fenilpentanoico; ácido (R) - 3 - amino - 6 - fenil - 5 - hexenoico; ácido (S) - 1,2,3,4 - tetrahydro - isoquinolina - 3 - acético; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (1 - naftil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2,4 - diclorofenil)butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - clorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - cianofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - fluorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - furil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - metilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - naftil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - tienil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (2 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3,4 - diclorofenil)butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3,4 - difluorofenil)butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - benzotienil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - clorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - cianofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - fluorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - metilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - piridil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - tienil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (3 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - bromofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - clorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - cianofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - fluorofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - iodofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - metilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - nitrofenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - piridil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - (4 - trifluorometilfenil) - butírico; ácido (S) - 3 - amino - 4 - pentafluoro - fenilbutírico; ácido (S) - 3 - amino - 5 - hexenoico; ácido (S) - 3 - amino - 5 - hexenoico; ácido (S) - 3 - amino - 5 - fenilpentanoico; ácido (S) - 3 - amino - 6 - fenil - 5 - hexenoico; ácido 1,2,5,6 - tetrahidropiridina - 3 - carboxílico; ácido 1,2,5,6 - tetrahidropiridina - 4 - carboxílico; ácido 3 - amino - 3 - (2 - clorofenil) - propiónico; ácido 3 - amino - 3 - (2 - tienil) - propiónico; ácido 3 - amino - 3 - (3 - bromofenil) - propiónico; ácido 3 - amino - 3 - (4 - clorofenil) - propiónico; ácido 3 - amino - 3 - (4 - metoxifenil) - propiónico; ácido 3 - amino - 4,4,4 - trifluoro - butírico; ácido 3 -

aminoadípico; D- β - fenilalanina; β - leucina; L - β - homoalanina; ácido L - β - homoaspártico γ - benzil éster; ácido L - β - homoglutámico δ - benzil éster; L - β - homoisoleucina; L - β - homoleucina; L - β - homometionina; L - β - homofenilalanina; L - β - homoprolina; L - β - homotriptofano; L - β - homovalina; L - Nw - benziloxycarbonilo - β - homolisina; Nw - L - β - homoarginina; O - benzil - L - β - homohidroxiprolina; O - benzil - L - β - homoserina; O - benzil - L - β - homotreonina; O - benzil - L - β - homotirosina; γ - tritil - L - β - homoasparagina; (R) - β - fenilalanina; ácido L - β - homoaspártico γ - t - butil éster; ácido L - β - homoglutámico δ - t - butil éster; L - Nw - β - homolisina; N δ - tritil - L - β - homoglutamina; Nw - 2,2,4,6,7 - pentametil - dihidrobenzofuran - 5 - sulfonil - L - β - homoarginina; O - t - butil - L - β - homohidroxi - prolina; O - t - butil - L - β - homoserina; O - t - butil - L - β - homotreonina; O - t - butil - L - β - homotirosina; ácido 2- aminociclopentano carboxílico; y ácido 2-aminociclohexano carboxílico.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de alanina, valina, glicina o leucina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de alanina, valina, glicina y leucina incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

α - metoxiglicina; α - alil - L - alanina; ácido α - aminoisobutírico; α - metil - leucina; β - (1 - naftil) - D - alanina; β - (1 - naftil) - L - alanina; β - (2 - naftil) - D - alanina; β - (2 - naftil) - L - alanina; β - (2 - piridil) - D - alanina; β - (2 - piridil) - L - alanina; β - (2 - tienil) - D - alanina; β - (2 - tienil) - L - alanina; β - (3 - benzotienil) - D - alanina; β - (3 - benzotienil) - L - alanina; β - (3 - piridil) - D - alanina; β - (3 - piridil) - L - alanina; β - (4 - piridil) - D - alanina; β - (4 - piridil) - L - alanina; β - cloro - L - alanina; β - ciano - L - alanina; β - ciclohexil - D - alanina; β - ciclohexil - L - alanina; β - ciclopenten - 1 - il - alanina; β - ciclopentil - alanina; sal de β - ciclopropil - L - Ala - OH • dicitlohexilamonio; β - t - butil - D - alanina; β - t - butil - L - alanina; ácido γ - aminobutírico; ácido L - α,β - diaminopropiónico; 2,4 - dinitro - fenilglicina; 2,5 - dihidro - D - fenilglicina; ácido 2 - amino - 4,4,4 - trifluorobutírico; 2 - fluoro - fenilglicina; ácido 3 - amino - 4,4,4 - trifluoro - butírico; 3 - fluoro - valina; 4,4,4 - trifluoro - valina; sal de 4,5 - dehidro - L - leu - OH • dicitlohexilamonio; 4 - fluoro - D - fenilglicina; 4 - fluoro - L - fenilglicina; 4 - hidroxil - D - fenilglicina; ácido 5,5,5 - trifluoro - leucina; ácido 6 - aminohexanoico; sal de ciclopentil - D - Gly - OH • dicitlohexilamonio; sal de ciclopentil - Gly - OH • dicitlohexilamonio; Ácido D - α,β - diaminopropiónico; ácido D - α - aminobutírico; D - α - t - butilglicina; D - (2 - tienil)glicina; D - (3 - tienil)glicina; ácido D - 2 - aminocaproico; D - 2 - indanilglicina; sal de D - alilglicina•dicitlohexilamonio; D - ciclohexilglicina; D - norvalina; D - fenilglicina; ácido β - aminobutírico; ácido β - aminoisobutírico; (2 - bromofenil)glicina; (2 - metoxifenil)glicina; (2 - metilfenil)glicina; (2 - tiazolil)glicina; ácido (2 - tienil)glicina; 2 - amino - 3 - (dimetilamino) - propiónico; ácido L - α,β - diaminopropiónico; ácido L - α - aminobutírico; L - α - t - butilglicina; L - (3 - tienil)glicina; ácido L - 2 - amino - 3 - (dimetilamino) - propiónico; sal de ácido L - 2 - aminocaproico dicitlohexil - amonio; L - 2 - indanilglicina; sal de L - alilglicina•dicitlohexil amonio; L - ciclohexilglicina; L - fenilglicina; L - propargilglicina; L - norvalina; N - α - aminometil - L - alanina; ácido D - α,γ - diaminobutírico; ácido L - α,γ - diaminobutírico; β - ciclopropil - L - alanina; ácido (N - β - (2,4 - dinitrofenil)) - L - α,β - diaminopropiónico; ácido (N - β - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxociclohex - 1 - ilideno)etil) - D - α,β - diaminopropiónico; ácido (N - β - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxociclohex - 1 - ilideno)etil) - L - α,β - diaminopropiónico; ácido (N - β - 4 - metiltritil) - L - α,β - diaminopropiónico; ácido (N - β - aliloxycarbonil) - L - α,β - diaminopropiónico; ácido (N - γ - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxociclohex - 1 - ilideno)etil) - D - α,γ - diaminobutírico; ácido (N - γ - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxociclohex - 1 - ilideno)etil) - L - α,γ - diaminobutírico; ácido (N - γ - 4 - metiltritil) - D - α,γ - diaminobutírico; ácido (N - γ - 4 - metiltritil) - L - α,γ - diaminobutírico; ácido (N - γ - aliloxycarbonil) - L - α,γ - diaminobutírico; ácido D - α,γ - diaminobutírico; 4,5 - dehidro - L - leucina; ciclopentil - D - Gly - OH; ciclopentil - Gly - OH; D - alilglicina; D - homociclohexilalanina; L - 1 - pirenilalanina; ácido L - 2 - aminocaproico; L - alilglicina; L - homociclohexilalanina; y N - (2 - hidroxil - 4 - metoxil - Bzl) - Gly - OH.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de arginina o lisina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de arginina y lisina incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: citrulina; ácido L - 2 - amino - 3 - guanidinopropiónico; ácido L - 2 - amino - 3 - ureidopropiónico; L - citrulina; Lys(Me)₂ - OH; Lys(N₃) - OH; N δ - benziloxycarbonil - L - ornitina; Nw - nitro - D - arginina; Nw - nitro - L - arginina; α - metil - ornitina; ácido 2,6 - diaminoheptanodioico; L - ornitina; (N δ - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxo - ciclohex - 1 - ilideno)etil) - D - ornitina; (N δ - 1 - (4,4 - dimetil - 2,6 - dioxo - ciclohex - 1 - ilideno)etil) - L - ornitina; (N δ - 4 - metiltritil) - D - ornitina; (N δ - 4 - metiltritil) - L - ornitina; D - ornitina; L - ornitina; Arg(Me)(Pbf) - OH; Arg(Me)₂ - OH (asimétrico); Arg(Me)₂ - OH (simétrico); Lys(ivDde) - OH; Lys(Me)₂ - OH • HCl; Lys(Me₃) - OH cloruro; Nw - nitro - D - arginina; y Nw - nitro - L - arginina.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de los ácidos aspártico o glutámico. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de los ácidos aspártico y glutámico incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: ácido α - metil - D - aspártico; ácido α - metil - glutámico; ácido α - metil - L - aspártico; ácido γ - metileno - glutámico; ácido (N - γ - etil) - L - glutamina; ácido [N - α - (4 - aminobenzoil)] - L - glutámico; ácido 2,6 - diaminopimélico; ácido L - α - aminosubérico; ácido D - 2 - aminoadípico; ácido D - α - aminosubérico; ácido α - aminopimélico; ácido iminodiacético; ácido L - 2 - aminoadípico; ácido treo - β - metil - aspártico; ácido γ - carboxil - D - glutámico γ,γ - di - t - butil éster; ácido γ - carboxil - L - glutámico γ,γ - di - t - butil éster; Glu(OAll) - OH; L - Asu(OtBu) - OH; y ácido piroglutámico.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de cisteína y metionina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de cisteína y metionina incluyen, pero no se limitan a, Cys(farnesil) - OH, Cys(farnesil) - OMe, α - metil - metionina, Cys(2 - hidroxietil) - OH, Cys(3 - aminopropil) - OH, ácido 2 - amino - 4 - (etilil)butírico, butionina, butioninasulfonoximina, etionina, cloruro de metionina metilsulfonio, selenometionina, ácido cisteico, [2 - (4 - piridil)etil] - DL - penicilamina, [2 - (4 - piridil)etil] - L - cisteína, 4 - metoxibenzil - D - penicilamina, 4 - metoxibenzil - L - penicilamina, 4 - metilbenzil - D

- penicilamina, 4 - metilbenzil - L - penicilamina, benzil-D-cisteína, benzil - L - cisteína, benzil - DL - homocisteína, carbamoil - L - cisteína, carboxietil - L - cisteína, carboximetil - L - cisteína, difenilmetil - L - cisteína, etil - L - cisteína, metil - L - cisteína, t-butil - D - cisteína, tritil - L-homocisteína, tritil - D - penicilamina, cistationina, homocistina, L-homocistina, (2-aminoetil) - L - cisteína, seleno - L - cistina, cistationina, Cys(StBu) - OH, y acetamidometil - D - penicilamina.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de fenilalanina y tirosina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de fenilalanina y tirosina incluyen β - metil - fenilalanina, β - hidroxifenilalanina, α - metil - 3 - metoxi - DL - fenilalanina, α - metil - D - fenilalanina, α - metil - L - fenilalanina, ácido 1,2,3,4 - tetrahidroisoquinolina - 3 - carboxílico, 2,4 - dicloro - fenilalanina, 2 - (trifluorometil) - D - fenilalanina, 2 - (trifluorometil) - L - fenilalanina, 2 - bromo - D - fenilalanina, 2 - bromo - L - fenilalanina, 2 - cloro - D - fenilalanina, 2 - cloro - L - fenilalanina, 2 - ciano - D - fenilalanina, 2 - ciano - L - fenilalanina, 2 - fluoro - D - fenilalanina, 2 - fluoro - L - fenilalanina, 2 - metil - D - fenilalanina, 2 - metil - L - fenilalanina, 2 - nitro - D - fenilalanina, 2 - nitro - L - fenilalanina, 2;4;5 - trihidroxi - fenilalanina, 3,4,5 - trifluoro - D - fenilalanina, 3,4,5 - trifluoro - L - fenilalanina, 3,4 - dicloro - D - fenilalanina, 3,4 - dicloro - L - fenilalanina, 3,4 - difluoro - D - fenilalanina, 3,4 - difluoro - L - fenilalanina, 3,4 - dihidroxi - L - fenilalanina, 3,4 - dimetoxi - L - fenilalanina, 3,5,3' - triiodo - L - tironina, 3,5 - diiodo - D - tirosina, 3,5 - diiodo - L - tirosina, 3,5 - diiodo - L - tironina, 3 - (trifluorometil) - D - fenilalanina, 3 - (trifluorometil) - L - fenilalanina, 3 - amino - L - tirosina, 3 - bromo - D - fenilalanina, 3 - bromo - L - fenilalanina, 3 - cloro - D - fenilalanina, 3 - cloro - L - fenilalanina, 3 - cloro - L - tirosina, 3 - ciano - D - fenilalanina, 3 - ciano - L - fenilalanina, 3 - fluoro - D - fenilalanina, 3 - fluoro - L - fenilalanina, 3 - fluoro - tirosina, 3 - iodo - D - fenilalanina, 3 - iodo - L - fenilalanina, 3 - iodo - L - tirosina, 3 - metoxi - L - tirosina, 3 - metil - D - fenilalanina, 3 - metil - L - fenilalanina, 3 - nitro - D - fenilalanina, 3 - nitro - L - fenilalanina, 3 - nitro - L - tirosina, 4 - (trifluorometil) - D - fenilalanina, 4 - (trifluorometil) - L - fenilalanina, 4 - amino - D - fenilalanina, 4 - amino - L - fenilalanina, 4 - benzoil - D - fenilalanina, 4 - benzoil - L - fenilalanina, 4 - bis(2 - cloroetil)amino - L - fenilalanina, 4 - bromo - D - fenilalanina, 4 - bromo - L - fenilalanina, 4 - cloro - D - fenilalanina, 4 - cloro - L - fenilalanina, 4 - ciano - D - fenilalanina, 4 - ciano - L - fenilalanina, 4 - fluoro - D - fenilalanina, 4 - fluoro - L - fenilalanina, 4 - iodo - D - fenilalanina, 4 - iodo - L - fenilalanina, homofenilalanina, tiroxina, 3,3 - difenilalanina, tironina, etil-tirosina, y metil-tirosina.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de prolina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de prolina incluyen, pero no se limitan a, 3,4-deshidro-prolina, 4-fluoro-prolina, cis-4-hidroxi-prolina, ácido tiazolidina-2-carboxílico, y trans-4-fluoro- prolina.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de serina y treonina. Los ejemplos de análogos de aminoácidos de serina y treonina incluyen, entre otros, ácido 3 - amino - 2 - hidroxil - 5 - metilhexanoico, ácido 2 - amino - 3 - hidroxil - 4 - metilpentanoico, ácido 2 - amino - 3 - etoxibutanoico, ácido 2 - amino - 3 - metoxibutanoico, ácido 4 - amino - 3 - hidroxil - 6 - metilheptanoico, ácido 2 - amino - 3 - benziloxipropiónico, ácido 2 - amino - 3 - benziloxipropiónico, ácido 2 - amino - 3 - etoxipropiónico, ácido 4 - amino - 3 - hidroxibutanoico, y α -metilserina.

Los análogos de aminoácidos incluyen análogos de triptófano. Los ejemplos de análogos de aminoácidos del triptófano incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: α - metil - triptófano; β - (3 - benzotienil) - D - alanina; β - (3 - benzotienil) - L - alanina; 1 - metil - triptófano; 4 - metil - triptófano; 5 - benziloxi - triptófano; 5 - bromo - triptófano; 5 - cloro - triptófano; 5 - fluoro - triptófano; 5 - hidroxil - triptófano; 5 - hidroxil - L - triptófano; 5 - metoxi - triptófano; 5 - metoxi - L - triptófano; 5 - metil - triptófano; 6 - bromo - triptófano; 6 - cloro - D - triptófano; 6 - cloro - triptófano; 6 - fluoro - triptófano; 6 - metil - triptófano; 7 - benziloxi - triptófano; 7 - bromo - triptófano; 7 - metil - - triptófano; ácido D - 1,2,3,4 - tetrahidro - norarmano - 3 - carboxílico; ácido 6 - metoxi - 1,2,3,4 - tetrahidronorarmano - 1 - carboxílico; ácido 7 - azatriptófano; L - 1,2,3,4 - tetrahidro - norarmano - 3 - carboxílico; 5 - metoxi - 2 - metil - triptófano; y 6 - cloro - L - triptófano.

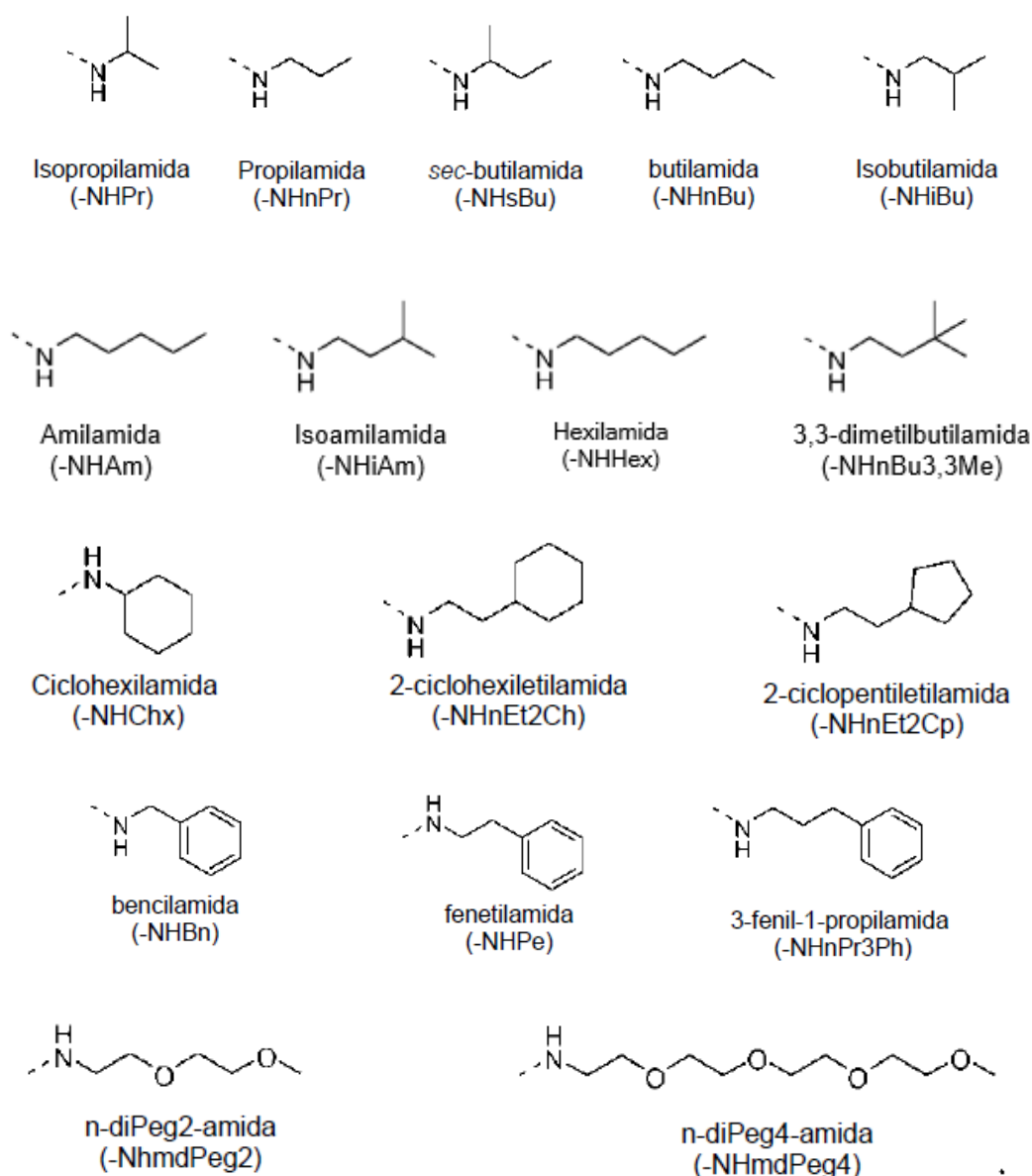
En algunos casos, los análogos de aminoácidos son racémicos. En algunos casos, se usa el isómero D del análogo de aminoácido. En algunos casos, se usa el isómero L del análogo de aminoácido. En otros casos, el análogo de aminoácido comprende centros quirales que están en la configuración R o S. Aún en otros casos, el grupo(s) amino de un análogo de β -aminoácido está sustituido con un grupo protector, *por ejemplo*, terc-butiloxicarbonilo (grupo BOC), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), tosilo, y similares. Aún en otros casos, el grupo funcional ácido carboxílico de un análogo de β -aminoácido está protegido, por ejemplo, como su derivado éster. En algunos casos se usa la sal del análogo de aminoácido.

Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar de la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido sin abolir o alterar sustancialmente su actividad biológica o bioquímica esencial (por ejemplo, unión o activación de receptor). Un residuo de aminoácido "esencial" es un residuo que, cuando se altera de la secuencia de tipo silvestre del polipéptido, resulta en la abolición o en la abolición sustancial de la actividad biológica o bioquímica esencial del polipéptido.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, K, R, H), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, D, E), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, G, N, Q, S, T, Y, C), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, A, V, L, I, P, F, M, W), cadenas laterales

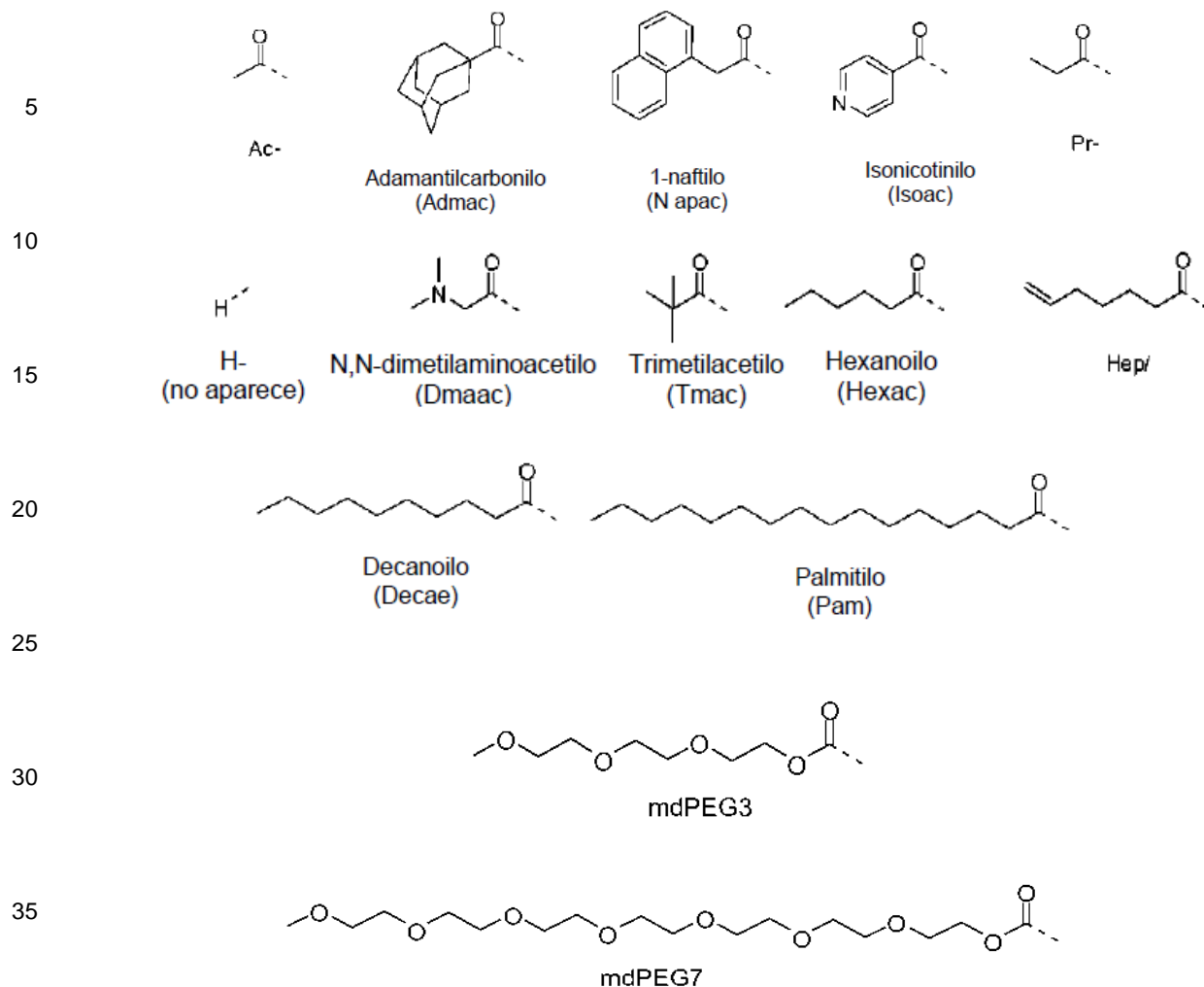
beta ramificadas (*por ejemplo*, T, V, I) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, Y, F, W, H). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido, por ejemplo, se reemplaza con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Otros ejemplos de sustituciones aceptables son sustituciones basadas en consideraciones isoestéricas (por ejemplo, norleucina por metionina) u otras propiedades (por ejemplo, 2-tienilalanina por fenilalanina o 6-Cl-triptófano por triptófano).

El término "grupo de protección" se refiere a la porción química que se encuentra en el extremo carboxi o amino de la cadena polipeptídica del macrociclo peptidomimético sujeto. El grupo protector de un extremo carboxilo terminal incluye un ácido carboxílico no modificado (es decir, -COOH) o un ácido carboxílico con un sustituyente. Por ejemplo, el extremo carboxilo terminal puede sustituirse con un grupo amino para producir una carboxamida en el extremo C terminal. Varios sustituyentes incluyen, pero no se limitan a aminas primarias y secundarias, que incluye las aminas secundarias pegiladas. Los grupos de protección de amina secundaria representativos para el extremo C terminal incluyen:



El grupo de terminación de un extremo amino terminal incluye una amina no modificada (es decir, -NH₂) o una amina con un sustituyente. Por ejemplo, el extremo amino puede sustituirse con un grupo acilo para producir una carboxamida en el extremo N-terminal. Varios sustituyentes incluyen, pero no se limitan a grupos acilo sustituidos, que incluyen carbonilos C₁-C₆, carbonilos C₇-C₃₀, y carbamatos pegilados.

Los grupos protectores representativos para el extremo N terminal incluyen, pero no se limitan a, 4-FBzl (4-fluorobencilo) y los siguientes:



40 El término "miembro" como se usa en la presente descripción junto con macrociclos o enlazadores formadores de macrociclo se refiere a los átomos que forman o pueden formar el macrociclo, y excluye átomos sustituyentes o de cadena lateral. Por analogía, el ciclodecano, el 1,2-difluoro-decano y el 1,3-dimetilciclodecano se consideran todos macrociclos de diez miembros ya que los sustituyentes de hidrógeno o flúor o las cadenas laterales de metilo no participan en la formación del macrociclo.

45 El símbolo " cuando se usa como parte de una estructura molecular se refiere a un enlace único o un enlace doble *trans* o *cis*".

50 El término "cadena lateral de aminoácidos" se refiere a una porción unida al carbono α (u otro átomo de la cadena principal) en un aminoácido. Por ejemplo, la cadena lateral de aminoácidos para alanina es metilo, la cadena lateral de aminoácidos para fenilalanina es fenilmetilo, la cadena lateral de aminoácidos para cisteína es tiometilo, la cadena lateral de aminoácidos para aspartato es carboximetilo, la cadena lateral de aminoácidos para tirosina es 4-hidroxifenilmetilo, etcétera. Además, se incluyen otras cadenas laterales de aminoácidos no naturales, por ejemplo, las que se encuentran en la naturaleza (*por ejemplo*, un metabolito de aminoácido) o las que se fabrican sintéticamente (*por ejemplo*, un α,α aminoácido disustituido).

60 El término " α,α aminoácido disustituido" se refiere a una molécula o porción que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo unido a un carbono (el carbono α) que está unido a dos cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales.

65 El término "polipéptido" abarca dos o más aminoácidos naturales o no naturales unidos por un enlace covalente (*por ejemplo*, un enlace amida). Los polipéptidos como se describen en la presente descripción incluyen proteínas de longitud completa (*por ejemplo*, proteínas completamente procesadas) así como también secuencias de aminoácidos más cortas (*por ejemplo*, fragmentos de proteínas de origen natural o fragmentos de polipéptidos sintéticos).

El término "primer aminoácido C-terminal" se refiere al aminoácido que está más cerca del extremo C-terminal. El término "segundo aminoácido C-terminal" se refiere al aminoácido unido al N-terminal del primer aminoácido C-terminal.

5 El término "reactivo de macrociclización" o "reactivo formador de macrociclo" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier reactivo que pueda usarse para preparar un macrociclo peptidomimético a través de mediar la reacción entre dos grupos reactivos. Los grupos reactivos pueden ser, por ejemplo, una azida y un alquino, en cuyo caso los reactivos de macrociclización incluyen, sin limitación, reactivos de Cu tales como reactivos que proporcionan especies reactivas de Cu(I), tales como CuBr, CuI o CuOTf, así como también sales de Cu(II) tales como Cu(CO₂CH₃)₂,
10 CuSO₄, y CuCl₂ que pueden convertirse in situ en un reactivo de Cu(I) activo mediante la adición de un agente reductor tal como ácido ascórbico o ascorbato de sodio. Los reactivos de macrociclización pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, reactivos de Ru conocidos en la técnica tal como Cp*RuCl(PPh₃)₂, [Cp*RuCl]₄ u otros reactivos de Ru que pueden proporcionar una especie reactiva de Ru(II). En otros casos, los grupos reactivos son olefinas terminales. En tales casos, los reactivos de macrociclización o los reactivos formadores de macrociclo son catalizadores de metátesis que incluyen, pero no se limitan a, catalizadores de complejo de carbeno de metal de transición tardía estabilizados tales como catalizadores carbeno de metal de transición del Grupo VIII. Por ejemplo, tales catalizadores son centros metálicos Ru y Os que tienen un estado de oxidación +2, un conteo de electrones de 16 y pentacoordinados. En otros ejemplos, los catalizadores tienen centros W o Mo. Se describen varios catalizadores en Grubbs y otros, "Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis" Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452, patente de EE.UU. núm. 5,811,515; patente de EE.UU. núm. 7,932,397; Solicitud de EE.UU. núm. 2011/0065915; Solicitud de EE.UU. núm. 2011/0245477; Yu y otros, "Synthesis of Macrocyclic Natural Products by Catalyst-Controlled Stereoselective Ring-Closing Metathesis," Nature 2011, 479, 88; y Peryshkov y otros, "Z-Selective Olefin Metathesis Reactions Promoted by Tungsten Oxo Alkylidene Complexes," J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 20754. Aún en otros casos, los grupos reactivos son grupos tiol. En tales casos, el reactivo de macrociclización es, por ejemplo, un enlazador funcionalizado con dos grupos reactivos tiol tales como grupos halógenos.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo o un radical de estos.

30 El término "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que es una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀ indica que el grupo tiene de 1 a 10 (inclusive) átomos de carbono en él. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 1 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

35 El término "alquilenilo" se refiere a un alquilo divalente (*es decir*, -R-).

El término "alquenilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que es una cadena lineal o una cadena ramificada que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. La porción alquenilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en él. El término "alquenilo inferior" se refiere a una cadena de alquenilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquenilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

40 El término "alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que es una cadena lineal o ramificada que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. La porción alquinilo contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₂-C₁₀ indica que el grupo tiene de 2 a 10 (inclusive) átomos de carbono en él. El término "alquinilo inferior" se refiere a una cadena alquinilo C₂-C₆. En ausencia de cualquier designación numérica, "alquinilo" es una cadena (lineal o ramificada) que tiene de 2 a 20 (inclusive) átomos de carbono en ella.

50 El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 6 carbonos o bicíclico de 10 carbonos en donde 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y similares. El término "arilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con arilo.

"Arilalquilo" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado por un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente. Los ejemplos representativos de un grupo arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, 2-metilfenilo, 3-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etilfenilo, 3-etilfenilo, 4-etilfenilo, 2-propilfenilo, 3-propilfenilo, 4-propilfenilo, 2-butilfenilo, 3-butilfenilo, 4-butilfenilo, 2-pentilfenilo, 3-pentilfenilo, 4-pentilfenilo, 2-isopropilfenilo, 3-isopropilfenilo, 4-isopropilfenilo, 2-isobutilfenilo, 3-isobutilfenilo, 4-isobutilfenilo 2-sec-butilfenilo, 3-sec-butilfenilo, 4-sec-butilfenilo, 2-t-butilfenilo, 3-t-butilfenilo y 4-t-butilfenilo.

60 "Arilamido" se refiere a un grupo arilo, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo arilo se ha reemplazado con uno o más grupos -C(O)NH₂. Ejemplos representativos de un grupo arilamido incluyen 2-C(O)NH₂-fenilo, 3-C(O)NH₂-fenilo, 4-C(O)NH₂-fenilo, 2-C(O)NH₂-piridilo, 3-C(O)NH₂-piridilo, y 4-C(O)NH₂-piridilo,

65 "Alquilheterociclo" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, tal como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado con un heterociclo. Los ejemplos representativos de un grupo alquilheterociclo incluyen, pero no se limitan a, -CH₂CH₂-morfolina, -CH₂CH₂-piperidina, -CH₂CH₂CH₂-morfolina, y -

CH₂CH₂CH₂-imidazol.

5 "Alquilamido" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado con un grupo -C(O)NH₂. Los ejemplos representativos de un grupo alquilamido incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₃, -CH₂CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃, -CH(C(O)NH₂)CH₂CH₃, -C(CH₃)₂CH₂-C(O)NH₂, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₃-CH₃, y -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH=CH₂.

10 "Alcanol" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado con un grupo hidroxilo. Los ejemplos representativos de un grupo alcanol incluyen, pero no se limitan a, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH(OH)CH₃, -CH₂CH(OH)CH₂CH₃, -CH(OH)CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂OH.

15 "Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo C₁-C₅, como se definió anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo C₁-C₅ se ha reemplazado con un grupo --COOH. Los ejemplos representativos de un grupo alquilcarboxi incluyen, pero no se limitan a, -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₂CH₃, -CH(COOH)CH₂CH₃ y -C(CH₃)₂CH₂COOH.

20 El término "cicloalquilo" como se emplea en la presente descripción incluye grupos hidrocarbonados cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen de 3 a 12 carbonos, preferentemente, de 3 a 8 carbonos, y con mayor preferencia de 3 a 6 carbonos, en donde el grupo cicloalquilo adicionalmente está opcionalmente sustituido. Algunos grupos cicloalquilo incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.

30 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados de O, N, o S (*por ejemplo*, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de O, N, o S si son monocíclicos, bicíclicos, o tricíclicos, respectivamente), en donde 0, 1, 2, 3, o 4 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo, y similares.

35 El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con heteroarilo.

40 El término "heteroarilalquilo" o el término "heteroaralquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un heteroarilo. El término "heteroarilalcoxi" se refiere a un alcoxi sustituido con heteroarilo.

45 El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados de O, N, o S (*por ejemplo*, átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de O, N, o S si son monocíclicos, bicíclicos, o tricíclicos, respectivamente), en donde 0, 1, 2 o 3 átomos de cada anillo están sustituidos por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, y similares.

50 El término "sustituyente" se refiere a un grupo que reemplaza un segundo átomo o grupo tal como un átomo de hidrógeno en cualquier molécula, compuesto o porción. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, grupos halo, hidroxí, mercapto, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, aralquilo, alcoxi, tioalcoxi, ariloxi, amino, alcoxycarbonilo, amido, carboxi, alcanosulfonilo, alquilcarbonilo, y ciano.

55 En algunos casos, los compuestos descritos en la presente descripción contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, se presentan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen a menos que se describa expresamente de cualquier otra manera. En algunos casos, los compuestos descritos en la presente descripción además se representan en múltiples formas tautoméricas, en tales casos, los compuestos incluyen todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente descripción (*por ejemplo*, si la alquilación de un sistema de anillos resulta en la alquilación en múltiples sitios, la invención incluye todos estos productos de reacción).

60 Todas estas formas isoméricas de tales compuestos se incluyen a menos que se describa expresamente de cualquier otra manera. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente descripción se incluyen a menos que se describa expresamente de cualquier otra manera.

65 Como se usa en la presente descripción, los términos "aumentar" y "disminuir" significan, respectivamente, causar un aumento o disminución estadísticamente significativo (*es decir*, $p < 0,1$) de al menos un 5 %.

Como se usa en la presente descripción, la enumeración de un intervalo numérico para una variable tiene la intención de transmitir que la variable es igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Por lo tanto, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable es igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, que incluye los puntos extremos del intervalo. De manera similar, para una variable que es inherentemente continua, la variable es igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, que incluye los puntos extremos del intervalo. Como un ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe con valores entre 0 y 2 toma los valores 0, 1 o 2 si la variable es inherentemente discreta, y toma los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001 o cualquiera de otros valores reales ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es inherentemente continua.

Como se usa en la presente descripción, a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera, la palabra "o" se usa en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "uno u otro".

El término "en promedio" representa el valor medio derivado de realizar al menos tres réplicas independientes para cada punto de datos.

El término "actividad biológica" abarca las propiedades estructurales y funcionales de un macrociclo. La actividad biológica es, por ejemplo, estabilidad estructural, alfa-helicidad, afinidad por una diana, resistencia a la degradación proteolítica, penetrabilidad celular, estabilidad intracelular, estabilidad *in vivo* o cualquier combinación de estas.

El término "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de unión de una interacción, por ejemplo, entre un macrociclo peptidomimético y una diana. La afinidad de unión puede expresarse, por ejemplo, como una constante de disociación de equilibrio (" K_D "), que se expresa en unidades que son una medida de concentración (por ejemplo, M, mM, μ M, nM, etcétera). Numéricamente, la afinidad de unión y los valores de K_D varían inversamente, de manera que una afinidad de unión más baja corresponde a un valor de K_D más alto, mientras que una afinidad de unión más alta corresponde a un valor de K_D más bajo. Cuando es conveniente una alta afinidad de unión, la afinidad de unión "mejorada" se refiere a una mayor afinidad de unión y, por lo tanto, valores más bajos de K_D .

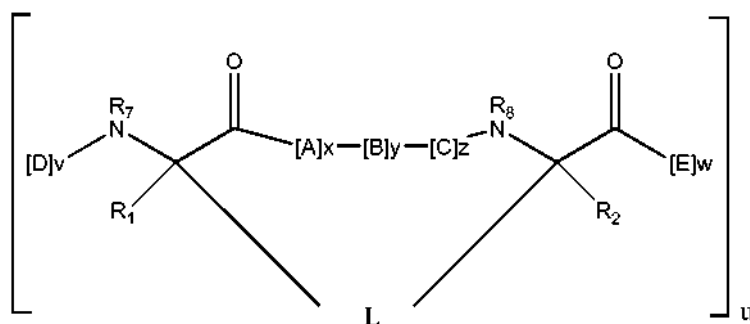
El término "eficacia *in vitro*" se refiere al grado en que un compuesto de prueba, tal como un macrociclo peptidomimético, produce un resultado beneficioso en un sistema de prueba o ensayo *in vitro*. La eficacia *in vitro* puede medirse, por ejemplo, como un valor de " IC_{50} " o " EC_{50} ", que representa la concentración del compuesto de prueba que produce el 50 % del efecto máximo en el sistema de prueba.

El término "relación de eficacias *in vitro*" o "relación de eficacia *in vitro*" se refiere a la relación de IC_{50} o valores de EC_{50} a partir de un primer ensayo (el numerador) versus un segundo ensayo (el denominador). En consecuencia, una relación de eficacia *in vitro* mejorada para el Ensayo 1 versus el Ensayo 2 se refiere a un valor más bajo para la relación expresada como $IC_{50}(\text{Ensayo 1})/IC_{50}(\text{Ensayo 2})$ o alternativamente como $EC_{50}(\text{Ensayo 1})/EC_{50}(\text{Ensayo 2})$. Este concepto puede caracterizarse, además, como una "selectividad mejorada" en el Ensayo 1 versus el Ensayo 2, que puede deberse bien sea a una disminución en el valor de IC_{50} o EC_{50} para la Diana 1 o a un aumento en el valor de IC_{50} o valor de EC_{50} para la Diana 2.

Los detalles de uno o más casos particulares de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción más abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Macrociclos Peptidomiméticos

En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene la Fórmula (I):

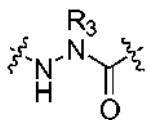


Fórmula I

en donde:

cada A, C, D, y E es independientemente un aminoácido (que incluye aminoácidos naturales o no naturales y análogos de aminoácidos) y los terminales D y E incluyen opcionalmente independientemente un grupo protector; B es un aminoácido (que incluye aminoácidos naturales o no naturales y análogos de aminoácidos),

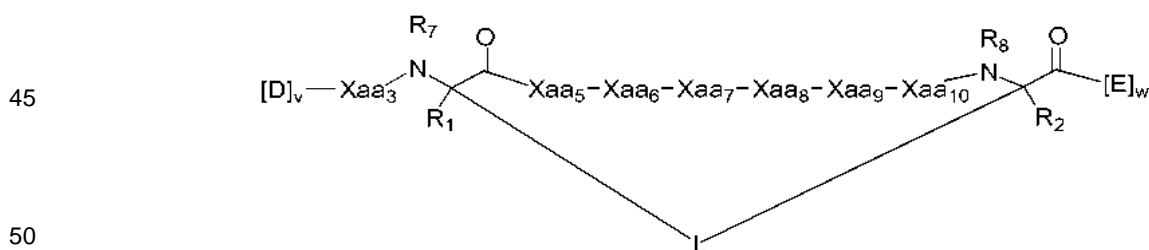
5



- 10 [-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], o [-NH-L₃-];
 R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-;
 R₃ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;
 15 L es un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-;
 L₁ y L₂ son independientemente alqueno, alqueno, alquino, heteroalqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;
 cada R₄ es alqueno, alqueno, alquino, heteroalqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, arileno, o heteroarileno;
 cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;
 cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;
 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;
 25 R₇ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;
 R₈ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;
 30 v y w son independientemente números enteros de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20, o 1-10;
 u es un número entero de 1-10, por ejemplo, 1-5, 1-3 o 1-2;
 x, y, y z son independientemente números enteros de 0-10, por ejemplo, la suma de x+y+z es 2, 3, o 6; y
 n es un número entero de 1-5.

35 En algunos casos, v y w son números enteros entre 1-30. En algunos casos, w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3 o 6. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3. En otros casos, la suma de x+y+z es 6.

40 En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos también se describen de la fórmula:



- 55 en donde:
 cada uno de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ es individualmente un aminoácido, en donde al menos tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂, donde cada X es un aminoácido;
 cada D y E es independientemente un aminoácido;
 60 R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;
 cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-;
 L₁ y L₂ son independientemente alqueno, alqueno, alquino, heteroalqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;

R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

cada R₄ es alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, o heteroarileno;

5 cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

10 R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

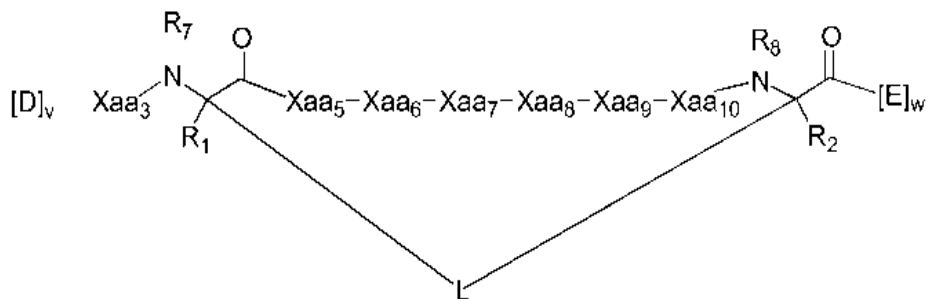
v es un número entero de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20 o 1-10;

15 w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10; y n es un número entero de 1-5.

En algunos casos, v y w son números enteros entre 1-30. En algunos casos, w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3 o 6. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3. En otros casos, la suma de x+y+z es 6.

En algunos casos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente descripción, al menos tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂. En otros casos, al menos cuatro de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂. En otros casos, al menos cinco de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂. En otros casos, al menos seis de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂. En otros casos, al menos siete de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂.

En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene la Fórmula:



en donde:

50 cada uno de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ es individualmente un aminoácido, en donde al menos tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂, donde cada X es un aminoácido;

55 cada D es independientemente un aminoácido;

cada E es independientemente un aminoácido, por ejemplo, un aminoácido seleccionado de Ala (alanina), D-Ala (D-alanina), Aib (ácido α-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina), y Ser (serina);

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

60 cada L o L' es independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂;

L₁ y L₂ son independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;

65 R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

cada R₄ es alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con un residuo E;

v es un número entero de 1-1000, por ejemplo, 1-500, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 1-20, o 1-10;

w es un número entero de 3-1000, por ejemplo, 3-500, 3-200, 3-100, 3-50, 3-30, 3-20, o 3-10; y n es un número entero de 1-5.

En algunos casos de la Fórmula anterior, al menos tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂. En otros casos de la Fórmula anterior, al menos cuatro de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂. En otros casos de la Fórmula anterior, al menos cinco de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂. En otros casos de la Fórmula anterior, al menos seis de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂. En otros casos de la Fórmula anterior, al menos siete de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, y Xaa₁₀ son el mismo aminoácido que el aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂.

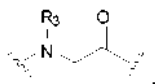
En algunos casos, w es un número entero de 3-10, por ejemplo, 3-6, 3-8, 6-8, o 6-10. En algunos casos, w es 3. En otros casos, w es 6. En algunos casos, v es un número entero del 1-10, por ejemplo, 2-5. En algunos casos, v es 2.

En el caso de cualquiera de las Fórmulas descritas en la presente descripción, L₁ y L₂, ya sea solos o en combinación, no forman un triazol o un tioéter.

En un ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, no sustituido o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, no sustituido o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otros casos, R₁ y R₂ son metilo.

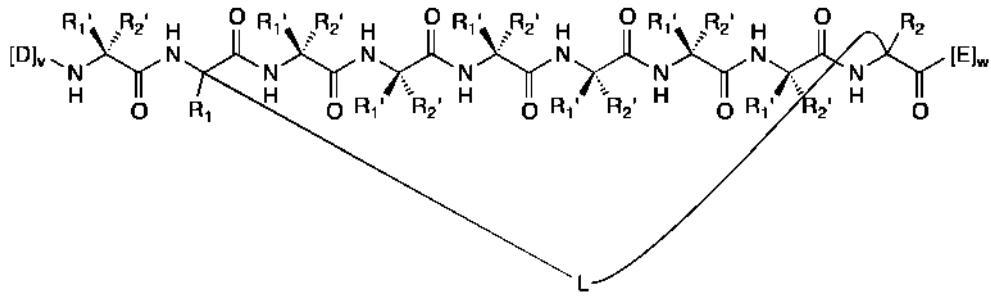
En algunos casos, x+y+z es al menos 3. En otros casos, x+y+z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3 o 6. En algunos casos, la suma de x+y+z es 3. En otros casos, la suma de x+y+z es 6. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula [A]_x, cuando x es 3, abarca los casos donde los aminoácidos no son idénticos, por ejemplo, Gln-Asp-Ala, así como también los casos donde los aminoácidos son idénticos, por ejemplo, Gln-Gln-Gln. Esto se aplica a cualquier valor de x, y, o z en los intervalos indicados. De manera similar, cuando u es mayor que 1, cada compuesto puede abarcar macrociclos peptidomiméticos que son iguales o diferentes. Por ejemplo, un compuesto puede comprender macrociclos peptidomiméticos que comprenden diferentes longitudes de enlazadores o composiciones químicas.

En algunos casos, el macrociclo peptidomimético comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, lo que permite el enlace de hidrógeno intrahélice. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un α,α -aminoácido disustituido. En un ejemplo, B es un α,α -aminoácido disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C, D o E es



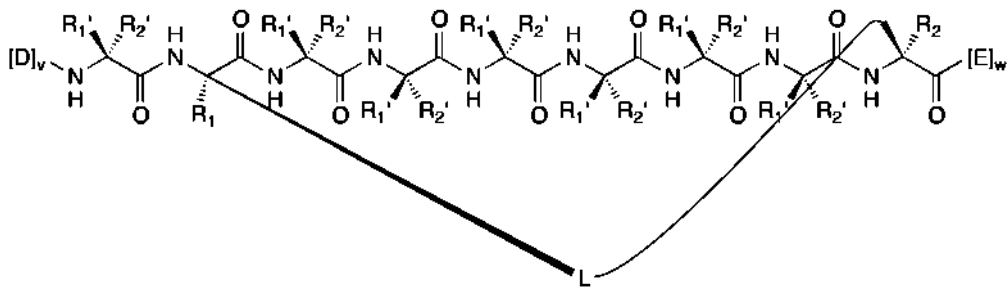
En otros casos, la longitud del enlazador formador de macrociclo L, como se mide desde un primer C α hasta un segundo C α , se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria conveniente, tal como una hélice α formada por residuos del macrociclo peptidomimético que incluye, pero no necesariamente limitado a aquellos entre el primer C α y un segundo C α .

En un caso, el macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I) es:



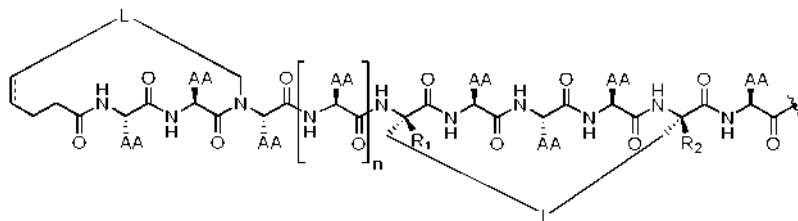
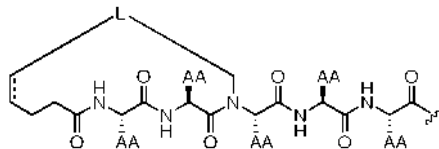
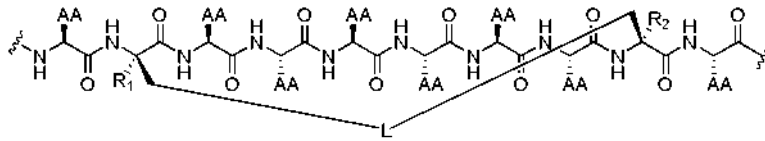
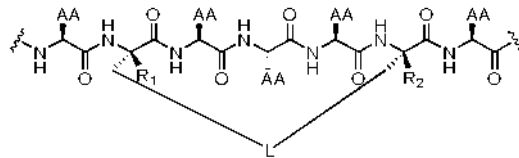
15 en donde cada R₁ y R₂ es independientemente -H, alquilo, alquenoilo, alquiniilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-.

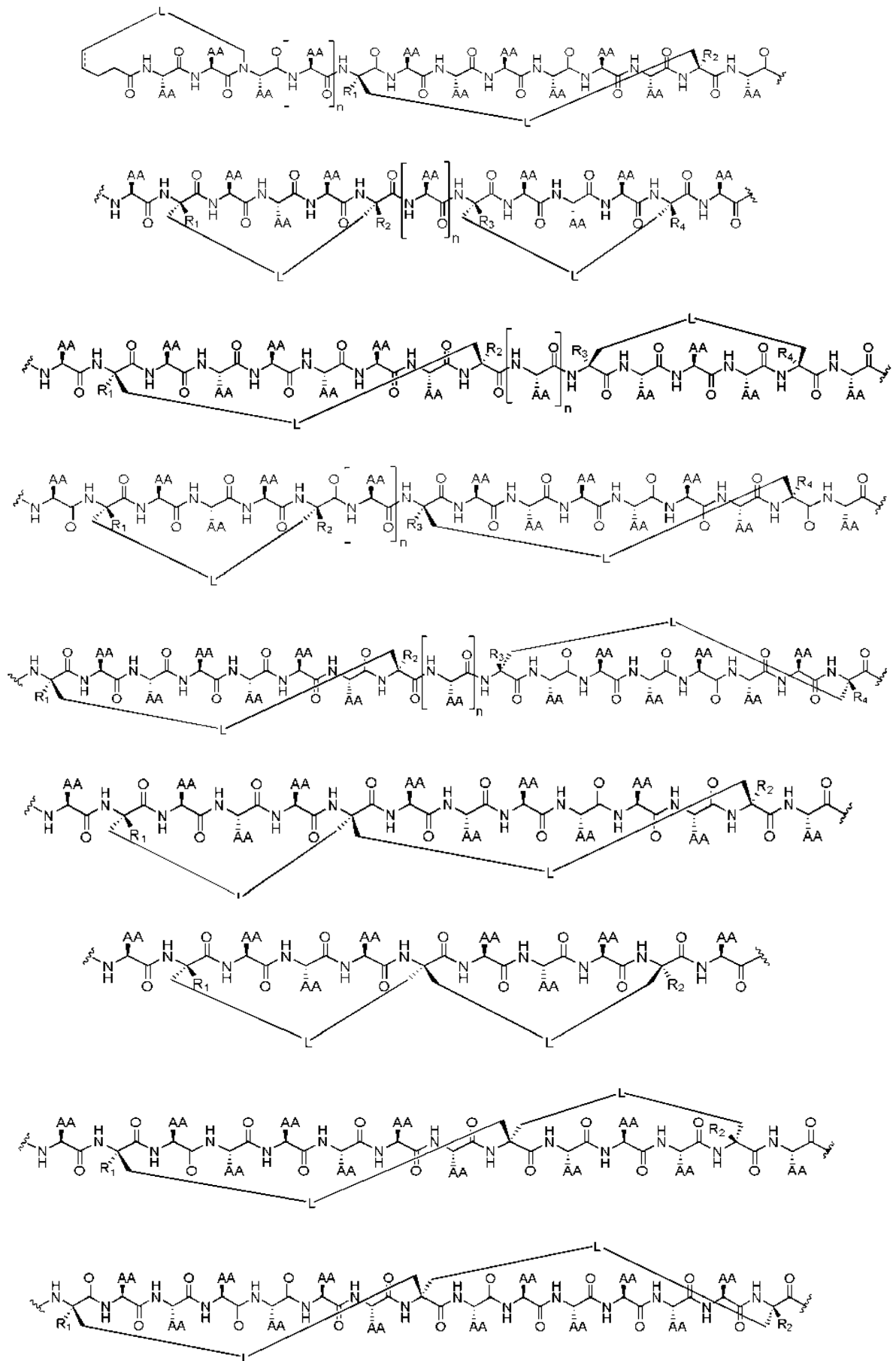
15 En casos relacionados, el macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I) es:



30 en donde cada R₁' y R₂' es independientemente un aminoácido.

30 En otros casos, el macrociclo peptidomimético de la Fórmula (I) es un compuesto de cualquiera de las fórmulas que se muestran más abajo:



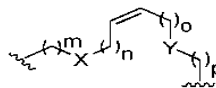
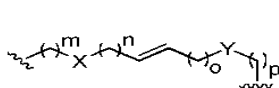


en donde "AA" representa cualquier cadena lateral de aminoácido natural o no natural y "S" es-[D]_v, [E]_w como se definió anteriormente, y n es un número entero entre 0 y 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500. En algunos casos, n es 0. En otros casos, n es menor que 50.

5

Los casos ilustrativos del enlazador L formador de macrociclo se muestran más abajo.

10

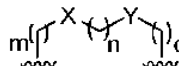
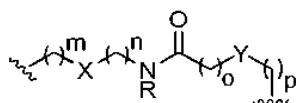


15

donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10

donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10

20



25

donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, alquilo, otro sustituyente

donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o = 0-10

30

En otros casos, D y/o E en el compuesto de la Fórmula I se modifican adicionalmente para facilitar la captación celular. En algunos casos, la lipidación o PEGilación de un macrociclo peptidomimético facilita la captación celular, aumenta la biodisponibilidad, aumenta la circulación sanguínea, altera la farmacocinética, disminuye la inmunogenicidad y/o disminuye la frecuencia de administración necesaria.

35

En otros casos, al menos uno de [D] y [E] en el compuesto de la Fórmula I representa una porción que comprende un enlazador formador de macrociclo adicional de manera que el macrociclo peptidomimético comprende al menos dos enlazadores formadores de macrociclo. En un caso específico, un macrociclo peptidomimético comprende dos enlazadores formadores de macrociclo. En un caso, u es 2.

40

En algunos casos, cualquiera de los enlazadores formadores de macrociclo descritos en la presente descripción puede usarse en cualquier combinación con cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 1, Tabla 1a, Tabla 1b, o Tabla 1c y además con cualquiera de los sustituyentes R indicados en la presente descripción.

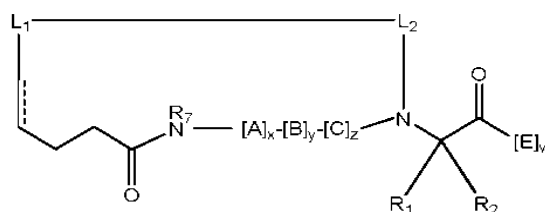
45

En algunos casos, el macrociclo peptidomimético comprende al menos un motivo de hélice α . Por ejemplo, A, B y/o C en el compuesto de la Fórmula I incluyen una o más hélices α . En general, las hélices α incluyen entre 3 y 4 residuos de aminoácidos por vuelta. En algunos casos, la hélice α del macrociclo peptidomimético incluye de 1 a 5 vueltas y, por lo tanto, de 3 a 20 residuos de aminoácidos. En casos específicos, la hélice α incluye 1 vuelta, 2 vueltas, 3 vueltas, 4 vueltas, o 5 vueltas. En algunos casos, el enlazador formador de macrociclo estabiliza un motivo de hélice α incluido dentro del macrociclo peptidomimético. Por tanto, en algunos casos, la longitud del enlazador L formador del macrociclo desde un primer C α hasta un segundo C α se selecciona para aumentar la estabilidad de una hélice α . En algunos casos, el enlazador formador de macrociclo abarca desde 1 vuelta a 5 vueltas de la hélice α . En algunos casos, el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 vuelta, 2 vueltas, 3 vueltas, 4 vueltas, o 5 vueltas de la hélice α . En algunos casos, la longitud del enlazador formador de macrociclo es aproximadamente de 5 Å a 9 Å por vuelta de la hélice α , o aproximadamente de 6 Å a 8 Å por vuelta de la hélice α . Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 vuelta de una hélice α , la longitud es igual a aproximadamente 5 enlaces carbono-carbono a 13 enlaces carbono-carbono, aproximadamente 7 enlaces carbono-carbono a 11 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 9 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 vueltas de una hélice α , la longitud es igual a aproximadamente 8 enlaces carbono-carbono a 16 enlaces carbono-carbono, aproximadamente 10 enlaces carbono-carbono a 14 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 12 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 vueltas de una hélice α , la longitud es igual a aproximadamente 14 enlaces carbono-carbono a 22 enlaces carbono-carbono, aproximadamente 16 enlaces carbono-carbono a 20 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 18 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 vueltas de una hélice α , la longitud es igual a aproximadamente 20 enlaces carbono-carbono a 28 enlaces carbono-carbono, aproximadamente 22 enlaces carbono-carbono a 26 enlaces carbono-carbono, o aproximadamente 24 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 vueltas de una hélice α , la longitud es igual a aproximadamente 26 enlaces carbono-carbono a 34 enlaces carbono-carbono, aproximadamente 28 enlaces carbono-carbono a 32 enlaces carbono-carbono, o

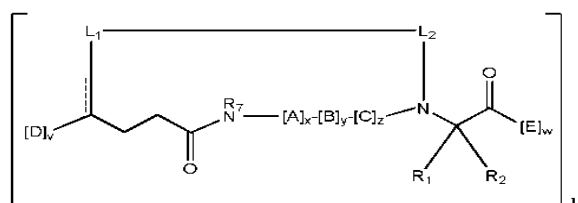
65

aproximadamente 30 enlaces carbono-carbono. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 vuelta de una hélice α , el enlace contiene aproximadamente 4 átomos a 12 átomos, aproximadamente 6 átomos a 10 átomos, o aproximadamente 8 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 vueltas de la hélice α , el enlace contiene aproximadamente 7 átomos a 15 átomos, aproximadamente 9 átomos a 13 átomos, o aproximadamente 11 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 vueltas de la hélice α , el enlace contiene aproximadamente 13 átomos a 21 átomos, aproximadamente 15 átomos a 19 átomos, o aproximadamente 17 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 vueltas de la hélice α , el enlace contiene aproximadamente 19 átomos a 27 átomos, aproximadamente 21 átomos a 25 átomos, o aproximadamente 23 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 vueltas de la hélice α , el enlace contiene aproximadamente 25 átomos a 33 átomos, aproximadamente 27 átomos a 31 átomos, o aproximadamente 29 átomos. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 1 vuelta de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente de 17 miembros a 25 miembros, aproximadamente de 19 miembros a 23 miembros, o aproximadamente 21 miembros. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 2 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente 29 miembros a 37 miembros, aproximadamente 31 miembros a 35 miembros, o aproximadamente 33 miembros. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 3 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente 44 miembros a 52 miembros, aproximadamente 46 miembros a 50 miembros, o aproximadamente 48 miembros. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 4 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente 59 miembros a 67 miembros, aproximadamente 61 miembros a 65 miembros, o aproximadamente 63 miembros. Cuando el enlazador formador de macrociclo abarca aproximadamente 5 vueltas de la hélice α , el macrociclo resultante forma un anillo que contiene aproximadamente 74 miembros a 82 miembros, aproximadamente 76 miembros a 80 miembros, o aproximadamente 78 miembros.

En otros casos, se describen macrociclos peptidomiméticos de la Fórmula (IV) o (IVa):



Fórmula (IV)

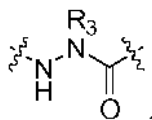


Fórmula (IVa)

en donde:

cada A, C, D, y E es independientemente un aminoácido natural o no natural, y los D y E terminales incluyen opcionalmente, independientemente, un grupo protector;

B es un aminoácido natural o no natural, un análogo de aminoácido,



[-NH-L₃-CO-], [-NH-L₃-SO₂-], o [-NH-L₃-];

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroalquilo, o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o al menos uno de R₁ y R₂ forma un enlazador formador de macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

R₃ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

L es un enlazador formador de macrociclo de la fórmula -L₁-L₂-;

L₁ y L₂ son independientemente alquileo, alquenilo, alquinilo, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, cicloarileno, heterocicloarileno, o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con R₅;

5 cada R₄ es alquileo, alquenilo, alquinilo, heteroalquileo, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, o heteroarileno;

cada K es O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

10 cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, cicloarilo, o heterocicloarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

v y w son independientemente números enteros de 1-1000;

15 u es un número entero de 1-10;

x, y, z son independientemente números enteros de 0-10; y

n es un número entero de 1-5.

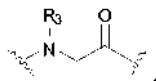
20 En un ejemplo, L₁ y L₂, solos o en combinación, no forman un triazol o un tioéter.

En un ejemplo, al menos uno de R₁ y R₂ es alquilo, no sustituido o sustituido con halo-. En otro ejemplo, tanto R₁ como R₂ son independientemente alquilo, no sustituido o sustituido con halo-. En algunos casos, al menos uno de R₁ y R₂ es metilo. En otros casos, R₁ y R₂ son metilo.

25 En algunos casos, x+y+z es al menos 1. En otros casos, x+y+z es al menos 2. En otros casos, x+y+z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cada aparición de A, B, C, D o E en un macrociclo o precursor de macrociclo se selecciona independientemente. Por ejemplo, una secuencia representada por la fórmula [A]_x, cuando x es 3, abarca los casos donde los aminoácidos no son idénticos, por ejemplo, Gln-Asp-Ala, así como también los casos donde los aminoácidos son idénticos, por ejemplo, Gln-Gln-Gln. Esto se aplica a cualquier valor de x, y, o z en los intervalos indicados.

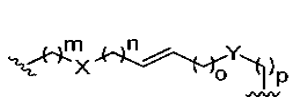
30 En algunos casos, el macrociclo peptidomimético comprende una estructura secundaria que es una hélice α y R₈ es -H, lo que permite el enlace de hidrógeno intrahélice. En algunos casos, al menos uno de A, B, C, D o E es un α,α-aminoácido disustituido. En un ejemplo, B es un α,α-aminoácido disustituido. Por ejemplo, al menos uno de A, B, C, D o E es ácido 2-aminoisobutírico. En otros casos, al menos uno de A, B, C, D o E es

35

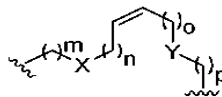


40 En otros casos, la longitud del enlazador formador de macrociclo L, como se mide desde un primer Cα hasta un segundo Cα, se selecciona para estabilizar una estructura peptídica secundaria conveniente, tal como una hélice α formada por residuos del macrociclo peptidomimético que incluye, pero no necesariamente limitado a aquellos entre el primer Cα y un segundo Cα.

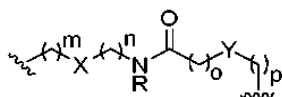
45 Los casos ilustrativos del enlazador formador de macrociclo -L₁-L₂- se muestran más abajo.



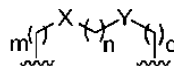
50 donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10



donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10



55 donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, alquilo, otro sustituyente



60 donde X, Y = -CH₂-, O, S, o NH
m, n, o = 0-10

65 A menos que se indique de cualquier otra manera, cualquier compuesto (que incluye macrociclos peptidomiméticos, precursores de macrociclo y otras composiciones) también pretende abarcar compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las estructuras

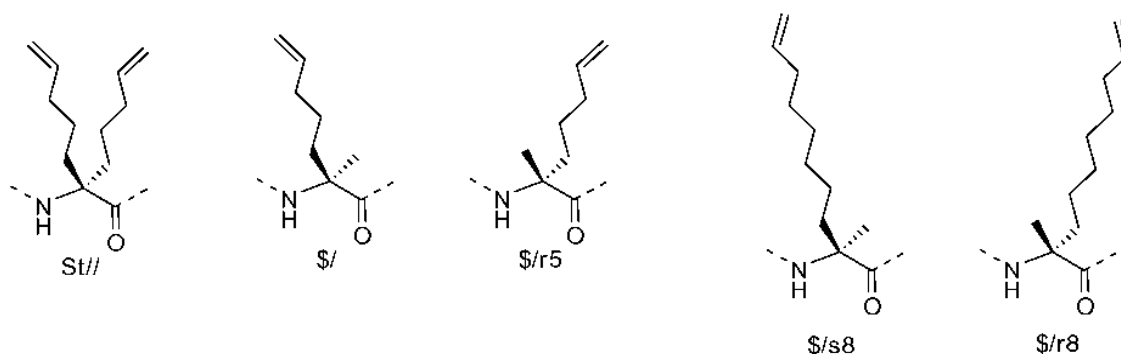
descritas excepto por el reemplazo de un hidrógeno por un deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C están dentro del alcance de esta invención.

En algunos casos, los compuestos descritos en la presente descripción pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden marcarse radiactivamente con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). En otros casos, uno o más átomos de carbono se reemplazan con un átomo de silicio. Todas las variaciones isotópicas de los compuestos descritos en la presente descripción ya sean radiactivos o no, se contemplan en la presente descripción.

Preparación de Macrociclos Peptidomiméticos

Los macrociclos peptidomiméticos pueden prepararse mediante cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cualquiera de los residuos indicados por "\$" o "\$r8" en la Tabla 1, Tabla 1a, Tabla 1b, o Tabla 1c puede sustituirse con un residuo capaz de formar un reticulante con un segundo residuo en la misma molécula o un precursor de tal residuo.

Se conocen en la técnica diversos métodos para efectuar la formación de macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, la preparación de macrociclos peptidomiméticos de la Fórmula I se describe en Schafmeister y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister & Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky y otros, Science 305:1466-1470 (2004); patente de los EE.UU. núm. 7,192,713 y solicitud PCT WO 2008/121767. Los α,α -aminoácidos disustituídos y los precursores de aminoácidos descritos en las referencias citadas pueden emplearse en la síntesis de los polipéptidos precursores del macrociclo peptidomimético. Por ejemplo, el "aminoácido olefínico S5" es (S)- α -(2'-pentenil) alanina y el "aminoácido olefínico R8" es (R)- α -(2'-octenil) alanina. Después de la incorporación de tales aminoácidos en polipéptidos precursores, las olefinas terminales se hacen reaccionar con un catalizador de metátesis, lo que conduce a la formación del macrociclo peptidomimético. En varios casos, los siguientes aminoácidos pueden emplearse en la síntesis del macrociclo peptidomimético:



En otros casos, los macrociclos peptidomiméticos son de la Fórmula IV o IVa. Los métodos para la preparación de tales macrociclos se describen, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. núm. 7,202,332.

Los métodos adicionales para formar macrociclos peptidomiméticos que se conciben como adecuados incluyen los descritos por Mustapa, M. Firouz Mohd y otros, J. Org. Chem (2003), 68, pp. 8193-8198; Yang, Bin y otros, Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, pp. 1403-1406; patente de los EE.UU. núm. 5,364,851; patente de los EE.UU. núm. 5,446,128; patente de los EE.UU. núm. 5,824,483; patente de los EE.UU. núm. 6,713,280; y patente de los EE.UU. núm. 7,202,332. En tales casos, se usan precursores de aminoácidos que contienen un sustituyente R- adicional en la posición alfa. Tales aminoácidos se incorporan en el precursor del macrociclo en las posiciones convenientes, que pueden ser en las posiciones donde el reticulante está sustituido o, alternativamente, en cualquier otro lugar en la secuencia del precursor del macrociclo. Después se efectúa la ciclación del precursor de acuerdo con el método indicado.

Ensayos

Las propiedades de los macrociclos peptidomiméticos se evalúan, por ejemplo, mediante el uso de los métodos descritos más abajo. En algunos casos, un macrociclo peptidomimético tiene propiedades biológicas mejoradas en relación con un polipéptido correspondiente que carece de los sustituyentes descritos en la presente descripción.

Ensayo para determinar α -helicidad

En solución, la estructura secundaria de los polipéptidos con dominios α -helicoidales alcanzará un equilibrio dinámico entre las estructuras helicoidales aleatorias y las estructuras α -helicoidales, expresado a menudo como un "porcentaje de helicidad". Por lo tanto, por ejemplo, los dominios de hélice alfa son predominantemente arrollamientos aleatorios

en solución, con un contenido de hélice alfa habitualmente inferior al 25 %. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados, por otro lado, poseen, por ejemplo, una alfa-helicidad que es al menos dos veces mayor que la de un polipéptido no reticulado correspondiente. En algunos casos, los macrociclos poseerán una alfa-helicidad superior al 50 %. Para evaluar la helicidad de macrociclos peptidomiméticos, los compuestos se disuelven en una solución acuosa (por ejemplo, solución de fosfato de potasio 50 mM a pH 7, o H₂O destilada, a concentraciones de 25-50 μ M). Los espectros de dicroísmo circular (CD) se obtienen en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) mediante el uso de parámetros de medición estándar (por ejemplo, temperatura, 20 °C; longitud de onda, 190-260 nm; resolución escalonada, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 segundo; ancho de banda, 1 nm; longitud de la trayectoria, 0,1 cm). El contenido α -helicoidal de cada péptido se calcula dividiendo la elipticidad media del residuo (por ejemplo, $[\Phi]_{222\text{obs}}$) por el valor informado para un decapeptido helicoidal modelo (Yang y otros, (1986), *Methods Enzymol.* 130:208)).

Ensayo para Determinar la Temperatura de Fusión (T_m).

Un macrociclo peptidomimético que comprende una estructura secundaria tal como una hélice α exhibe, por ejemplo, una temperatura de fusión más alta que un polipéptido no reticulado correspondiente. Típicamente, los macrociclos peptidomiméticos exhiben una T_m de > 60 °C que representa una estructura muy estable en soluciones acuosas. Para evaluar el efecto de la formación de macrociclo sobre la temperatura de fusión, se disuelven macrociclos peptidomiméticos o péptidos no modificados en H₂O destilada (por ejemplo, a una concentración final de 50 μ M) y la T_m se determina midiendo el cambio de elipticidad en un intervalo de temperatura (por ejemplo, 4 a 95 °C) en un espectropolarímetro (por ejemplo, Jasco J-710) mediante el uso de parámetros estándar (por ejemplo, longitud de onda 222 nm; resolución escalonada, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/seg; acumulaciones, 10; respuesta, 1 seg; ancho de banda, 1 nm; velocidad de aumento de temperatura: 1 °C/min; longitud de la trayectoria, 0,1 cm).

Ensayo de Resistencia a Proteasas.

El enlace amida de la cadena peptídica es susceptible de hidrólisis por proteasas, lo que hace que los compuestos peptídicos sean vulnerables a una rápida degradación *in vivo*. Sin embargo, la formación de hélice de los péptidos típicamente entierra la cadena amida y, por lo tanto, puede protegerla de la escisión proteolítica. Los macrociclos peptidomiméticos pueden someterse a proteólisis de tripsina *in vitro* para evaluar cualquier cambio en la velocidad de degradación en comparación con un polipéptido no reticulado correspondiente. Por ejemplo, el macrociclo peptidomimético y un polipéptido no reticulado correspondiente se incuban con tripsina agarosa y las reacciones se inactivan en varios puntos de tiempo mediante centrifugación y posterior inyección en HPLC para cuantificar el sustrato residual mediante absorción ultravioleta a 280 nm. Brevemente, el macrociclo peptidomimético y el precursor peptidomimético (5 mcg) se incuban con tripsina agarosa (Pierce) (S/E \sim 125) durante 0, 10, 20, 90, y 180 minutos. Las reacciones se inactivan mediante centrifugación de mesa a alta velocidad; el sustrato restante en el sobrenadante aislado se cuantifica mediante detección de picos basada en HPLC a 280 nm. La reacción proteolítica muestra una cinética de primer orden y la constante de velocidad, k , se determina a partir de una gráfica de $\ln[S]$ versus al tiempo ($k = -1 \times$ pendiente).

Ensayo de Estabilidad *Ex Vivo*.

Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, una vida media *ex vivo* que es al menos dos veces mayor que la de un polipéptido no reticulado correspondiente, y poseen una vida media *ex vivo* de 12 horas o más. Para los estudios de estabilidad del suero *ex vivo*, pueden usarse una diversidad de ensayos. Por ejemplo, un macrociclo peptidomimético y un polipéptido no reticulado correspondiente (2 mcg) se incuban con suero fresco de ratón, rata y/o humano (2 mL) a 37 °C durante 0, 1, 2, 4, 8, y 24 horas. Para determinar el nivel de compuesto intacto, puede usarse el siguiente procedimiento: Las muestras se extraen mediante la transferencia de 100 μ l de suero a tubos de centrifuga de 2 mL, seguido de la adición de 10 μ L de ácido fórmico al 50 % y 500 μ L de acetonitrilo y centrifugación a 14 000 RPM durante 10 minutos a 4 ± 2 °C. Después los sobrenadantes se transfieren a tubos frescos de 2 mL y se evaporan en TurboVap bajo N₂ < 10 psi, 37 °C. Las muestras se reconstituyen en 100 μ l de acetonitrilo:agua 50:50 y se someten a análisis por LC-MS/MS.

Ensayos de Unión *in vitro*.

Para evaluar la unión y la afinidad de macrociclos peptidomiméticos y precursores peptidomiméticos a proteínas aceptoras, se usa, por ejemplo, un ensayo de polarización de fluorescencia (FPA). La técnica FPA mide la orientación y la movilidad molecular mediante el uso de luz polarizada y un trazador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los trazadores fluorescentes (por ejemplo, FITC) unidos a moléculas con altos pesos moleculares aparentes (por ejemplo, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades de rotación más lentas en comparación a trazadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (por ejemplo, péptidos marcados con FITC que están libres en solución).

Por ejemplo, se incuban macrociclos peptidomiméticos fluoresceinados (25 nM) con la proteína aceptora (25-1000 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de unión se mide, por ejemplo, mediante polarización de fluorescencia en un espectrofotómetro de

luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d pueden determinarse a través del análisis de regresión no lineal mediante el uso de, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Un macrociclo peptidomimético muestra, en algunos casos, K_d similar o menor que un polipéptido no reticulado correspondiente.

5 Ensayos de Desplazamiento *In Vitro* Para Caracterizar Antagonistas de Interacciones Péptido-Proteína.

Para evaluar la unión y la afinidad de compuestos que antagonizan la interacción entre un péptido y una proteína aceptora, se usa, por ejemplo, un ensayo de polarización de fluorescencia (FPA) que utiliza un macrociclo peptidomimético fluoresceinado derivado de una secuencia precursora peptidomimética. La técnica FPA mide la orientación y la movilidad molecular mediante el uso de luz polarizada y un trazador fluorescente. Cuando se excitan con luz polarizada, los trazadores fluorescentes (*por ejemplo*, FITC) unidos a moléculas con altos pesos moleculares aparentes (*por ejemplo*, péptidos marcados con FITC unidos a una proteína grande) emiten niveles más altos de fluorescencia polarizada debido a sus velocidades de rotación más lentas en comparación a trazadores fluorescentes unidos a moléculas más pequeñas (*por ejemplo*, péptidos marcados con FITC que están libres en solución). Un compuesto que antagoniza la interacción entre el macrociclo peptidomimético fluoresceinado y una proteína aceptora se detectará en un experimento de FPA de unión competitiva.

Por ejemplo, los compuestos antagonistas putativos (1 nM a 1 mM) y un macrociclo peptidomimético fluoresceinado (25 nM) se incuban con la proteína aceptora (50 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM, Tris-HCL 50 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de unión del antagonista se mide, por ejemplo, mediante polarización de fluorescencia en un espectrofotómetro de luminiscencia (por ejemplo, Perkin-Elmer LS50B). Los valores de K_d pueden determinarse a través del análisis de regresión no lineal mediante el uso de, por ejemplo, el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

25 Cualquier clase de molécula, tales como moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, oligonucleótidos o proteínas, puede examinarse como antagonistas putativos en este ensayo.

30 Ensayo de Unión Proteína-ligando mediante Espectrometría de Masas de Selección por Afinidad

Para evaluar la unión y la afinidad de los compuestos de prueba por las proteínas, se usa, por ejemplo, un ensayo de espectrometría de masas de selección por afinidad. Los experimentos de unión proteína-ligando se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento representativo descrito para un experimento de control de todo el sistema mediante el uso de macrociclo peptidomimético 1 μ M más hMDM2 5 μ M. Se disuelve una alícuota de 1 μ L de DMSO de una solución madre 40 μ M de macrociclo peptidomimético en 19 μ L de PBS (solución salina tamponada con Fosfato: 50 mM, tampón Fosfato pH 7,5 que contiene NaCl 150 mM). La solución resultante se mezcla mediante pipeteo repetido y se clarifica mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. A una alícuota de 4 μ L del sobrenadante resultante se le añaden 4 μ L de hMDM2 10 μ M en PBS. Por lo tanto, cada muestra experimental de 8,0 μ L contiene 40 pmol (1,5 μ g) de proteína a una concentración de 5,0 μ M en PBS más macrociclo peptidomimético 1 μ M y DMSO al 2,5 %. Las muestras duplicadas preparadas de esta manera para cada punto de concentración se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, y después se enfriaron a 4 °C antes del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño LC-MS de inyecciones de 5,0 μ L. Las muestras que contienen una proteína diana, complejos proteína-ligando, y compuestos no unidos se inyectan en una columna SEC, donde los complejos se separan del componente que no está unido mediante una etapa rápida en SEC. El eluido de la columna SEC se controla mediante el uso de detectores UV para confirmar que la fracción de proteína de elución temprana, que eluye en el volumen vacío de la columna SEC, está bien separada de los componentes no unidos que se retienen en la columna. Después de que el pico que contiene la proteína y los complejos proteína-ligando eluye del detector UV primario, ingresa a un bucle de muestra donde se escinde de la corriente de flujo de la etapa SEC y se transfiere directamente a la LC-MS mediante un mecanismo de válvula. El ion $(M + 3H)^{3+}$ del macrociclo peptidomimético se observa mediante ESI-MS en el m/z esperado, lo que confirma la detección del complejo proteína-ligando.

Ensayo para Experimentos de Titulación de K_d de Proteína-ligando.

Para evaluar la unión y la afinidad de los compuestos de prueba por las proteínas, se realiza, por ejemplo, un experimento de titulación de K_d proteína-ligando. Los experimentos de titulaciones de K_d proteína-ligando se realizaron como sigue: se prepararon alícuotas de 2 μ L de DMSO de una solución madre diluida en serie del macrociclo peptidomimético titulable (5, 2, 5, ..., 0,098 mM), después se disolvió en 38 μ L de PBS. Las soluciones resultantes se mezclan pipeteando repetidamente y se clarificaron mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 min. A las alícuotas de 4,0 μ L de los sobrenadantes resultantes se añaden 4,0 μ L de hMDM2 10 μ M en PBS. Por lo tanto, cada muestra experimental de 8,0 μ L contiene 40 pmol (1,5 μ g) de proteína a una concentración de 5,0 μ M en PBS, concentraciones variables (125, 62, 5, ..., 0,24 μ M) del péptido titulable, y DMSO al 2,5 %. Las muestras duplicadas preparadas de esta manera para cada punto de concentración se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se enfriaron a 4 °C antes del análisis SEC-LC-MS de inyecciones de 2,0 μ L. El ion $(M + H)^{1+}$, $(M + 2H)^{2+}$, $(M + 3H)^{3+}$, y/o $(M + Na)^{1+}$ se observa mediante ESI-MS; los cromatogramas de iones extraídos se cuantifican, después se ajustan a las ecuaciones para derivar la afinidad de unión K_d como se describe en "A General Technique to Rank ProteinLigand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures." Annis, D. A.;

Nazef, N.; Chuang, C. C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. J. *Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15495-15503; además en "ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions" D. A. Annis, C.-C. Chuang, y N. Nazef. En *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*. Editado por Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH; 2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (Editores de la Serie): *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*.

Ensayo para Experimentos de Unión Competitiva mediante Selección de Afinidad-Espectrometría de Masas

Para determinar la capacidad de los compuestos de prueba para unirse competitivamente a proteínas, se realiza, por ejemplo, un ensayo de espectrometría de masas de selección por afinidad. Se prepara una mezcla de ligandos a 40 μM por componente mediante la combinación de alícuotas de 2 μL de soluciones madres de 400 μM de cada uno de los tres compuestos con 14 μL de DMSO. Después, se combinan alícuotas de 1 μL de esta mezcla de 40 μM por componente con alícuotas de 1 μL de DMSO de una solución madre diluida en serie de macrociclo peptidomimético titulable (10, 5, 2, 5, ..., 0,078 mM). Estas muestras de 2 μL se disuelven en 38 μL de PBS. Las soluciones resultantes se mezclaron pipeteando repetidamente y se clarificaron mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos. A las alícuotas de 4,0 μL de los sobrenadantes resultantes se añaden 4,0 μL de proteína hMDM2 10 μM en PBS. Por lo tanto, cada muestra experimental de 8,0 μL contiene 40 pmol (1,5 μg) de proteína a una concentración de 5,0 μM en PBS más ligando 0,5 μM , DMSO al 2,5 % y concentraciones variables (125, 62, 5, ..., 0,98 μM) del macrociclo peptidomimético titulable. Las muestras duplicadas preparadas de esta manera para cada punto de concentración se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min, después se enfriaron a 4 °C antes del análisis SEC-LC-MS de inyecciones de 2,0 μL . Los detalles adicionales sobre estos y otros métodos se describen en "A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures." Annis, D. A.; Nazef, N.; Chuang, C. C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. J. *Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15495-15503; además en "ALIS: An Affinity Selection Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions" D. A. Annis, C.-C. Chuang, y N. Nazef. En *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*. Editado por Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH; 2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (Editores de la Serie): *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*.

Ensayos de Unión en Células Intactas.

Es posible medir la unión de péptidos o macrociclos peptidomiméticos a sus aceptores naturales en células intactas mediante experimentos de inmunoprecipitación. Por ejemplo, las células intactas se incuban con compuestos fluoresceinados (marcados con FITC) durante 4 horas en ausencia de suero, seguido de reemplazo de suero y una incubación adicional que varía de 4 a 18 horas. Después, las células se sedimentan y se incuban en tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,6], NaCl 150 mM, CHAPS al 1 % y coctel inhibidor de proteasa) durante 10 minutos a 4 °C. Los extractos se centrifugan a 14 000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se recolectan y se incuban con 10 μL de anticuerpo anti-FITC generado en cabra durante 2 horas, rotando a 4 °C seguido de otras 2 horas de incubación a 4 °C con proteína A/G Sepharosa (50 μL de suspensión de perlas al 50 %). Después de una centrifugación rápida, los sedimentos se lavan en tampón de lisis que contiene una concentración de sal creciente (*por ejemplo*, 150, 300, 500 mM). Después, las perlas se vuelven a equilibrar en NaCl 150 mM antes de la adición de tampón de muestra que contiene SDS y se hierven. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se someten a electroforesis opcionalmente mediante el uso de geles Bis-Tris en gradiente de 4 %-12 % seguido de transferencia a membranas Immobilon-P. Después del bloqueo, las transferencias se incuban opcionalmente con un anticuerpo que detecta FITC y además con uno o más anticuerpos que detectan las proteínas que se unen al macrociclo peptidomimético.

Ensayos de Penetrabilidad Celular.

Un macrociclo peptidomimético es, por ejemplo, más penetrable en las células en comparación con un macrociclo no reticulado correspondiente. Los macrociclos peptidomiméticos con enlazadores optimizados poseen, por ejemplo, una penetrabilidad celular que es al menos dos veces mayor que un macrociclo no reticulado correspondiente y, a menudo, se observará que el 20 % o más del macrociclo peptidomimético aplicado ha penetrado en la célula después de 4 horas. Para medir la penetrabilidad celular de los macrociclos peptidomiméticos y el macrociclo no reticulado correspondiente, las células intactas se incubaron con macrociclos peptidomiméticos marcados con fluorescencia (por ejemplo, fluoresceinados) o el macrociclo no reticulado correspondiente (10 μM) durante 4 horas en medio sin suero a 37 °C, se lavaron dos veces con medio y se incubaron con tripsina (0,25 %) durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron de nuevo y se suspenden nuevamente en PBS. La fluorescencia celular se analizó, por ejemplo, mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur o un lector KineticScan® HCS de Cellomics.

Ensayos de Eficacia Celular.

La eficacia de determinados macrociclos peptidomiméticos se determina, por ejemplo, en ensayos basados en destrucción de células mediante el uso de una diversidad de líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas y células primarias derivadas de poblaciones de células humanas o de ratón. La viabilidad celular se controla, por ejemplo, durante más de 24-96 horas de incubación con macrociclos peptidomiméticos (0,5 a 50 μM) para identificar los que destruyen a $\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{M}$. Numerosos ensayos estándar que miden la viabilidad celular están disponibles comercialmente y se usan opcionalmente para evaluar la eficacia de los macrociclos peptidomiméticos. Además, los

ensayos que miden Anexina V y la activación de caspasa se usan opcionalmente para evaluar si los macrociclos peptidomiméticos destruyen las células mediante la activación de la maquinaria apoptótica. Por ejemplo, se usa el ensayo Cell Titer-glo que determina la viabilidad celular en función de la concentración de ATP intracelular.

5 Ensayo de Estabilidad *In Vivo*.

Para investigar la estabilidad *in vivo* de los macrociclos peptidomiméticos, los compuestos se administraron, por ejemplo, a ratones y/o ratas por vía IV, IP, PO o inhalación en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 50 mg/kg y las muestras de sangre se extrajeron a 0', 5', 15', 30', 1 hora, 4 horas, 8 horas y 24 horas después de la inyección. Después, se miden los niveles de compuesto intacto en 25 µl de suero fresco mediante LC-MS/MS como se indicó anteriormente.

Eficacia *In Vivo* en Modelos Animales.

15 Para determinar la actividad antioncogénica de macrociclos peptidomiméticos *in vivo*, los compuestos se administraron, por ejemplo, solos (IP, IV, PO, por inhalación o vías nasales) o en combinación con dosis subóptimas de quimioterapia relevante (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido). En un ejemplo, 5×10^6 células RS4;11 (establecidas a partir de la médula ósea de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) que expresan de manera estable la luciferasa se inyectaron por la vena de la cola en ratones NOD-SCID 3 horas después de haberlos sometidos a tratamiento con irradiación corporal total. En este modelo, si no se trata, esta forma de leucemia es fatal en 3 semanas. La leucemia se monitorea fácilmente, por ejemplo, mediante la inyección a los ratones con D-luciferina (60 mg/kg) y se obtienen imágenes de los animales anestesiados (*por ejemplo*, Sistema de Imágenes *In Vivo* Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). La bioluminiscencia corporal total se cuantifica mediante la integración del flujo fotónico (fotones/seg) mediante el programa informático Living Image (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los macrociclos peptidomiméticos solos o en combinación con dosis subóptimas de agentes quimioterapéuticos relevantes se administran, por ejemplo, a ratones leucémicos (10 días después de la inyección/día 1 del experimento, en un intervalo de bioluminiscencia de 14-16) por la vena de la cola o vía IP en dosis que varían desde 0,1 mg/kg a 50 mg/kg durante 7 a 21 días. Opcionalmente, se toman imágenes de los ratones a lo largo del experimento cada dos días y se monitorea la supervivencia diariamente durante la duración del experimento. Los ratones fallecidos opcionalmente se someten a una necropsia al final del experimento. Otro modelo animal es la implantación en ratones NOD-SCID de DoHH2, una línea celular derivada de linfoma folicular humano, que expresa luciferasa de manera estable. Estas pruebas *in vivo* opcionalmente generan datos farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos preliminares.

Ensayos Clínicos.

35 Para determinar la idoneidad de los macrociclos peptidomiméticos para el tratamiento de seres humanos, se realizan ensayos clínicos. Por ejemplo, los pacientes diagnosticados con cáncer y que necesitan tratamiento pueden seleccionarse y separarse en grupos de tratamiento y uno o más grupos de control, en donde al grupo de tratamiento se le administra un macrociclo peptidomimético, mientras que los grupos de control reciben un placebo o un fármaco anticanceroso conocido. Por lo tanto, la seguridad y eficacia del tratamiento de los macrociclos peptidomiméticos pueden evaluarse mediante la realización de comparaciones de los grupos de pacientes con respecto a factores tales como supervivencia y calidad de vida. En este ejemplo, el grupo de pacientes tratado con un macrociclo peptidomimético puede mostrar una supervivencia a largo plazo mejorada en comparación con un grupo de pacientes control tratado con un placebo.

Composiciones Farmacéuticas y Vías de Administración

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción incluyen macrociclos peptidomiméticos y derivados o profármacos aceptables farmacéuticamente de estos. Un "derivado aceptable farmacéuticamente" significa cualquier sal, éster, sal de un éster, profármaco u otro derivado aceptable farmacéuticamente de un compuesto descrito en la presente descripción que, tras su administración a un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto descrito en la presente descripción. Los derivados aceptables farmacéuticamente particularmente favorecidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos cuando se administran a un mamífero (*por ejemplo*, mediante el aumento de la absorción en la sangre de un compuesto administrado por vía oral) o que aumentan la liberación del compuesto activo a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) en relación con la especie parental. Algunos derivados aceptables farmacéuticamente incluyen un grupo químico que aumenta la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la mucosa gastrointestinal.

60 En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos se modifican mediante la unión covalentemente o no covalentemente de grupos funcionales apropiados para mejorar las propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones incluyen las que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración mediante inyección, alteran el metabolismo, y alteran la tasa de excreción.

65 Las sales aceptables farmacéuticamente de los compuestos descritos en la presente descripción incluyen las

derivadas de ácidos y bases, inorgánicos y orgánicos, aceptables farmacéuticamente. Los ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, butirato, citrato, digluconato, dodecilsulfato, formato, fumarato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2- naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquil)₄⁺.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos en la presente descripción, los vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen vehículos sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias, que también actúan como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes desintegradores de comprimidos, o un material encapsulante. Los detalles sobre las técnicas de formulación y administración están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes, ver, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido, que está mezclado con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño convenientes.

Los excipientes sólidos adecuados son rellenos de carbohidratos o proteínas que incluyen, pero no se limitan a, azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa, u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas que incluyen arábiga y tragacanto; así como también proteínas tales como gelatina y colágeno. Si es conveniente, se añaden agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico, o una sal de estos, tal como alginato de sodio.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas pueden formularse en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

La preparación farmacéutica puede estar en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, el envase contiene cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos, cápsulas, y polvos envasados en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello, o pastilla en sí misma, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma empaquetada.

Cuando una o más composiciones descritas en la presente descripción comprenden una combinación de un macrociclo peptidomimético y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 a 100 %, y con mayor preferencia entre aproximadamente 5 a 95 % de la dosificación administrada normalmente en un régimen de monoterapia. En algunos casos, los agentes adicionales se administran por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, de uno o más compuestos descritos en la presente descripción. Alternativamente, esos agentes son parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos descritos en la presente descripción en una composición única.

Métodos de Uso

En un aspecto, en la presente descripción se describen macrociclos peptidomiméticos novedosos que son útiles en ensayos de unión competitiva para identificar agentes que se unen al ligando(s) natural(es) de las proteínas o péptidos sobre los que se modelan los macrociclos peptidomiméticos. Por ejemplo, en el sistema p53/MDMX, los macrociclos peptidomiméticos marcados basados en p53 pueden usarse en un ensayo de unión a MDMX junto con moléculas pequeñas que se unen competitivamente a MDMX. Los estudios de unión competitiva permiten una rápida evaluación *in vitro* y la determinación de candidatos a fármacos específicos para el sistema p53/MDMX. Tales estudios de unión pueden realizarse con cualquiera de los macrociclos peptidomiméticos descritos en la presente descripción y sus compañeros de unión.

Además, se describen métodos para la generación de anticuerpos contra los macrociclos peptidomiméticos. En algunos casos, estos anticuerpos se unen específicamente tanto al macrociclo peptidomimético como a los péptidos precursores, tales como p53, con los que están relacionados los macrociclos peptidomiméticos. Tales anticuerpos, por ejemplo, interrumpen la interacción proteína-proteína nativa, por ejemplo, la unión entre p53 y MDMX.

En otros aspectos, en la presente descripción se describen métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con una expresión o actividad aberrante (por ejemplo, insuficiente o excesiva) de las moléculas que incluyen p53, MDM2 o MDMX.

En otro caso, un trastorno es causado, al menos en parte, por un nivel anormal de p53 o MDM2 o MDMX, (por ejemplo, expresión excesiva o insuficiente), o por la presencia de p53 o MDM2 o MDMX que exhiben actividad anormal. Como tal, la reducción en el nivel y/o actividad de p53 o MDM2 o MDMX, o el incremento del nivel y/o actividad de p53 o MDM2 o MDMX, por macrociclos peptidomiméticos derivados de p53, se usa, por ejemplo, para mejorar o reducir los síntomas adversos del trastorno.

En otro aspecto, en la presente descripción se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad que incluye enfermedad hiperproliferativa y trastorno inflamatorio mediante la interferencia con la interacción o unión entre compañeros de unión, por ejemplo, entre p53 y MDM2 o p53 y MDMX. Estos métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un compuesto a un animal de sangre caliente, que incluye un ser humano. En algunos casos, la administración de uno o más compuestos descritos en la presente descripción induce la detención del crecimiento celular o la apoptosis.

Como se usa en la presente descripción, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, mitigar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, beneficiar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos pueden usarse para tratar, prevenir y/o diagnosticar cánceres y afecciones neoplásicas. Como se usa en la presente descripción, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o afección anormal caracterizado por un crecimiento celular que prolifera rápidamente. Los estados de enfermedad hiperproliferativos y neoplásicos pueden clasificarse como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad, o pueden categorizarse como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociado con un estado de enfermedad. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o de la etapa de invasividad. Un tumor metastásico puede surgir a partir de una multitud de tipos de tumores primarios, que incluye, pero no se limita a, los de origen de mama, pulmón, hígado, colon y ovario. Las células "patológicas hiperproliferativas" se producen en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento de tumores malignos. Los ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas. Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, o trastornos metastásicos. En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos son agentes terapéuticos novedosos para controlar el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, metástasis de tales cánceres y similares.

Los ejemplos de cánceres o afecciones neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de recto, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, o sarcoma de Kaposi.

En algunos casos, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, o glioma.

Los ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Como se usa en la presente descripción, el término "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que involucran células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de estas. Las enfermedades pueden surgir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ilustrativos adicionales incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus (1991), Crit Rev. Oncol./Hematol. 11:267-97); las neoplasias linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin y variantes de este, linfomas periféricos de células T, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), Enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Stemberg.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación de la mama incluyen, pero no se limitan a, enfermedad mamaria proliferativa que incluye, por ejemplo, hiperplasia epitelial, adenosis esclerosante, y papilomas

de conductos pequeños; tumores, por ejemplo, tumores estromales tales como fibroadenoma, tumor filoides, y sarcomas, y tumores epiteliales tales como papiloma de conductos grandes; carcinoma de mama, que incluye el carcinoma in situ (no invasivo) que incluye el carcinoma ductal in situ (que incluye la enfermedad de Paget) y el carcinoma lobulillar in situ, y el carcinoma invasivo (infiltrante) que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobulillar invasivo, carcinoma medular, carcinoma coloide (mucinoso), carcinoma tubular, y carcinoma papilar invasivo, y neoplasias malignas diversas. Los trastornos en la mama masculina incluyen, pero no se limitan a, ginecomastia y carcinoma.

Los exámenes de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación de la piel incluyen, pero no se limitan a, enfermedades proliferativas de la piel tales como melanomas, que incluyen melanoma mucoso, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, léntigo (por ejemplo, léntigo maligno, melanoma léntigo maligno o melanoma lentiginoso acral), melanoma amelanótico, melanoma desmoplásico, melanoma con características de un nevo de Spitz, melanoma con células pequeñas similares a nevo, melanoma polipoide, y melanoma de tejidos blandos; carcinomas basocelulares que incluyen carcinoma basocelular micronodular, carcinoma basocelular superficial, carcinoma basocelular nodular (úlceras de roedor), carcinoma basocelular quístico, carcinoma basocelular cicatricial, carcinoma basocelular pigmentado, carcinoma basocelular aberrante, carcinoma basocelular infiltrativo, síndrome de carcinoma basocelular nevoide, carcinoma basocelular polipoide, carcinoma basocelular en forma de poro, y fibroepitelioma de Pinkus; carcinomas de células escamosas que incluyen acantoma (acantoma de células grandes), carcinoma de células escamosas adenoides, carcinoma de células escamosas basaloides, carcinoma de células escamosas de células claras, carcinoma de células escamosas de células en anillo de sello, carcinoma de células escamosas de células fusiformes, úlcera de Marjolin, eritroplasia de Queyrat, y enfermedad de Bowen; u otros tumores cutáneos o subcutáneos.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación del pulmón incluyen, pero no se limitan a, carcinoma broncogénico, que incluye los síndromes paraneoplásicos, carcinoma bronquioloalveolar, tumores neuroendocrinos, tales como carcinoide bronquial, tumores diversos, y tumores metastásicos; patologías de la pleura, que incluye derrames pleurales inflamatorios, derrames pleurales no inflamatorios, neumotórax, y tumores pleurales, que incluyen tumores fibrosos solitarios (fibroma pleural) y mesotelioma maligno.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación del colon incluyen, pero no se limitan a, pólipos no neoplásicos, adenomas, síndromes familiares, carcinogénesis colorrectal, carcinoma colorrectal, y tumores carcinoides.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación del hígado incluyen, pero no se limitan a, hiperplasias nodulares, adenomas, y tumores malignos, que incluyen el carcinoma primario del hígado y tumores metastásicos.

Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación del ovario incluyen, pero no se limitan a, tumores de ovario tales como tumores del epitelio celómico, tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, adenocarcinoma de células claras, cistoadenofibroma, tumor de Brenner, tumores epiteliales superficiales, tumores de células germinales tales como teratomas maduros (benignos), teratomas monodérmicos, teratomas malignos inmaduros, disgerminoma, tumor del seno endodérmico, coriocarcinoma; tumores del estoma del cordón sexual tales como tumores de células de teca-granulosa, tecomafibromas, androblastomas, tumores de células de colina, y gonadoblastoma; y tumores metastásicos tales como los tumores de Krukenberg.

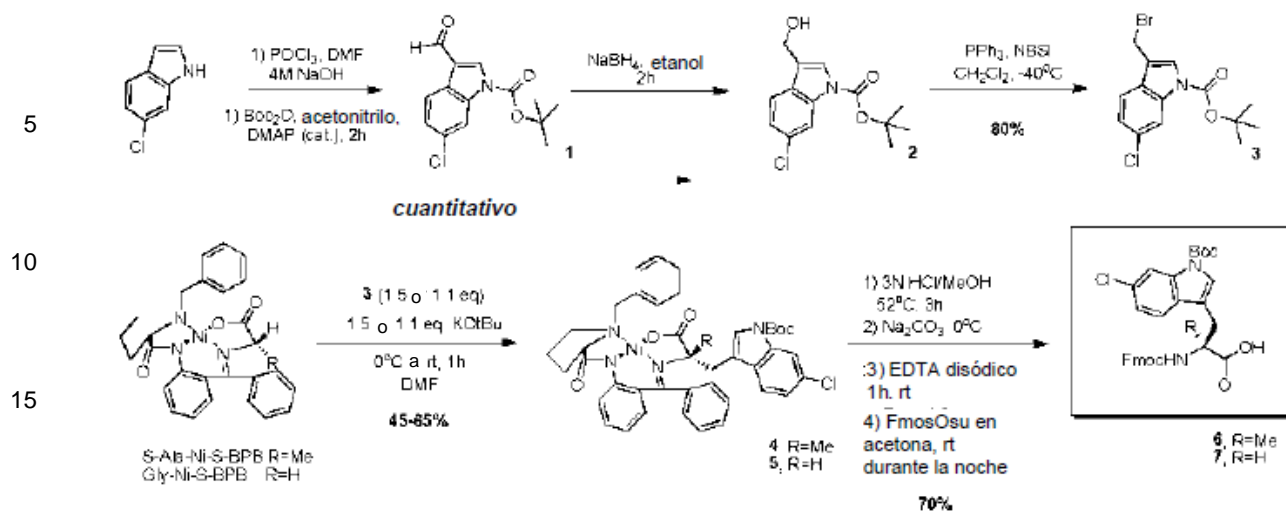
Aunque se han mostrado y descrito en la presente descripción casos preferidos de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que tales casos se describen únicamente a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse varias alternativas a los casos descritos en la presente descripción al poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de aminoácidos 6-clorotriptófano Fmoc

60

65



20

Terc-butil 6-cloro-3-formil-1H-indol-1-carboxilato, **1**. A una solución agitada de DMF seca (12 mL) se le añadió gota a gota POCl_3 (3,92 mL, 43 mmol, 1,3 equiv) a 0°C bajo Argón. La solución se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos antes de añadir gota a gota una solución de 6-cloroindol (5,0 g, 33 mmol, 1 eq.) en DMF anhidro (30 mL). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 horas adicionales. Se añadió agua (50 mL) y la solución se neutralizó con NaOH acuoso 4 M (pH ~ 8). El sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. Este material se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. A una solución agitada del formil indol crudo (33 mmol, 1 eq.) en THF (150 mL) se le añadió sucesivamente Boc_2O (7,91 g, 36,3 mmol, 1,1 equiv) y DMAP (0,4 g, 3,3 mmol, 0,1 equiv) a temperatura ambiente bajo N_2 . La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se recolectó en EtOAc y se lavó con HCl 1N, se secó y se concentró para dar el formil indol **1** (9 g, 98 % en 2 etapas) como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,70 (s, Boc, 9H); 7,35 (dd, 1H); 8,21 (m, 3H); 10,07 (s, 1H).

35

Terc-butil 6-cloro-3-(hidroximetil)-1H-indol-1-carboxilato, **2**. A una solución del compuesto **1** (8,86 g, 32 mmol, 1 eq.) en etanol (150 mL) se le añadió NaBH_4 (2,4 g, 63 mmol, 2 eq.). La reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se vertió en éter dietílico y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido blanco (8,7 g, 98 %). Este material se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,65 (s, Boc, 9H); 4,80 (s, 2H, CH_2); 7,21 (dd, 1H); 7,53 (m, 2H); 8,16 (bs, 1H).

40

Terc-butil 3-(bromometil)-6-cloro-1H-indol-1-carboxilato, **3**. A una solución del compuesto **2** (4,1 g, 14,6 mmol, 1 eq.) en diclorometano (50 mL) bajo argón se le añadió una solución de trifenilfosfina (4,59 g, 17,5 mmol, 1,2 eq.) en diclorometano (50 mL) a -40°C . La solución de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a 40°C . Después se añadió NBS (3,38 g, 19 mmol, 1,3 eq.). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se evaporó el diclorometano, se añadió Tetracloruro de Carbono (100 mL) y la mezcla se agitó durante 1 hora y se filtró. El filtrado se concentró, se cargó en un tapón de sílice y se eluyó rápidamente con EtOAc al 25 % en Hexanos. La solución se concentró para dar una espuma blanca (3,84 g, 77 %). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,66 (s, Boc, 9H); 4,63 (s, 2H, CH_2); 7,28 (dd, 1H); 7,57 (d, 1H); 7,64 (bs, 1H); 8,18 (bs, 1H).

50

aMe-6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **4**. A **S-Ala-Ni-S-BPB** (2,66 g, 5,2 mmol, 1 eq.) y KO-*t*Bu (0,87 g, 7,8 mmol, 1,5 eq.) se le añadieron 50 mL de DMF bajo argón. El compuesto derivado de bromuro **3** (2,68 g, 7,8 mmol, 1,5 eq.) en solución de DMF (5,0 mL) se añadió mediante una jeringa. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la solución se inactivó con ácido acético acuoso al 5 % y se diluyó con agua. El producto deseado se extrajo en diclorometano, se secó y se concentró. El producto aceitoso **4** se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (carga de sólidos) en fase normal mediante el uso de EtOAc y Hexanos como eluyentes para dar un sólido rojo (1,78 g, rendimiento del 45 %). aMe-6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **4**: M+H calc. 775,21, M+H obs. 775,26; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,23 (s, 3H, aMe); 1,56 (m, 11H, Boc + CH_2); 1,82-2,20 (m, 4H, 2 CH_2); 3,03 (m, 1H, CH_a); 3,24 (m, 2H, CH_2); 3,57 y 4,29 (sistema AB, 2H, CH_2 (bencilo), J= 12,8Hz); 6,62 (d, 2H); 6,98 (d, 1H); 7,14 (m, 2H); 7,23 (m, 1H); 7,32-7,36 (m, 5H); 7,50 (m, 2H); 7,67 (bs, 1H); 7,98 (d, 2H); 8,27 (m, 2H).

60

Fmoc-aMe-6Cl-Trp(Boc)-OH, **6**. A una solución de HCl 3N/MeOH (1/3, 15 mL) a 50°C se añadió una solución del compuesto **4** (1,75 g, 2,3 mmol, 1 eq.) gota a gota, en MeOH (5 mL). El material de partida desapareció en 3-4 horas. Después, la solución ácida se enfrió a 0°C con un baño de hielo y se inactivó con una solución acuosa de Na_2CO_3 (1,21 g, 11,5 mmol, 5 eq.). Se eliminó el metanol y a la suspensión se añadieron 8 equivalentes más de Na_2CO_3 (1,95 g, 18,4 mmol). Después se añadió la sal dihidrato disódica de EDTA depuradora de níquel (1,68 g, 4,5 mmol, 2 eq.) y la suspensión se agitó durante 2 horas. Se añadió una solución de Fmoc-OSu (0,84 g, 2,5 mmol, 1,1 eq.) en acetona

(50 mL) y la reacción se agitó durante la noche. Posteriormente, la reacción se diluyó con éter dietílico y HCl 1N. Después, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto deseado **6** se purificó en fase normal mediante el uso de acetona y diclorometano como eluyentes para dar una espuma blanca (0,9 g, rendimiento del 70 %). Fmoc-aMe-6Cl-Trp(Boc)-OH, **6**: M+H calc. 575,19, M+H obs. 575,37; ¹H NMR (CDCl₃) 1,59 (s, 9H, Boc); 1,68 (s, 3H, Me); 3,48 (bs, 2H, CH₂); 4,22 (m, 1H, CH); 4,39 (bs, 2H, CH₂); 5,47 (s, 1H, NH); 7,10 (m, 1H); 7,18 (m, 2H); 7,27 (m, 2H); 7,39 (m, 2H); 7,50 (m, 2H); 7,75 (d, 2H); 8,12 (bs, 1H).

6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **5**. A **Gly-Ni-S-BPB** (4,6 g, 9,2 mmol, 1 eq.) y KO-*t*Bu (1,14 g, 10,1 mmol, 1,1 eq.) se le añadieron 95 mL de DMF bajo argón. El compuesto derivado de bromuro **3** (3,5 g, 4,6 mmol, 1,1 eq.) en solución de DMF (10 mL) se añadió mediante una jeringa. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la solución se inactivó con ácido acético acuoso al 5 % y se diluyó con agua. El producto deseado se extrajo en diclorometano, se secó y se concentró. El producto aceitoso **5** se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (carga de sólidos) en fase normal mediante el uso de EtOAc y Hexanos como eluyentes para dar un sólido rojo (5 g, rendimiento del 71 %). 6Cl-Trp(Boc)-Ni-S-BPB, **5**: M+H calc. 761,20, M+H obs. 761,34; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,58 (m, 11H, Boc + CH₂); 1,84 (m, 1H); 1,96 (m, 1H); 2,24 (m, 2H, CH₂); 3,00 (m, 1H, CH_α); 3,22 (m, 2H, CH₂); 3,45 y 4,25 (sistema AB, 2H, CH₂ (bencil), J= 12,8Hz); 4,27 (m, 1H, CH_α); 6,65 (d, 2H); 6,88 (d, 1H); 7,07 (m, 2H); 7,14 (m, 2H); 7,28 (m, 3H); 7,35-7,39 (m, 2H); 7,52 (m, 2H); 7,96 (d, 2H); 8,28 (m, 2H).

Fmoc-6Cl-Trp(Boc)-OH, **7**. A una solución de HCl 3N/MeOH (1/3, 44 mL) a 50 °C se añadió una solución del compuesto **5** (5 g, 6,6 mmol, 1 eq.) gota a gota, en MeOH (10 mL). El material de partida desapareció en 3-4 horas. Después, la solución ácida se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se inactivó con una solución acuosa de Na₂CO₃ (3,48 g, 33 mmol, 5 eq.). Se eliminó el metanol y a la suspensión se añadieron 8 equivalentes más de Na₂CO₃ (5,57 g, 52 mmol). La sal dihidrato disódica de EDTA depuradora de níquel (4,89 g, 13,1 mmol, 2 eq.) y la suspensión se agitaron durante 2 horas. Se añadió una solución de Fmoc-OSu (2,21 g, 6,55 mmol, 1,1 eq.) en acetona (100 mL) y la reacción se agitó durante la noche. Posteriormente, la reacción se diluyó con éter dietílico y HCl 1N. Después, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El producto deseado **7** se purificó en fase normal mediante el uso de acetona y diclorometano como eluyentes para dar una espuma blanca (2,6 g, rendimiento del 69 %). Fmoc-6Cl-Trp(Boc)-OH, **7**: M+H calc. 561,17, M+H obs. 561,37; ¹H NMR (CDCl₃) 1,63 (s, 9H, Boc); 3,26 (m, 2H, CH₂); 4,19 (m, 1H, CH); 4,39 (m, 2H, CH₂); 4,76 (m, 1H); 5,35 (d, 1H, NH); 7,18 (m, 2H); 7,28 (m, 2H); 7,39 (m, 3H); 7,50 (m, 2H); 7,75 (d, 2H); 8,14 (bs, 1H).

Ejemplo 2: macrociclos peptidomiméticos

Se sintetizaron, purificaron y analizaron macrociclos peptidomiméticos como se describió previamente y como se describe más abajo (Schafmeister y otros, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister & Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky y otros, Science 305:1466-1470 (2004); y la patente de los EE.UU. núm. 7,192,713). Los macrociclos peptidomiméticos se diseñaron mediante el reemplazo de dos o más aminoácidos de origen natural con los correspondientes aminoácidos sintéticos. Se realizaron sustituciones en las posiciones i e i+4, e i e i+7. La síntesis de péptidos se realizó manualmente o en un sintetizador de péptidos automático (Applied Biosystems, modelo 433A), mediante el uso de condiciones de fase sólida, resina AM de amida de pista (Novabiochem) y química del grupo protector de la cadena principal Fmoc. Para el acoplamiento de aminoácidos naturales protegidos con Fmoc (Novabiochem), se emplearon 10 equivalentes de aminoácido y una relación molar 1:1:2 de reactivos de acoplamiento HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA. Se acoplaron aminoácidos no naturales (4 equiv.) con una relación molar 1:1:2 de HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA. Los extremos N terminales de los péptidos sintéticos se acetilaron, mientras que los extremos C terminales se amidaron.

La purificación de compuestos reticulados se logró mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Varian ProStar) en una columna C18 de fase inversa (Varian) para producir los compuestos puros. La composición química de los productos puros se confirmó mediante espectrometría de masas LC/MS (Micromass LCT en interfaz con el sistema de HPLC Agilent 1100) y análisis de aminoácidos (Applied Biosystems, modelo 420A).

El siguiente protocolo se usó en la síntesis de macrociclos peptidomiméticos reticulados con dialquino, que incluye SP662, SP663 y SP664. Se sintetizaron péptidos unidos a resina totalmente protegidos en una resina PEG-PS (cargando 0,45 mmol/g) en una escala de 0,2 mmol. La desprotección del grupo Fmoc temporal se logró por tratamientos de 10 minutos 3 x del péptido unido a resina con piperidina al 20 % (v/v) en DMF. Después de lavar con NMP (3x), diclorometano (3x) y NMP (3x), se logró el acoplamiento de cada aminoácido sucesivo con incubación 1 x 60 minutos con el derivado de aminoácido Fmoc preactivado apropiado. Todos los aminoácidos protegidos (0,4 mmol) se disolvieron en NMP y se activaron con HCTU (0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) antes de transferir la solución de acoplamiento al péptido desprotegido unido a resina. Después del acoplamiento, se lavó la resina en preparación para el siguiente ciclo de desprotección/acoplamiento. La acetilación del extremo amino se realizó en presencia de acético anhídrido/DIEA en NMP. El análisis LC-MS de una muestra escindida y desprotegida que se obtiene de una alícuota del péptido unido a resina completamente ensamblado se realizó para verificar la finalización de cada acoplamiento. En un ejemplo típico, se añadieron tetrahidrofurano (4 mL) y trietilamina (2 mL) a la resina peptídica (0,2 mmol) en un vial de vidrio de 40 mL y se agitó durante 10 minutos. Después, se añadieron Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,014 g, 0,02 mmol) y yoduro de cobre (0,008 g, 0,04 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó mecánicamente durante 16 horas mientras estaba abierta a la atmósfera. Los péptidos unidos a resina ciclados con diino se desprotegeron y se

escindieron del soporte sólido mediante tratamiento con TFA/H₂O/TIS (95/5/5 v/v) durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar la resina, se precipitó la solución de TFA en éter dietílico frío y se centrifugó para producir el producto deseado como un sólido. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa.

5 El siguiente protocolo se usó en la síntesis de macrociclos peptidomiméticos reticulados con alquino único, que incluye SP665. Se sintetizaron péptidos unidos a resina completamente protegidos en una resina Rink amida MBHA (carga 0,62 mmol/g) en una escala de 0,1 mmol. La desprotección del grupo Fmoc temporal se logró por tratamientos de 20 minutos 2 x del péptido unido a resina con piperidina al 25 % (v/v) en NMP. Después de un lavado de flujo extenso con NMP y diclorometano, se logró el acoplamiento de cada aminoácido sucesivo con incubación 1 x 60 minutos con el derivado de aminoácido Fmoc preactivado apropiado. Todos los aminoácidos protegidos (1 mmol) se disolvieron en NMP y se activaron con HCTU (1 mmol) y DIEA (1 mmol) antes de transferir la solución de acoplamiento al péptido desprotegido unido a resina. Después de completar el acoplamiento, la resina se lavó abundantemente en flujo en preparación para el siguiente ciclo de desprotección/acoplamiento. La acetilación del extremo amino se realizó en presencia de acético anhídrido/DIEA en NMP /NMM. El análisis LC-MS de una muestra escindida y desprotegida que se obtiene de una alícuota del péptido unido a resina completamente ensamblado se realizó para verificar la finalización de cada acoplamiento. En un ejemplo típico, la resina peptídica (0,1 mmol) se lavó con DCM. La resina se cargó en un vial de microondas. El recipiente se evacuó y se purgó con nitrógeno. Se añadió molibdenohexacarbonilo (0,01 eq, Sigma Aldrich 199959). Se añadió clorobenceno anhidro al recipiente de reacción. Después, se añadió 2-fluorofenol (1 eq, Sigma Aldrich F12804). Después, la reacción se cargó en el microondas y se mantuvo a 130 °C durante 10 minutos. Es posible que sea necesario presionar la reacción un tiempo posterior para que se complete. Los péptidos unidos a resina metatizados con alquino se desprotegieron y se escindieron del soporte sólido mediante tratamiento con TFA/H₂O/TIS (94/3/3 v/v) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar la resina, se precipitó la solución de TFA en éter dietílico frío y se centrifugó para producir el producto deseado como un sólido. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa.

25 La Tabla 1 muestra una lista de macrociclos peptidomiméticos preparados.

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP1	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAA-NH2		1456,78	729,44	1457,79	729,4	486,6
SP2	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAIbA-NH2		1470,79	736,4	1471,8	736,4	491,27
SP3	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SANIe-NH2		1715,97	859,02	1716,98	858,99	573
SP4	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAL-NH2		1715,97	859,02	1716,98	858,99	573
SP5	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAM-NH2		1733,92	868,48	1734,93	867,97	578,98
SP6	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAhL-NH2		1729,98	865,98	1730,99	866	577,67
SP7	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAF-NH2		1749,95	876,36	1750,96	875,98	584,32
SP8	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAl-NH2		1715,97	859,02	1716,98	858,99	573
SP9	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAChg-NH2		1741,98	871,98	1742,99	872	581,67
SP10	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAAIb-NH2		1687,93	845,36	1688,94	844,97	563,65
SP11	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAAA-NH2		1673,92	838,01	1674,93	837,97	558,98
SP12	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SSNIe-NH2		1767,04	884,77	1768,05	884,53	590,02
SP13	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SSA-NH2		1724,99	864,23	1726	863,5	576
SP14	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAINIe-NH2		1498,82	750,46	1499,83	750,42	500,61
SP15	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAL-NH2		1498,82	750,46	1499,83	750,42	500,61
SP16	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAM-NH2		1516,78	759,41	1517,79	759,4	506,6
SP17	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAhL-NH2		1512,84	757,49	1513,85	757,43	505,29
SP18	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAF-NH2		1532,81	767,48	1533,82	767,41	511,94
SP19	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAI-NH2		1498,82	750,39	1499,83	750,42	500,61
SP20	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAChg-NH2		1524,84	763,48	1525,85	763,43	509,29
SP21	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AACCha-NH2		1538,85	770,44	1539,86	770,43	513,96
SP22	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAAIIb-NH2		1470,79	736,84	1471,8	736,4	491,27
SP23	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAIIbV-NH2		1771,01	885,81	1772,02	886,51	591,34
SP24	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAIIbV-NH2	iso2	1771,01	886,26	1772,02	886,51	591,34
SP25	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAIbAA-NH2		1758,97	879,89	1759,98	880,49	587,33

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP26	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAibAA-NH2	iso2	1758,97	880,34	1759,98	880,49	587,33
SP27	Ac-HLTF\$r8HHWHQL\$AAInIe-NH2		2056,15	1028,86	2057,16	1029,08	686,39
SP28	Ac-DLTF\$r8HHWHQL\$RRLV-NH2		2190,23	731,15	2191,24	1096,12	731,08
SP29	Ac-HHTF\$r8HHWHQL\$AAML-NH2		2098,08	700,43	2099,09	1050,05	700,37
SP30	Ac-F\$r8HHWHQL\$RRDCha-NH2		1917,06	959,96	1918,07	959,54	640,03
SP31	Ac-F\$r8HHWHQL\$HRFV-NH2		1876,02	938,65	1877,03	939,02	626,35
SP32	Ac-HLTF\$r8HHWHQL\$AAhLA-NH2		2028,12	677,2	2029,13	1015,07	677,05
SP33	Ac-DLTF\$r8HHWHQL\$RRCngI-NH2		2230,26	1115,89	2231,27	1116,14	744,43
SP34	Ac-DLTF\$r8HHWHQL\$RRCngI-NH2	iso2	2230,26	1115,96	2231,27	1116,14	744,43
SP35	Ac-HHTF\$r8HHWHQL\$AAChav-NH2		2106,14	1053,95	2107,15	1054,08	703,05
SP36	Ac-F\$r8HHWHQL\$RRDa-NH2		1834,99	918,3	1836	918,5	612,67
SP37	Ac-F\$r8HHWHQL\$HRAibG-NH2		1771,95	886,77	1772,96	886,98	591,66
SP38	Ac-F\$r8AYWAQL\$HHIeL-NH2		1730,97	866,57	1731,98	866,49	578
SP39	Ac-F\$r8AYWSAL\$HQANie-NH2		1638,89	820,54	1639,9	820,45	547,3
SP40	Ac-F\$r8AYWVQL\$QHCngI-NH2		1776,01	889,44	1777,02	889,01	593,01
SP41	Ac-F\$r8AYWTAL\$QQNiev-NH2		1671,94	836,97	1672,95	836,98	558,32
SP42	Ac-F\$r8AYWYQL\$HAibAa-NH2		1686,89	844,52	1687,9	844,45	563,3
SP43	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$HHLA-NH2		1903,05	952,27	1904,06	952,53	635,36
SP44	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$HHLA-NH2	iso2	1903,05	952,27	1904,06	952,53	635,36
SP45	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$HQNiev-NH2		1922,08	962,48	1923,09	962,05	641,7
SP46	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$HQNiev-NH2	iso2	1922,08	962,4	1923,09	962,05	641,7
SP47	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$QQMI-NH2		1945,05	973,95	1946,06	973,53	649,36
SP48	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$QQMI-NH2	iso2	1945,05	973,88	1946,06	973,53	649,36
SP49	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$HAibhLV-NH2		1893,09	948,31	1894,1	947,55	632,04
SP50	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AHFA-NH2		1871,01	937,4	1872,02	936,51	624,68

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP51	Ac-HLTF\$r8HHWHQL\$AANIEl-NH2		2056,15	1028,79	2057,16	1029,08	686,39
SP52	Ac-DLTF\$r8HHWHQL\$RRLa-NH2		2162,2	721,82	2163,21	1082,11	721,74
SP53	Ac-HHTF\$r8HHWHQL\$AAMv-NH2		2084,07	1042,92	2085,08	1043,04	695,7
SP54	Ac-F\$r8HHWHQL\$RRDA-NH2		1834,99	612,74	1836	918,5	612,67
SP55	Ac-F\$r8HHWHQL\$HRFCha-NH2		1930,06	966,47	1931,07	966,04	644,36
SP56	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHAM		1443,82	1445,71	1444,83	722,92	482,28
SP57	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHIAm		1443,82	723,13	1444,83	722,92	482,28
SP58	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHnPr3Ph		1491,82	747,3	1492,83	746,92	498,28
SP59	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHnBu33Me		1457,83	1458,94	1458,84	729,92	486,95
SP60	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHnPr		1415,79	709,28	1416,8	708,9	472,94
SP61	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHnEt2Ch		1483,85	1485,77	1484,86	742,93	495,62
SP62	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHnEt2Cp		1469,83	1470,78	1470,84	735,92	490,95
SP63	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NHHex		1457,83	730,19	1458,84	729,92	486,95
SP64	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAIA-NH2		1771,01	885,81	1772,02	886,51	591,34
SP65	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAIA-NH2	iso2	1771,01	866,8	1772,02	886,51	591,34
SP66	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAMA-NH2		1731,94	867,08	1732,95	866,98	578,32
SP67	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAMA-NH2	iso2	1731,94	867,28	1732,95	866,98	578,32
SP68	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANIEa-NH2		1771,01	867,1	1772,02	886,51	591,34
SP69	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANIEa-NH2	iso2	1771,01	886,89	1772,02	886,51	591,34
SP70	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAIa-NH2		1771,01	886,8	1772,02	886,51	591,34
SP71	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAIa-NH2	iso2	1771,01	887,09	1772,02	886,51	591,34
SP72	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAMA-NH2		1731,94	867,17	1732,95	866,98	578,32
SP73	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAMA-NH2	iso2	1731,94	867,37	1732,95	866,98	578,32
SP74	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANIEa-NH2		1771,01	887,08	1772,02	886,51	591,34
SP75	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANIEa-NH2	iso2	1771,01	887,08	1772,02	886,51	591,34

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP76	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAIv-NH2		1742,02	872,37	1743,03	872,02	581,68
SP77	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAIv-NH2	iso2	1742,02	872,74	1743,03	872,02	581,68
SP78	Ac-LTf\$8AYWAQL\$AAMv-NH2		1817	910,02	1818,01	909,51	606,67
SP79	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAIlev-NH2		1742,02	872,37	1743,03	872,02	581,68
SP80	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAIlev-NH2	iso2	1742,02	872,28	1743,03	872,02	581,68
SP81	Ac-LTf\$8AYWAQL\$AAII-NH2		1813,05	907,81	1814,06	907,53	605,36
SP82	Ac-LTf\$8AYWAQL\$AAII-NH2	iso2	1813,05	907,81	1814,06	907,53	605,36
SP83	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAMI-NH2		1773,99	887,37	1775	888	592,34
SP84	Ac-LTf\$8AYWAQL\$AAIlev-NH2		1813,05	907,61	1814,06	907,53	605,36
SP85	Ac-LTf\$8AYWAQL\$AAIlev-NH2	iso2	1813,05	907,71	1814,06	907,53	605,36
SP86	Ac-F\$8AYWEAL\$AAMA-NH2		1575,82	789,02	1576,83	788,92	526,28
SP87	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIlea-NH2		1557,86	780,14	1558,87	779,94	520,29
SP88	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIla-NH2		1557,86	780,33	1558,87	779,94	520,29
SP89	Ac-F\$8AYWEAL\$AAMA-NH2		1575,82	789,3	1576,83	788,92	526,28
SP90	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIlea-NH2		1557,86	779,4	1558,87	779,94	520,29
SP91	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIv-NH2		1585,89	794,29	1586,9	793,95	529,64
SP92	Ac-F\$8AYWEAL\$AAMv-NH2		1603,85	803,08	1604,86	802,93	535,62
SP93	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIlev-NH2		1585,89	793,46	1586,9	793,95	529,64
SP94	Ac-F\$8AYWEAL\$AAII-NH2		1599,91	800,49	1600,92	800,96	534,31
SP95	Ac-F\$8AYWEAL\$AAMI-NH2		1617,86	809,44	1618,87	809,94	540,29
SP96	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIlev-NH2		1599,91	801,7	1600,92	800,96	534,31
SP97	Ac-F\$8AYWEAL\$AAIlev-NH2	iso2	1599,91	801,42	1600,92	800,96	534,31
SP98	Ac-LTf\$8AY6cIWAQL\$SAA-NH2		1707,88	855,72	1708,89	854,95	570,3
SP99	Ac-LTf\$8AY6cIWAQL\$SAA-NH2	iso2	1707,88	855,35	1708,89	854,95	570,3
SP100	Ac-WTf\$8FYWSQL\$AV/Aa-NH2		1922,01	962,21	1923,02	962,01	641,68

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP101	Ac-WTF\$r8FYWSQL\$AVAA-NH2	iso2	1922,01	962,49	1923,02	962,01	641,68
SP102	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$AVA-NH2		1802,98	902,72	1803,99	902,5	602
SP103	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$AVA-NH2	iso2	1802,98	903	1803,99	902,5	602
SP104	Ac-WTF\$r8FYWSQL\$SAAa-NH2		1909,98	956,47	1910,99	956	637,67
SP105	Ac-WTF\$r8FYWSQL\$SAAa-NH2	iso2	1909,98	956,47	1910,99	956	637,67
SP106	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$AVAAA-NH2		1945,05	974,15	1946,06	973,53	649,36
SP107	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$AVAAA-NH2	iso2	1945,05	973,78	1946,06	973,53	649,36
SP108	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AVG-NH2		1671,94	837,52	1672,95	836,98	558,32
SP109	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AVG-NH2	iso2	1671,94	837,21	1672,95	836,98	558,32
SP110	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AVQ-NH2		1742,98	872,74	1743,99	872,5	582
SP111	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AVQ-NH2	iso2	1742,98	872,74	1743,99	872,5	582
SP112	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAA-NH2		1673,92	838,23	1674,93	837,97	558,98
SP113	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAA-NH2	iso2	1673,92	838,32	1674,93	837,97	558,98
SP114	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$SAA-NH2		1687,93	844,37	1688,94	844,97	563,65
SP115	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$SAA-NH2	iso2	1687,93	844,81	1688,94	844,97	563,65
SP116	Ac-LTF\$r8AYWEQL\$SAS-NH2		1826	905,27	1827,01	914,01	609,67
SP117	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SLA-NH2		1715,97	858,48	1716,98	858,99	573
SP118	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SLA-NH2	iso2	1715,97	858,87	1716,98	858,99	573
SP119	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SWA-NH2		1788,96	895,21	1789,97	895,49	597,33
SP120	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SWA-NH2	iso2	1788,96	895,28	1789,97	895,49	597,33
SP121	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SVS-NH2		1717,94	859,84	1718,95	859,98	573,65
SP122	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SAS-NH2		1689,91	845,85	1690,92	845,96	564,31
SP123	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SVG-NH2		1687,93	844,81	1688,94	844,97	563,65
SP124	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SAA-NH2		1717,91	859,76	1718,92	859,96	573,64
SP125	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SAA-NH2		1717,91	859,84	1718,92	859,96	573,64

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP126	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SVA-NH2		1745,94	873,82	1746,95	873,98	582,99
SP127	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SLA-NH2		1759,96	880,85	1760,97	880,99	587,66
SP128	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SWA-NH2		1832,95	917,34	1833,96	917,48	611,99
SP129	Ac-ETF\$r8KYWAQL\$SWA-NH2		1861,98	931,92	1862,99	932	621,67
SP130	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SVS-NH2		1761,93	881,89	1762,94	881,97	588,32
SP131	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SAS-NH2		1733,9	867,83	1734,91	867,96	578,97
SP132	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SVG-NH2		1731,92	866,87	1732,93	866,97	578,31
SP133	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SSa-NH2		1717,94	859,47	1718,95	859,98	573,65
SP134	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SSa-NH2		1733,9	867,83	1734,91	867,96	578,97
SP135	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SNa-NH2		1744,96	873,38	1745,97	873,49	582,66
SP136	Ac-ETF\$r8VYWAQL\$SNa-NH2		1760,91	881,3	1761,92	881,46	587,98
SP137	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SAa-NH2		1701,95	851,84	1702,96	851,98	568,32
SP138	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVA-NH2		1729,98	865,53	1730,99	866	577,67
SP139	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVA-NH2	iso2	1729,98	865,9	1730,99	866	577,67
SP140	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SWA-NH2		1816,99	909,42	1818	909,5	606,67
SP141	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVS-NH2		1745,98	873,9	1746,99	874	583
SP142	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVS-NH2	iso2	1745,98	873,9	1746,99	874	583
SP143	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SAS-NH2		1717,94	859,84	1718,95	859,98	573,65
SP144	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SAS-NH2	iso2	1717,94	859,91	1718,95	859,98	573,65
SP145	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVG-NH2		1715,97	858,87	1716,98	858,99	573
SP146	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$SVG-NH2	iso2	1715,97	858,87	1716,98	858,99	573
SP147	Ac-LTF\$r8EYWAQCha\$SAA-NH2		1771,96	886,85	1772,97	886,99	591,66
SP148	Ac-LTF\$r8EYWAQCha\$SAA-NH2	iso2	1771,96	886,85	1772,97	886,99	591,66
SP149	Ac-LTF\$r8EYWAQCPg\$SAA-NH2		1743,92	872,86	1744,93	872,97	582,31
SP150	Ac-LTF\$r8EYWAQCPg\$SAA-NH2	iso2	1743,92	872,86	1744,93	872,97	582,31

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP151	Ac-LTF\$r8EYWAQF\$SAA-NH2		1765,91	883,44	1766,92	883,96	589,64
SP152	Ac-LTF\$r8EYWAQF\$SAA-NH2	iso2	1765,91	883,89	1766,92	883,96	589,64
SP153	Ac-LTF\$r8EYWAQCbA\$SAA-NH2		1743,92	872,42	1744,93	872,97	582,31
SP154	Ac-LTF\$r8EYWAQCbA\$SAA-NH2	iso2	1743,92	873,39	1744,93	872,97	582,31
SP155	Ac-LTF3CI\$r8EYWAQQL\$SAA-NH2		1765,89	883,89	1766,9	883,95	589,64
SP156	Ac-LTF3CI\$r8EYWAQQL\$SAA-NH2	iso2	1765,89	883,96	1766,9	883,95	589,64
SP157	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQQL\$SAA-NH2		1767,91	884,48	1768,92	884,96	590,31
SP158	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQQL\$SAA-NH2	iso2	1767,91	884,48	1768,92	884,96	590,31
SP159	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1781,92	891,44	1782,93	891,97	594,98
SP160	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2	iso2	1781,92	891,88	1782,93	891,97	594,98
SP161	Ac-ETF\$r8EYWAQQL\$SAA-NH2		1747,88	874,34	1748,89	874,95	583,63
SP162	Ac-LTF\$r8AYWVQL\$SAA-NH2		1701,95	851,4	1702,96	851,98	568,32
SP163	Ac-LTF\$r8AHWAQQL\$SAA-NH2		1647,91	824,83	1648,92	824,96	550,31
SP164	Ac-LTF\$r8AEWAQQL\$SAA-NH2		1639,9	820,39	1640,91	820,96	547,64
SP165	Ac-LTF\$r8ASWAQQL\$SAA-NH2		1597,89	799,38	1598,9	799,95	533,64
SP166	Ac-LTF\$r8AEWAQQL\$SAA-NH2	iso2	1639,9	820,39	1640,91	820,96	547,64
SP167	Ac-LTF\$r8ASWAQQL\$SAA-NH2	iso2	1597,89	800,31	1598,9	799,95	533,64
SP168	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQQL\$SAA-NH2		1701,91	851,4	1702,92	851,96	568,31
SP169	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQQL\$SAA-NH2	iso2	1701,91	851,4	1702,92	851,96	568,31
SP170	Ac-LTF\$r8AHWAQQL\$AAIa-NH2		1745	874,13	1746,01	873,51	582,67
SP171	Ac-ITF\$r8FYWAQQL\$AAIa-NH2		1847,04	923,92	1848,05	924,53	616,69
SP172	Ac-ITF\$r8EHWAQQL\$AAIa-NH2		1803,01	903,17	1804,02	902,51	602,01
SP173	Ac-ITF\$r8EHWAQQL\$AAIa-NH2	iso2	1803,01	903,17	1804,02	902,51	602,01
SP174	Ac-ETF\$r8EHWAQQL\$AAIa-NH2		1818,97	910,76	1819,98	910,49	607,33
SP175	Ac-ETF\$r8EHWAQQL\$AAIa-NH2	iso2	1818,97	910,85	1819,98	910,49	607,33

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP176	Ac-LTF\$r8AHWVQL\$AAIa-NH2		1773,03	888,09	1774,04	887,52	592,02
SP177	Ac-ITF\$r8FYWVQL\$AAIa-NH2		1875,07	939,16	1876,08	938,54	626,03
SP178	Ac-ITF\$r8EYWVQL\$AAIa-NH2		1857,04	929,83	1858,05	929,53	620,02
SP179	Ac-ITF\$r8EHVWVQL\$AAIa-NH2		1831,04	916,86	1832,05	916,53	611,35
SP180	Ac-LTF\$r8AEWAQL\$AAIa-NH2		1736,99	869,87	1738	869,5	580
SP181	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQL\$AAIa-NH2		1799	900,17	1800,01	900,51	600,67
SP182	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQL\$AAIa-NH2	iso2	1799	900,24	1800,01	900,51	600,67
SP183	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$AHFA-NH2		1845,01	923,89	1846,02	923,51	616,01
SP184	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$AHFA-NH2		1947,05	975,05	1948,06	974,53	650,02
SP185	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$AHFA-NH2	iso2	1947,05	976,07	1948,06	974,53	650,02
SP186	Ac-ITF\$r8FHWAQL\$AEFA-NH2		1913,02	958,12	1914,03	957,52	638,68
SP187	Ac-ITF\$r8FHWAQL\$AEFA-NH2	iso2	1913,02	957,86	1914,03	957,52	638,68
SP188	Ac-ITF\$r8EHWAQL\$AHFA-NH2		1903,01	952,94	1904,02	952,51	635,34
SP189	Ac-ITF\$r8EHWAQL\$AHFA-NH2	iso2	1903,01	953,87	1904,02	952,51	635,34
SP190	Ac-LTF\$r8AHWVQL\$AHFA-NH2		1873,04	937,86	1874,05	937,53	625,35
SP191	Ac-ITF\$r8FYWVQL\$AHFA-NH2		1975,08	988,83	1976,09	988,55	659,37
SP192	Ac-ITF\$r8EYWVQL\$AHFA-NH2		1957,05	979,35	1958,06	979,53	653,36
SP193	Ac-ITF\$r8EHVWVQL\$AHFA-NH2		1931,05	967	1932,06	966,53	644,69
SP194	Ac-ITF\$r8EHVWVQL\$AHFA-NH2	iso2	1931,05	967,93	1932,06	966,53	644,69
SP195	Ac-ETF\$r8EYWAAL\$SAA-NH2		1690,86	845,85	1691,87	846,44	564,63
SP196	Ac-LTF\$r8AYWVAL\$SAA-NH2		1644,93	824,08	1645,94	823,47	549,32
SP197	Ac-LTF\$r8AHWAAL\$SAA-NH2		1590,89	796,88	1591,9	796,45	531,3
SP198	Ac-LTF\$r8AEWAAL\$SAA-NH2		1582,88	791,9	1583,89	792,45	528,63
SP199	Ac-LTF\$r8AEWAAL\$SAA-NH2	iso2	1582,88	791,9	1583,89	792,45	528,63
SP200	Ac-LTF\$r8ASWAAL\$SAA-NH2		1540,87	770,74	1541,88	771,44	514,63

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP201	Ac-LTF\$r8ASWAAL\$SAA-NH2	iso2	1540,87	770,88	1541,88	771,44	514,63
SP202	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAIa-NH2		1713,99	857,39	1715	858	572,34
SP203	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAIa-NH2	iso2	1713,99	857,84	1715	858	572,34
SP204	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AHFa-NH2		1813,99	907,86	1815	908	605,67
SP205	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AHIa-NH2		1869,03	936,1	1870,04	935,52	624,02
SP206	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AHIa-NH2	iso2	1869,03	937,03	1870,04	935,52	624,02
SP207	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$AHIa-NH2		1811,03	906,87	1812,04	906,52	604,68
SP208	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AHIa-NH2		1895,04	949,15	1896,05	948,53	632,69
SP209	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAFa-NH2		1804,99	903,2	1806	903,5	602,67
SP210	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAFa-NH2	iso2	1804,99	903,28	1806	903,5	602,67
SP211	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAWa-NH2		1844	922,81	1845,01	923,01	615,67
SP212	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAVa-NH2		1756,99	878,86	1758	879,5	586,67
SP213	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAVa-NH2	iso2	1756,99	879,3	1758	879,5	586,67
SP214	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AALa-NH2		1771,01	886,26	1772,02	886,51	591,34
SP215	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AALa-NH2	iso2	1771,01	886,33	1772,02	886,51	591,34
SP216	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAIa-NH2		1829,01	914,89	1830,02	915,51	610,68
SP217	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAIa-NH2	iso2	1829,01	915,34	1830,02	915,51	610,68
SP218	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAFa-NH2		1863	932,87	1864,01	932,51	622,01
SP219	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAFa-NH2	iso2	1863	932,87	1864,01	932,51	622,01
SP220	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAVa-NH2		1815	908,23	1816,01	908,51	606,01
SP221	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAVa-NH2	iso2	1815	908,31	1816,01	908,51	606,01
SP222	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAIa-NH2		1803,01	903,17	1804,02	902,51	602,01
SP223	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAIa-NH2	iso2	1803,01	902,8	1804,02	902,51	602,01
SP224	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAWa-NH2		1876	939,34	1877,01	939,01	626,34
SP225	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAWa-NH2	iso2	1876	939,62	1877,01	939,01	626,34

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP226	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAla-NH2		1803,01	902,8	1804,02	902,51	602,01
SP227	Ac-LTF\$r8EHWAQL\$AAla-NH2	iso2	1803,01	902,9	1804,02	902,51	602,01
SP228	Ac-ETF\$r8EHWWQL\$AAla-NH2		1847	924,82	1848,01	924,51	616,67
SP229	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAA-NH2		1728,96	865,89	1729,97	865,49	577,33
SP230	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAA-NH2	iso2	1728,96	865,89	1729,97	865,49	577,33
SP231	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAlba-NH2		1742,98	872,83	1743,99	872,5	582
SP232	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAlba-NH2	iso2	1742,98	872,92	1743,99	872,5	582
SP233	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAAa-NH2		1800	901,42	1801,01	901,01	601,01
SP234	Ac-LTF\$r5AYWAQL\$s8AAIa-NH2		1771,01	887,17	1772,02	886,51	591,34
SP235	Ac-LTF\$r5AYWAQL\$s8SAA-NH2		1673,92	838,33	1674,93	837,97	558,98
SP236	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$AANleA-NH2		1783,01	892,64	1784,02	892,51	595,34
SP237	Ac-ETF\$r8AYWAQCba\$AANleA-NH2		1798,97	900,59	1799,98	900,49	600,66
SP238	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$AANleA-NH2		1841,01	922,05	1842,02	921,51	614,68
SP239	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$AWNleA-NH2		1898,05	950,46	1899,06	950,03	633,69
SP240	Ac-ETF\$r8AYWAQCba\$AWNleA-NH2		1914,01	958,11	1915,02	958,01	639,01
SP241	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$AWNleA-NH2		1956,06	950,62	1957,07	979,04	653,03
SP242	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAFA-NH2		1890,99	946,55	1892	946,5	631,34
SP243	Ac-LTF\$34F2\$r8EYWAQCba\$SANleA-NH2		1892,99	947,57	1894	947,5	632
SP244	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$SANleA-NH2		1885	943,59	1886,01	943,51	629,34
SP245	Ac-LTF\$r8EYWSQCba\$SANleA-NH2		1873	937,58	1874,01	937,51	625,34
SP246	Ac-LTF\$r8EYWWQCba\$SANleA-NH2		1972,05	987,61	1973,06	987,03	658,36
SP247	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$AAIa-NH2		1841,01	922,05	1842,02	921,51	614,68
SP248	Ac-LTF\$34F2\$r8EYWAQCba\$AAIa-NH2		1876,99	939,99	1878	939,5	626,67
SP249	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$AAIa-NH2		1869,01	935,64	1870,02	935,51	624,01

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP250	Pam-ETf\$R8EYWAQCba\$SAA-NH2		1956,1	979,57	1957,11	979,06	653,04
SP251	Ac-LTh\$R8EFWAQCba\$SAA-NH2		1741,94	872,11	1742,95	871,98	581,65
SP252	Ac-LtA\$R8EYWAQCba\$SAA-NH2		1667,89	835,4	1668,9	834,95	556,97
SP253	Ac-LtF\$R8EYAAQCba\$SAA-NH2		1628,88	815,61	1629,89	815,45	543,97
SP254	Ac-LtF\$R8EY2NaIAQCba\$SAA-NH2		1754,93	879,04	1755,94	878,47	585,98
SP255	Ac-LtF\$R8AYWAQCba\$SAA-NH2		1685,92	844,71	1686,93	843,97	562,98
SP256	Ac-LtF\$R8EYWAQCba\$SAF-NH2		1819,96	911,41	1820,97	910,99	607,66
SP257	Ac-LtF\$R8EYWAQCba\$SAFa-NH2		1890,99	947,41	1892	946,5	631,34
SP258	Ac-LtF\$R8AYWAQCba\$SAF-NH2		1761,95	882,73	1762,96	881,98	588,32
SP259	Ac-LtF34F2\$R8AYWAQCba\$SAF-NH2		1797,93	900,87	1798,94	899,97	600,32
SP260	Ac-LtF\$R8AF4coohWAQCba\$SAF-NH2		1789,94	896,43	1790,95	895,98	597,65
SP261	Ac-LtF\$R8EY6clWAQCba\$SAF-NH2		1853,92	929,27	1854,93	927,97	618,98
SP262	Ac-LtF\$R8AYWSQCba\$SAF-NH2		1777,94	890,87	1778,95	889,98	593,65
SP263	Ac-LtF\$R8AYWWQCba\$SAF-NH2		1876,99	939,91	1878	939,5	626,67
SP264	Ac-LtF\$R8AYWAQCba\$AAIa-NH2		1783,01	893,19	1784,02	892,51	595,34
SP265	Ac-LtF34F2\$R8AYWAQCba\$AAIa-NH2		1818,99	911,23	1820	910,5	607,34
SP266	Ac-LtF\$R8AY6clWAQCba\$AAIa-NH2		1816,97	909,84	1817,98	909,49	606,66
SP267	Ac-LtF\$R8AF4coohWAQCba\$AAIa-NH2		1811	906,88	1812,01	906,51	604,67
SP268	Ac-LtF\$R8EYWAQCba\$AAFa-NH2		1875	938,6	1876,01	938,51	626,01
SP269	Ac-LtF\$R8EYWAQCba\$AAFa-NH2	iso2	1875	938,6	1876,01	938,51	626,01
SP270	Ac-ETf\$R8AYWAQCba\$AWNlea-NH2		1914,01	958,42	1915,02	958,01	639,01
SP271	Ac-LtF\$R8EYWAQCba\$AWNlea-NH2		1956,06	979,42	1957,07	979,04	653,03
SP272	Ac-ETf\$R8EYWAQCba\$AWNlea-NH2		1972,01	987,06	1973,02	987,01	658,34
SP273	Ac-ETf\$R8EYWAQCba\$AWNlea-NH2	iso2	1972,01	987,06	1973,02	987,01	658,34
SP274	Ac-LtF\$R8AYWAQCba\$SAFa-NH2		1832,99	917,89	1834	917,5	612

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP275	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$SAFa-NH2	iso2	1832,99	918,07	1834	917,5	612
SP276	Ac-ETF\$r6AYWAQL\$AWNlea-NH2		1902,01	952,22	1903,02	952,01	635,01
SP277	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AWNlea-NH2		1944,06	973,5	1945,07	973,04	649,03
SP278	Ac-ETF\$r8EYWAQL\$AWNlea-NH2		1960,01	981,46	1961,02	981,01	654,34
SP279	Dmaac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1788,98	896,06	1789,99	895,5	597,33
SP280	Hexac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1802	902,9	1803,01	902,01	601,67
SP281	Napac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1871,99	937,58	1873	937	625
SP282	Decac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1858,06	930,55	1859,07	930,04	620,36
SP283	Admac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1866,03	934,07	1867,04	934,02	623,02
SP284	Tmac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1787,99	895,41	1789	895	597
SP285	Pam-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1942,16	972,08	1943,17	972,09	648,39
SP286	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$AANlea-NH2	iso2	1783,01	892,64	1784,02	892,51	595,34
SP287	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQCba\$AAIa-NH2	iso2	1876,99	939,62	1878	939,5	626,67
SP288	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		1779,91	892,07	1780,92	890,96	594,31
SP289	Ac-LTF34F2\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2	iso2	1779,91	891,61	1780,92	890,96	594,31
SP290	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$SAA-NH2		1771,92	887,54	1772,93	886,97	591,65
SP291	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$SAA-NH2	iso2	1771,92	887,63	1772,93	886,97	591,65
SP292	Ac-LTF\$r8EYWSQCba\$SAA-NH2		1759,92	881,9	1760,93	880,97	587,65
SP293	Ac-LTF\$r8EYWSQCba\$SAA-NH2	iso2	1759,92	881,9	1760,93	880,97	587,65
SP294	Ac-LTF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1745,94	875,05	1746,95	873,98	582,99
SP295	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$SAF-NH2		1763,97	884,02	1764,98	882,99	589
SP296	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$SAF-NH2	iso2	1763,97	883,56	1764,98	882,99	589
SP297	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQhL\$SAA-NH2		1723,92	863,67	1724,93	862,97	575,65
SP298	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQhL\$SAA-NH2	iso2	1723,92	864,04	1724,93	862,97	575,65
SP299	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQhL\$SAA-NH2		1715,93	859,44	1716,94	858,97	572,98

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP300	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQhL\$SAAA-NH2	iso2	1715,93	859,6	1716,94	858,97	572,98
SP301	Ac-LTF\$r8AYWSQhL\$SAAA-NH2		1703,93	853,96	1704,94	852,97	568,98
SP302	Ac-LTF\$r8AYWSQhL\$SAAA-NH2	iso2	1703,93	853,59	1704,94	852,97	568,98
SP303	Ac-LTF\$r8EYWAQhL\$AAANleA-NH2		1829,01	915,45	1830,02	915,51	610,68
SP304	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQhL\$AAANleA-NH2		1806,99	904,58	1808	904,5	603,34
SP305	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQhL\$AAANleA-NH2		1799	901,6	1800,01	900,51	600,67
SP306	Ac-LTF\$r8AYWSQhL\$AAANleA-NH2		1787	894,75	1788,01	894,51	596,67
SP307	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQhL\$AAANleA-NH2		1821	911,79	1822,01	911,51	608,01
SP308	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQhL\$AAANleA-NH2	iso2	1821	912,61	1822,01	911,51	608,01
SP309	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQhL\$AAANleA-NH2		1813,02	907,95	1814,03	907,52	605,35
SP310	Ac-LTF\$r8AF4coohWAQhL\$AAANleA-NH2	iso2	1813,02	908,54	1814,03	907,52	605,35
SP311	Ac-LTF\$r8AYWSQhL\$AAANleA-NH2		1801,02	901,84	1802,03	901,52	601,35
SP312	Ac-LTF\$r8AYWSQhL\$AAANleA-NH2	iso2	1801,02	902,62	1802,03	901,52	601,35
SP313	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAAAa-NH2		1814,01	908,63	1815,02	908,01	605,68
SP314	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAAAa-NH2	iso2	1814,01	908,34	1815,02	908,01	605,68
SP315	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAAAa-NH2		1871,04	936,94	1872,05	936,53	624,69
SP316	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAAAa-NH2	iso2	1942,07	972,5	1943,08	972,04	648,37
SP317	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAAAa-NH2	iso1	1942,07	972,5	1943,08	972,04	648,37
SP318	Ac-LTF\$r8EYWAQhL\$AAANleA-NH2		1843,03	922,54	1844,04	922,52	615,35
SP319	Ac-AATF\$r8AYWAQhL\$AAANleA-NH2		1800	901,39	1801,01	901,01	601,01
SP320	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAANleAA-NH2		1842,04	922,45	1843,05	922,03	615,02
SP321	Ac-ALTF\$r8AYWAQhL\$AAANleAA-NH2		1913,08	957,94	1914,09	957,55	638,7
SP322	Ac-LTF\$r8AYWAQCbA\$AAANleAA-NH2		1854,04	928,43	1855,05	928,03	619,02
SP323	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$AAANleAA-NH2		1856,06	929,4	1857,07	929,04	619,69
SP324	Ac-LTF\$r8EYWAQCbA\$SAAA-NH2		1814,96	909,37	1815,97	908,49	605,99

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP325	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAAAA-NH2	iso2	1814,96	909,37	1815,97	908,49	605,99
SP326	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAAAA-NH2		1886	944,61	1887,01	944,01	629,67
SP327	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAAAA-NH2	iso2	1886	944,61	1887,01	944,01	629,67
SP328	Ac-ALTF\$r8EYWAQCba\$SAAA-NH2		1814,96	909,09	1815,97	908,49	605,99
SP329	Ac-ALTF\$r8EYWAQCba\$SAAAA-NH2		1886	944,61	1887,01	944,01	629,67
SP330	Ac-ALTF\$r8EYWAQCba\$SAAA-NH2	iso2	1814,96	909,09	1815,97	908,49	605,99
SP331	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1929,04	966,08	1930,05	965,53	644,02
SP332	Ac-LTF\$r8EY6clWAQCba\$SAA-NH2		1777,89	890,78	1778,9	889,95	593,64
SP333	Ac-LTF\$r8EF4cooh6clWAQCba\$SANleA-NH2		1918,96	961,27	1919,97	960,49	640,66
SP334	Ac-LTF\$r8EF4cooh6clWAQCba\$SANleA-NH2	iso2	1918,96	961,27	1919,97	960,49	640,66
SP335	Ac-LTF\$r8EF4cooh6clWAQCba\$AAIa-NH2		1902,97	953,03	1903,98	952,49	635,33
SP336	Ac-LTF\$r8EF4cooh6clWAQCba\$AAIa-NH2	iso2	1902,97	953,13	1903,98	952,49	635,33
SP337	Ac-LTF\$r8AY6clWAQL\$AAAAAa-NH2		1905	954,61	1906,01	953,51	636,01
SP338	Ac-LTF\$r8AY6clWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1905	954,9	1906,01	953,51	636,01
SP339	Ac-F\$r8AY6clWEAL\$AAAAAa-NH2		1762,89	883,01	1763,9	882,45	588,64
SP340	Ac-ETf\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1945	974,31	1946,01	973,51	649,34
SP341	Ac-ETf\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1945	974,49	1946,01	973,51	649,34
SP342	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2000,08	1001,6	2001,09	1001,05	667,7
SP343	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	2000,08	1001,6	2001,09	1001,05	667,7
SP344	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAANleAAa-NH2		1913,08	958,58	1914,09	957,55	638,7
SP345	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAANleAAa-NH2	iso2	1913,08	958,58	1914,09	957,55	638,7

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP346	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$AAAAAa-NH2		1941,04	972,55	1942,05	971,53	648,02
SP347	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$AAAAAa-NH2	iso2	1941,04	972,55	1942,05	971,53	648,02
SP348	Ac-LTf\$R8EF4coohWAQCbA\$AAAAAa-NH2		1969,04	986,33	1970,05	985,53	657,35
SP349	Ac-LTf\$R8EF4coohWAQCbA\$AAAAAa-NH2	iso2	1969,04	986,06	1970,05	985,53	657,35
SP350	Ac-LTf\$R8EYWSQCbA\$AAAAAa-NH2		1957,04	980,04	1958,05	979,53	653,35
SP351	Ac-LTf\$R8EYWSQCbA\$AAAAAa-NH2	iso2	1957,04	980,04	1958,05	979,53	653,35
SP352	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2		1814,96	909	1815,97	908,49	605,99
SP353	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2	iso2	1814,96	909	1815,97	908,49	605,99
SP354	Ac-ALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2		1886	944,52	1887,01	944,01	629,67
SP355	Ac-ALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2	iso2	1886	944,98	1887,01	944,01	629,67
SP356	Ac-ALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2		1957,04	980,04	1958,05	979,53	653,35
SP357	Ac-ALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAa-NH2	iso2	1957,04	980,04	1958,05	979,53	653,35
SP358	Ac-AALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAAAa-NH2		2028,07	1016,1	2029,08	1015,04	677,03
SP359	Ac-AALTF\$R8EYWAQCbA\$SAAAAa-NH2	iso2	2028,07	1015,57	2029,08	1015,04	677,03
SP360	Ac-RTF\$R8EYWAQCbA\$SAA-NH2		1786,94	895,03	1787,95	894,48	596,65
SP361	Ac-LRF\$R8EYWAQCbA\$SAA-NH2		1798,98	901,51	1799,99	900,5	600,67
SP362	Ac-LTf\$R8EYWRQCbA\$SAA-NH2		1828,99	916,4	1830	915,5	610,67
SP363	Ac-LTf\$R8EYWARCbA\$SAA-NH2		1771,97	887,63	1772,98	886,99	591,66
SP364	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$RAA-NH2		1812,99	908,08	1814	907,5	605,34
SP365	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$SRA-NH2		1828,99	916,12	1830	915,5	610,67
SP366	Ac-LTf\$R8EYWAQCbA\$SAR-NH2		1828,99	916,12	1830	915,5	610,67
SP367	5-FAM-BaLTF\$R8EYWAQCbA\$SAA-NH2		2131	1067,09	2132,01	1066,51	711,34
SP368	5-FAM-BaLTF\$R8AYWAQL\$AAANieA-NH2		2158,08	1080,6	2159,09	1080,05	720,37
SP369	Ac-LAF\$R8EYWAQCbA\$AAANieA-NH2		1799	901,05	1800,01	900,51	600,67

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP370	Ac-ATF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1786,97	895,03	1787,98	894,49	596,66
SP371	Ac-AAF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1756,96	880,05	1757,97	879,49	586,66
SP372	Ac-AAAF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1827,99	915,57	1829	915	610,34
SP373	Ac-AAAAF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1899,03	951,09	1900,04	950,52	634,02
SP374	Ac-AAATF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1858	930,92	1859,01	930,01	620,34
SP375	Ac-AALTF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		1971,09	987,17	1972,1	986,55	658,04
SP376	Ac-AAALTF\$r8EYWAQL\$AAiNleA-NH2		2042,12	1023,15	2043,13	1022,07	681,71
SP377	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAiNleAA-NH2		1900,05	952,02	1901,06	951,03	634,36
SP378	Ac-ALTF\$r8EYWAQL\$AAiNleAA-NH2		1971,09	987,63	1972,1	986,55	658,04
SP379	Ac-AALTF\$r8EYWAQL\$AAiNleAAA-NH2		2042,12	1022,69	2043,13	1022,07	681,71
SP380	Ac-LTF\$r8EYWAQCbA\$AAiNleAAA-NH2		1912,05	958,03	1913,06	957,03	638,36
SP381	Ac-LTF\$r8EYWAQhL\$AAiNleAA-NH2		1914,07	958,68	1915,08	958,04	639,03
SP382	Ac-ALTF\$r8EYWAQhL\$AAiNleAAA-NH2		1985,1	994,1	1986,11	993,56	662,71
SP383	Ac-LTF\$r8ANmYWAQL\$AAiNleA-NH2		1785,02	894,11	1786,03	893,52	596,01
SP384	Ac-LTF\$r8ANmYWAQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1785,02	894,11	1786,03	893,52	596,01
SP385	Ac-LTF\$r8AYNmYWAQL\$AAiNleA-NH2		1785,02	894,11	1786,03	893,52	596,01
SP386	Ac-LTF\$r8AYNmYWAQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1785,02	894,11	1786,03	893,52	596,01
SP387	Ac-LTF\$r8AYAmwAQL\$AAiNleA-NH2		1785,02	894,01	1786,03	893,52	596,01
SP388	Ac-LTF\$r8AYAmwAQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1785,02	894,01	1786,03	893,52	596,01
SP389	Ac-LTF\$r8AYWaibQL\$AAiNleA-NH2		1785,02	894,01	1786,03	893,52	596,01
SP390	Ac-LTF\$r8AYWaibQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1785,02	894,01	1786,03	893,52	596,01
SP391	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAiNleA-NH2		1785,02	894,38	1786,03	893,52	596,01
SP392	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1785,02	894,38	1786,03	893,52	596,01
SP393	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAiNleA-NH2		1771,01	887,54	1772,02	886,51	591,34
SP394	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AAiNleA-NH2	iso2	1771,01	887,54	1772,02	886,51	591,34

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP395	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$ASarNleA-NH2		1771,01	887,35	1772,02	886,51	591,34
SP396	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$ASarNleA-NH2	iso2	1771,01	887,35	1772,02	886,51	591,34
SP397	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAib-NH2		1785,02	894,75	1786,03	893,52	596,01
SP398	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAib-NH2	iso2	1785,02	894,75	1786,03	893,52	596,01
SP399	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleNmA-NH2		1785,02	894,6	1786,03	893,52	596,01
SP400	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleNmA-NH2	iso2	1785,02	894,6	1786,03	893,52	596,01
SP401	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleSar-NH2		1771,01	886,98	1772,02	886,51	591,34
SP402	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleSar-NH2	iso2	1771,01	886,98	1772,02	886,51	591,34
SP403	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAaib-NH2		1856,06		1857,07	929,04	619,69
SP404	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAaib-NH2	iso2	1856,06		1857,07	929,04	619,69
SP405	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleANmA-NH2		1856,06	930,37	1857,07	929,04	619,69
SP406	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleANmA-NH2	iso2	1856,06	930,37	1857,07	929,04	619,69
SP407	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAa-NH2		1842,04	922,69	1843,05	922,03	615,02
SP408	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleAa-NH2	iso2	1842,04	922,69	1843,05	922,03	615,02
SP409	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleASar-NH2		1842,04	922,6	1843,05	922,03	615,02
SP410	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleASar-NH2	iso2	1842,04	922,6	1843,05	922,03	615,02
SP411	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NH2		1799,04	901,14	1800,05	900,53	600,69
SP412	Ac-LTFaibAYWAQLaibAANleA-NH2		1648,9	826,02	1649,91	825,46	550,64
SP413	Ac-LTF\$r8Cou4YWAQL\$AANleA-NH2		1975,05	989,11	1976,06	988,53	659,36
SP414	Ac-LTF\$r8Cou4YWAQL\$AANleA-NH2	iso2	1975,05	989,11	1976,06	988,53	659,36
SP415	Ac-LTF\$r8AYWCou4QL\$AANleA-NH2		1975,05	989,11	1976,06	988,53	659,36
SP416	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$Cou4ANleA-NH2		1975,05	989,57	1976,06	988,53	659,36
SP417	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$Cou4ANleA-NH2	iso2	1975,05	989,57	1976,06	988,53	659,36
SP418	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$ACou4NleA-NH2		1975,05	989,57	1976,06	988,53	659,36
SP419	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$ACou4NleA-NH2	iso2	1975,05	989,57	1976,06	988,53	659,36

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP420	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-OH		1771,99	887,63	1773	887	591,67
SP421	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-OH	iso2	1771,99	887,63	1773	887	591,67
SP422	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHnPr		1813,05	908,08	1814,06	907,53	605,36
SP423	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHnPr	iso2	1813,05	908,08	1814,06	907,53	605,36
SP424	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHnBu33 Me		1855,1	929,17	1856,11	928,56	619,37
SP425	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHnBu33 Me	iso2	1855,1	929,17	1856,11	928,56	619,37
SP426	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHHex		1855,1	929,17	1856,11	928,56	619,37
SP427	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NHHex	iso2	1855,1	929,17	1856,11	928,56	619,37
SP428	Ac-LTA\$r8AYWAQL\$AANleA-NH2		1694,98	849,33	1695,99	848,5	566
SP429	Ac-LThL\$r8AYWAQL\$AANleA-NH2		1751,04	877,09	1752,05	876,53	584,69
SP430	Ac-LTF\$r8AYAAQL\$AANleA-NH2		1655,97	829,54	1656,98	828,99	553
SP431	Ac-LTF\$r8AY2NaIaQL\$AANleA-NH2		1782,01	892,63	1783,02	892,01	595,01
SP432	Ac-LTF\$r8EYWCou4QCba\$SAA-NH2		1947,97	975,8	1948,98	974,99	650,33
SP433	Ac-LTF\$r8EYWCou7QCba\$SAA-NH2		16,03	974,9	17,04	9,02	6,35
SP434	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		1745,94	874,8	1746,95	873,98	582,99
SP435	Dmaac-LTF\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		1786,97	894,8	1787,98	894,49	596,66
SP436	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAAAa-NH2		1914,08	958,2	1915,09	958,05	639,03
SP437	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1914,08	958,2	1915,09	958,05	639,03
SP438	Dmaac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1972,08	987,3	1973,09	987,05	656,37
SP439	Dmaac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1972,08	987,3	1973,09	987,05	656,37
SP440	Dmaac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$AAIa-NH2		1912,05	957,4	1913,06	957,03	638,36
SP441	Dmaac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$AAIa-NH2	iso2	1912,05	957,4	1913,06	957,03	638,36
SP442	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NH2		1814,05	908,3	1815,06	908,03	605,69
SP443	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$AANleA-NH2	iso2	1814,05	908,3	1815,06	908,03	605,69

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP444	Ac-L TF\$r8AYWAQL%AAAN1eA-NH2		1773,02	888,37	1774,03	887,52	592,01
SP445	Ac-L TF\$r8EYWAQL%AAAAAa-NH2		1931,06	966,4	1932,07	966,54	644,69
SP446	Cou6BaL TF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		2018,05	1009,9	2019,06	1010,03	673,69
SP447	Cou8BaL TF\$r8EYWAQhL\$SAA-NH2		1962,96	982,34	1963,97	982,49	655,32
SP448	Ac-L TF4\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2054,93	1028,68	2055,94	1028,47	685,98
SP449	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1929,04	966,17	1930,05	965,53	644,02
SP550	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-OH		1930,02	966,54	1931,03	966,02	644,35
SP551	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-OH	iso2	1930,02	965,89	1931,03	966,02	644,35
SP552	Ac-L TF\$r8EYWAEL\$AAAAAa-NH2		1930,02	966,82	1931,03	966,02	644,35
SP553	Ac-L TF\$r8EYWAEL\$AAAAAa-NH2	iso2	1930,02	966,91	1931,03	966,02	644,35
SP554	Ac-L TF\$r8EYWAEL\$AAAAAa-OH		1931,01	967,28	1932,02	966,51	644,68
SP555	Ac-L TF\$r8EY6cIWAQL\$AAAAAa-NH2		1963	983,28	1964,01	982,51	655,34
SP556	Ac-L TF\$r8EF4bOH2WAQL\$AAAAAa-NH2		1957,05	980,04	1958,06	979,53	653,36
SP557	Ac-AAAL TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2142,15	1072,83	2143,16	1072,08	715,06
SP558	Ac-L TF34F2\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1965,02	984,3	1966,03	983,52	656,01
SP559	Ac-RTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1972,06	987,81	1973,07	987,04	658,36
SP560	Ac-L TA\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1853,01	928,33	1854,02	927,51	618,68
SP561	Ac-L TF\$r8EYWAibQL\$AAAAAa-NH2		1943,06	973,48	1944,07	972,54	648,69
SP562	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAibAAAAa-NH2		1943,06	973,11	1944,07	972,54	648,69
SP563	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAibAAAAa-NH2		1943,06	973,48	1944,07	972,54	648,69
SP564	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAibAa-NH2		1943,06	973,48	1944,07	972,54	648,69
SP565	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAibA-NH2		1943,06	973,38	1944,07	972,54	648,69
SP566	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAibA-NH2	iso2	1943,06	973,38	1944,07	972,54	648,69
SP567	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAib-NH2		1943,06	973,01	1944,07	972,54	648,69
SP568	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1929,04	966,54	1930,05	965,53	644,02

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP569	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAaAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP570	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAaAa-NH2		1929,04	966,54	1930,05	965,53	644,02
SP571	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAaAa-NH2	iso2	1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP572	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP573	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP574	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$ASarAAAa-NH2		1929,04	966,54	1930,05	965,53	644,02
SP575	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$ASarAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP576	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$ASarAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP577	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP578	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1929,04	966,08	1930,05	965,53	644,02
SP579	Ac-7LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1918,07	951,99	1919,08	960,04	640,37
SP581	Ac-TF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1815,96	929,85	1816,97	908,99	606,33
SP582	Ac-F\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1714,91	930,92	1715,92	858,46	572,64
SP583	Ac-LV\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1927,06	895,12	1928,07	964,54	643,36
SP584	Ac-AAF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1856,98	859,51	1857,99	929,5	620
SP585	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1858	824,08	1859,01	930,01	620,34
SP586	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1786,97	788,56	1787,98	894,49	596,66
SP587	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2		1715,93	1138,57	1716,94	858,97	572,98
SP588	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$Aa-NH2		1644,89	1144,98	1645,9	823,45	549,3
SP589	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$a-NH2		1573,85	1113,71	1574,86	787,93	525,62
SP590	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAa-OH		1716,91	859,55	1717,92	859,46	573,31
SP591	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$a-OH		1574,84	975,14	1575,85	788,43	525,95
SP592	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAA-NH2		1715,93	904,75	1716,94	858,97	572,98
SP593	Ac-LTF\$r8EYWAQCb\$a\$AAa-OH		1744,91	802,49	1745,92	873,46	582,64
SP594	Ac-LTF\$r8EYWAQCb\$a\$S-OH		1602,83	913,53	1603,84	802,42	535,28

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP595	Ac-LTf8EYWAQCbA\$S-NH2		1601,85	979,58	1602,86	801,93	534,96
SP596	4-FBzL-LTFf8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2009,05	970,52	2010,06	1005,53	670,69
SP597	4-FBzL-LTFf8EYWAQCbA\$SAA-NH2		1823,93	965,8	1824,94	912,97	608,98
SP598	Ac-LTf8RYWAQL\$AAAAAa-NH2		1956,1	988,28	1957,11	979,06	653,04
SP599	Ac-LTf8HYWAQL\$AAAAAa-NH2		1937,06	1003,54	1938,07	969,54	646,69
SP600	Ac-LTf8QYWAQL\$AAAAAa-NH2		1928,06	993,92	1929,07	965,04	643,69
SP601	Ac-LTf8CfYWAQL\$AAAAAa-NH2		1957,08	987	1958,09	979,55	653,37
SP602	Ac-LTf8GlaYWAQL\$AAAAAa-NH2		1973,03	983	1974,04	987,52	658,68
SP603	Ac-LTf8F4gYWAQL\$AAAAAa-NH2		2004,1	937,86	2005,11	1003,06	669,04
SP604	Ac-LTf82mRYWAQL\$AAAAAa-NH2		1984,13	958,58	1985,14	993,07	662,38
SP605	Ac-LTf8ipKYWAQL\$AAAAAa-NH2		1970,14	944,52	1971,15	986,08	657,72
SP606	Ac-LTf8F4NH2YWAQL\$AAAAAa-NH2		1962,08	946	1963,09	982,05	655,03
SP607	Ac-LTf8EYWAAL\$AAAAAa-NH2		1872,02	959,32	1873,03	937,02	625,01
SP608	Ac-LTf8EYWALL\$AAAAAa-NH2		1914,07	980,88	1915,08	958,04	639,03
SP609	Ac-LTf8EYWAaibL\$AAAAAa-NH2		1886,03	970,61	1887,04	944,02	629,68
SP610	Ac-LTf8EYWASL\$AAAAAa-NH2		1888,01	980,51	1889,02	945,01	630,34
SP611	Ac-LTf8EYWANL\$AAAAAa-NH2		1915,02	1006,41	1916,03	958,52	639,35
SP612	Ac-LTf8EYWACiL\$AAAAAa-NH2		1958,07		1959,08	980,04	653,7
SP613	Ac-LTf8EYWAHL\$AAAAAa-NH2		1938,04	966,24	1939,05	970,03	647,02
SP614	Ac-LTf8EYWARL\$AAAAAa-NH2		1957,08		1958,09	979,55	653,37
SP615	Ac-LTf8EpYWAQL\$AAAAAa-NH2		2009,01		2010,02	1005,51	670,68
SP616	Cbm-LTFf8EYWAQCbA\$SAA-NH2		1590,85		1591,86	796,43	531,29
SP617	Cbm-LTFf8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1930,04		1931,05	966,03	644,35
SP618	Ac-LTf8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1945,04	1005,11	1946,05	973,53	649,35
SP619	Ac-LTf8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1945,04	986,52	1946,05	973,53	649,35

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP620	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$SAAAAa-NH2		1961,03	993,27	1962,04	981,52	654,68
SP621	Ac-L TF\$r8EYWAQTba\$AAAAAa-NH2		1943,06	983,1	1944,07	972,54	648,69
SP622	Ac-L TF\$r8EYWAQAdm\$AAAAAa-NH2		2007,09	990,31	2008,1	1004,55	670,04
SP623	Ac-L TF\$r8EYWAQCha\$AAAAAa-NH2		1969,07	987,17	1970,08	985,54	657,36
SP624	Ac-L TF\$r8EYWAQhCha\$AAAAAa-NH2		1983,09	1026,11	1984,1	992,55	662,04
SP625	Ac-L TF\$r8EYWAQF\$AAAAAa-NH2		1963,02	957,01	1964,03	982,52	655,35
SP626	Ac-L TF\$r8EYWAQhF\$AAAAAa-NH2		1977,04	1087,81	1978,05	989,53	660,02
SP627	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAANleAAa-NH2		1971,09	933,45	1972,1	986,55	658,04
SP628	Ac-L TF\$r8EYWAQAdm\$AAANleAAa-NH2		2049,13	1017,97	2050,14	1025,57	684,05
SP629	4-FBz-BaL TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2080,08		2081,09	1041,05	694,37
SP630	4-FBz-BaL TF\$r8EYWAQCb\$SAA-NH2		1894,97		1895,98	948,49	632,66
SP631	Ac-L TF\$r5EYWAQL\$S8AAAAAa-NH2		1929,04	1072,68	1930,05	965,53	644,02
SP632	Ac-L TF\$r5EYWAQCb\$S8SAA-NH2		1743,92	1107,79	1744,93	872,97	582,31
SP633	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAhhLAAa-NH2		1999,12		2000,13	1000,57	667,38
SP634	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2071,11		2072,12	1036,56	691,38
SP635	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2142,15	778,1	2143,16	1072,08	715,06
SP636	Ac-L TF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2213,19	870,53	2214,2	1107,6	738,74
SP637	Ac-L TA\$r8EYAAQCb\$SAA-NH2		1552,85		1553,86	777,43	518,62
SP638	Ac-L TA\$r8EYAAQL\$AAAAAa-NH2		1737,97	779,45	1738,98	869,99	580,33
SP639	Ac-L TF\$r8EPmpWAQL\$AAAAAa-NH2		2007,03	779,54	2008,04	1004,52	670,02
SP640	Ac-L TF\$r8EPmpWAQCb\$SAA-NH2		1821,91	838,04	1822,92	911,96	608,31
SP641	Ac-ATF\$r8HYWAQL\$S-NH2		1555,82	867,83	1556,83	778,92	519,61
SP642	Ac-L TF\$r8HAWAQL\$S-NH2		1505,84	877,91	1506,85	753,93	502,95
SP643	Ac-L TF\$r8HYWAQ\$S-NH2		1555,82	852,52	1556,83	778,92	519,61
SP644	Ac-L TF\$r8EYWAQCb\$SA-NH2		1672,89	887,18	1673,9	837,45	558,64

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP645	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$SAA-NH2		1731,92	873,32	1732,93	866,97	578,31
SP646	Ac-LTF\$r8HYWAQCb\$a\$SAA-NH2		1751,94	873,05	1752,95	876,98	584,99
SP647	Ac-LTF\$r8SYWAQCb\$a\$SAA-NH2		1701,91	844,88	1702,92	851,96	568,31
SP648	Ac-LTF\$r8RYWAQCb\$a\$SAA-NH2		1770,98	865,58	1771,99	886,5	591,33
SP649	Ac-LTF\$r8KYWAQCb\$a\$SAA-NH2		1742,98	936,57	1743,99	872,5	582
SP650	Ac-LTF\$r8QYWAQCb\$a\$SAA-NH2		1742,94	930,93	1743,95	872,48	581,99
SP651	Ac-LTF\$r8EYWAACb\$a\$SAA-NH2		1686,9	1032,45	1687,91	844,46	563,31
SP652	Ac-LTF\$r8EYWAQCb\$a\$AAA-NH2		1727,93	895,46	1728,94	864,97	576,98
SP653	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAA-OH		1858,99	824,54	1860	930,5	620,67
SP654	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAA-OH		1787,95	894,48	1788,96	894,98	596,99
SP655	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AA-OH		1645,88	856	1646,89	823,95	549,63
SP656	Ac-LTF\$r8AF4bOH2WAQL\$AAAAAa-NH2						
SP657	Ac-LTF\$r8AF4bOH2WAAL\$AAAAAa-NH2						
SP658	Ac-LTF\$r8EF4bOH2WAQCb\$a\$SAA-NH2						
SP659	Ac-LTF\$r8ApYWAQL\$AAAAAa-NH2						
SP660	Ac-LTF\$r8ApYWAAL\$AAAAAa-NH2						
SP661	Ac-LTF\$r8EpYWAQCb\$a\$SAA-NH2						
SP662	Ac-LTF\$rda6AYWAQL\$da5AAAAAa-NH2		1974,06	934,44			
SP663	Ac-LTF\$rda6EYWAQCb\$a\$da5SAA-NH2		1846,95	870,52		869,94	
SP664	Ac-LTF\$rda6EYWAQL\$da5AAAAAa-NH2						
SP665	Ac-LTF\$ra9EYWAQL\$a6AAAAAa-NH2			936,57		935,51	
SP666	Ac-LTF\$ra9EYWAQL\$a6AAAAAa-NH2						
SP667	Ac-LTF\$ra9EYWAQCb\$a\$a6SAA-NH2						
SP668	Ac-LTA\$ra9EYWAQCb\$a\$a6SAA-NH2						

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP669	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQCba\$a6SAA-NH2						
SP670	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2316,11				
SP671	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2344,15				
SP672	5-FAM-BaLTA\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2240,08				
SP673	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2258,11				
SP674	5-FAM-BaATF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2274,07				
SP675	5-FAM-BaLAF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2286,1				
SP676	5-FAM-BaLTF\$r8EAWAQL\$AAAAAa-NH2		2224,09				
SP677	5-FAM-BaLTF\$r8EYAAQL\$AAAAAa-NH2		2201,07				
SP678	5-FAM-BaLTA\$r8EYAAQL\$AAAAAa-NH2		2125,04				
SP679	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAAL\$AAAAAa-NH2		2259,09				
SP680	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQA\$AAAAAa-NH2		2274,07				
SP681	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQCba\$/SAA-NH2		2159,03				
SP682	5-FAM-BaLTA\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		2054,97				
SP683	5-FAM-BaLTF\$r8EYAAQCba\$SAA-NH2		2015,96				
SP684	5-FAM-BaLTA\$r8EYAAQCba\$SAA-NH2		1939,92				
SP685	5-FAM-BaQSQQTF\$r8NLWRLl\$QN-NH2		2495,23				
SP686	5-TAMRA-BaLTF\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		2186,1				
SP687	5-TAMRA-BaLTA\$r8EYWAQCba\$SAA-NH2		2110,07				
SP688	5-TAMRA-BaLTF\$r8EYAAQCba\$SAA-NH2		2071,06				
SP689	5-TAMRA-BaLTA\$r8EYAAQCba\$SAA-NH2		1995,03				
SP690	5-TAMRA-BaLTF\$r8EYWAQCba\$/SAA-NH2		2214,13				

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP691	5-TAMRA-BaLTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2371,22				
SP692	5-TAMRA-BaLTA\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2295,19				
SP693	5-TAMRA-BaLTF\$r8EYWAQL\$/AAAAAa-NH2		2399,25				
SP694	Ac-LTF\$r8EYWCou7QCba\$SAA-OH		1947,93				
SP695	Ac-LTF\$r8EYWCou7QCba\$S-OH		1805,86				
SP696	Ac-LTA\$r8EYWCou7QCba\$SAA-NH2		1870,91				
SP697	Ac-LTF\$r8EYACou7QCba\$SAA-NH2		1831,9				
SP698	Ac-LTA\$r8EYACou7QCba\$SAA-NH2		1755,87				
SP699	Ac-LTF\$r8EYWCou7QCba\$/SAA-NH2		1974,98				
SP700	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$AAAAAa-NH2		2132,06				
SP701	Ac-LTF\$/r8EYWCou7QL\$/AAAAAa-NH2		2160,09				
SP702	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$AAAAA-OH		2062,01				
SP703	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$AAAAA-OH		1990,97				
SP704	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$AAAA-OH		1919,94				
SP705	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$AA-OH		1848,9				
SP706	Ac-LTF\$r8EYWCou7QL\$A-OH		1777,86				
SP707	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$AAAAa-NH2	iso2		974,4	973,53		
SP708	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$AAAAAa-NH2	iso2	1814,01	908,82	1815,02	908,01	605,68
SP709	Bioti n-BaLTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2184,14	1093,64	2185,15	1093,08	729,05
SP710	Ac-LTF\$r8HAWAQL\$S-NH2	iso2	1505,84	754,43	1506,85	753,93	502,95
SP711	Ac-LTF\$r8EYWAQCba\$SA-NH2	iso2	1672,89	838,05	1673,9	837,45	558,64
SP712	Ac-LTF\$r8HYWAQCba\$SAA-NH2	iso2	1751,94	877,55	1752,95	876,98	584,99
SP713	Ac-LTF\$r8SYWAQCba\$SAA-NH2	iso2	1701,91	852,48	1702,92	851,96	568,31

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP714	Ac-LTf\$8RYWAQCb\$SAA-NH2	iso2	1770,98	887,45	1771,99	886,5	591,33
SP715	Ac-LTf\$8KYWAQCb\$SAA-NH2	iso2	1742,98	872,92	1743,99	872,5	582
SP716	Ac-LTf\$8EYWAQCb\$AAA-NH2	iso2	1727,93	865,71	1728,94	864,97	576,98
SP717	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AAAAaBaC-NH2		2103,09	1053,12	2104,1	1052,55	702,04
SP718	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AAAAadPeg4C-NH2		2279,19	1141,46	2280,2	1140,6	760,74
SP719	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAAAaA-NH2		1737,98	870,43	1738,99	870	580,33
SP720	Ac-LTf\$8AYAAAL\$AAAAaA-NH2		1698,97	851	1699,98	850,49	567,33
SP721	5-FAM-BaLTf\$8AYWAAL\$AAAAaA-NH2		2201,09	1101,87	2202,1	1101,55	734,7
SP722	Ac-LTf\$8AYWAQl\$AAAAaA-NH2		1795	898,92	1796,01	898,51	599,34
SP723	Ac-LTf\$8AYAAQl\$AAAAaA-NH2		1755,99	879,49	1757	879	586,34
SP724	Ac-LTf\$8a6AYWAAL\$da5AAAAaA-NH2		1807,97		1808,98	904,99	603,66
SP725	FITC-BaLTf\$8EYWAQl\$AAAAaA-NH2		2347,1	1174,49	2348,11	1174,56	783,37
SP726	FITC-BaLTf\$8EYWAQCb\$SAA-NH2		2161,99	1082,35	2163	1082	721,67
SP733	Ac-LTf\$8EYWAQl\$EAAAAa-NH2		1987,05	995,03	1988,06	994,53	663,36
SP734	Ac-LTf\$8AYWAQl\$EAAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP735	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AAAAaBaKbio-NH2		2354,25	1178,47	2355,26	1178,13	785,76
SP736	Ac-LTf\$8AYWAAL\$AAAAaA-NH2		1814,01	908,45	1815,02	908,01	605,68
SP737	Ac-LTf\$8AYAAAL\$AAAAaA-NH2	iso2	1698,97	850,91	1699,98	850,49	567,33
SP738	Ac-LTf\$8AYAAQl\$AAAAaA-NH2	iso2	1755,99	879,4	1757	879	586,34
SP739	Ac-LTf\$8EYWAQl\$EAAAAa-NH2	iso2	1987,05	995,21	1988,06	994,53	663,36
SP740	Ac-LTf\$8AYWAQl\$EAAAAa-NH2	iso2	1929,04	966,08	1930,05	965,53	644,02
SP741	Ac-LTf\$8EYWAQCb\$AAAAaA-NH2		1957,04	980,04	1958,05	979,53	653,35
SP742	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AAAA\$5AA-NH2		2023,12	1012,83	2024,13	1012,57	675,38
SP743	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AAAA\$A-NH2		2108,17	1055,44	2109,18	1055,09	703,73
SP744	Ac-LTf\$8EYWAQl\$AA\$AAAA\$A-NH2		2179,21	1090,77	2180,22	1090,61	727,41

(continuación)

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc(M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP745	Ac-LTf8EYWAQL\$AAA\$AAA\$A-NH2		2250,25	1126,69	2251,26	1126,13	751,09
SP746	Ac-AAALTF8EYWAQL\$AAA-OH		1930,02		1931,03	966,02	644,35
SP747	Ac-AAALTF8EYWAQL\$AAA-NH2		1929,04	965,85	1930,05	965,53	644,02
SP748	Ac-AAAAALTF8EYWAQL\$AAA-NH2		2000,08	1001,4	2001,09	1001,05	667,7
SP749	Ac-AAAAALTF8EYWAQL\$AAA-NH2		2071,11	1037,13	2072,12	1036,56	691,38
SP750	Ac-AAAAAALTF8EYWAQL\$AAA-NH2		2142,15		2143,16	1072,08	715,06
SP751	Ac-LTf8EYWAQCbada6SAA-NH2	iso2	1751,89	877,36	1752,9	876,95	584,97
SP752	Ac-tf8EYWAQL\$AAA-NH2			844,25			
SP753	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			837,03			
SP754	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			822,97			
SP755	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			908,35			
SP756	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			858,03			
SP757	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			879,86			
SP758	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			936,38			
SP759	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2			844,25			
SP760	5-FAM-Batawy8EYWAQL\$AAA-NH2						
SP761	5-FAM-Batawy8EYWAQL\$AAA-NH2						
SP762	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2						
SP763	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2						
SP764	Ac-tawy8EYWAQL\$AAA-NH2						

La Tabla 1a muestra una selección de macrociclos peptidomiméticos.

Tabla 1a

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc(M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP244	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$SANIleA-NH2		1885	943,59	1886,01	943,51	629,34
SP331	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	iso2	1929,04	966,08	1930,05	965,53	644,02
SP555	Ac-LTF \$r8EY6ciWAQL\$AAAAAa-NH2		1963	983,28	1964,01	982,51	655,34
SP557	Ac-AAA LTF\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		2142,15	1072,83	2143,16	1072,08	715,06
SP558	Ac-LTF 34F2\$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1965,02	984,3	1966,03	983,52	656,01
SP562	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAIibAAAAa-NH2		1943,06	973,11	1944,07	972,54	648,69
SP564	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAIibAa-NH2		1943,06	973,48	1944,07	972,54	648,69
SP566	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAibA-NH2	iso2	1943,06	973,38	1944,07	972,54	648,69
SP567	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAib-NH2		1943,06	973,01	1944,07	972,54	648,69
SP572	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP573	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAa-NH2		1929,04	966,35	1930,05	965,53	644,02
SP578	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAASar-NH2		1929,04	966,08	1930,05	965,53	644,02
SP551	Ac-LTF \$r8EYWAQL\$AAAAAa-OH	iso2	1930,02	965,89	1931,03	966,02	644,35
SP662	Ac-LTF \$rda6AYWAQL\$da5AAAAAa-NH2		1974,06	934,44		933,49	
SP367	5-FAM-BaLTF\$r8EYWAQCba\$AAA-NH2		2131	1067,09	2132,01	1066,51	711,34
SP349	Ac-LTF\$r8EF4coohWAQCba\$AAAAAa-NH2	iso2	1969,04	986,06	1970,05	985,53	657,35
SP347	Ac-LTF \$r8EYWAQCba\$AAAAAa-NH2	iso2	1941,04	972,55	1942,05	971,53	648,02

La Tabla 1b muestra una selección adicional de macrociclos peptidomiméticos.

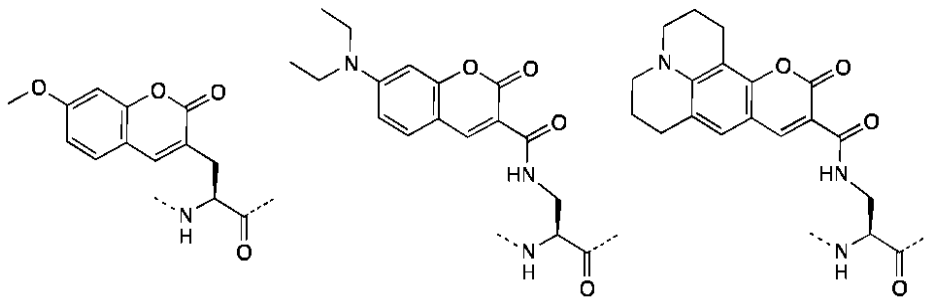
Tabla 1b

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
5	SP581	Ac-TF\$8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	1815,96	929,85	1816,97	908,99	606,33
	SP582	Ac-F\$8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	1714,91	930,92	1715,92	858,46	572,64
	SP583	Ac-LVF\$8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	1927,06	895,12	1928,07	964,54	643,36
10	SP584	Ac-AAF\$8EYWAQL\$AAAAAa-NH2	1856,98	859,51	1857,99	929,5	620
	SP585	Ac-LTF\$8EYWAQL\$AAAAa-NH2	1858	824,08	1859,01	930,01	620,34
	SP586	Ac-LTF\$8EYWAQL\$AAAa-NH2	1786,97	788,56	1787,98	894,49	596,66
	SP587	Ac-LTF\$8EYWAQL\$AAa-NH2	1715,93	1138,57	1716,94	858,97	572,98
	SP588	Ac-LTF\$8EYWAQL\$Aa-NH2	1644,89	1144,98	1645,9	823,45	549,3
15	SP589	Ac-LTF\$8EYWAQL\$a-NH2	1573,85	1113,71	1574,86	787,93	525,62

En las secuencias mostradas anteriormente y en otras partes, se usan las siguientes abreviaturas: "Nle" representa norleucina, "Aib" representa ácido 2-aminoisobutírico, "Ac" representa acetilo, y "Pr" representa propionilo. Los aminoácidos representados como "\$" son aminoácidos de olefina alfa-Me S5-pentenil-alanina conectados por un reticulante totalmente de carbono que comprende un doble enlace. Los aminoácidos representados como "\$r5" son aminoácidos de olefina alfa-Me R5-pentenil-alanina conectados por un carbono que comprende un doble enlace. Los aminoácidos representados como "\$s8" son aminoácidos de olefina alfa-Me S8-octenil-alanina conectados por un reticulante totalmente de carbono que comprende un doble enlace. Los aminoácidos representados como "\$r8" son aminoácidos de olefina alfa-Me R8-octenil-alanina conectados por un reticulante totalmente de carbono que comprende un doble enlace. "Ahx" representa un enlazador de aminociclohexilo. Los reticulantes son reticulantes lineales totalmente de carbono que comprenden ocho u once átomos de carbono entre los carbonos alfa de cada aminoácido. Los aminoácidos representados como "\$/" son aminoácidos de olefina alfa-Me S5-pentenil-alanina que no están conectados por ningún reticulante. Los aminoácidos representados como "\$/r5" son aminoácidos de olefina alfa-Me R5-pentenil-alanina que no están conectados por ningún reticulante. Los aminoácidos representados como "\$/s8" son aminoácidos de olefina alfa-Me S8-octenil-alanina que no están conectados por ningún reticulante. Los aminoácidos representados como "\$/r8" son aminoácidos de olefina alfa-Me R8-octenil-alanina que no están conectados por ningún reticulante. Los aminoácidos representados como "Amw" son aminoácidos triptófano alfa-Me. Los aminoácidos representados como "Aml" son aminoácidos leucina alfa-Me. Los aminoácidos representados como "Amf" son aminoácidos alfa-Me fenilalanina. Los aminoácidos representados como "2ff" son aminoácidos 2-fluoro-fenilalanina. Los aminoácidos representados como "3ff" son aminoácidos 3-fluoro-fenilalanina. Los aminoácidos representados como "St" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de olefina de pentenil-alanina, cada una de las cuales está reticulada con otro aminoácido como se indica. Los aminoácidos representados como "St/" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de olefina de pentenil-alanina que no están reticuladas. Los aminoácidos representados como "%St" son aminoácidos que comprenden dos cadenas laterales de olefina de pentenil-alanina, cada una de las cuales está reticulada con otro aminoácido como se indica mediante reticulaciones de hidrocarbonadas completamente saturadas. Los aminoácidos representados como "Ba" son beta-alanina. El carácter en minúscula "e" o "z" dentro de la designación de un aminoácido reticulado (por ejemplo, "\$er8" o "\$zr8") representa la configuración del doble enlace (E o Z, respectivamente). En otros contextos, letras minúsculas como "a" o "f" representan D aminoácidos (por ejemplo, D-alanina, o D-fenilalanina, respectivamente). Los aminoácidos designados como "NmW" representan N-metilriptófano. Los aminoácidos designados como "NmY" representan N-metiltirosina. Los aminoácidos designados como "NmA" representan N-metilalanina. "Kbio" representa un grupo biotina unido al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina. Los aminoácidos designados como "Sar" representan sarcosina. Los aminoácidos designados como "Cha" representan ciclohexilalanina. Los aminoácidos designados como "Cpg" representan ciclopentilglicina. Los aminoácidos designados como "Chg" representan ciclohexil glicina. Los aminoácidos designados como "Cba" representan ciclobutil alanina. Los aminoácidos designados como "F4I" representan 4-yodo fenilalanina. "7L" representa leucina isotópica N15. Los aminoácidos designados como "F3Cl" representan 3-cloro fenilalanina. Los aminoácidos designados como "F4cooh" representan 4-carboxifenilalanina. Los aminoácidos designados como "F34F2" representan 3,4-difluorofenilalanina. Los aminoácidos designados como "6clW" representan 6-cloro triptófano. Los aminoácidos designados como "\$rda6" representan alfa-Me R6-hexinil-alanina alquinil aminoácidos, reticulados mediante un enlace dialquino a un segundo alquinil aminoácido. Los aminoácidos designados como "\$da5" representan alfa-Me S5-pentenil-alanina alquinil aminoácidos, en donde el alquino forma la mitad de un enlace dialquino con un segundo alquinil aminoácido. Los aminoácidos designados como "\$ra9" representan alfa-Me R9-noninil-alanina alquinil aminoácidos, reticulados mediante una reacción de metátesis de alquino con un segundo alquinil aminoácido. Los aminoácidos designados como "\$a6" representan alfa-Me S6-hexinil-alanina alquinil aminoácidos, reticulados mediante una reacción de metátesis de alquino con un segundo alquinil aminoácido. La designación "iso1" o "iso2" indica que el macrociclo peptidomimético es un isómero único.

Los aminoácidos designados como "Cit" representan citrulina. Los aminoácidos designados como "Cou4", "Cou6", "Cou7" y "Cou8", respectivamente, representan las siguientes estructuras:

5



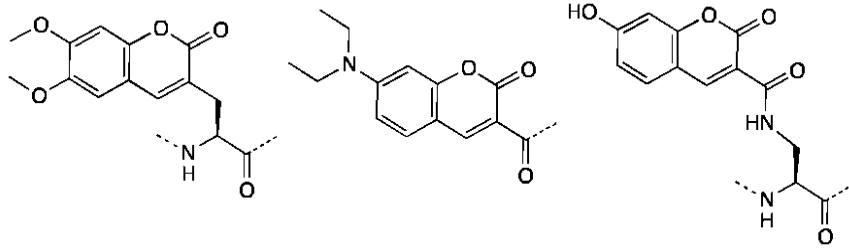
Cou

Cou2

Cou3

10

15



Cou4

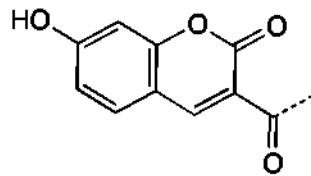
Cou6

Cou7

20

25

30



Cou8

35

40

45

En algunos casos, se obtiene un macrociclo peptidomimético en más de un isómero, por ejemplo, debido a la configuración de un doble enlace dentro de la estructura del reticulante (*E* vs *Z*). Tales isómeros pueden separarse o no mediante métodos cromatográficos convencionales. En algunos casos, un isómero tiene propiedades biológicas mejoradas con respecto al otro isómero. En un caso, un isómero de olefina reticulante *E* de un macrociclo peptidomimético tiene mejor solubilidad, mejor afinidad por la diana, mejor eficacia in vivo o in vitro, mayor helicidad, o permeabilidad celular mejorada en relación con su contraparte *Z*. En otro caso, un isómero de olefina reticulante *Z* de un macrociclo peptidomimético tiene mejor solubilidad, mejor afinidad por la diana, mejor eficacia in vivo o in vitro, mayor helicidad, o permeabilidad celular mejorada en relación con su contraparte *E*.

La Tabla 1c muestra un macrociclo peptidomimético ilustrativo:

50

55

60

65

Tabla 1c

		Estructura	
5 10	SP154	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{87}H_{125}N_{17}O_{21}$ Masa Exacta: 1743,92 Peso Molecular: 1745,02</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 EYWAQCbaSe SAA -NH2</p>	
15 20	SP115	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{85}H_{125}N_{17}O_{19}$ Masa Exacta: 1687,93 Peso Molecular: 1689,00</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 AYWAQhL \$e SAA -NH2</p>	
25 30	SP114	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{85}H_{125}N_{17}O_{19}$ Masa Exacta: 1687,93 Peso Molecular: 1689,00</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Szr8 AYWAQhL \$z SAA -NH2</p>	
35 40	SP99	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{84}H_{122}ClN_{17}O_{19}$ Masa Exacta: 1707,88 Peso Molecular: 1709,42</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 AY6cWAQL \$e SAA -NH2</p>	
45 50	SP388	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{97}H_{138}N_{18}O_{19}$ Masa Exacta: 1785,02 Peso Molecular: 1786,16</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 AYAmwAQL \$e AA Nie A -NH2</p>	

60

65

(continuación)

		Estructura	
5	SP331		<p>Fórmula Química: C₉₅H₁₄₀N₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1929,04 Peso Molecular: 1930,25</p>
10		Ac-L T F Ser8 EYWAQL SeAAAAA a-NH2	
15	SP445		<p>Fórmula Química: C₉₅H₁₄₀N₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1931,06 Peso Molecular: 1932,26</p>
20		Ac-L T F %r8 EYWAQL %AAAAA s-NH2	
25	SP351		<p>Fórmula Química: C₉₈H₁₄₀N₂₀O₂₄ Masa Exacta: 1957,03 Peso Molecular: 1958,26</p>
30		Ac-L T F Ser8 EYWSQCba SeAAAAA a-NH2	
35	SP71		<p>Fórmula Química: C₉₀H₁₃₄N₁₈O Masa Exacta: 1771,01 Peso Molecular: 1772,14</p>
40		Ac-L T F Ser8 AYWAQL SeAA I a-NH2	
45	SP69		<p>Fórmula Química: C₉₀H₁₃₄N₁₈O Masa Exacta: 1771,01 Peso Molecular: 1772,14</p>
50		Ac-L T F Ser8 AYWAQL SeAA Nle A-NH2	
55	SP7		<p>Fórmula Química: C₉₀H₁₂₇N₁₇O₁₉ Masa Exacta: 1749,95 Peso Molecular: 1751,07</p>
60		Ac-L T F Sr8 AYWAQLSSA F-NH2	

(continuación)

		Estructura	
5 10	SP160	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{87}H_{125}F_2N_{17}O_{21}$ Masa Exacta: 1781,92 Peso Molecular: 1783,02</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F34F2 Ser8 E YWAQhL Se SAA -NH2</p>	
15 20	SP315	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{85}H_{138}N_{20}O_{21}$ Masa Exacta: 1871,03 Peso Molecular: 1872,21</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 AYWAQL Se AAAAA a -NH2</p>	
25 30	SP249	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{94}H_{136}N_{18}O_{22}$ Masa Exacta: 1869,01 Peso Molecular: 1870,19</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 EF4cooh WAQCba Se AA-I-a -NH2</p>	
35 40	SP437	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{86}H_{143}N_{21}O_{21}$ Masa Exacta: 1914,08 Peso Molecular: 1915,28</p> <p style="text-align: center;">Dmaac- L T F Ser8 AYWAQL Se AAAAA a -NH2</p>	
45 50	SP349	<p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{87}H_{140}N_{20}O_{24}$ Masa Exacta: 1969,03 Peso Molecular: 1970,27</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 EF4cooh WAQCba Se AAAAA a -NH2</p>	

60

65

(continuación)

		Estructura	
5 10	SP555	<p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 E Y6dW AQL Se A A A A A a -NH2</p> <p style="text-align: right;"> Fórmula Química: C₂₆H₁₃₉ClN₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1963,00 Peso Molecular: 1964,69 </p>	
15 20	SP557	<p style="text-align: center;">Ac-AAA L T F Ser8 E YWAQL Se A A A A A a -NH2</p> <p style="text-align: right;"> Fórmula Química: C₁₀₄H₁₅₀N₂₃O₂₆ Masa Exacta: 2142,15 Peso Molecular: 2143,48 </p>	
25 30	SP558	<p style="text-align: center;">Ac-L T F34F2 Ser8 E YWAQL Se A A A A A a -NH2</p> <p style="text-align: right;"> Fórmula Química: C₉₅H₁₃₅F₂N₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1965,02 Peso Molecular: 1966,23 </p>	
35 40	SP367	<p style="text-align: center;">5-FAM- Ba L T F Ser8 E YWAQCba Se SAA -NH2</p>	
45 50	SP562	<p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 E YWAQL Se AAib A A A a -NH2</p> <p style="text-align: right;"> Fórmula Química: C₉₃H₁₄₂N₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1943,06 Peso Molecular: 1944,27 </p>	
55 60	SP564	<p style="text-align: center;">Ac-L T F Ser8 E YWAQL Se A A A Aib A a -NH2</p> <p style="text-align: right;"> Fórmula Química: C₉₃H₁₄₂N₂₀O₂₃ Masa Exacta: 1943,06 Peso Molecular: 1944,27 </p>	

(continuación)

Estructura	
5 10	<p>SP566</p>
15 20 25	<p>SP567</p> <p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{96}H_{142}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1943,06 Peso Molecular: 1944,27</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F \$er8 EYWAQL \$e A A A A A Aib-NH2</p>
30 35	<p>SP572</p> <p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{95}H_{141}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1929,04 Peso Molecular: 1930,25</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F \$er8 EYWAQL \$e A A A A a a-NH2</p>
40 45	<p>SP573</p> <p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{95}H_{140}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1929,04 Peso Molecular: 1930,25</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F \$er8 EYWAQL \$e A A A A A A-NH2</p>
50 55	<p>SP578</p> <p style="text-align: right;">Fórmula Química: $C_{95}H_{140}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1929,04 Peso Molecular: 1930,25</p> <p style="text-align: center;">Ac-L T F \$er8 EYWAQL \$e A A A A A Sar-NH2</p>

60

65

(continuación)

Estructura	
5	<p>Fórmula Química: $C_{95}H_{134}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1922,99 Peso Molecular: 1924,20</p> <p>Ac-LTF\$rd a6EYWAQL\$da5AAAAAa-NH2</p>
10	
15	
20	<p>Fórmula Química: $C_{95}H_{134}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1922,99 Peso Molecular: 1924,20</p> <p>Ac-L T F \$rd a6 E YWAQL \$da5 AA AAA a -NH2</p>
25	
30	
35	<p>Fórmula Química: $C_{96}H_{136}N_{20}O_{23}$ Masa Exacta: 1937,01 Peso Molecular: 1938,23</p>

En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos excluyen los macrociclos peptidomiméticos que se muestran en la Tabla 2a:

Tabla 2a

Número	Secuencia
1	L\$5QETFSD\$8WKLLPEN
2	LSQ\$5TFSDLW\$8LLPEN
3	LSQE\$5FSDLWK\$8LPEN
4	LSQET\$5SDLWKL\$8PEN
5	LSQETF\$5DLWKLL\$8EN
6	LXQETF\$5LWKLLP\$8N
7	LSQETFSD\$5WKLLPE\$8
8	LSQQT\$5DLWKLL\$8EN
9	LSQETF\$5DLWKLL\$8QN
10	LSQQT\$5DLWKLL\$8QN
11	LSQETF\$5NLWKLL\$8QN
12	LSQQT\$5NLWKLL\$8QN
13	LSQQT\$5NLWRL\$8QN
14	QSQQT\$5NLWKLL\$8QN
15	QSQQT\$5NLWRL\$8QN
16	QSQQT\$5NLWRL\$8QN
17	L\$8QETFSD\$WKLLPEN
18	LSQ\$8TFSDLW\$LLPEN
19	LSQE\$8FSDLWK\$LPEN
20	LSQET\$8SDLWKL\$PEN
21	LSQETF\$8DLWKLL\$EN
22	LXQETF\$8LWKLLP\$N

Número	Secuencia
23	LSQETFSDr8WKLLPE\$
24	LSQQTFr8DLWKLL\$EN
25	LSQETFr8DLWKLL\$QN
26	LSQQTFr8DLWKLL\$QN
27	LSQETFr8NLWKLL\$QN
28	LSQQTFr8NLWKLL\$QN
29	LSQQTFr8NLWRLL\$QN
30	QSQQTFr8NLWKLL\$QN
31	QSQQTFr8NLWRLL\$QN
32	QSQQTAr8NLWRLL\$QN
33	QSQQTFr8NLWRKK\$QN
34	QQTFr8DLWRLL\$EN
35	QQTFr8DLWRLL\$
36	LSQQTFDLW\$LL
37	QQTFDLW\$LL
38	QQTAr8DLWRLL\$EN
39	QSQQTFr5NLWRLLs8QN (olefina dihidroxilada)
40	QSQQTAr5NLWRLLs8QN (olefina dihidroxilada)
41	QSQQTFr8DLWRLL\$QN
42	QTFr8NLWRLL\$
43	QSQQTFNLW\$LLPQN
44	QS\$QTFNLWRLLPQN
45	\$TF\$DLWKLL
46	ETF\$DLW\$LL
47	QTF\$NLW\$LL
48	\$SQE\$F\$NLWKLL

En la Tabla 2a, X representa S o cualquier aminoácido. Los péptidos mostrados pueden comprender un grupo protector N-terminal tal como acetilo o un enlazador adicional tal como beta-alanina entre el grupo protector y el comienzo de la secuencia peptídica.

En algunos casos, los macrociclos peptidomiméticos no comprenden una estructura de macrociclo peptidomimético como se muestra en la Tabla 2a.

En otros casos, los macrociclos peptidomiméticos excluyen los macrociclos peptidomiméticos que se muestran en la Tabla 2b:

Tabla 2b

Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
1	Ac-LSQETFr8DLWKLL\$EN-NH2	2068,13	1035,07	1035,36
2	Ac-LSQETFr8NLWKLL\$QN-NH2	2066,16	1034,08	1034,31
3	Ac-LSQQTFr8NLWRLL\$QN-NH2	2093,18	1047,59	1047,73
4	Ac-QSQQTFr8NLWKLL\$QN-NH2	2080,15	1041,08	1041,31
5	Ac-QSQQTFr8NLWRLL\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,32
6	Ac-QSQQTAr8NLWRLL\$QN-NH2	2032,12	1017,06	1017,24
7	Ac-QAibQQTFr8NLWRLL\$QN-NH2	2106,17	1054,09	1054,34
8	Ac-QSQQTF\$NLWRLLPQN-NH2	2000,02	1001,01	1001,26
9	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLL\$/QN-NH2	2136,18	1069,09	1069,37
10	Ac-QSQAibTF\$/r8NLWRLL\$/QN-NH2	2065,15	1033,58	1033,71
11	Ac-QSQQTFr8NLWRLL\$AN-NH2	2051,13	1026,57	1026,70
12	Ac-ASQQTFr8NLWRLL\$QN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
13	Ac-QSQQTFr8ALWRLL\$QN-NH2	2065,15	1033,58	1033,41
14	Ac-QSQETFr8NLWRLL\$QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
15	Ac-RSQQTFr8NLWRLL\$QN-NH2	2136,20	1069,10	1069,17
16	Ac-RSQQTFr8NLWRLL\$EN-NH2	2137,18	1069,59	1069,75
17	Ac-LSQETFSDLWKLLPEN-NH2	1959,99	981,00	981,24
18	Ac-QSQQTF\$NLWRLLPQN-NH2	2008,09	1005,05	1004,97
19	Ac-QSQQ\$F\$NLWRLLPQN-NH2	2036,06	1019,03	1018,86
20	Ac-QSQQT\$NL\$RLLPQN-NH2	1917,04	959,52	959,32

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	21	Ac-QSQQTF\$NLW\$LLPQN-NH2	2007,06	1004,53	1004,97
	22	Ac-RTQATF\$r8NQWAibANie\$TNAibTR-NH2	2310,26	1156,13	1156,52
	23	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLl\$RN-NH2	2136,20	1069,10	1068,94
	24	Ac-QSQRTF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2136,20	1069,10	1068,94
10	25	Ac-QSQQTF\$r8NNieWRLl\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,44
	26	Ac-QSQQTF\$r8NLWRNleL\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,84
	27	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLNle\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,12
	28	Ac-QSQQTY\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2124,15	1063,08	1062,92
	29	Ac-RAibQQTF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2134,22	1068,11	1068,65
15	30	Ac-MPRFMDYWEGLN-NH2	1598,70	800,35	800,45
	31	Ac-RSQQRF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2191,25	1096,63	1096,83
	32	Ac-QSQQRF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2163,21	1082,61	1082,87
	33	Ac-RAibQQRF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2189,27	1095,64	1096,37
20	34	Ac-RSQQRF\$r8NFWRLl\$QN-NH2	2225,23	1113,62	1114,37
	35	Ac-RSQQRF\$r8NYWRLl\$QN-NH2	2241,23	1121,62	1122,37
	36	Ac-RSQQTF\$r8NLWQLl\$QN-NH2	2108,15	1055,08	1055,29
	37	Ac-QSQQTF\$r8NLWQAmil\$QN-NH2	2094,13	1048,07	1048,32
	38	Ac-QSQQTF\$r8NAmiWRLl\$QN-NH2	2122,17	1062,09	1062,35
25	39	Ac-NiePRF\$r8DYWEGL\$QN-NH2	1869,98	935,99	936,20
	40	Ac-NiePRF\$r8NYWRLl\$QN-NH2	1952,12	977,06	977,35
	41	Ac-RF\$r8NLWRLl\$Q-NH2	1577,96	789,98	790,18
	42	Ac-QSQQTF\$r8N2ffWRLl\$QN-NH2	2160,13	1081,07	1081,40
	43	Ac-QSQQTF\$r8N3ffWRLl\$QN-NH2	2160,13	1081,07	1081,34
30	44	Ac-QSQQTF#r8NLWRLl#QN-NH2	2080,12	1041,06	1041,34
	45	Ac-RSQQTA\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2060,16	1031,08	1031,38
	46	Ac-QSQQTF%r8NLWRLl%QN-NH2	2110,17	1056,09	1056,55
	47	HepQSQ\$TFSNLWRLlPQN-NH2	2051,10	1026,55	1026,82
	48	HepQSQ\$TF\$r8NLWRLl\$QN-NH2	2159,23	1080,62	1080,89
35	49	Ac-QSQQTF\$r8NL6clWRLl\$QN-NH2	2142,11	1072,06	1072,35
	50	Ac-QSQQTF\$r8NLMe6clwRLL\$QN-NH2	2156,13	1079,07	1079,27
	51	Ac-LTFEHYWAQLTS-NH2	1535,74	768,87	768,91
	52	Ac-LTF\$HYW\$QLTS-NH2	1585,83	793,92	794,17
40	53	Ac-LTFE\$YWA\$LTS-NH2	1520,79	761,40	761,67
	54	Ac-LTF\$zr8HYWAQL\$zS-NH2	1597,87	799,94	800,06
	55	Ac-LTF\$r8HYWRQL\$S-NH2	1682,93	842,47	842,72
	56	Ac-QS\$QTFStNLWRLl\$s8QN-NH2	2145,21	1073,61	1073,90
	57	Ac-QSQQTASNLWRLlPQN-NH2	1923,99	963,00	963,26
45	58	Ac-QSQQTA\$/r8NLWRLl\$/QN-NH2	2060,15	1031,08	1031,24
	59	Ac-ASQQTF\$/r8NLWRLl\$/QN-NH2	2079,16	1040,58	1040,89
	60	Ac-\$SQQ\$F\$NLWRLlAibQN-NH2	2009,09	1005,55	1005,86
	61	Ac-QS\$QTF\$NLWRLlAibQN-NH2	2023,10	1012,55	1012,79
	62	Ac-QSQQ\$F\$SN\$WRLlAibQN-NH2	2024,06	1013,03	1013,31
50	63	Ac-QSQQTF\$NLW\$LLAibQN-NH2	1995,06	998,53	998,87
	64	Ac-QSQQTF\$S\$WRLlAibQN-NH2	2011,06	1006,53	1006,83
	65	Ac-QSQQTF\$NLW\$LLA\$N-NH2	1940,02	971,01	971,29
	66	Ac-\$/SQQ\$/F\$NLWRLlAibQN-NH2	2037,12	1019,56	1019,78
	67	Ac-QS\$/QTF\$/NLWRLlAibQN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
55	68	Ac-QSQQ\$/F\$SN\$/WRLlAibQN-NH2	2052,09	1027,05	1027,36
	69	Ac-QSQQTF\$/NLW\$/LLAibQN-NH2	2023,09	1012,55	1013,82
	70	Ac-QSQ\$TFS\$/WRLlAibQN-NH2	1996,09	999,05	999,39
	71	Ac-QSQ\$/TF\$/LWRLlAibQN-NH2	2024,12	1013,06	1013,37
	72	Ac-QS\$/QTFSt/NLWRLl\$/s8QN-NH2	2201,27	1101,64	1102,00
60	73	Ac-\$r8SQQTF\$S\$WRLlAibQN-NH2	2038,14	1020,07	1020,23
	74	Ac-QSQ\$r8TFSNLW\$LLAibQN-NH2	1996,08	999,04	999,32
	75	Ac-QSQQTF\$S\$r8LWRLlAibQN-NH2	2024,12	1013,06	1013,37
	76	Ac-QS\$r5QTFStNLW\$LLAibQN-NH2	2032,12	1017,06	1017,39
	77	Ac-\$/r8SQQTF\$S\$/WRLlAibQN-NH2	2066,17	1034,09	1034,80
65	78	Ac-QSQ\$/r8TFSNLW\$/LLAibQN-NH2	2024,11	1013,06	1014,34

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	79	Ac-QSQQTFSS/r8LWRLLA\$/N-NH2	2052,15	1027,08	1027,16
	80	Ac-QS\$/r5QTFSt//NLW\$/LLAibQN-NH2	2088,18	1045,09	1047,10
	81	Ac-QSQQTFSNLWRLLAibQN-NH2	1988,02	995,01	995,31
	82	Hep/QSQ\$/TF\$/r8NLWRLA\$/QN-NH2	2215,29	1108,65	1108,93
10	83	Ac-ASQQTF\$r8NLRWLL\$/QN-NH2	2051,13	1026,57	1026,90
	84	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLA\$/Q-NH2	2022,14	1012,07	1012,66
	85	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLA\$/Q-NH2	1994,11	998,06	998,42
	86	Ac-AAARAA\$r8AAARAA\$AA-NH2	1515,90	758,95	759,21
	87	AC-LTFEHYWAQLTSA-NH2	1606,78	804,39	804,59
15	88	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$SA-NH2	1668,90	835,45	835,67
	89	AC-ASQQTFSNLWRLLPQN-NH2	1943,00	972,50	973,27
	90	Ac-QS\$QTFStNLW\$r5LLAibQN-NH2	2032,12	1017,06	1017,30
	91	Ac-QSQQTFAibNLWRLAibQN-NH2	1986,04	994,02	994,19
	92	Ac-QSQQTFNleNLWRLNleQN-NH2	2042,11	1022,06	1022,23
20	93	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLAibQN-NH2	2082,14	1042,07	1042,23
	94	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLNleQN-NH2	2110,17	1056,09	1056,29
	95	Ac-QSQQTFAibNLWRLA\$/QN-NH2	2040,09	1021,05	1021,25
	96	Ac-QSQQTFNleNLWRLA\$/QN-NH2	2068,12	1035,06	1035,31
	97	Ac-QSQQTF\$r8NL6clWRNleL%QN-NH2	2144,13	1073,07	1073,32
25	98	Ac-QSQQTF\$r8NLMe6clWRLA%QN-NH2	2158,15	1080,08	1080,31
	101	Ac-FNle\$YWE\$-NH2	1160,63	-	1161,70
	102	Ac-F\$r8AYWELL\$A-NH2	1344,75	-	1345,90
	103	Ac-F\$r8AYWQLL\$A-NH2	1343,76	-	1344,83
30	104	Ac-NlePRF\$r8NYWELL\$/QN-NH2	1925,06	963,53	963,69
	105	Ac-NlePRF\$r8DYWRLA\$/QN-NH2	1953,10	977,55	977,68
	106	Ac-NlePRF\$r8NYWRLA\$/Q-NH2	1838,07	920,04	920,18
	107	Ac-NlePRF\$r8NYWRLA\$/-NH2	1710,01	856,01	856,13
	108	Ac-QSQQTF\$r8DLWRLA\$/QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,64
35	109	Ac-QSQQTF\$r8NLWRLA\$/SEN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
	110	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLA\$/QD-NH2	2109,14	1055,57	1055,64
	111	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRLA\$/S-NH2	1953,08	977,54	977,60
	112	Ac-ESQQTF\$/r8NLWRLA\$/QN-NH2	2109,14	1055,57	1055,70
	113	Ac-LTF\$r8NLWRNleL\$/Q-NH2	1635,99	819,00	819,10
40	114	Ac-LRF\$r8NLWRNleL\$/Q-NH2	1691,04	846,52	846,68
	115	Ac-QSQQTF\$/r8NWWRNleL\$/QN-NH2	2181,15	1091,58	1091,64
	116	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRNleL\$/Q-NH2	1994,11	998,06	998,07
	117	Ac-QTF\$/r8NLWRNleL\$/QN-NH2	1765,00	883,50	883,59
	118	Ac-NlePRF\$r8NWWRLA\$/QN-NH2	1975,13	988,57	988,75
45	119	Ac-NlePRF\$r8NWWRLA\$/A-NH2	1804,07	903,04	903,08
	120	Ac-TSFAEYWNLLNH2	1467,70	734,85	734,90
	121	Ac-QTF\$/r8HWWSQL\$S-N H2	1651,85	826,93	827,12
	122	Ac-FM\$YWE\$-NH2	1178,58	-	1179,64
50	123	AC-QTFEHWWSQLLS-NH2	1601,76	801,88	801,94
	124	Ac-QsQQTF\$/r8NLAmwRLNle\$/QN-NH2	2122,17	1062,09	1062,24
	125	Ac-FMAibY6clWEAc3cl-NH2	1130,47	-	1131,53
	126	Ac-FNle\$Y6clWE\$-NH2	1194,59	-	1195,64
	127	Ac-F\$zr8AY6clWEAc3cl\$z-NH2	1277,63	639,82	1278,71
55	128	Ac-F\$r8AY6clWEAc3cl\$A-NH2	1348,66	-	1350,72
	129	Ac-NlePRF\$r8NY6clWRLA\$/QN-NH2	1986,08	994,04	994,64
	130	Ac-AF\$r8AAWALA\$/A-NH2	1223,71	-	1224,71
	131	Ac-TF\$r8AAWRLA\$/Q-NH2	1395,80	698,90	399,04
	132	Pr-TF\$r8AAWRLA\$/Q-NH2	1409,82	705,91	706,04
60	133	Ac-QSQQTF\$/r8NLWRNleL%QN-NH2	2110,17	1056,09	1056,22
	134	Ac-LTF\$/r8HYWAQL%SA-NH2	1670,92	836,46	836,58
	135	Ac-NlePRF\$/r8NYWRLA%QN-NH2	1954,13	978,07	978,19
	136	Ac-NlePRF\$/r8NY6clWRLA%QN-NH2	1988,09	995,05	995,68
	137	Ac-LTF\$/r8HY6clWAQL%S-NH2	1633,84	817,92	817,93
65	138	Ac-QS%QTF%StNLWRLA%\$s8QN-NH2	2149,24	1075,62	1075,65

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	139	Ac-LTF\$r8HY6clWRQL%S-NH2	1718,91	860,46	860,54
	140	Ac-QSQQTF\$r8NL6clWRLL%QN-NH2	2144,13	1073,07	1073,64
	141	Ac-%r8SQQTFs%LWRLLaibQN-NH2	2040,15	1021,08	1021,13
	142	Ac-LTF\$r8HYWAQL%S-NH2	1599,88	800,94	801,09
10	143	Ac-TSF\$r8QYWNL%P-NH2	1602,88	802,44	802,58
	147	Ac-LTFEHWYWAQLTS-NH2	1535,74	768,87	769,5
	152	Ac-F\$r8AY6clWEAc3cl\$e-NH2	1277,63	639,82	1278,71
	153	Ac-AF\$r8AAWALAS-NH2	1277,63	639,82	1277,84
	154	Ac-TF\$r8AAWRLASQ-NH2	1395,80	698,90	699,04
15	155	Pr-TF\$r8AAWRLASQ-NH2	1409,82	705,91	706,04
	156	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$eS-NH2	1597,87	799,94	800,44
	159	Ac-CCPGCCBaQSQQTF\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2745,30	1373,65	1372,99
	160	Ac-CCPGCCBaQSQQTAS\$r8NLWRLL\$QN-NH2	2669,27	1335,64	1336,09
	161	Ac-CCPGCCBaNiePRF\$r8NYWRLL\$QN-NH2	2589,26	1295,63	1296,2
20	162	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$/S-NH2	1625,90	813,95	814,18
	163	Ac-F\$r8HY6clWRAc3cl%-NH2	1372,72	687,36	687,59
	164	Ac-QTF\$r8HWWSQL%S-NH2	1653,87	827,94	827,94
	165	Ac-LTAS\$r8HYWRQLS-NH2	1606,90	804,45	804,66
25	166	Ac-Q\$r8QQTFsNLWRLLaibQN-NH2	2080,12	1041,06	1041,61
	167	Ac-QSQQ\$r8FNSNLWRLLaibQN-NH2	2066,11	1034,06	1034,58
	168	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$A-NH2	1314,70	658,35	1315,88
	169	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$S-NH2	1330,70	666,35	1331,87
	170	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$Q-NH2	1371,72	686,86	1372,72
30	171	Ac-F\$r8AYWEAibL\$S-NH2	1332,71	667,36	1334,83
	172	Ac-F\$r8AYWEAL\$S-NH2	1318,70	660,35	1319,73
	173	Ac-F\$r8AYWEQL\$S-NH2	1375,72	688,86	1377,53
	174	Ac-F\$r8HYWEQL\$S-NH2	1441,74	721,87	1443,48
	175	Ac-F\$r8HYWAQL\$S-NH2	1383,73	692,87	1385,38
35	176	Ac-F\$r8HYWAAC3cl\$S-NH2	1338,71	670,36	1340,82
	177	Ac-F\$r8HYWRAc3cl\$S-NH2	1423,78	712,89	713,04
	178	Ac-F\$r8AYWEAc3cl#A-NH2	1300,69	651,35	1302,78
	179	Ac-NiePTF\$r8NYWRLL%QN-NH2	1899,08	950,54	950,56
	180	Ac-TF\$r8AAWRAL\$Q-NH2	1395,80	698,90	699,13
40	181	Ac-TSF\$r8HYWAQL%S-NH2	1573,83	787,92	787,98
	184	Ac-F\$r8AY6clWEAc3cl%A-NH2	1350,68	676,34	676,91
	185	Ac-LTF\$r8HYWAQI\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
	186	Ac-LTF\$r8HYWAQNie\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
	187	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$A-NH2	1581,87	791,94	792,45
45	188	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$Abu-NH2	1595,89	798,95	799,03
	189	Ac-LTF\$r8HYWAAbuQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807,47
	190	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$eS-NH2	1531,84	766,92	766,96
	191	Ac-LAF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1567,86	784,93	785,49
50	192	Ac-LAF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1501,83	751,92	752,01
	193	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$eA-NH2	1515,85	758,93	758,97
	194	Ac-LAF\$r8AYWAQL\$A-NH2	1485,84	743,92	744,05
	195	Ac-LTF\$r8NLWANieL\$Q-NH2	1550,92	776,46	776,61
	196	Ac-LTF\$r8NLWANieL\$A-NH2	1493,90	747,95	1495,6
55	197	Ac-LTF\$r8ALWANieL\$Q-NH2	1507,92	754,96	755
	198	Ac-LAF\$r8NLWANieL\$Q-NH2	1520,91	761,46	761,96
	199	Ac-LAF\$r8ALWANieL\$A-NH2	1420,89	711,45	1421,74
	200	Ac-A\$r8AYWEAc3cl\$A-NH2	1238,67	620,34	1239,65
	201	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$AA-NH2	1385,74	693,87	1386,64
60	202	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$Abu-NH2	1328,72	665,36	1330,17
	203	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$Nie-NH2	1356,75	679,38	1358,22
	204	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$S8A-NH2	1314,70	658,35	1315,51
	205	Ac-F\$AYWEAc3cl\$r8A-NH2	1314,70	658,35	1315,66
	206	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$A-NH2	1314,70	658,35	1316,18
65	207	Ac-F\$r8AYWEAc3cl\$eA-NH2	1314,70	658,35	1315,66

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	208	Ac-F\$8AYWEAmIL\$A-NH2	1358,76	680,38	1360,21
	209	Ac-F\$8AYWENleL\$A-NH2	1344,75	673,38	1345,71
	210	Ac-F\$8AYWQAc3cL\$A-NH2	1313,72	657,86	1314,7
	211	Ac-F\$8AYWAAc3cL\$A-NH2	1256,70	629,35	1257,56
10	212	Ac-F\$8AYWAbuAc3cL\$A-NH2	1270,71	636,36	1272,14
	213	Ac-F\$8AYWNleAc3cL\$A-NH2	1298,74	650,37	1299,67
	214	Ac-F\$8AbuYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	1329,65
	215	Ac-F\$8NleYWEAc3cL\$A-NH2	1356,75	679,38	1358,66
	216	5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH2	1922,82	962,41	962,87
15	217	5-FAM-BaLTF%r8HYWAQL%S-NH2	1986,96	994,48	994,97
	218	Ac-LTF\$8HYWAQhL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
	219	Ac-LTF\$8HYWAQTle\$S-NH2	1597,87	799,94	799,97
	220	Ac-LTF\$8HYWAQAdm\$S-NH2	1675,91	838,96	839,09
	221	Ac-LTF\$8HYWAQhCha\$S-NH2	1651,91	826,96	826,98
20	222	Ac-LTF\$8HYWAQCha\$S-NH2	1637,90	819,95	820,02
	223	Ac-LTF\$8HYWA6cQL\$S-NH2	1651,91	826,96	826,98
	224	Ac-LTF\$8HYWA5cQL\$S-NH2	1637,90	819,95	820,02
	225	Ac-LThF\$8HYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
25	226	Ac-LTgl\$8HYWAQL\$S-NH2	1625,90	813,95	812,99
	227	Ac-LTF\$8HYWAQChg\$S-NH2	1623,88	812,94	812,99
	228	Ac-LTF\$8HYWAQF\$S-NH2	1631,85	816,93	816,99
	229	Ac-LTF\$8HYWAQlgl\$S-NH2	1659,88	830,94	829,94
	230	Ac-LTF\$8HYWAQCba\$S-NH2	1609,87	805,94	805,96
30	231	Ac-LTF\$8HYWAQCpg\$S-NH2	1609,87	805,94	805,96
	232	Ac-LTF\$8HhYWAQL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
	233	Ac-F\$8AYWEAc3chL\$A-NH2	1328,72	665,36	665,43
	234	Ac-F\$8AYWEAc3cTle\$A-NH2	1314,70	658,35	1315,62
	235	Ac-F\$8AYWEAc3cAdm\$A-NH2	1392,75	697,38	697,47
35	236	Ac-F\$8AYWEAc3chCha\$A-NH2	1368,75	685,38	685,34
	237	Ac-F\$8AYWEAc3cCha\$A-NH2	1354,73	678,37	678,38
	238	Ac-F\$8AYWEAc6cL\$A-NH2	1356,75	679,38	679,42
	239	Ac-F\$8AYWEAc5cL\$A-NH2	1342,73	672,37	672,46
	240	Ac-hF\$8AYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	665,43
40	241	Ac-lgl\$8AYWEAc3cL\$A-NH2	1342,73	672,37	671,5
	243	Ac-F\$8AYWEAc3cF\$A-NH2	1348,69	675,35	675,35
	244	Ac-F\$8AYWEAc3cgl\$A-NH2	1376,72	689,36	688,37
	245	Ac-F\$8AYWEAc3cCba\$A-NH2	1326,70	664,35	664,47
	246	Ac-F\$8AYWEAc3cCpg\$A-NH2	1326,70	664,35	664,39
45	247	Ac-F\$8AhYWEAc3cL\$A-NH2	1328,72	665,36	665,43
	248	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$Q-NH2	1371,72	686,86	1372,87
	249	Ac-F\$8AYWEAibL\$A-NH2	1316,72	659,36	1318,18
	250	Ac-F\$8AYWEAL\$A-NH2	1302,70	652,35	1303,75
50	251	Ac-LAF\$8AYWAAL\$A-NH2	1428,82	715,41	715,49
	252	Ac-LTF\$8HYWAAc3cL\$S-NH2	1552,84	777,42	777,5
	253	Ac-NleTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1597,87	799,94	800,04
	254	Ac-VTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1583,85	792,93	793,04
	255	Ac-FTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1631,85	816,93	817,02
55	256	Ac-WTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1670,86	836,43	836,85
	257	Ac-RTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1640,88	821,44	821,9
	258	Ac-KTF\$8HYWAQL\$S-NH2	1612,88	807,44	807,91
	259	Ac-LNleF\$8HYWAQL\$S-NH2	1609,90	805,95	806,43
	260	Ac-LVF\$8HYWAQL\$S-NH2	1595,89	798,95	798,93
60	261	Ac-LFF\$8HYWAQL\$S-NH2	1643,89	822,95	823,38
	262	Ac-LWF\$8HYWAQL\$S-NH2	1682,90	842,45	842,55
	263	Ac-LRF\$8HYWAQL\$S-NH2	1652,92	827,46	827,52
	264	Ac-LKF\$8HYWAQL\$S-NH2	1624,91	813,46	813,51
	265	Ac-LTF\$8NleYWAQL\$S-NH2	1573,89	787,95	788,05
65	266	Ac-LTF\$8VYWAQL\$S-NH2	1559,88	780,94	780,98

ES 2 817 877 T3

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	267	Ac-LTF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1607,88	804,94	805,32
	268	Ac-LTF\$r8WYWAQL\$\$-NH2	1646,89	824,45	824,86
	269	Ac-LTF\$r8RYWAQL\$\$-NH2	1616,91	809,46	809,51
	270	Ac-LTF\$r8KYWAQL\$\$-NH2	1588,90	795,45	795,48
10	271	Ac-LTF\$r8HNleWAQL\$\$-NH2	1547,89	774,95	774,98
	272	Ac-LTF\$r8HVWAQL\$\$-NH2	1533,87	767,94	767,95
	273	Ac-LTF\$r8HFWAQL\$\$-NH2	1581,87	791,94	792,3
	274	Ac-LTF\$r8HWWAQL\$\$-NH2	1620,88	811,44	811,54
	275	Ac-LTF\$r8HRWAQL\$\$-NH2	1590,90	796,45	796,52
15	276	Ac-LTF\$r8HKWAQL\$\$-NH2	1562,90	782,45	782,53
	277	Ac-LTF\$r8HYWNleQL\$\$-NH2	1639,91	820,96	820,98
	278	Ac-LTF\$r8HYVWQL\$\$-NH2	1625,90	813,95	814,03
	279	Ac-LTF\$r8HYWFQL\$\$-NH2	1673,90	837,95	838,03
	280	Ac-LTF\$r8HYVWQL\$\$-NH2	1712,91	857,46	857,5
20	281	Ac-LTF\$r8HYWKQL\$\$-NH2	1654,92	828,46	828,49
	282	Ac-LTF\$r8HYWANleL\$\$-NH2	1582,89	792,45	792,52
	283	Ac-LTF\$r8HYWAVL\$\$-NH2	1568,88	785,44	785,49
	284	Ac-LTF\$r8HYWAVL\$\$-NH2	1616,88	809,44	809,47
	285	Ac-LTF\$r8HYWAWL\$\$-NH2	1655,89	828,95	829
25	286	Ac-LTF\$r8HYWARL\$\$-NH2	1625,91	813,96	813,98
	287	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$Nle-NH2	1623,92	812,96	813,39
	288	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$V-NH2	1609,90	805,95	805,99
	289	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$F-NH2	1657,90	829,95	830,26
30	290	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$W-NH2	1696,91	849,46	849,5
	291	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$R-NH2	1666,94	834,47	834,56
	292	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$K-NH2	1638,93	820,47	820,49
	293	Ac-Q\$r8QQTF\$SN\$WRLLAibQN-NH2	2080,12	1041,06	1041,54
	294	Ac-QSQQ\$r8F\$SNLWR\$LAibQN-NH2	2066,11	1034,06	1034,58
35	295	Ac-LT2Pal\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1598,86	800,43	800,49
	296	Ac-LT3Pal\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1598,86	800,43	800,49
	297	Ac-LT4Pal\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1598,86	800,43	800,49
	298	Ac-LTF2CF3\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1665,85	833,93	834,01
	299	Ac-LTF2CN\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1622,86	812,43	812,47
40	300	Ac-LTF2Me\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1611,88	806,94	807
	301	Ac-LTF3CI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1631,83	816,92	816,99
	302	Ac-LTF4CF3\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1665,85	833,93	833,94
	303	Ac-LTF4tBu\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1653,93	827,97	828,02
	304	Ac-LTF5F\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1687,82	844,91	844,96
45	305	Ac-LTF\$r8HY3BthAAQL\$\$-NH2	1614,83	808,42	808,48
	306	Ac-LTF2Br\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1675,78	838,89	838,97
	307	Ac-LTF4Br\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1675,78	838,89	839,86
	308	Ac-LTF2CI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1631,83	816,92	816,99
50	309	Ac-LTF4CI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1631,83	816,92	817,36
	310	Ac-LTF3CN\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1622,86	812,43	812,47
	311	Ac-LTF4CN\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1622,86	812,43	812,47
	312	Ac-LTF34CI2\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1665,79	833,90	833,94
	313	Ac-LTF34F2\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1633,85	817,93	817,95
55	314	Ac-LTF35F2\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1633,85	817,93	817,95
	315	Ac-LTDip\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1673,90	837,95	838,01
	316	Ac-LTF2F\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1615,86	808,93	809
	317	Ac-LTF3F\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1615,86	808,93	809
	318	Ac-LTF4F\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1615,86	808,93	809
60	319	Ac-LTF4I\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1723,76	862,88	862,94
	320	Ac-LTF3Me\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1611,88	806,94	807,07
	321	Ac-LTF4Me\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1611,88	806,94	807
	322	Ac-LT1NaI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1647,88	824,94	824,98
	323	Ac-LT2NaI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1647,88	824,94	825,06
65	324	Ac-LTF3CF3\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1665,85	833,93	834,01

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	325	Ac-LTF4N02\$8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,46
	326	Ac-LTF3NO2\$8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,46
	327	Ac-LTF\$82ThiYWAQL\$S-NH2	1613,83	807,92	807,96
	328	Ac-LTF\$8HBipWAQL\$S-NH2	1657,90	829,95	830,01
10	329	Ac-LTF\$8HF4tBuWAQL\$S-NH2	1637,93	819,97	820,02
	330	Ac-LTF\$8HF4CF3WAQL\$S-NH2	1649,86	825,93	826,02
	331	Ac-LTF\$8HF4CIWAQL\$S-NH2	1615,83	808,92	809,37
	332	Ac-LTF\$8HF4MeWAQL\$S-NH2	1595,89	798,95	799,01
	333	Ac-LTF\$8HF4BrWAQL\$S-NH2	1659,78	830,89	830,98
15	334	Ac-LTF\$8HF4CNWAQL\$S-NH2	1606,87	804,44	804,56
	a335	Ac-LTF\$8HF4NO2WAQL\$S-NH2	1626,86	814,43	814,55
	336	Ac-LTF\$8H1NaIWAQL\$S-NH2	1631,89	816,95	817,06
	337	Ac-LTF\$8H2NaIWAQL\$S-NH2	1631,89	816,95	816,99
	338	Ac-LTF\$8HWAQL\$S-NH2	1434,80	718,40	718,49
20	339	Ac-LTF\$8HY1NaIAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,52
	340	Ac-LTF\$8HY2NaIAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,52
	341	Ac-LTF\$8HYWAQNIe\$S-NH2	1597,87	799,94	800,07
	342	Ac-LTF\$8HYWAQNIe\$S-NH2	1597,87	799,94	800,44
25	343	Ac-LTF\$8HYWAQL\$eA-NH2	1581,87	791,94	791,98
	344	Ac-LTF\$8HYWAQL\$Abu-NH2	1595,89	798,95	799,03
	345	Ac-LTF\$8HYWAbuQL\$S-NH2	1611,88	806,94	804,47
	346	Ac-LAF\$8HYWAQL\$S-NH2	1567,86	784,93	785,49
	347	Ac-LTF\$8NLWANieL\$Q-NH2	1550,92	776,46	777,5
30	348	Ac-LTF\$8ALWANieL\$Q-NH2	1507,92	754,96	755,52
	349	Ac-LAF\$8NLWANieL\$Q-NH2	1520,91	761,46	762,48
	350	Ac-F\$8AYWAAL\$S-NH2	1256,70	629,35	1257,56
	351	Ac-LTF\$8AYWAAL\$S-NH2	1474,82	738,41	738,55
	352	Ac-LVF\$8AYWAQL\$S-NH2	1529,87	765,94	766
35	353	Ac-LTF\$8AYWAbuQL\$S-NH2	1545,86	773,93	773,92
	354	Ac-LTF\$8AYWNieQL\$S-NH2	1573,89	787,95	788,17
	355	Ac-LTF\$8AbuYWAQL\$S-NH2	1545,86	773,93	773,99
	356	Ac-LTF\$8AYWHQL\$S-NH2	1597,87	799,94	799,97
	357	Ac-LTF\$8AYWKQL\$S-NH2	1588,90	795,45	795,53
40	358	Ac-LTF\$8AYWOQL\$S-NH2	1574,89	788,45	788,5
	359	Ac-LTF\$8AYWRQL\$S-NH2	1616,91	809,46	809,51
	360	Ac-LTF\$8AYWSQL\$S-NH2	1547,84	774,92	774,96
	361	Ac-LTF\$8AYWRAL\$S-NH2	1559,89	780,95	780,95
	362	Ac-LTF\$8AYWRQL\$A-NH2	1600,91	801,46	801,52
45	363	Ac-LTF\$8AYWRAL\$A-NH2	1543,89	772,95	773,03
	364	Ac-LTF\$8HYWAQL\$8S-NH2	1597,87	799,94	799,97
	365	Ac-LTF\$8HYWAQL\$8S-NH2	1597,87	799,94	799,97
	366	Ac-LTF\$8HYWAAL\$S-NH2	1540,84	771,42	771,48
50	367	Ac-LTF\$8HYWAbuL\$S-NH2	1554,86	778,43	778,51
	368	Ac-LTF\$8HYWALL\$S-NH2	1582,89	792,45	792,49
	369	Ac-F\$8AYWHAL\$A-NH2	1310,72	656,36	656,4
	370	Ac-F\$8AYWAAL\$A-NH2	1244,70	623,35	1245,61
	371	Ac-F\$8AYWSAL\$A-NH2	1260,69	631,35	1261,6
55	372	Ac-F\$8AYWRAL\$A-NH2	1329,76	665,88	1330,72
	373	Ac-F\$8AYWKAL\$A-NH2	1301,75	651,88	1302,67
	374	Ac-F\$8AYWOAL\$A-NH2	1287,74	644,87	1289,13
	375	Ac-F\$8VYWEAc3cL\$A-NH2	1342,73	672,37	1343,67
	376	Ac-F\$8FYWEAc3cL\$A-NH2	1390,73	696,37	1392,14
60	377	Ac-F\$8WYWEAc3cL\$A-NH2	1429,74	715,87	1431,44
	378	Ac-F\$8RYWEAc3cL\$A-NH2	1399,77	700,89	700,95
	379	Ac-F\$8KYWEAc3cL\$A-NH2	1371,76	686,88	686,97
	380	Ac-F\$8ANieWEAc3cL\$A-NH2	1264,72	633,36	1265,59
	381	Ac-F\$8AVWEAc3cL\$A-NH2	1250,71	626,36	1252,2
65	382	Ac-F\$8AFWEAc3cL\$A-NH2	1298,71	650,36	1299,64

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	383	Ac-F\$r8AWWEAc3cL\$A-NH2	1337,72	669,86	1338,64
	384	Ac-F\$r8ARWEAc3cL\$A-NH2	1307,74	654,87	655
	385	Ac-F\$r8AKWEAc3cL\$A-NH2	1279,73	640,87	641,01
	386	Ac-F\$r8AYWVAc3cL\$A-NH2	1284,73	643,37	643,38
10	387	Ac-F\$r8AYWFAc3cL\$A-NH2	1332,73	667,37	667,43
	388	Ac-F\$r8AYWWAc3cL\$A-NH2	1371,74	686,87	686,97
	389	Ac-F\$r8AYWRAc3cL\$A-NH2	1341,76	671,88	671,94
	390	Ac-F\$r8AYWKA3cL\$A-NH2	1313,75	657,88	657,88
	391	Ac-F\$r8AYWEVL\$A-NH2	1330,73	666,37	666,47
15	392	Ac-F\$r8AYWEFL\$A-NH2	1378,73	690,37	690,44
	393	Ac-F\$r8AYWEWL\$A-NH2	1417,74	709,87	709,91
	394	Ac-F\$r8AYWERL\$A-NH2	1387,77	694,89	1388,66
	395	Ac-F\$r8AYWEKL\$A-NH2	1359,76	680,88	1361,21
	396	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$V-NH2	1342,73	672,37	1343,59
20	397	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$F-NH2	1390,73	696,37	1392,58
	398	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$W-NH2	1429,74	715,87	1431,29
	399	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$R-NH2	1399,77	700,89	700,95
	400	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$K-NH2	1371,76	686,88	686,97
25	401	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AV-NH2	1413,77	707,89	707,91
	402	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AF-NH2	1461,77	731,89	731,96
	403	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AW-NH2	1500,78	751,39	751,5
	404	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AR-NH2	1470,80	736,40	736,47
	405	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AK-NH2	1442,80	722,40	722,41
30	406	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AH-NH2	1451,76	726,88	726,93
	407	Ac-LTF2NO2\$r8HYWAQL\$S-NH2	1642,85	822,43	822,54
	408	Ac-LTA\$r8HYAAQL\$S-NH2	1406,79	704,40	704,5
	409	Ac-LTF\$r8HYAAQL\$S-NH2	1482,82	742,41	742,47
	410	Ac-QSQQTF\$r8NLWALL\$AN-NH2	1966,07	984,04	984,38
35	411	Ac-QAibQQTF\$r8NLWALL\$AN-NH2	1964,09	983,05	983,42
	412	Ac-QAibQQTF\$r8ALWALL\$AN-NH2	1921,08	961,54	961,59
	413	Ac-AAATF\$r8AAWAAL\$AA-NH2	1608,90	805,45	805,52
	414	Ac-F\$r8AAWRAL\$Q-NH2	1294,76	648,38	648,48
	415	Ac-TF\$r8AAWAAL\$Q-NH2	1310,74	656,37	1311,62
40	416	Ac-TF\$r8AAWRAL\$A-NH2	1338,78	670,39	670,46
	417	Ac-VF\$r8AAWRAL\$Q-NH2	1393,82	697,91	697,99
	418	Ac-AF\$r8AAWAAL\$A-NH2	1223,71	612,86	1224,67
	420	Ac-TF\$r8AAWKAL\$Q-NH2	1367,80	684,90	684,97
	421	Ac-TF\$r8AAWOAL\$Q-NH2	1353,78	677,89	678,01
45	422	Ac-TF\$r8AAWSAL\$Q-NH2	1326,73	664,37	664,47
	423	Ac-LTF\$r8AAWRAL\$Q-NH2	1508,89	755,45	755,49
	424	Ac-F\$r8AYWAQL\$A-NH2	1301,72	651,86	651,96
	425	Ac-F\$r8AWWAAL\$A-NH2	1267,71	634,86	634,87
50	426	Ac-F\$r8AWWAQL\$A-NH2	1324,73	663,37	663,43
	427	Ac-F\$r8AYWEAL\$-NH2	1231,66	616,83	1232,93
	428	Ac-F\$r8AYWAAL\$-NH2	1173,66	587,83	1175,09
	429	Ac-F\$r8AYWKAL\$-NH2	1230,72	616,36	616,44
	430	Ac-F\$r8AYWOAL\$-NH2	1216,70	609,35	609,48
55	431	Ac-F\$r8AYWQAL\$-NH2	1230,68	616,34	616,44
	432	Ac-F\$r8AYWAQL\$-NH2	1230,68	616,34	616,37
	433	Ac-F\$r8HYWDQL\$S-NH2	1427,72	714,86	714,86
	434	Ac-F\$r8HFWEQL\$S-NH2	1425,74	713,87	713,98
	435	Ac-F\$r8AYWHQL\$S-NH2	1383,73	692,87	692,96
60	436	Ac-F\$r8AYWKQL\$S-NH2	1374,77	688,39	688,45
	437	Ac-F\$r8AYWOQL\$S-NH2	1360,75	681,38	681,49
	438	Ac-F\$r8HYWSQL\$S-NH2	1399,73	700,87	700,95
	439	Ac-F\$r8HWWWEQL\$S-NH2	1464,76	733,38	733,44
	440	Ac-F\$r8HWWAQL\$S-NH2	1406,75	704,38	704,43
65	441	Ac-F\$r8AWWHQL\$S-NH2	1406,75	704,38	704,43

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	442	Ac-F\$r8AWWWKQL\$S-NH2	1397,79	699,90	699,92
	443	Ac-F\$r8AWWOQL\$S-NH2	1383,77	692,89	692,96
	444	Ac-F\$r8HWWSQL\$S-NH2	1422,75	712,38	712,42
	445	Ac-LTF\$r8NYWANieL\$Q-NH2	1600,90	801,45	801,52
10	446	Ac-LTF\$r8NLWAQL\$Q-NH2	1565,90	783,95	784,06
	447	Ac-LTF\$r8NYWANieL\$A-NH2	1543,88	772,94	773,03
	448	Ac-LTF\$r8NLWAQL\$A-NH2	1508,88	755,44	755,49
	449	Ac-LTF\$r8AYWANieL\$Q-NH2	1557,90	779,95	780,06
	450	Ac-LTF\$r8ALWAQL\$Q-NH2	1522,89	762,45	762,45
15	451	Ac-LAF\$r8NYWANieL\$Q-NH2	1570,89	786,45	786,5
	452	Ac-LAF\$r8NLWAQL\$Q-NH2	1535,89	768,95	769,03
	453	Ac-LAF\$r8AYWANieL\$A-NH2	1470,86	736,43	736,47
	454	Ac-LAF\$r8ALWAQL\$A-NH2	1435,86	718,93	719,01
	455	Ac-LAF\$r8AYWAAL\$A-NH2	1428,82	715,41	715,41
20	456	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AAib-NH2	1399,75	700,88	700,95
	457	Ac-F\$r8AYWAQL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,78
	458	Ac-F\$r8AYWAAc3cL\$AA-NH2	1327,73	664,87	664,84
	459	Ac-F\$r8AYWSAc3cL\$AA-NH2	1343,73	672,87	672,9
25	460	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AS-NH2	1401,73	701,87	701,84
	461	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AT-NH2	1415,75	708,88	708,87
	462	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AL-NH2	1427,79	714,90	714,94
	463	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$AQ-NH2	1442,76	722,38	722,41
	464	Ac-F\$r8AFWEAc3cL\$AA-NH2	1369,74	685,87	685,93
30	465	Ac-F\$r8AWWEAc3cL\$AA-NH2	1408,75	705,38	705,39
	466	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$SA-NH2	1401,73	701,87	701,99
	467	Ac-F\$r8AYWEAL\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
	468	Ac-F\$r8AYWENieL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
	469	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$Abu-NH2	1399,75	700,88	700,95
35	470	Ac-F\$r8AYWEAc3cL\$NleA-NH2	1427,79	714,90	714,86
	471	Ac-F\$r8AYWEAibL\$NleA-NH2	1429,80	715,90	715,97
	472	Ac-F\$r8AYWEAL\$NleA-NH2	1415,79	708,90	708,94
	473	Ac-F\$r8AYWENieL\$NleA-NH2	1457,83	729,92	729,96
	474	Ac-F\$r8AYWEAibL\$Abu-NH2	1330,73	666,37	666,39
40	475	Ac-F\$r8AYWENieL\$Abu-NH2	1358,76	680,38	680,39
	476	Ac-F\$r8AYWEAL\$Abu-NH2	1316,72	659,36	659,36
	477	Ac-LTF\$r8AFWAQL\$S-NH2	1515,85	758,93	759,12
	478	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$S-NH2	1554,86	778,43	778,51
	479	Ac-LTF\$r8AYWAQI\$S-NH2	1531,84	766,92	766,96
45	480	Ac-LTF\$r8AYWAQNie\$S-NH2	1531,84	766,92	766,96
	481	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$SA-NH2	1602,88	802,44	802,48
	482	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$A-NH2	1538,87	770,44	770,89
	483	Ac-LTF\$r8AYWAQI\$A-NH2	1515,85	758,93	759,42
50	484	Ac-LTF\$r8AYWAQNie\$A-NH2	1515,85	758,93	759,42
	485	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$AA-NH2	1586,89	794,45	794,94
	486	Ac-LTF\$r8HWWAQL\$S-NH2	1620,88	811,44	811,47
	487	Ac-LTF\$r8HRWAQL\$S-NH2	1590,90	796,45	796,52
	488	Ac-LTF\$r8HKWAQL\$S-NH2	1562,90	782,45	782,53
55	489	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$W-NH2	1696,91	849,46	849,5
	491	Ac-F\$r8AYWAbuAL\$A-NH2	1258,71	630,36	630,5
	492	Ac-F\$r8AbuYWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,51
	493	Ac-NlePRF%r8NYWRLL%QN-NH2	1954,13	978,07	978,54
	494	Ac-TSF%r8HYWAQL%S-NH2	1573,83	787,92	787,98
60	495	Ac-LTF%r8AYWAQL%S-NH2	1533,86	767,93	768
	496	Ac-HTF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1621,84	811,92	811,96
	497	Ac-LHF\$r8HYWAQL\$S-NH2	1633,88	817,94	818,02
	498	Ac-LTF\$r8HHWAQL\$S-NH2	1571,86	786,93	786,94
	499	Ac-LTF\$r8HYWHQL\$S-NH2	1663,89	832,95	832,38
65	500	Ac-LTF\$r8HYWAHL\$S-NH2	1606,87	804,44	804,48

ES 2 817 877 T3

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	501	Ac-LTF\$8HYWAQL\$H-NH2	1647,89	824,95	824,98
	502	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHPr	1639,91	820,96	820,98
	503	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHsBu	1653,93	827,97	828,02
	504	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHiBu	1653,93	827,97	828,02
10	505	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHBn	1687,91	844,96	844,44
	506	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHPe	1700,92	851,46	851,99
	507	Ac-LTF\$8HYWAQL\$S-NHChx	1679,94	840,97	841,04
	508	Ac-ETF\$8AYWAQL\$S-NH2	1547,80	774,90	774,96
	509	Ac-STF\$8AYWAQL\$S-NH2	1505,79	753,90	753,94
15	510	Ac-LEF\$8AYWAQL\$S-NH2	1559,84	780,92	781,25
	511	Ac-LSF\$8AYWAQL\$S-NH2	1517,83	759,92	759,93
	512	Ac-LTF\$8EYWAQL\$S-NH2	1589,85	795,93	795,97
	513	Ac-LTF\$8SYWAQL\$S-NH2	1547,84	774,92	774,96
	514	Ac-LTF\$8AYWEQL\$S-NH2	1589,85	795,93	795,9
20	515	Ac-LTF\$8AYWAEL\$S-NH2	1532,83	767,42	766,96
	516	Ac-LTF\$8AYWASL\$S-NH2	1490,82	746,41	746,46
	517	Ac-LTF\$8AYWAQL\$E-NH2	1573,85	787,93	787,98
	518	Ac-LTF2CN\$8HYWAQL\$S-NH2	1622,86	812,43	812,47
25	519	Ac-LTF3CI\$8HYWAQL\$S-NH2	1631,83	816,92	816,99
	520	Ac-LTDip\$8HYWAQL\$S-NH2	1673,90	837,95	838,01
	521	Ac-LTF\$8HYWAQTie\$S-NH2	1597,87	799,94	800,04
	522	Ac-F\$8AY6ciWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	1338,56
	523	Ac-F\$8AYdl6brWEAL\$A-NH2	1380,61	691,31	692,2
30	524	Ac-F\$8AYdl6fWEAL\$A-NH2	1320,69	661,35	1321,61
	525	Ac-F\$8AYdl4mWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,36
	526	Ac-F\$8AYdl5clWEAL\$A-NH2	1336,66	669,33	669,35
	527	Ac-F\$8AYdl7mWEAL\$A-NH2	1316,72	659,36	659,36
	528	Ac-LTF%8HYWAQL%A-NH2	1583,89	792,95	793,01
35	529	Ac-LTF\$8HCouWAQL\$S-NH2	1679,87	840,94	841,38
	530	Ac-LTFEHCouWAQLTS-NH2	1617,75	809,88	809,96
	531	Ac-LTA\$8HCouWAQL\$S-NH2	1603,84	802,92	803,36
	532	Ac-F\$8AYWEAL\$AbuA-NH2	1387,75	694,88	694,88
	533	Ac-F\$8AYWEAI\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
40	534	Ac-F\$8AYWEANIe\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
	535	Ac-F\$8AYWEAmIL\$AA-NH2	1429,80	715,90	715,97
	536	Ac-F\$8AYWQAL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,48
	537	Ac-F\$8AYWAAL\$AA-NH2	1315,73	658,87	658,92
	538	Ac-F\$8AYWAbuAL\$AA-NH2	1329,75	665,88	665,95
45	539	Ac-F\$8AYWNleAL\$AA-NH2	1357,78	679,89	679,94
	540	Ac-F\$8AbuYWEAL\$AA-NH2	1387,75	694,88	694,96
	541	Ac-F\$8NieYWEAL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
	542	Ac-F\$8FYWEAL\$AA-NH2	1449,77	725,89	725,97
50	543	Ac-LTF\$8HYWAQhL\$S-NH2	1611,88	806,94	807
	544	Ac-LTF\$8HYWAQAdm\$S-NH2	1675,91	838,96	839,04
	545	Ac-LTF\$8HYWAQIgl\$S-NH2	1659,88	830,94	829,94
	546	Ac-F\$8AYWAQL\$AA-NH2	1372,75	687,38	687,48
	547	Ac-LTF\$8ALWAQL\$Q-NH2	1522,89	762,45	762,52
55	548	Ac-F\$8AYWEAL\$AA-NH2	1373,74	687,87	687,93
	549	Ac-F\$8AYWNIeL\$AA-NH2	1415,79	708,90	708,94
	550	Ac-F\$8AYWEAiBL\$Abu-NH2	1330,73	666,37	666,39
	551	Ac-F\$8AYWNIeL\$Abu-NH2	1358,76	680,38	680,38
	552	Ac-F\$8AYWEAL\$Abu-NH2	1316,72	659,36	659,36
60	553	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$AbuA-NH2	1399,75	700,88	700,95
	554	Ac-F\$8AYWEAc3cL\$NIeA-NH2	1427,79	714,90	715,01
	555	H-LTF\$8AYWAQL\$S-NH2	1489,83	745,92	745,95
	556	mdPEG3-LTF\$8AYWAQL\$S-NH2	1679,92	840,96	840,97
	557	mdPEG7-LTF\$8AYWAQL\$S-NH2	1856,02	929,01	929,03
65	558	Ac-F\$8ApmPEt6clWEAL\$A-NH2	1470,71	736,36	788,17

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	559	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1565,81	783,91	809,18
	560	Ac-LTF3CI\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1615,83	808,92	875,24
	561	Ac-LTF3CI\$r8HYWWQL\$\$-NH2	1746,87	874,44	841,65
	562	Ac-LTF3CI\$r8AYWWQL\$\$-NH2	1680,85	841,43	824,63
10	563	Ac-LTF\$r8AYWWQL\$\$-NH2	1646,89	824,45	849,98
	564	Ac-LTF\$r8HYWWQL\$\$-NH2	1696,91	849,46	816,67
	565	Ac-LTF\$r8AYWWQL\$\$-NH2	1630,89	816,45	776,15
	566	Ac-LTF4F\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1549,83	775,92	776,15
	567	Ac-LTF2F\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1549,83	775,92	776,15
15	568	Ac-LTF3F\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1549,83	775,92	785,12
	569	Ac-LTF34F2\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1567,83	784,92	785,12
	570	Ac-LTF35F2\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1567,83	784,92	1338,74
	571	Ac-F3CI\$r8AYWEAL\$\$-NH2	1336,66	669,33	705,28
	572	Ac-F3CI\$r8AYWEAL\$\$-NH2	1407,70	704,85	680,11
20	573	Ac-F\$r8AY6ciWEAL\$\$-NH2	1407,70	704,85	736,83
	574	Ac-F\$r8AY6ciWEAL\$\$-NH2	1265,63	633,82	784,1
	575	Ac-LTF\$r8HYWAQLSt/S-NH2	16,03	9,02	826,98
	576	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHsBu	1653,93	827,97	828,02
	577	Ac-STF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1505,79	753,90	753,94
25	578	Ac-LTF\$r8AYWAEL\$\$-NH2	1532,83	767,42	767,41
	579	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1573,85	787,93	787,98
	580	mdPEG3-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1679,92	840,96	840,97
	581	Ac-LTF\$r8AYWAQhL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,31
30	583	Ac-LTF\$r8AYWAQCha\$\$-NH2	1571,88	786,94	787,3
	584	Ac-LTF\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1557,86	779,93	780,4
	585	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1543,84	772,92	780,13
	586	Ac-LTF\$r8AYWAQF\$\$-NH2	1565,83	783,92	784,2
	587	Ac-LTF4F\$r8HYWAQhL\$\$-NH2	1629,87	815,94	815,36
35	588	Ac-LTF4F\$r8HYWAQCha\$\$-NH2	1655,89	828,95	828,39
	589	Ac-LTF4F\$r8HYWAQChg\$\$-NH2	1641,87	821,94	821,35
	590	Ac-LTF4F\$r8HYWAQCba\$\$-NH2	1627,86	814,93	814,32
	591	Ac-LTF4F\$r8AYWAQhL\$\$-NH2	1563,85	782,93	782,36
	592	Ac-LTF4F\$r8AYWAQCha\$\$-NH2	1589,87	795,94	795,38
40	593	Ac-LTF4F\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1575,85	788,93	788,35
	594	Ac-LTF4F\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1561,83	781,92	781,39
	595	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQhL\$\$-NH2	1579,82	790,91	790,35
	596	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCha\$\$-NH2	1605,84	803,92	803,67
	597	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1591,82	796,91	796,34
45	598	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1577,81	789,91	789,39
	599	Ac-LTF\$r8AYWAQhF\$\$-NH2	1579,84	790,92	791,14
	600	Ac-LTF\$r8AYWAQF3CF3\$\$-NH2	1633,82	817,91	818,15
	601	Ac-LTF\$r8AYWAQF3Me\$\$-NH2	1581,86	791,93	791,32
50	602	Ac-LTF\$r8AYWAQ1NaI\$\$-NH2	1615,84	808,92	809,18
	603	Ac-LTF\$r8AYWAQBip\$\$-NH2	1641,86	821,93	822,13
	604	Ac-LTF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1591,88	796,94	797,33
	605	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHAm	1667,94	834,97	835,92
	606	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHHiAm	1667,94	834,97	835,55
55	607	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHnPr3Ph	1715,94	858,97	859,79
	608	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHnBu3,3Me	1681,96	841,98	842,49
	610	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHnPr	1639,91	820,96	821,58
	611	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHnEt2Ch	1707,98	854,99	855,35
	612	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$\$-NHHex	1681,96	841,98	842,4
60	613	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NHmdPeg2	1633,91	817,96	818,35
	614	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NHmdPeg2	1617,92	809,96	810,3
	615	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NHmdPeg4	1705,97	853,99	854,33
	616	Ac-F\$r8AYdl4mWEAL\$\$-NH2	1316,72	659,36	659,44
	617	Ac-F\$r8AYdl5ciWEAL\$\$-NH2	1336,66	669,33	669,43
65	618	Ac-LThF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,11

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	619	Ac-LT2NaI\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1581,86	791,93	792,43
	620	Ac-LTA\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1455,81	728,91	729,15
	621	Ac-LTF\$r8AYWVQL\$\$-NH2	1559,88	780,94	781,24
	622	Ac-LTF\$r8HYWAAL\$\$-NH2	1524,85	763,43	763,86
10	623	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$\$-NH2	1543,88	772,94	773,37
	624	Ac-LTF\$r8IYWAQL\$\$-NH2	1573,89	787,95	788,17
	625	Ac-FTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1609,85	805,93	806,22
	626	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1607,88	804,94	805,2
	627	Ac-2NaITF\$r8VYWsQL\$\$-NH2	1659,87	830,94	831,2
15	628	Ac-ITF\$r8LYWSQL\$\$-NH2	1589,89	795,95	796,13
	629	Ac-FTF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1641,86	821,93	822,13
	630	Ac-WTF\$r8VYWAQL\$\$-NH2	1632,87	817,44	817,69
	631	Ac-WTF\$r8WYWAQL\$\$-NH2	1719,88	860,94	861,36
	632	Ac-VTF\$r8AYWSQL\$\$-NH2	1533,82	767,91	768,19
20	633	Ac-WTF\$r8FYWSQL\$\$-NH2	1696,87	849,44	849,7
	634	Ac-FTF\$r8IYWAQL\$\$-NH2	1607,88	804,94	805,2
	635	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1648,87	825,44	824,8
	636	Ac-FTF\$r8LYWSQL\$\$-NH2	1623,87	812,94	812,8
	637	Ac-YTF\$r8FYWSQL\$\$-NH2	1673,85	837,93	837,8
25	638	Ac-LTF\$r8AY6ciWEAL\$\$-NH2	1550,79	776,40	776,14
	639	Ac-LTF\$r8AY6ciWSQL\$\$-NH2	1581,80	791,90	791,68
	640	Ac-F\$r8AY6ciWSAL\$\$-NH2	1294,65	648,33	647,67
	641	Ac-F\$r8AY6ciWQAL\$\$-AA-NH2	1406,72	704,36	703,84
30	642	Ac-LHF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1567,86	784,93	785,21
	643	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1531,84	766,92	767,17
	644	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$\$-NH2	1505,84	753,92	754,13
	645	Ac-LTF\$r8AYWAHL\$\$-NH2	1540,84	771,42	771,61
	646	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$H-NH2	1581,87	791,94	792,15
35	647	H-LTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1473,84	737,92	737,29
	648	Ac-HHF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1591,83	796,92	797,35
	649	Ac-aAibWTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1804,96	903,48	903,64
	650	Ac-AibWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1755,91	878,96	879,4
	651	Ac-AibAWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1826,95	914,48	914,7
40	652	Ac-fWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1817,93	909,97	910,1
	653	Ac-AibWWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1941,99	972,00	972,2
	654	Ac-WTF\$r8LYWSQL\$\$-NH2	1662,88	832,44	832,8
	655	Ac-WTF\$r8NieYWSQL\$\$-NH2	1662,88	832,44	832,6
	656	Ac-LTF\$r8AYWSQL\$a-NH2	1531,84	766,92	767,2
45	657	Ac-LTF\$r8EYWARL\$\$-NH2	1601,90	801,95	802,1
	658	Ac-LTF\$r8EYWAHL\$\$-NH2	1582,86	792,43	792,6
	659	Ac-aTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1489,80	745,90	746,08
	660	Ac-AibTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1503,81	752,91	753,11
50	661	Ac-AmfTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1579,84	790,92	791,14
	662	Ac-AmwTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1618,86	810,43	810,66
	663	Ac-NmLTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,11
	664	Ac-LNmTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,11
	665	Ac-LSarF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1501,83	751,92	752,18
55	667	Ac-LGF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1487,82	744,91	745,15
	668	Ac-LTNmF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,2
	669	Ac-TF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1418,76	710,38	710,64
	670	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1531,81	766,91	767,2
	671	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$\$-NH2	1573,85	787,93	788,1
60	672	Ac-LT2NaI\$r8AYWSQL\$\$-NH2	1597,85	799,93	800,4
	673	Ac-LTF\$r8AYWAAL\$\$-NH2	1474,82	738,41	738,68
	674	Ac-LTF\$r8AYWAQhCha\$\$-NH2	1585,89	793,95	794,19
	675	Ac-LTF\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1557,86	779,93	780,97
	676	Ac-LTF\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1543,84	772,92	773,19
65	677	Ac-LTF\$r8AYWAQF3CF3\$\$-NH2	1633,82	817,91	818,15

ES 2 817 877 T3

(continuación)

	Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)
5	678	Ac-LTF\$r8AYWAQ1NaI\$\$-NH2	1615,84	808,92	809,18
	679	Ac-LTF\$r8AYWAQBip\$\$-NH2	1641,86	821,93	822,32
	680	Ac-LT2NaI\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1581,86	791,93	792,15
	681	Ac-LTF\$r8AYWVQL\$\$-NH2	1559,88	780,94	781,62
10	682	Ac-LTF\$r8AWWAQL\$\$-NH2	1554,86	778,43	778,65
	683	Ac-FTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1609,85	805,93	806,12
	684	Ac-ITF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1607,88	804,94	805,2
	685	Ac-ITF\$r8LYWSQL\$\$-NH2	1589,89	795,95	796,22
	686	Ac-FTF\$r8FYWAQL\$\$-NH2	1641,86	821,93	822,41
15	687	Ac-VTF\$r8AYWSQL\$\$-NH2	1533,82	767,91	768,19
	688	Ac-LTF\$r8AHWAQL\$\$-NH2	1505,84	753,92	754,31
	689	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$H-NH2	1581,87	791,94	791,94
	690	Ac-LTF\$r8AYWAHL\$\$-NH2	1540,84	771,42	771,61
	691	Ac-aAibWTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1804,96	903,48	903,9
20	692	Ac-AibWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1755,91	878,96	879,5
	693	Ac-AibAWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1826,95	914,48	914,7
	694	Ac-fWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1817,93	909,97	910,2
	695	Ac-AibWWTF\$r8HYWAQL\$\$-NH2	1941,99	972,00	972,7
	696	Ac-WTF\$r8LYWSQL\$\$-NH2	1662,88	832,44	832,7
25	697	Ac-WTF\$r8NieYWSQL\$\$-NH2	1662,88	832,44	832,7
	698	Ac-LTF\$r8AYWSQL\$a-NH2	1531,84	766,92	767,2
	699	Ac-LTF\$r8EYWARL\$a-NH2	1601,90	801,95	802,2
	700	Ac-LTF\$r8EYWAHL\$a-NH2	1582,86	792,43	792,6
30	701	Ac-aTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1489,80	745,90	746,1
	702	Ac-AibTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1503,81	752,91	753,2
	703	Ac-AmTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1579,84	790,92	791,2
	704	Ac-AmwTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1618,86	810,43	810,7
	705	Ac-NmLTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,1
35	706	Ac-LNmTF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1545,86	773,93	774,4
	707	Ac-LSarF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1501,83	751,92	752,1
	708	Ac-TF\$r8AYWAQL\$\$-NH2	1418,76	710,38	710,8
	709	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$a-NH2	1531,81	766,91	767,4
40	710	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$a-NH2	1573,85	787,93	788,2
	711	Ac-WTF\$r8VYWSQL\$\$-NH2	1648,87	825,44	825,2
	713	Ac-YTF\$r8FYWSQL\$\$-NH2	1673,85	837,93	837,3
	714	Ac-F\$r8AY6ciWSAL\$a-NH2	1294,65	648,33	647,74
	715	Ac-ETF\$r8EYWVQL\$\$-NH2	1633,84	817,92	817,36
	716	Ac-ETF\$r8EHWAQL\$a-NH2	1563,81	782,91	782,36
45	717	Ac-ITF\$r8EYWAQL\$\$-NH2	1589,85	795,93	795,38
	718	Ac-ITF\$r8EHWVQL\$a-NH2	1575,88	788,94	788,42
	719	Ac-ITF\$r8EHWAQL\$\$-NH2	1563,85	782,93	782,43
	720	Ac-LTF4F\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1561,83	781,92	781,32
50	721	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQhL\$\$-NH2	1579,82	790,91	790,64
	722	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCha\$\$-NH2	1605,84	803,92	803,37
	723	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1591,82	796,91	796,27
	724	Ac-LTF3CI\$r8AYWAQCba\$\$-NH2	1577,81	789,91	789,83
	725	Ac-LTF\$r8AY6ciWSQL\$\$-NH2	1581,80	791,90	791,75
55	726	Ac-LTF4F\$r8HYWAQhL\$\$-NH2	1629,87	815,94	815,36
	727	Ac-LTF4F\$r8HYWAQCba\$\$-NH2	1627,86	814,93	814,32
	728	Ac-LTF4F\$r8AYWAQhL\$\$-NH2	1563,85	782,93	782,36
	729	Ac-LTF4F\$r8AYWAQChg\$\$-NH2	1575,85	788,93	788,35
	730	Ac-ETF\$r8EYWVAL\$\$-NH2	1576,82	789,41	788,79
60	731	Ac-ETF\$r8EHWAAL\$a-NH2	1506,79	754,40	754,8
	732	Ac-ITF\$r8EYWAAL\$\$-NH2	1532,83	767,42	767,75
	733	Ac-ITF\$r8EHWVAL\$a-NH2	1518,86	760,43	760,81
	734	Ac-ITF\$r8EHWAAL\$\$-NH2	1506,82	754,41	754,8
	735	Pam-LTF\$r8EYWAQL\$\$-NH2	1786,07	894,04	894,48
65	736	Pam-ETF\$r8EYWAQL\$\$-NH2	1802,03	902,02	902,34

(continuación)

Número	Secuencia	Masa Exacta	M+2	Masa Observada (m/e)	
5	737	Ac-LTF\$r8AYWLQL\$S-NH2	1573,89	787,95	787,39
	738	Ac-LTF\$r8EYWLQL\$S-NH2	1631,90	816,95	817,33
	739	Ac-LTF\$r8EHWLQL\$S-NH2	1605,89	803,95	804,29
	740	Ac-LTF\$r8VYWAQL\$S-NH2	1559,88	780,94	781,34
10	741	Ac-LTF\$r8AYWSQL\$S-NH2	1547,84	774,92	775,33
	742	Ac-ETF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1547,80	774,90	775,7
	743	Ac-LTF\$r8EYWAQL\$S-NH2	1589,85	795,93	796,33
	744	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHAm	1667,94	834,97	835,37
	745	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHiAm	1667,94	834,97	835,27
15	746	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnPr3Ph	1715,94	858,97	859,42
	747	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnBu3,3Me	1681,96	841,98	842,67
	748	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnBu	1653,93	827,97	828,24
	749	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnPr	1639,91	820,96	821,31
	750	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHnEt2Ch	1707,98	854,99	855,35
20	751	Ac-LTF\$r8HYWAQL\$S-NHHex	1681,96	841,98	842,4
	752	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NHmdPeg2	1633,91	817,96	855,35
	753	Ac-LTF\$r8AYWAQL\$A-NHmdPeg2	1617,92	809,96	810,58
	754	Ac-LTF\$r5AYWAAL\$S8S-NH2	1474,82	738,41	738,79
25	755	Ac-LTF\$r8AYWCouQL\$S-NH2	1705,88	853,94	854,61
	756	Ac-LTF\$r8CouYWAQL\$S-NH2	1705,88	853,94	854,7
	757	Ac-CouTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1663,83	832,92	833,33
	758	H-LTF\$r8AYWAQL\$A-NH2	1473,84	737,92	737,29
	759	Ac-HHF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1591,83	796,92	797,72
30	760	Ac-LT2NaI\$r8AYWSQL\$S-NH2	1597,85	799,93	800,68
	761	Ac-LTF\$r8HCouWAQL\$S-NH2	1679,87	840,94	841,38
	762	Ac-LTF\$r8AYWCou2QL\$S-NH2	1789,94	895,97	896,51
	763	Ac-LTF\$r8Cou2YWAQL\$S-NH2	1789,94	895,97	896,5
	764	Ac-Cou2TF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1747,90	874,95	875,42
35	765	Ac-LTF\$r8ACou2WAQL\$S-NH2	1697,92	849,96	850,82
	766	Dmaac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1574,89	788,45	788,82
	767	Hexac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1587,91	794,96	795,11
	768	Napac-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1657,89	829,95	830,36
	769	Pam-LTF\$r8AYWAQL\$S-NH2	1728,06	865,03	865,45
40	770	Ac-LT2NaI\$r8HYAAQL\$S-NH2	1532,84	767,42	767,61
	771	Ac-LT2NaI\$/r8HYWAQL\$/S-NH2	1675,91	838,96	839,1
	772	Ac-LT2NaI\$r8HYFAQL\$S-NH2	1608,87	805,44	805,9
	773	Ac-LT2NaI\$r8HWAAQL\$S-NH2	1555,86	778,93	779,08
	774	Ac-LT2NaI\$r8HYAWQL\$S-NH2	1647,88	824,94	825,04
45	775	Ac-LT2NaI\$r8HYAAQW\$S-NH2	1605,83	803,92	804,05
	776	Ac-LTW\$r8HYWAQL\$S-NH2	1636,88	819,44	819,95
	777	Ac-LT1NaI\$r8HYWAQL\$S-NH2	1647,88	824,94	825,41

50 En algunos casos, los macrociclos a peptidomiméticos descritos en la presente descripción no comprenden una estructura de macrociclo peptidomimético como se muestra en la Tabla 2b.

La Tabla 2c muestra ejemplos de polipéptidos no reticulados que comprenden D-aminoácidos.

SP	Secuencia	Isómero	Masa Exacta	Masa Encontrada	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
SP765	Ac-tawyanfekllr-NH2			777,46			
SP766	Ac-tawyanf4CF3ekllr-NH2			811,41			

60 Ejemplo 3: cocrystalografía de rayos X de macrociclos peptidomiméticos en complejo con MDMX

65 Para la cocrystalización con el péptido 46 (Tabla 2b), se añadió una cantidad estequiométrica de compuesto de una solución madre 100 mM en DMSO a la solución de proteína MDMX de pez cebra y se dejó reposar durante la noche a 4 °C antes de preparar los experimentos de cristalización. Los procedimientos fueron similares a los descritos por Popowicz y otros, con algunas variaciones, como se indica más abajo. La proteína (residuos 15-129, L46V/V95L) se

obtuvo de un sistema de expresión de *E. coli* BL21(DE3) mediante el uso del vector pET15b. Las células se cultivaron a 37 °C y se indujeron con IPTG 1 mM a una OD₆₀₀ de 0,7. Se permitió que las células crecieran durante 18 horas adicionales a 23 °C. La proteína se purificó mediante el uso de Ni-NT Agarosa seguido de Superdex 75 tamponado con NaPO₄ 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, TCEP 2 mM y después se concentró a 24 mg/mL. Para los experimentos de cristalización el tampón se cambió a Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, DTT 2 mM. Los cristales iniciales se obtuvieron con la pantalla AMS #94 de Nextal (Qiagen) y el depósito optimizado final fue AMS 2,6 M, Hepes 75 mM, pH 7,5. Los cristales crecieron de forma rutinaria como placas delgadas a 4 °C y se crioprotegieron mediante su paso a través de una solución que contenía malonato concentrado (3,4 M) seguido de enfriamiento rápido, almacenamiento, y envío en nitrógeno líquido.

La recolección de datos se realizó en el APS en la línea de luz 31-ID (SGX-CAT) a 100 °K y una longitud de onda de 0,97929 Å. La línea de luz estaba equipada con un detector Rayonix 225-HE. Para la recolección de datos, los cristales se rotaron 180° en incrementos de 1° mediante el uso de tiempos de exposición de 0,8 segundos. Los datos se procesaron y redujeron mediante el uso de Mosflm/scala (CCP4; ver The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. Acta Crystallogr. D50, 760-763 (1994); P.R. Evans. Joint CCP4 y ESF-EACBM Newsletter 33, 22-24 (1997)) en grupo espacial C2 (unidad de celda: a = 109,2786, b = 81,0836, c = 30,9058Å, α = 90, β = 89,8577, γ = 90°). El reemplazo molecular con el programa Molrep (CCP4; ver A.Vagin & A. Teplyakov. J. Appl. Cryst. 30, 1022-1025 (1997)) se realizó con el componente MDMX de la estructura determinada por Popowicz y otros, (2Z5S; ver G.M. Popowicz, A. Czarna, U. Rothweiler, A. Szwagierczak, M. Krajewski, L. Weber & T.A. Holak. Cell Cycle 6, 2386-2392 (2007)) e identificó dos moléculas en la unidad asimétrica. Refinamiento inicial de solo las dos moléculas del pez cebra MDMX con el programa Refmac (CCP4; ver G.N. Murshudov, A.A. Vagin & E.J. Dodson. Acta Crystallogr. D53, 240-255 (1997)) resultó en un factor R de 0,3424 (R_{libre} = 0,3712) y valores rmsd para enlaces (0,018 Å) y ángulos (1,698°). La densidad de electrones para los componentes peptídicos grapados, comenzando con Gln¹⁹ e incluyendo toda la grapa alifática, fue muy clara. Un mayor refinamiento con CNX (Accelrys) mediante el uso de los datos a una resolución de 2,3 Å resultó en un modelo (compuesto por 1448 átomos de MDMX, 272 átomos de los péptidos grapados y 46 moléculas de agua) que está bien refinado (R_f = 0,2601, R_{libre} = 0,3162, enlaces rmsd = 0,007 Å y ángulos rmsd = 0,916°).

Los resultados de este ejemplo se muestran en las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 4: Análisis de dicroísmo circular (CD) de alfa-helicidad

Las soluciones de péptidos se analizaron por espectroscopía de CD mediante el uso de un espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) con el programa informático del sistema Jasco Spectra Manager Ver.2. Se usó un controlador de temperatura Peltier para mantener el control de temperatura de la celda óptica. Los resultados se expresan como elipticidad molar media [θ] (grados cm² dmol⁻¹) como se calcula a partir de la ecuación [θ] = θ_{obs} · MRW / 10³ · c donde θ_{obs} es la elipticidad observada en milisegundos, MRW es el peso medio del residuo del péptido (peso molecular del péptido/número de residuos), l es la longitud de la trayectoria óptica de la celda en centímetros, y c es la concentración de péptido en mg/mL. Las concentraciones de péptidos se determinaron mediante análisis de aminoácidos. Se prepararon soluciones madre de péptidos en tampón CD benigno (ácido fosfórico 20 mM, pH 2). Las soluciones madres se usaron para preparar soluciones de péptidos de 0,05 mg/mL en tampón CD benigno o en tampón CD con trifluoroetanol (TFE) al 50 % para análisis en una celda de 10 mm de longitud de trayectoria. Se escanearon medidas de longitud de onda variable de soluciones de péptidos a 4 °C desde 195 a 250 nm, en incrementos de 0,2 nm, y una velocidad de escaneo de 50 nm por minuto. Se informó el promedio de seis escáneres.

La Tabla 3 muestra los datos de dicroísmo circular para macrociclos peptidomiméticos seleccionados:

Tabla 3

SP#	Elipticidad Molar Benigna (222 en TFE 0 %)	Elipticidad Molar TFE 50 % (222 en TFE 50 %)	Elipticidad Molar TFE-Elipticidad Molar Benigna	% Hélice TFE 50 % en comparación con TFE 50 % parental (CD)	% Hélice benigno en comparación con TFE 50 % parental (CD)
7	124	-19 921,4	-20 045,4	137,3	-0,9
11	-398,2	-16 623,4	16 225,2	106,1	2,5
41	-909	-21 319,4	20 410,4	136	5,8
43	-15334,5	-18 247,4	2912,9	116,4	97,8
69	-102,6	-21 509,7	-21 407,1	148,2	0,7
71	-121,2	-17 957	-17 835,9	123,7	0,8
154	-916,2	-3 0965,1	-30 048,9	213,4	6,3
230	-213,2	-17 974	-17 760,8	123,9	1,5
233	-477,9	-19 032,6	-18 554,7	131,2	3,3

Ejemplo 5: ensayo de unión directa a MDM2 con polarización de Fluorescencia (FP)

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir MDM2 (del laboratorio, 41 kD) en tampón FP (tampón con alto contenido de sal - NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) para obtener una solución madre de trabajo 10 μ M.
2. Añadir 30 μ l de solución madre de proteína 10 μ M en los pocillos A1 y B1 de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices).
3. Llenar con 30 μ l de tampón FP en la columna A2 a A12, B2 a B12, C1 a C12, y D1 a D12.
4. Diluir en serie de 2 o 3 veces de la solución madre de proteína de A1, B1 en A2, B2; A2, B2 a A3, B3; ... para alcanzar la concentración nM de un solo dígito en el último punto de dilución.
5. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO hasta 100 μ M (dilución 1:10). Después, diluir desde 100 μ M hasta 10 μ M con agua (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 10 μ M hasta 40 nM (dilución 1:250). Esta es la solución de trabajo que tendrá una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución 1:4). Mantener en la oscuridad el péptido diluido marcado con FAM hasta su uso.
6. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM 10 nM en cada pocillo, incubar, y leer en diferentes momentos. Kd con 5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ es ~13,38 nM.

Ejemplo 6: Ensayo de polarización de Fluorescencia competitiva para MDM2

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir MDM2 (del laboratorio, 41 kD) en tampón FP (tampón con alto contenido de sal- NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) para hacer una solución madre de trabajo 84 nM (2X).
2. Añadir 20 μ l de la solución madre de proteína 84 nM (2X) en cada pocillo de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices)
3. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO hasta 100 μ M (dilución 1:10). Después, diluir desde 100 μ M hasta 10 μ M con agua (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 10 μ M hasta 40 nM (dilución 1:250). Esta es la solución de trabajo que tendrá una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución 1:4). Mantener en la oscuridad el péptido diluido marcado con FAM hasta su uso.
4. Preparar una placa de dosis del péptido sin marcar con tampón FP comenzando con 1 μ M (final) de péptido y haciendo diluciones en serie de 5 veces para 6 puntos mediante el uso del siguiente esquema de dilución. Diluir 10 mM (en DMSO al 100 %) con DMSO hasta 5 mM (dilución 1:2). Después, diluir desde 5 mM hasta 500 μ M con H₂O (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 500 μ M hasta 20 μ M (dilución 1:25). Hacer 5 diluciones en serie de 5 veces de 4 μ M (4X) para 6 puntos.
5. Transferir 10 μ l de péptidos no marcados diluidos en serie a cada pocillo que se llenó con 20 μ l de proteína 84 nM.
6. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM de 10 nM (4X) en cada pocillo e incubar durante 3 horas para leer.

Ejemplo 7: Ensayo de unión directa de MDMX con polarización de Fluorescencia (FP)

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir MDMX (del laboratorio, 40 kD) en tampón FP (tampón con alto contenido de sal: NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) para hacer una solución madre de trabajo 10 μ M.
2. Añadir 30 μ l de solución madre de proteína 10 μ M en los pocillos A1 y B1 de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices).
3. Llenar con 30 μ l de tampón FP en la columna A2 a A12, B2 a B12, C1 a C12, y D1 a D12.
4. Diluir en serie de 2 o 3 veces de la solución madre de proteína de A1, B1 en A2, B2; A2, B2 a A3, B3; ... para alcanzar la concentración nM de un solo dígito en el último punto de dilución.
5. Diluir 1 mM (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO hasta 100 μ M (dilución 1:10). Después, diluir desde 100 μ M hasta 10 μ M con agua (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 10 μ M hasta 40 nM (dilución 1:250). Esta es la solución de trabajo que tendrá una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución 1:4). Mantener en la oscuridad el péptido diluido marcado con FAM hasta su uso.
6. Añadir 10 μ l de péptido marcado con FAM 10 nM en cada pocillo, incubar, y leer en diferentes momentos. Kd con 5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ es ~51 nM.

Ejemplo 8: Ensayo de polarización de Fluorescencia competitivo para MDMX

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

1. Diluir MDMX (del laboratorio, 40 kD) en tampón FP (tampón con alto contenido de sal: NaCl 200 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) para obtener una solución madre de trabajo 300 nM (2X).
2. Añadir 20 μ l de 300 nM (2X) de solución madre de proteína en cada pocillo de la microplaca HE negra de 96 pocillos (Molecular Devices)
3. Diluir 1 μ M (en DMSO al 100 %) de péptido lineal marcado con FAM con DMSO hasta 100 μ M (dilución 1:10). Después, diluir desde 100 μ M hasta 10 μ M con agua (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 10 μ M hasta 40 nM (dilución 1:250). Esta es la solución de trabajo que tendrá una concentración de 10 nM en el pocillo (dilución 1:4). Mantener en la oscuridad el péptido diluido marcado con FAM hasta su uso.
4. Hacer una placa de dosis de péptido sin marcar con tampón FP comenzando con 5 mM (final) de péptido y haciendo diluciones en serie de 5 veces para 6 puntos mediante el uso del siguiente esquema de dilución.
5. Diluir 10 mM (en DMSO al 100 %) con DMSO hasta 5 mM (dilución 1:2). Después, diluir desde 5 mM hasta

500 µM con H₂O (dilución 1:10) y después diluir con tampón FP desde 500 µM hasta 20 µM (dilución 1:25). Hacer diluciones en serie de 5 veces a partir de 20 µM (4X) para 6 puntos.

6. Transferir 10 µl de péptidos no marcados diluidos en serie a cada pocillo que se llenó con 20 µl de proteína 300 nM.

7. Añadir 10 µl de péptido marcado con FAM de 10 nM (4X) en cada pocillo e incubar durante 3 horas para leer. Los resultados de los Ejemplos 5-8 se muestran en la Tabla 4. Se usa la siguiente escala: "+" representa un valor mayor que 1000 nM, "++" representa un valor mayor que 100 y menor o igual a 1000 nM, "+++" representa un valor mayor que 10 nM y menor que o igual a 100 nM, y "++++" representa un valor menor o igual a 10 nM.

Tabla 4

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)
3	++	++	+++	+++
4	+++	++	++++	+++
5	+++	++	++++	+++
6	++	++	+++	+++
7	+++	+++	++++	+++
8	++	++	+++	+++
9	++	++	+++	+++
10	++	++	+++	+++
11	+++	++	++++	+++
12	+	+	+++	++
13	++	++	+++	++
14	+++	+++	++++	++++
15	+++	++	+++	+++
16	+++	+++	++++	+++
17	+++	+++	++++	+++
18	+++	+++	++++	++++
19	++	+++	+++	+++
20	++	++	+++	+++
21	++	+++	+++	+++
22	+++	+++	++++	+++
23	++	++	+++	+++
24	+++	++	++++	+++
26	+++	++	++++	+++
28	+++	+++	++++	+++
30	++	++	+++	+++
32	+++	++	++++	+++
38	+	++	++	+++
39	+	++	++	++
40	++	++	++	+++
41	++	+++	+++	+++
42	++	++	+++	++
43	+++	+++	++++	+++
45	+++	+++	++++	++++
46	+++	+++	++++	+++
47	++	++	+++	+++
48	++	++	+++	+++
49	++	++	+++	+++
50	+++	++	++++	+++
52	+++	+++	++++	++++
54	++	++	+++	+++
55	+	+	++	++
65	+++	++	++++	+++
68	++	++	+++	+++
69	+++	++	++++	+++
70	++	++	++++	+++
71	+++	++	++++	+++
75	+++	++	++++	+++
77	+++	++	++++	+++
80	+++	++	++++	+++
81	++	++	+++	+++
82	++	++	+++	+++
85	+++	++	++++	+++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)
99	++++	++	++++	+++
100	++	++	++++	+++
101	+++	++	++++	+++
102	++	++	++++	+++
103	++	++	++++	+++
104	+++	++	++++	+++
105	+++	++	++++	+++
106	++	++	+++	+++
107	++	++	+++	+++
108	+++	++	++++	+++
109	+++	++	++++	+++
110	++	++	++++	+++
111	++	++	++++	+++
112	++	++	+++	+++
113	++	++	+++	+++
114	+++	++	++++	+++
115	++++	++	++++	+++
116	+	+	++	++
118	++++	++	++++	+++
120	+++	++	++++	+++
121	++++	++	++++	+++
122	++++	++	++++	+++
123	++++	++	++++	+++
124	++++	++	++++	+++
125	++++	++	++++	+++
126	++++	++	++++	+++
127	++++	++	++++	+++
128	++++	++	++++	+++
129	++++	++	++++	+++
130	++++	++	++++	+++
133	++++	++	++++	+++
134	++++	++	++++	+++
135	++++	++	++++	+++
136	++++	++	++++	+++
137	++++	++	++++	+++
139	++++	++	++++	+++
142	++++	+++	++++	+++
144	++++	++	++++	+++
146	++++	++	++++	+++
148	++++	++	++++	+++
150	++++	++	++++	+++
153	++++	+++	++++	+++
154	++++	+++	++++	++++
156	++++	++	++++	+++
158	++++	++	++++	+++
160	++++	++	++++	+++
161	++++	++	++++	+++
166	++++	++	++++	+++
167	+++	++	++++	++
169	++++	+++	++++	+++
170	++++	++	++++	+++
173	++++	++	++++	+++
175	++++	++	++++	+++
177	+++	++	++++	+++
180	+++	++	++++	+++
182	++++	++	++++	+++
185	+++	+	++++	++
186	+++	++	++++	+++
189	+++	++	++++	+++
192	+++	++	++++	+++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)
194	+++	++	++++	++
196	+++	++	++++	+++
197	++++	++	++++	+++
199	+++	++	++++	++
201	+++	++	++++	++
203	+++	++	++++	+++
204	+++	++	++++	+++
206	+++	++	++++	+++
207	++++	++	++++	+++
210	++++	++	++++	+++
211	++++	++	++++	+++
213	++++	++	++++	+++
215	+++	++	++++	+++
217	++++	++	++++	+++
218	++++	++	++++	+++
221	++++	+++	++++	+++
227	++++	++	++++	+++
230	++++	+++	++++	++++
232	++++	++	++++	+++
233	++++	+++	++++	+++
236	+++	++	++++	+++
237	+++	++	++++	+++
238	+++	+++	++++	+++
239	+++	++	+++	+++
240	+++	++	++++	+++
241	+++	++	++++	+++
242	+++	++	++++	+++
243	+++	+++	++++	+++
244	+++	+++	++++	++++
245	+++	+++	++++	+++
246	+++	++	++++	+++
247	+++	+++	++++	+++
248	+++	+++	++++	+++
249	+++	+++	++++	++++
250	++	+	++	+
252	++	+	++	+
254	+++	++	++++	+++
255	+++	+++	++++	+++
256	+++	+++	++++	+++
257	+++	+++	++++	+++
258	+++	++	++++	+++
259	+++	+++	++++	+++
260	+++	+++	++++	+++
261	+++	++	++++	+++
262	+++	++	++++	+++
263	+++	++	++++	+++
264	+++	+++	++++	+++
266	+++	++	++++	+++
267	+++	+++	++++	++++
270	++++	+++	++++	+++
271	++++	+++	++++	++++
272	++++	+++	++++	++++
276	+++	+++	++++	++++
277	+++	+++	++++	++++
278	+++	+++	++++	++++
279	++++	+++	++++	+++
280	+++	++	++++	+++
281	+++	+	+++	++
282	++	+	+++	+
283	+++	++	++++	++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)
284	+++	++	++++	+++
289	+++	+++	++++	+++
291	+++	+++	++++	++++
293	++++	+++	++++	+++
306	++++	++	++++	+++
308	++	++	+++	+++
310	+++	+++	++++	+++
312	+++	++	+++	+++
313	++++	++	++++	+++
314	++++	+++	++++	++++
315	+++	+++	++++	+++
316	++++	++	++++	+++
317	+++	++	+++	+++
318	+++	++	+++	+++
319	+++	++	+++	++
320	+++	++	+++	++
321	+++	++	++++	+++
322	+++	++	+++	++
323	+++	+	+++	++
328	+++	+++	++++	+++
329	+++	+++	++++	+++
331	++++	+++	++++	++++
332	++++	+++	++++	++++
334	++++	+++	++++	++++
336	++++	+++	++++	++++
339	++++	++	++++	+++
341	+++	+++	++++	++++
343	+++	+++	++++	++++
347	+++	+++	++++	+++
349	++++	+++	++++	++++
351	++++	+++	++++	++++
353	++++	+++	++++	++++
355	++++	+++	++++	++++
357	++++	+++	++++	++++
359	++++	+++	++++	+++
360	++++	++++	++++	++++
363	+++	+++	++++	++++
364	+++	+++	++++	++++
365	+++	+++	++++	++++
366	+++	+++	++++	+++
369	++	++	+++	+++
370	+++	+++	++++	+++
371	++	++	+++	+++
372	++	++	+++	+++
373	+++	+++	+++	+++
374	+++	+++	++++	++++
375	+++	+++	++++	++++
376	+++	+++	++++	++++
377	+++	+++	++++	+++
378	+++	+++	++++	+++
379	+++	+++	++++	+++
380	+++	+++	++++	+++
381	+++	+++	++++	+++
382	+++	+++	++++	++++
384	++	+	++	+
386	++	+	++	+
388	++	+++	+++	++++
390	+++	+++	++++	+++
392	+++	+++	++++	++++
394	++++	+++	++++	++++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)
396	++++	++++	++++	++++
398	+++	+++	++++	+++
402	++++	++++	++++	++++
404	+++	+++	++++	++++
408	+++	+++	++++	+++
410	++++	++++	++++	++++
411	++	+	++	+
412	++++	+++	++++	++++
415	++++	++++	++++	++++
416	+++	+++	++++	+++
417	+++	+++	++++	+++
418	++++	+++	++++	++++
419	+++	+++	+++	++++
421	++++	++++	++++	++++
423	+++	+++	++++	+++
425	+++	+++	+++	+++
427	++	++	+++	+++
432	++++	+++	++++	++++
434	+++	+++	++++	+++
435	++++	+++	++++	++++
437	+++	+++	++++	+++
439	++++	+++	++++	++++
441	++++	++++	++++	++++
443	+++	+++	++++	+++
445	+++	++	++++	+++
446	+++	+	++++	+
447	++	+	++	+
551	N/A	N/A	++++	+++
555	N/A	N/A	++++	+++
556	N/A	N/A	++++	+++
557	N/A	N/A	+++	+++
558	N/A	N/A	+++	+++
559	N/A	N/A	+++	+++
560	N/A	N/A	+	+
561	N/A	N/A	++++	+++
562	N/A	N/A	+++	+++
563	N/A	N/A	+++	+++
564	N/A	N/A	++++	+++
565	N/A	N/A	+++	+++
566	N/A	N/A	++++	+++
567	N/A	N/A	++++	+++
568	N/A	N/A	++++	++++
569	N/A	N/A	++++	+++
570	N/A	N/A	++++	+++
571	N/A	N/A	++++	+++
572	N/A	N/A	+++	+++
573	N/A	N/A	+++	+++
574	N/A	N/A	++++	+++
575	N/A	N/A	++++	+++
576	N/A	N/A	++++	+++
577	N/A	N/A	++++	+++
578	N/A	N/A	++++	+++
585	N/A	N/A	+++	+++
586	N/A	N/A	++++	+++
587	N/A	N/A	++++	++++
589	N/A	N/A	++++	
594	N/A	N/A	++++	++++
596	N/A	N/A	++++	+++
597	N/A	N/A	++++	+++
598	N/A	N/A	++++	+++

(continuación)

SP #	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)	
5	600	N/A	N/A	++++	++++
	602	N/A	N/A	++++	++++
	603	N/A	N/A	++++	++++
	604	N/A	N/A	+++	+++
	608	N/A	N/A	++++	+++
	609	N/A	N/A	++++	+++
10	610	N/A	N/A	++++	+++
	611	N/A	N/A	++++	+++
	612	N/A	N/A	++++	+++
	613	N/A	N/A	++++	+++
	615	N/A	N/A	++++	++++
15	433	N/A	N/A	++++	+++
	686	N/A	N/A	++++	+++
	687	N/A	N/A	++	++
	595	N/A	N/A	+	N/A
20	665	N/A	N/A	+++	N/A
	708	N/A	N/A	+++	+++
	710	N/A	N/A	+++	+++
	711	N/A	N/A	+++	++
	712	N/A	N/A	++++	++++
25	713	N/A	N/A	++++	++++
	716	N/A	N/A	++++	++++
	765	+	+		
	766	+++	+		
	752	++	+		
30	753	+++	+		
	754	++	+		
	755	++++	+		
	756	+++	+		
	757	++++	+		
35	758	+++	+		

Ejemplo 9: ELISA de Unión Competitiva (MDM2 & MDMX)

40 En los pocillos de unas placas Immulon de 96 pocillos, se recubre con la proteína p53-His6 (30 nM/pocillo) durante la noche a temperatura ambiente. El día del experimento, las placas se lavan con PBS-Tween 20 1X (0,05 %) mediante el uso de un lavador de placas de ELISA automatizado, se bloquean con ELISA Micro well Blocking durante 30 minutos a temperatura ambiente; el exceso de agente de bloqueo se lava mediante el lavado de las placas con PBS-Tween 20 1X (0,05 %). Los péptidos se diluyen a partir de soluciones madres 10 mM en DMSO a soluciones de trabajo de 500 µM en agua estéril, y se realizan diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener constante la concentración de DMSO en las muestras. Los péptidos se añaden a los pocillos a 2X de las concentraciones deseadas en volúmenes de 50 µl, seguido de la adición de proteína GST-MDM2 o GST-HMDX diluida (concentración final: 10 nM). Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavan con PBS-Tween 20 (0,05 %) antes de añadir 100 µl de anticuerpo anti-GST conjugado con HRP [Hypromatrix, INC] diluido a 0,5 µg/mL en tampón estabilizador de HRP. Después de 30 minutos de incubación con el anticuerpo de detección, las placas se lavan y se incuban con 100 µl por pocillo de solución de sustrato TMB-E hasta 30 minutos; las reacciones se detienen mediante el uso de HCL 1M y se mide la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas. Los datos se analizan mediante el uso del programa informático GraphPad PRISM.

55 Ejemplo 10: Ensayo de Viabilidad Celular

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Células sembradas en placas: Tripsinizar, contar y sembrar células a las densidades predeterminadas en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo. Se usan las siguientes densidades celulares para cada línea celular en uso:

- 60 • SJSA-1: 7500 células/pocillo
- RKO: 5000 células/pocillo
- RKO-E6: 5000 células/pocillo
- HCT-116: 5000 células/pocillo
- SW-480: 2000 células/pocillo
- 65 • MCF-7: 5000 células/pocillo

ES 2 817 877 T3

El día del estudio, se cambia el medio con medio fresco con FBS 11 % (medio de ensayo) a temperatura ambiente. Añadir 180 µl del medio de ensayo por pocillo. Los pocillos control sin células, reciben 200 µl de medio.

Dilución de péptidos: todas las diluciones se realizan a temperatura ambiente y se añaden a las células a temperatura ambiente.

- Preparar soluciones madres de 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir en serie la solución madre mediante el uso de un esquema de dilución 1:3 para obtener soluciones 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM mediante el uso de DMSO como diluyente. Diluir los péptidos diluidos en serie con DMSO 33,3 veces mediante el uso de agua estéril. Esto da un intervalo de soluciones de trabajo 10X. Además, preparar una mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO 3 %) para los pocillos de control.
- Por lo tanto, el intervalo de concentración de las soluciones de trabajo µM será 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM. Mezclar bien en cada etapa de dilución mediante el uso de pipeta multicanal.
- La fila H tiene controles. H1-H3 recibirá 20 µl de medio de ensayo. H4-H9 recibirá 20 µl de vehículo DMSO-agua al 3 %. H10-H12 tendrá control de medio solo sin células.
- Control positivo: el inhibidor de molécula pequeña de MDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usa como control positivo. Nutlin se diluyó mediante el uso del mismo esquema de dilución que los péptidos.

Adición de las soluciones de trabajo a las células:

- Añadir 20 µl de la concentración 10X deseada al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 200 µl en el pocillo. (20 µl de péptido 300 µM + 180 µl de células en el medio = concentración final 30 µM en volumen de 200 µl en los pocillos). Mezclar suavemente unas cuantas veces mediante el uso de una pipeta. Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 y 0 µM (para péptidos potentes se incluyen diluciones adicionales).
- Los controles incluyen pocillos que no tienen péptidos pero que contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen los péptidos y que los pocillos que no contienen CÉLULAS.
- Incubar durante 72 horas a 37 °C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %.
- La viabilidad de las células se determina mediante el uso del reactivo MTT de Promega. La viabilidad de las células SJSA-1, RKO, RKO-E6, HCT-116 se determina el día 3, las células MCF-7 el día 5, y las células SW-480 el día 6. Al final del tiempo de incubación designado, dejar que las placas alcancen la temperatura ambiente. Retirar 80 µl de medio de ensayo de cada pocillo. Añadir 15 µl del reactivo MTT descongelado a cada pocillo.
- Dejar la placa incubar durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y añadir 100 µl de reactivo de solubilización según el protocolo del fabricante. Incubar con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 570 nM en el lector de placas múltiples Synergy Biotek.
- Analizar la viabilidad celular con respecto a los controles DMSO mediante el uso de las herramientas de análisis GraphPad PRISM.

Reactivos:

- Medios de cultivo de células Invitrogen
 - Placas tratadas de cultivo celular transparente Falcon de 96 pocillos (Nunc 353072)
- DMSO (Sigma D 2650)
- RPMI 1640 (Invitrogen 72400)
- MTT (Promega G4000)

Instrumentos: Lector de placas múltiples para lectura de absorbancia (Synergy 2).

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se muestran en las Tablas 5 y 6. Se usa la siguiente escala: "+" representa un valor superior a 30 µM, "++" representa un valor superior a 15 µM y menor o igual a 30 µM, "+++ " representa un valor superior a 5 µM y menor o igual a 15 µM, y "++++" representa un valor menor o igual a 5 µM. La "relación de IC50" representa la relación de IC50 promedio en células p53+/+ con respecto a IC50 promedio en células p53-/-.

Tabla 5

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
3	+++
4	+++
5	++++
6	++
7	++++
8	+++
9	+++
10	+++
11	++++
12	++
13	+++
14	+
15	++
16	+
17	+
18	+
19	++
20	+
21	+
22	+
24	+++
26	++++
28	+
29	+
30	+
32	++
38	+
39	+
40	+
41	+
42	+
43	++
45	+
46	+
47	+
48	+
49	+++
50	++++
52	+
54	+
55	+
65	++++
68	++++
69	++++
70	++++
71	++++
72	++++
74	++++
75	++++
77	++++
78	++
80	++++
81	+++
82	+++
83	+++
84	+
85	+++
99	++++
102	+++

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
103	+++
104	+++
105	+++
108	+++
109	+++
110	+++
111	++
114	++++
115	++++
118	++++
120	++++
121	++++
122	++++
123	++++
124	+++
125	++++
126	++++
127	++++
128	+++
129	++
130	++++
131	+++
132	++++
133	+++
134	+++
135	+++
136	++
137	+++
139	++++
142	+++
144	++++
147	++++
148	++++
149	++++
150	++++
152	+++
153	++++
154	++++
155	++
156	+++
157	+++
158	+++
160	++++
161	++++
162	+++
163	+++
166	++
167	+++
168	++
169	++++
170	++++
171	++
173	+++
174	++++
175	+++
176	+++
177	++++
179	+++
180	+++
181	+++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
182	++++
183	++++
184	+++
185	+++
186	++
188	++
190	++++
192	+++
193	++
194	+
195	++++
196	++++
197	++++
198	++
199	+++
200	+++
201	++++
202	+++
203	++++
204	++++
205	++
206	++
207	+++
208	+++
209	++++
210	+++
211	++++
213	++++
214	++++
215	++++
216	++++
217	++++
218	++++
219	++++
220	+++
221	++++
222	+++
223	++++
224	++
225	+++
226	++
227	+++
228	++++
229	++++
230	++++
231	++++
232	++++
233	++++
234	++++
235	++++
236	++++
237	++++
238	++++
239	+++
240	++
241	+++
242	++++
243	++++
244	++++
245	++++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
246	+++
247	++++
248	++++
249	++++
250	++
251	+
252	+
253	+
254	+++
255	+++
256	++
257	+++
258	+++
259	++
260	++
261	++
262	+++
263	++
264	++++
266	+++
267	++++
270	++
271	++
272	++
276	++
277	++
278	++
279	++++
280	+++
281	++
282	++
283	++
284	++++
289	++++
290	+++
291	++++
292	++++
293	++++
294	++++
295	+++
296	++++
297	+++
298	++++
300	++++
301	++++
302	++++
303	++++
304	++++
305	++++
306	++++
307	+++
308	++++
309	+++
310	++++
312	++++
313	++++
314	++++
315	++++
316	++++
317	++++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
318	++++
319	++++
320	++++
321	++++
322	++++
323	++++
324	++++
326	++++
327	++++
328	++++
329	++++
330	++++
331	++++
332	++++
333	++
334	+++
335	++++
336	++++
337	++++
338	++++
339	++++
340	++++
341	++++
342	++++
343	++++
344	++++
345	++++
346	++++
347	++++
348	++++
349	++++
350	++++
351	++++
352	++++
353	++++
355	++++
357	++++
358	++++
359	++++
360	++++
361	+++
362	++++
363	++++
364	++++
365	+++
366	++++
367	++++
368	+
369	++++
370	++++
371	++++
372	+++
373	+++
374	++++
375	++++
376	++++
377	++++
378	++++
379	++++
380	++++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
381	++++
382	++++
386	+++
388	++
390	++++
392	+++
394	+++
396	+++
398	+++
402	+++
404	+++
408	++++
410	+++
411	+++
412	+
421	+++
423	++++
425	++++
427	++++
434	+++
435	++++
436	++++
437	++++
438	++++
439	++++
440	++++
441	++++
442	++++
443	++++
444	+++
445	++++
449	++++
551	++++
552	++++
554	+
555	++++
557	++++
558	++++
560	+
561	++++
562	++++
563	++++
564	++++
566	++++
567	++++
568	+++
569	++++
571	++++
572	++++
573	++++
574	++++
575	++++
576	++++
577	++++
578	++++
585	++++
586	++++
587	++++
588	++++
589	+++

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)	
432	++++	
5	672	+
	673	++
	682	+
	686	+
	687	+
10	662	++++
	663	++++
	553	+++
	559	++++
	579	++++
15	581	++++
	582	++
	582	++++
	584	+++
20	675	++++
	676	++++
	677	+
	679	++++
	700	+++
25	704	+++
	591	+
	706	++
	695	++
	595	++++
30	596	++++
	597	+++
	598	+++
	599	++++
	600	++++
35	601	+++
	602	+++
	603	+++
	604	+++
40	606	++++
	607	++++
	608	++++
	610	++++
	611	++++
45	612	++++
	613	+++
	614	+++
	615	++++
	618	++++
50	619	++++
	707	++++
	620	++++
	621	++++
	622	++++
55	623	++++
	624	++++
	625	++++
	626	+++
60	631	++++
	633	++++
	634	++++
	635	+++
	636	+++
65	638	+
	641	+++

(continuación)

SP#	SJSA-1 EC50 (72 h)
665	++++
708	++++
709	+++
710	+
711	++++
712	++++
713	++++
714	+++
715	+++
716	++++
765	+
753	+
754	+
755	+
756	+
757	++++
758	+++

Tabla 6

SP#	HCT-116 EC50 (72 h)	RKO EC50 (72 h)	RKO-E6 EC50 (72 h)	SW480 EC50 (6 días)	Relación IC50
4	++++	++++	+++	++++	
5	++++	++++	+++	++++	
7	++++	++++	+++	++++	
10	++++	+++	+++	+++	
11	++++	++++	++	+++	
50	++++	++++	++	+++	
65	+++	+++	+++	+++	
69	++++	++++	+	++++	
70	++++	++++	++	+++	
71	++++	++++	+++	+++	
81	+++	+++	+++	+++	
99	++++	++++	+++	++++	
109	++++	++++	++	+++	
114		+++	+	+++	
115		+++	+	+++	1-29
118	+++	++++	+	++++	
120	++++	++++	+	++++	
121	++++	++++	+	++++	
122		+++	+	+++	1-29
125	+++	+++	+	+	
126	+	+	+	+	
148		++	+	+	
150		++	+	+	
153	+++		+		
154	+++	+++	+	+	30-49
158	+	+	+	+	
160	+++	+	+	+	1-29
161	+++	+	+	+	
175	+	+	+	+	
196	++++	++++	+++	++++	
219	++++	+++	+	+	1-29
233	++++				
237	++++		+	+	
238	++++		+	+	
243	++++		+	+	
244	++++		+	+	≥ 50
245	++++		+	+	
247	++++		+	+	

ES 2 817 877 T3

(continuación)

	SP#	HCT-116 EC50 (72 h)	RKO EC50 (72 h)	RKO-E6 EC50 (72 h)	SW480 EC50 (6 días)	Relación IC50
5	249	++++	++++	+	+	≥ 50
	255	++++		+		
	291			+		
	293	+++		+		
	303	+++		+		1-29
10	305			+		
	306	++++		+		
	310	++++		+		
	312	++++				
	313	++++		++		
15	314			+		
	315	++++	++++	++	++++	≥50
	316	++++	++++	+	+++	≥50
	317	+++		+	++	
20	321	++++		+		
	324	+++		+		
	325	+++				
	326	+++		+		
	327	+++		+		
25	328	+++		++		
	329	++++		+		
	330			+		
	331	++++	++++	+	+	≥50
	338	++++	++++	++	+++	
30	341	+++	++	+	+	
	343	+++		+	+	
	346	++++		+	+	
	347	+++		+	+	
	349	++++	+++	+	+	30-49
35	350	++++		+	+	
	351	++++	+++	+	+	30-49
	353	++	++	+	+	
	355	++++	++	+	+	1-29
40	357	++++	++++	+	+	
	358	++++	++	+	+	
	359	++++	++	+	+	
	367	++++		+	+	30-49
	386	++++	++++	++++	++++	
45	388	++	++	+	+++	1-29
	390	++++	++++	+++	++++	
	435	+++	++	+		
	436	++++	++++	++		
	437	++++	++++	++	++++	30-49
50	440	++	++	+		
	442	++++	++++	++		
	444	++++	++++	+++		
	445	++++	+++	+	+	≥ 50
	555					≥ 50
55	557					≥50
	558					30-49
	562					30-49
	564					30-49
	566					30-49
60	567					≥50
	572					≥50
	573					30-49
	578					30-49
	662					≥50
65	379					1-29

(continuación)

	SP#	HCT-116 EC50 (72 h)	RKO EC50 (72 h)	RKO-E6 EC50 (72 h)	SW480 EC50 (6 días)	Relación IC50
5	375					1-29
	559					≥50
	561					1-29
	563					1-29
	568					1-29
10	569					1-29
	571					1-29
	574					1-29
	575					1-29
	576					1-29
15	577					30-49
	433					1-29
	551					30-49
	553					1-29
20	710				+	
	711				+	
	712				++	
	713				++	
	714				+++	
25	715				+++	
	716				+	

Ejemplo 11: Ensayo ELISA de P21

30 El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Células sembradas en Placa:

- 35 • Tripsinizar, contar y sembrar células SJS1 a la densidad de 7500 células/100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo.
- El día del estudio, reemplazar el medio con RPMI-FBS 11 % (medio de ensayo) fresco. Añadir 90 µl del medio de ensayo por pocillo. Los pocillos control sin células, reciben 100 µl de medio.

Dilución de péptidos:

- 40 • Preparar soluciones madres de 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir en serie la solución madre mediante el uso de un esquema de dilución 1:3 para obtener soluciones 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM mediante el uso de DMSO como diluyente. Diluir los péptidos diluidos en serie con DMSO 33,3 veces con agua estéril. Esto da un intervalo de 10X de las soluciones de trabajo. Además, preparar una mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO 3 %) para los pocillos de control.
- 45 • Por lo tanto, el intervalo de concentración de las soluciones de trabajo µM será 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM. Mezclar bien en cada etapa de dilución mediante el uso de pipeta multicanal.
- La fila H tiene controles. H1-H3 recibirá 10 µl de medio de ensayo. H4-H9 recibirá 10 µl de vehículo de agua-DMSO al 3 %. H10-H12 tendrá control de medio solo sin células.
- 50 • Control positivo: el inhibidor de molécula pequeña de MDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usa como control positivo. Nutlin se diluyó mediante el uso del mismo esquema de dilución que los péptidos.

Adición de las soluciones de trabajo a las células:

- 55 • Añadir 10 µl de la concentración 10X deseada al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 100 µl en el pocillo. (10 µl de péptido 300 µM + 90 µl de células en medio = concentración final 30 µM en volumen de 100 µl en pocillos). Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM.
- 60 • Los controles incluirán pocillos que no tienen péptidos pero que contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen péptidos, y pocillos que no contienen CÉLULAS.
- 20 horas después de la incubación, aspirar los medios; lavar las células con PBS 1X (sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) y lisar en 60 µl de tampón de lisis celular 1X (tampón Cell Signaling Technologies 10X diluido a 1X y suplementado con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa) en hielo durante 30 minutos.
- 65 • Centrifugar las placas a una velocidad de 5000 rpm a 4 °C durante 8 minutos; recolectar los sobrenadantes transparentes y congelar a -80 °C hasta su uso posterior.

Estimación de proteínas:

- El contenido de proteína total de los lisados se mide mediante el uso del kit de detección de proteínas BCA y los estándares BSA de Thermofisher. Típicamente, se esperan aproximadamente 6-7 µg de proteína por pocillo.
- Usar 50 µl de lisado por pocillo para configurar el ELISA de p21.

ELISA de p21 Humano Total: El protocolo de ensayo ELISA se sigue según las instrucciones del fabricante. Se usan 50 µl de lisado para cada pocillo y cada pocillo se prepara por triplicado.

Reactivos:

- -Ensayo Basado en Células (-)-Nutlin-3 (10 mM): Cayman Chemicals, catálogo núm. 600034
- -OptiMEM, catálogo de Invitrogen núm. 51985
- -Tampón de Lisis de Señalización Celular (10X), Cell signaling technology, catálogo núm. 9803
- -(mini)Comprimidos de coctel con inhibidor de proteasa, Roche Chemicals, catálogo núm. 04693124001
- -Comprimido de coctel de Inhibidor de fosfatasa, Roche Chemicals, catálogo núm. 04906837001
- -Kit ELISA de p21 total humano, R&D Systems, DYC1047-5
- -Solución STOP (HCL 1M), Cell Signaling Technologies, catálogo núm. 7002

Instrumentos: Microcentrífuga Eppendorf 5415D y lector de placas múltiples para lectura de absorbancia (Synergy 2).

Ejemplo 12: Ensayo de detección de Caspasa 3:

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo general:

Células sembradas en placa: tripsinizar, contar y sembrar células SJS1 a la densidad de 7500 células/100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo. El día del estudio, reemplazar el medio con RPMI-FBS 11 % (medio de ensayo) fresco. Añadir 180 µl del medio de ensayo por pocillo. Los pocillos control sin células, reciben 200 µl de medio.

Dilución de péptidos:

- Preparar soluciones madres de 10 mM de los péptidos en DMSO. Diluir en serie la solución madre mediante el uso de un esquema de dilución 1:3 para obtener soluciones 10, 3,3, 1,1, 0,33, 0,11, 0,03, 0,01 mM mediante el uso de DMSO como diluyente. Diluir los péptidos diluidos en serie con DMSO 33,3 veces con agua estéril. Esto da un intervalo de 10X de las soluciones de trabajo. Además, preparar una mezcla de DMSO/agua estéril (DMSO 3 %) para los pocillos de control.
- Por lo tanto, el intervalo de concentración de las soluciones de trabajo µM será 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM. Mezclar bien en cada etapa de dilución mediante el uso de pipeta multicanal. Añadir 20 µl de soluciones de trabajo 10X a los pocillos apropiados.
- La fila H tiene controles. H1-H3 recibirá 20 µl de medio de ensayo. H4-H9 recibirá 20 µl de vehículo DMSO-agua al 3 %. H10-H12 tendrá control de medio solo sin células.
- Control positivo: el inhibidor de molécula pequeña de MDM2, Nutlin-3a (10 mM) se usa como control positivo. Nutlin se diluye mediante el uso del mismo esquema de dilución que los péptidos.

Adición de las soluciones de trabajo a las células:

- **Añadir 10 µl de la concentración 10X deseada** al pocillo apropiado **para lograr las concentraciones finales en un volumen total de 100 µl en el pocillo.** (10 µl de péptido 300 µM + 90 µl de células en medio = concentración final 30 µM en volumen de 100 µl en pocillos). Por lo tanto, el intervalo de concentración final usado será 30, 10, 3, 1, 0,3 y 0 µM.
- Los controles incluirán pocillos que no tienen péptidos pero que contienen la misma concentración de DMSO que los pocillos que contienen péptidos, y pocillos que no contienen CÉLULAS.
- 48 horas después de la incubación, aspirar 80 µl de medio de cada pocillo; añadir 100 µl de reactivo de ensayo Caspase3/7Glo (sistema de ensayo Promega Caspase 3/7 glo, G8092) por pocillo, incubar con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.
- leer en el lector de placas múltiple Synergy Biotek para obtener luminiscencia.
- Los datos se analizan como activación de Caspasa 3 sobre células tratadas con DMSO.

Los resultados de los Ejemplos 11 y 12 se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7

SP#	caspa 0,3 uM	caspa 1 uM	caspa 3 uM	caspa 10 uM	caspa 30 uM	p21 0,3 uM	p21 1 uM	p21 3 uM	p21 10 uM	p21 30 uM
4			9	37	35			317	3049	3257
7	0,93	1,4	5,08	21,7	23,96		18	368	1687	2306
8			1	19	25			34	972	2857
10	1		1	17	32		10	89	970	2250
11	1		5	23	33,5		140	350	2075,5	3154
26	1		1	3	14					
50			8	29	29		44	646	1923	1818
65	1		6	28	34	-69	-24	122	843	1472
69	4,34	9,51	16,39	26,59	26,11	272	458,72	1281,3 9	2138,88	2138,88 1447,22
70			1	9	26		-19	68	828	1871
71	0,95	1,02	3,68	14,72	23,52		95	101	1204	2075
72	1		1	4	10	-19	57	282	772	1045
77	1		2	19	23					
80	1		2	13	20					
81	1		1	6	21		0	0	417	1649
99	1		7	31	33	-19	117	370	996	1398
109			4	16	25		161	445	1221	1680
114	1		6	28	34	-21	11	116	742	910
115	1		10	26	32	-10	36	315	832	1020
118	1		2	18	27	-76	-62	-11	581	1270
120	2		11	20	30	-4	30	164	756	1349
121	1		5	19	30	9	33	81	626	1251
122	1		2	15	30	-39	-18	59	554	1289
123	1		1	6	14					
125	1		3	9	29	50	104	196	353	1222

(continuación)

SP#	caspasa 0,3 uM	caspasa 1 uM	caspasa 3 uM	caspasa 10 uM	caspasa 30 uM	p21 0,3 uM	p21 1 uM	p21 3 uM	p21 10 uM	p21 30 uM
126	1		1	6	30	-47	-10	90	397	1443
127	1		1	4	13					
130	1		2	6	17					
139	1		2	9	18					
142	1		2	15	20					
144	1		4	10	16					
148	1		11	23	31	-23	55	295	666	820
149	1		2	4	10	35	331	601	1164	1540
150	2		11	19	35	-37	24	294	895	906
153	2		10	15	20					
154	2,68	4	13,93	19,86	30,14	414,04	837,45	1622,42	2149,51	2156,98
158	1		1,67	5	16,33	-1,5	95	209,5	654	1665,5
160	2		10	16	31	-43	46	373	814	1334
161	2		8	14	22	13	128	331	619	1078
170	1		1	16	20					
175	1		5	12	21	-65	1	149	543	1107
177	1		1	8	20					
183	1		1	4	8	-132	-119	-14	1002	818
196	1		4	33	26	-49	-1	214	1715	687
197	1		1	10	20					
203	1		3	12	10	77	329	534	1805	380
204	1		4	10	10	3	337	928	1435	269
218	1		2	8	18					
219	1		5	17	34	28	53	289	884	1435
221	1		3	6	12	127	339	923	1694	1701

(continuación)

SP#	caspa 0,3 uM	caspa 1 uM	caspa 3 uM	caspa 10 uM	caspa 30 uM	p21 0,3 uM	p21 1 uM	p21 3 uM	p21 10 uM	p21 30 uM
223	1		1	5	18					
230	1		2	3	11	245,5	392	882	1549	2086
233	6	8	17	22	23	2000	2489	3528	3689	2481
237	1		5	9	15	0	0	2	284	421
238	1		2	4	21	0	149	128	825	2066
242	1		4	5	18	0	0	35	577	595
243	1		2	5	23	0	0	0	456	615
244	1		2	7	17	0	178	190	708	1112
245	1		3	9	16	0	0	0	368	536
247	1		3	11	24	0	0	49	492	699
248						0	50	22	174	1919
249	2		5	11	23	0	0	100	907	1076
251						0	0	0	0	0
252						0	0	0	0	0
253						0	0	0	0	0
254	1	3	7	14	22	118	896	1774	3042	3035
286	1	4	11	20	22	481	1351	2882	3383	2479
287	1	1	3	11	23	97	398	986	2828	3410
315	11	14,5	25,5	32	34	2110	2209	2626	2965	2635
316	6,5	10,5	21	32	32,5	1319	1718	2848	2918	2540
317	3	4	9	26	35	551	624	776	1367	1076
331	4,5	8	11	14,5	30,5	1510	1649	2027	2319	2509
338	1	5	23	20	29	660,37	1625,38	3365,87	2897,62	2727
341	3	8	11	14	21	1325,62	1873	2039,75	2360,75	2574
343	1	1	2	5	29	262	281	450	570	1199

(continuación)

SP#	caspasa 0,3 uM	caspasa 1 uM	caspasa 3 uM	caspasa 10 uM	caspasa 30 uM	p21 0,3 uM	p21 1 uM	p21 3 uM	p21 10 uM	p21 30 uM
346						235,86	339,82	620,36	829,32	1695,78
347	2	3	5	8	29	374	622	659	905	1567
349	1	8	11	16	24	1039,5	1598,88	1983,75	2191,25	2576,38
351	3	9	13	15	24	1350,67	1710,67	2030,92	2190,67	2668,54
353	1	2	5	7	30	390	490	709	931	1483
355	1	4	11	13	30	191	688	1122	1223	1519
357	2	7	11	15	23	539	777	1080	1362	1177
358	1	2	3	6	24	252	321	434	609	1192
359	3	9	11	13	23	1163,29	1508,79	1780,29	2067,67	2479,29
416						33,74	39,82	56,57	86,78	1275,28
417						0	0	101,13	639,04	2016,58
419						58,28	97,36	221,65	1520,69	2187,94
432						54,86	68,86	105,11	440,28	1594,4

Ejemplo 13. Lisis Celular mediante Macrocielos Peptidomiméticos

Las células SJSA-1 se sembraron un día antes en placas transparentes de fondo plano (Costar, número de catálogo 353072) a 7500 células/pocillo con 100 ul/pocillo de medio de crecimiento, dejando vacías las columnas 10-12 de la fila H para el medio solo. El día del ensayo, el medio se intercambió con medio RPMI FBS 1 %, 90 ul de medio por pocillo.

Se prepararon soluciones madre 10 mM de los macrocielos peptidomiméticos en DMSO al 100 %. Después los macrocielos peptidomiméticos se diluyeron en serie, en DMSO al 100 %, y después se diluyeron 20 veces en agua estéril para preparar soluciones madre de trabajo en DMSO al 5 %/agua de cada macrociclo peptidomimético a concentraciones que varían desde 500 uM hasta 62,5 uM.

Se añadieron 10 µl de cada compuesto a los 90 µl de células SJSA-1 para producir concentraciones finales de 50 µM a 6,25 µM en medio que contenía DMSO al 0,5 %. La muestra de control negativo (no lítico) era DMSO al 0,5 % solo y las muestras de control positivo (lítico) incluyen Melittin 10 uM y Triton X-100 al 1 %.

Las placas de células se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de 1 hora de incubación, se examina la morfología de las células al microscopio y después las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfieren 40 ul de sobrenadante para cada macrociclo peptidomimético y muestra de control a placas de ensayo transparentes. La liberación de LDH se mide mediante el uso del kit de ensayo de citotoxicidad de LDH de Cayman, catálogo núm. 1000882.

Los resultados se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8

SP#	6,25 µM % de células lisadas (1h LDH)	12,5 µM % de células lisadas (1h LDH)	25 µM % de células lisadas (1h LDH)	50 µM % de células lisadas (1h LDH)
3	1	0	1	3
4	-2	1	1	2
6	1	1	1	1
7	0	0	0	0
8	-1	0	1	1
9	-3	0	0	2
11	-2	1	2	3
15	1	2	2	5
18	0	1	2	4
19	2	2	3	21
22	0	-1	0	0
26	2	5	-1	0
32	0	0	2	0
39	0	-1	0	3
43	0	0	-1	-1
55	1	5	9	13
65	0	0	0	2
69	1	0,5	-0,5	5
71	0	0	0	0
72	2	1	0	3
75	-1	3	1	1
77	-2	-2	1	-1
80	0	1	1	5
81	1	1	0	0
82	0	0	0	1
99	1,5	3	2	3,5
108	0	0	0	1
114	3	-1	4	9
115	0	1	-1	6
118	4	2	2	4
120	0	-1	0	6
121	1	0	1	7
122	1	3	0	6
123	-2	2	5	3
125	0	1	0	2
126	1	2	1	1

ES 2 817 877 T3

(continuación)

SP#	6,25 μ M % de células lisadas (1h LDH)	12,5 μ M % de células lisadas (1h LDH)	25 μ M % de células lisadas (1h LDH)	50 μ M % de células lisadas (1h LDH)	
5	130	1	3	0	-1
	139	-2	-3	-1	-1
	142	1	0	1	3
	144	1	2	-1	2
	147	8	9	16	55
10	148	0	1	-1	0
	149	6	7	7	21
	150	-1	-2	0	2
	153	4	3	2	3
	154	-1	-1,5	-1	-1
15	158	0	-6	-2	
	160	-1	0	-1	1
	161	1	1	-1	0
	169	2	3	3	7
20	170	2	2	1	-1
	174	5	3	2	5
	175	3	2	1	0
	177	-1	-1	0	1
	182	0	2	3	6
25	183	2	1	0	3
	190	-1	-1	0	1
	196	0	-2	0	3
	197	1	-4	-1	-2
30	203	0	-1	2	2
	204	4	3	2	0
	211	5	4	3	1
	217	2	1	1	2
	218	0	-3	-4	1
	219	0	0	-1	2
35	221	3	3	3	11
	223	-2	-2	-4	-1
	230	0,5	-0,5	0	3
	232	6	6	5	5
40	233	2,5	4,5	3,5	6
	237	0	3	7	55
	243	4	23	39	64
	244	0	1	0	4
	245	1	14	11	56
45	247	0	0	0	4
	249	0	0	0	0
	254	11	34	60	75
	279	6	4	5	6
	280	5	4	6	18
50	284	5	4	5	6
	286	0	0	0	0
	287	0	6	11	56
	316	0	1	0	1
	317	0	1	0	0
55	331	0	0	0	0
	335	0	0	0	1
	336	0	0	0	0
	338	0	0	0	1
60	340	0	2	0	0
	341	0	0	0	0
	343	0	1	0	0
	347	0	0	0	0
	349	0	0	0	0
65	351	0	0	0	0
	353	0	0	0	0

(continuación)

SP#	6,25 μ M % de células lisadas (1h LDH)	12,5 μ M % de células lisadas (1h LDH)	25 μ M % de células lisadas (1h LDH)	50 μ M % de células lisadas (1h LDH)
355	0	0	0	0
357	0	0	0	0
359	0	0	0	0
413	5	3	3	3
414	3	3	2	2
415	4	4	2	2

Ejemplo 14: ensayo GRIP de p53

El ensayo de redistribución Thermo Scientific * Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) controla la interacción de la proteína con MDM2 y la translocación celular de p53 marcado con GFP en respuesta a compuestos farmacológicos u otros estímulos. Las células CHO-hIR recombinantes expresan de manera estable p53(1-312) humana fusionada al extremo C terminal de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y PDE4A4-MDM2(1-124), una proteína de fusión entre PDE4A4 y MDM2(1-124). Estas células proporcionan un sistema de ensayo listo para usar con el propósito de medir los efectos de las condiciones experimentales sobre la interacción de p53 y MDM2. Las imágenes y el análisis se realizaron con una plataforma HCS.

Las células CHO-hIR se mantienen regularmente en medio F12 de Ham suplementado con penicilina-estreptomicina al 1 %, Geneticina 0,5 mg/mL, zeocina 1 mg/mL y FBS al 10 %. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7000 células/100 μ l por pocillo 18-24 horas antes de realizar el ensayo mediante el uso de medio de cultivo. Al día siguiente, se cambia el medio y se añade PD177 a las células hasta la concentración final de 3 μ M para activar la formación de focos. Los pocillos de control se mantienen sin solución de PD-177. 24 horas después de la estimulación con PD177, las células se lavan una vez con medio Opti-MEM y se añaden a las células 50 μ L de medio Opti-MEM complementado con PD-177 (6 μ M). Los péptidos se diluyen a partir de soluciones madres 10 mM en DMSO a soluciones de trabajo de 500 μ M en agua estéril, y se realizan diluciones adicionales en DMSO al 0,5 % para mantener constante la concentración de DMSO en las muestras. La concentración final más alta de DMSO es del 0,5 % y se usa como control negativo. El ensayo basado en células de Cayman Chemicals (-)-Nutlin-3 (10 mM) se usa como control positivo. Nutlin se diluyó mediante el uso del mismo esquema de dilución que los péptidos. Se añaden 50 μ l de 2X las concentraciones deseadas al pocillo apropiado para lograr las concentraciones finales deseadas. Después, las células se incuban con péptidos durante 6 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. En el período posterior a la incubación, las células se fijan mediante la aspiración suave del medio y se adicionan 150 μ l de solución fijadora por pocillo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavan 4 veces con 200 μ l de PBS por pocillo cada vez. Al final del último lavado, se añaden 100 μ l de solución de tinción Hoechst 1 μ M. Las placas selladas se incuban durante al menos 30 minutos en la oscuridad, se lavan con PBS para eliminar el exceso de tinción y se añade PBS a cada pocillo. Las placas pueden almacenarse a 4 °C en la oscuridad hasta 3 días. La imagen de la translocación de p53/MDM2 se obtiene mediante el uso del módulo de translocación molecular en el instrumento Cellomics Arrayscan mediante el uso de un objetivo 10x, conjuntos de filtros XF-100 para Hoechst y GFP. Los parámetros de salida fueron la Media de la Relación CircRINGAveInten (la relación de las intensidades de fluorescencia promedio del núcleo y el citoplasma, (promedio por pocillo)). El número mínimamente aceptable de células por pocillo usado para el análisis de imágenes se estableció en 500 células.

Ejemplo 15: Estudio de cáncer de mama MCF-7 mediante el uso de SP315, SP249 y SP154

Se realizó un estudio de xenoinjerto para evaluar la eficacia de SP315, SP249 y SP154 en la inhibición del crecimiento tumoral en ratones atímicos en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MCF-7. Un péptido grapado de control negativo. El SP252, una mutación puntual de SP154 (F a A en la posición 19) se evaluó, además, en un grupo; este péptido no había mostrado actividad en el ensayo de viabilidad in vitro de SJSA-1. Se implantaron gránulos de 0,72 mg de 17 β -estradiol de liberación lenta durante 90 días (Innovative Research, Sarasota, FL) por vía subcutánea (sc) en la nuca un día antes de la implantación de las células tumorales (Día -1). El Día 0, se implantaron células tumorales MCF-7 sc en el flanco de ratones desnudos hembra (CrI:NU-Foxnlnu). El Día 18, los tumores sc resultantes se midieron mediante el uso de calibradores para determinar su longitud y ancho y se pesaron los ratones. Los tamaños de los tumores se calcularon mediante el uso de la fórmula (largo x ancho²)/2 y se expresaron como milímetros cúbicos (mm³). Los ratones con tumores menores de 85,3 mm³ o mayores de 417,4 mm³ se excluyeron de la formación de grupos posterior. Se formaron trece grupos de ratones, 10 ratones por grupo, mediante aleatorización de manera que los tamaños medios de los tumores del grupo fueran esencialmente equivalentes (media de los grupos \pm desviación estándar de los grupos = 180,7 \pm 17,5 mm³).

Las soluciones de dosificación de SP315, SP249, SP154 y SP252 se prepararon a partir de péptidos formulados en un vehículo que contenía MPEG(2K)-DSPE a una concentración de 50 mg/mL en una solución salina tamponada con histidina 10 mM a pH 7. Esta formulación se preparó una vez para la duración del estudio. Este vehículo se usó como control del vehículo en el estudio posterior.

A cada grupo se le asignó un régimen de tratamiento diferente. El grupo 1, como grupo de control negativo del vehículo, recibió el vehículo administrado a 8 mL/kg de peso corporal por vía intravenosa (iv) tres veces por semana desde los Días 18-39. Los grupos 2 y 3 recibieron SP154 como inyección intravenosa a 30 mg/kg tres veces por semana o 40 mg/kg dos veces por semana, respectivamente. El grupo 4 recibió SP249 6,7 mg/kg como inyección intravenosa tres veces por semana. Los grupos 5, 6, 7 y 8 recibieron SP315 como una inyección intravenosa de 26,7 mg/kg tres veces por semana, 20 mg/kg dos veces por semana, 30 mg/kg dos veces por semana o 40 mg/kg dos veces por semana, respectivamente. El grupo 9 recibió SP252 30 mg/kg como una inyección intravenosa tres veces por semana.

Durante el período de dosificación, se pesaron los ratones y se midieron los tumores 1-2 veces por semana. Los resultados en términos de volumen tumoral se muestran en las Figuras 3-6 y la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de vehículo, el cambio de peso corporal y el número de ratones con ≥ 20 % de pérdida de peso corporal o muerte se muestran en la Tabla 9. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó como $\%TGI = 100 - [(TuVol)^{Tratado-día\ x} - TuVol^{Tratado-día\ 18}] / (TuVol^{Control\ negativo\ vehículo - día\ x} - TuVol^{Control\ negativo\ vehículo - día\ 18}) * 100$ donde x= día que se evalúa el efecto del tratamiento. El grupo 1, el grupo de control negativo del vehículo mostró una buena tasa de crecimiento tumoral para este modelo de tumor.

Para SP154, en el grupo que recibió una dosis de 40 mg/kg dos veces por semana, 2 ratones murieron durante el tratamiento, lo que indica que este régimen de dosificación no era tolerable. El régimen de dosificación de 30 mg/kg de SP154 tres veces por semana fue bien tolerado y produjo un TGI del 84 %.

Para SP249, el grupo al que se le administró 6,7 mg/kg tres veces por semana, 4 ratones murieron durante el tratamiento, lo que indica que este régimen de dosificación no era tolerable.

Todos los regímenes de dosificación usados para SP315 mostraron una buena tolerabilidad, sin pérdida de peso corporal o muertes. La dosificación con SP315 40 mg/kg dos veces por semana produjo el TGI más alto (92 %). Los regímenes de dosificación de SP315 de 26,7 mg/kg tres veces por semana, 20 mg/kg dos veces por semana, 30 mg/kg dos veces por semana produjeron TGI de 86, 82, y 85 %, respectivamente.

Para SP252, la mutación puntual de SP154 que no muestra una actividad apreciable en ensayos in vitro, la dosificación de 30 mg/kg tres veces por semana fue bien tolerada sin pérdida de peso corporal o muertes registradas. Mientras que el TGI del 88 % se observó el Día 32, ese TGI se redujo al 41 % el Día 39.

Los resultados de este Ejemplo se muestran en las Figuras 3-6 y se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

Número del grupo	Grupo de tratamiento	% de cambio de peso corporal	Núm. con ≥ 10 % de pérdida de peso corporal	Núm. con ≥ 20 % de pérdida de peso corporal o muerte	% TGI
1	Vehículo	+8,6	0/10	0/10	-
2	SP154 30 mg/kg 3x/semana iv	+5,7	0/10	0/10	*84
3	SP154 40 mg/kg 2x/semana iv	N/A	0/10	2/10 (2 muertos)	Régimen no tolerado
4	SP249 6,7 mg/kg 3x/semana iv	N/A	6/10	4/10	Régimen no tolerado
5	SP315 26,7 mg/kg 3x/semana iv	+3,7	0/10	0/10	*86
6	SP315 20 mg/kg 2x/semana iv	+3,9	0/10	0/10	*82
7	SP315 30 mg/kg 2x/semana iv	+8,0	0/10	0/10	*85
8	SP315 40 mg/kg 2x/semana iv	+2,1	0/10	0/10	*92
9	SP252 30 mg/kg 3x/semana iv	+3,3	0/10	0/10	*41

***p $\leq 0,05$ Vs Control del vehículo**

Ejemplo 21: Determinación de solubilidad para macrociclos peptidomiméticos

Los macrociclos peptidomiméticos se disuelven primero en N, N-dimetilacetamida pura (DMA, Sigma-Aldrich, 38840-1L-F) para preparar soluciones madre 20X en un intervalo de concentración de 20-140 mg/mL. Las soluciones madre de DMA se diluyen 20 veces en un vehículo acuoso que contiene Solutol-HS-15 al 2 %, Histidina 25 mM, Manitol 45 mg/mL para obtener concentraciones finales de 1-7 mg/mL de los macrociclos peptidomiméticos en DMA al 5 %,

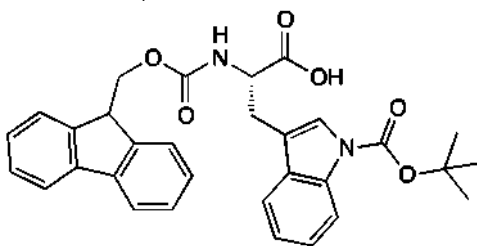
Solutol-HS-15 2 %, Histidina 25 mM, Manitol 45 mg/mL. Las soluciones finales se mezclan suavemente mediante pipeteo repetido o agitación ligera con vortex, y después las soluciones finales se someten a ultrasonido durante 10 minutos a temperatura ambiente en un baño de agua ultrasónico. Después se realiza una observación visual cuidadosa bajo la luz de la campana mediante el uso de un amplificador visual 7x para determinar si existe un precipitado en el fondo o como una suspensión. Se evalúan intervalos de concentración adicionales según sea necesario para determinar el límite máximo de solubilidad para cada macrociclo peptidomimético.

Los resultados de este Ejemplo se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 22: Preparación de macrociclos peptidomiméticos mediante el uso de un aminoácido protegido con Boc.

Se prepararon precursores de macrociclo peptidomimético como se describe en el Ejemplo 2 que comprende un aminoácido R8 en la posición "i" y un aminoácido S5 en la posición "i+7". El aminoácido en la posición "i+3" era un triptófano protegido con Boc que se incorporó durante la síntesis en fase sólida.

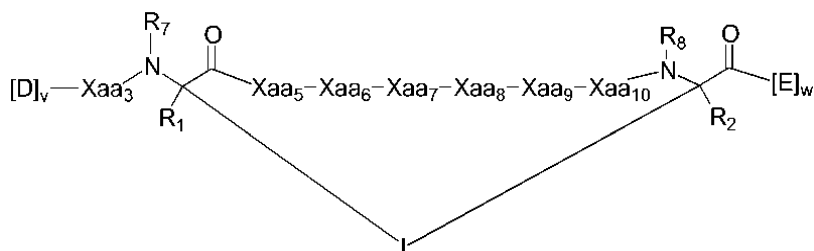
Específicamente, el aminoácido triptófano protegido con Boc que se muestra a continuación (y disponible comercialmente, por ejemplo, de Novabiochem) se usó durante la síntesis en fase sólida:



La metátesis se realizó mediante el uso de un catalizador de rutenio antes de las etapas de escisión y desprotección. Se determinó por análisis de HPLC que la composición que se obtiene después de la ciclación contenía principalmente macrociclos peptidomiméticos que tienen un reticulante que comprende una trans olefina ("iso2", que comprende el doble enlace en una configuración E). Inesperadamente, se observó una relación de 90:10 para los productos trans y cis, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un macrociclo peptidomimético de la fórmula:



o una sal aceptable farmacéuticamente de este,
en donde:

cada uno de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉ y Xaa₁₀ es independientemente un aminoácido,
en donde al menos tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉ y Xaa₁₀ son los mismos aminoácidos que el
aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-
Ser₁₂ (SEQ ID NO: 8), en donde cada X₄ y X₁₁ es independientemente un aminoácido;

cada D es independientemente un aminoácido;

cada E es independientemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (alanina), D-Ala
(D-alanina), Aib (ácido α-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina), y Ser (serina);

R₁ y R₂ son independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo,
heteroalquilo o heterocicloalquilo, no sustituido o sustituido con halo-; o forma un enlazador formador de
macrociclo L' conectado a la posición alfa de uno de dichos aminoácidos D o E;

cada R₃ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo,
heterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R₅;

L y L' son independientemente un enlazador formador de macrociclo de la fórmula L₁-L₂;

cada L₁ y L₂ es independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno,
heterocicloalquileno, arileno, heteroarileno o [-R₄-K-R₄]_n, cada uno de los cuales está opcionalmente
sustituido con R₅;

cada R₄ es independientemente alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, cicloalquileno,
heterocicloalquileno, arileno o heteroarileno;

cada K es independientemente O, S, SO, SO₂, CO, CO₂, o CONR₃;

cada R₅ es independientemente halógeno, alquilo, -OR₆, -N(R₆)₂, -SR₆, -SOR₆, -SO₂R₆, -CO₂R₆, una porción
fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

cada R₆ es independientemente -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilalquilo,
heterocicloalquilo, una porción fluorescente, un radioisótopo o un agente terapéutico;

R₇ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo,
heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con
un residuo D;

R₈ es -H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilalquilo,
heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido con R₅, o parte de una estructura cíclica con
un residuo E;

v es un número entero de 1-1000;

w es un número entero de 3-1000; y

n es un número entero de 1-5.

2. El macrociclo peptidomimético de conformidad con la reivindicación 1, en donde cada E es independientemente
un aminoácido seleccionado de Ala (alanina), D-Ala (D-alanina) y Ser (serina).
3. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con la
reivindicación 1 o 2, en donde v es un número entero de 2 a 10.
4. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera
de las reivindicaciones 1 a 3, en donde w es un número entero de 3 a 6.
5. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera
de las reivindicaciones 1 a 4, en donde Xaa₅ es Glu.
6. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera
de las reivindicaciones 1 a 5, en donde v es 2.
7. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera
de las reivindicaciones 1 a 6, en donde w es un número entero de 6 a 10.

8. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde (a) cada uno de L₁ y L₂ es independientemente alquileo o alquenileno y/o (b) cada L es independientemente alquileo, alquenileno o alquinileno.

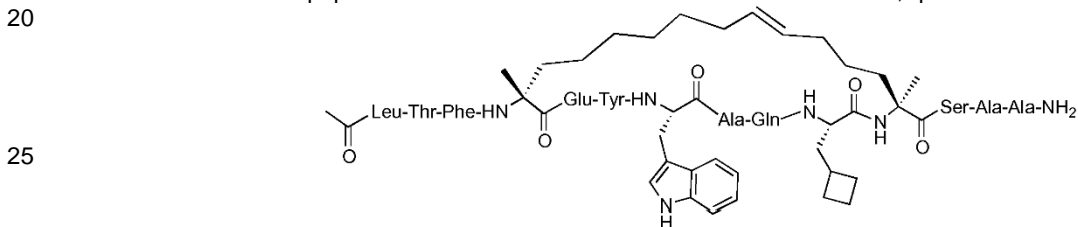
5 9. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde cada R₁ y R₂ es independientemente H o alquilo.

10. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el macrociclo peptidomimético o una sal aceptable farmacéuticamente de este comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

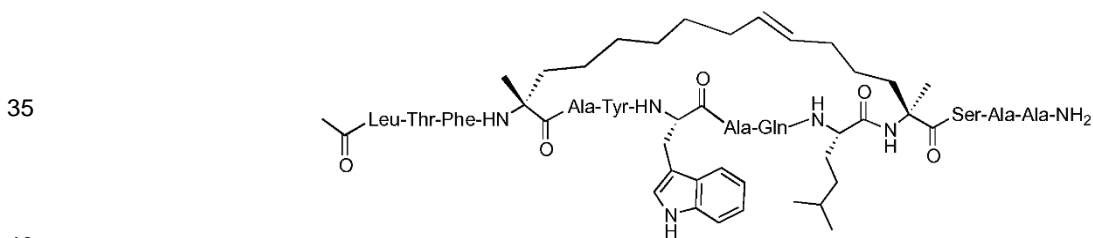
11. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde w es 6.

12. El macrociclo peptidomimético, o sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde [D]_v es -Leu₁-Thr₂.

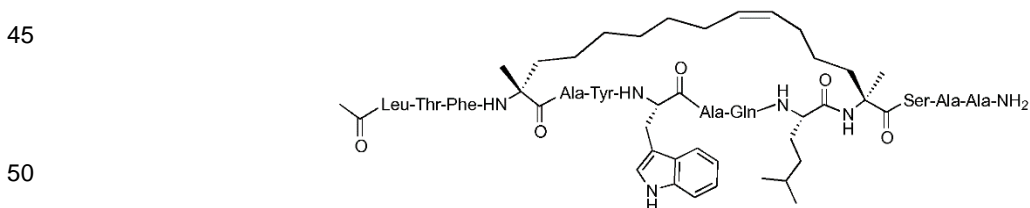
13. El macrociclo peptidomimético de conformidad con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



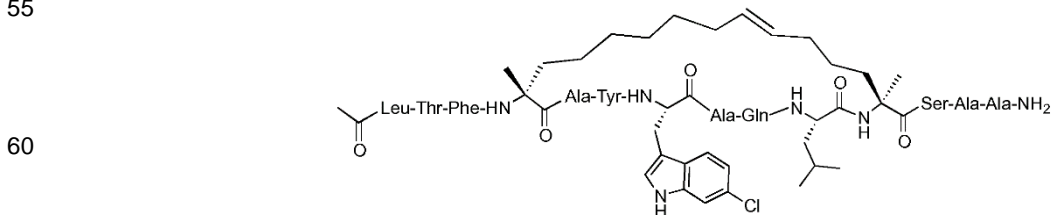
30 (SEQ ID NO: 163)
o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o



45 (SEQ ID NO: 124)
o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

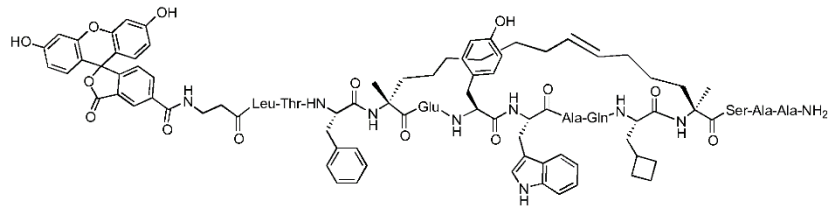


55 (SEQ ID NO: 123)
o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o



(SEQ ID NO: 108)
o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

5

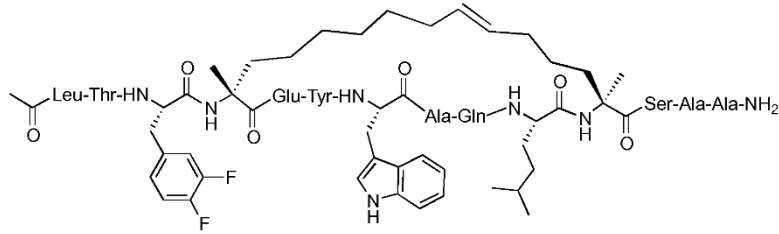


(SEQ ID NO: 376)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

10

15

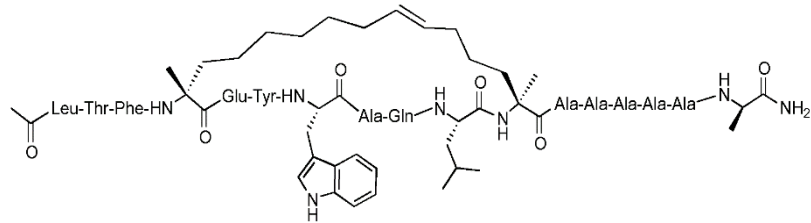


20

(SEQ ID NO: 169)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

25

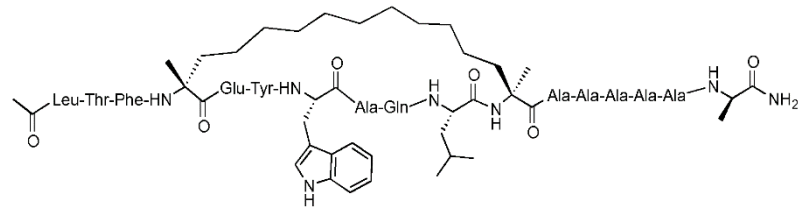


30

(SEQ ID NO: 340)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

35

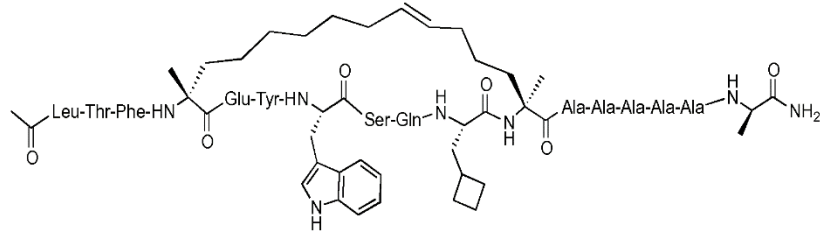


40

(SEQ ID NO: 454)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

45



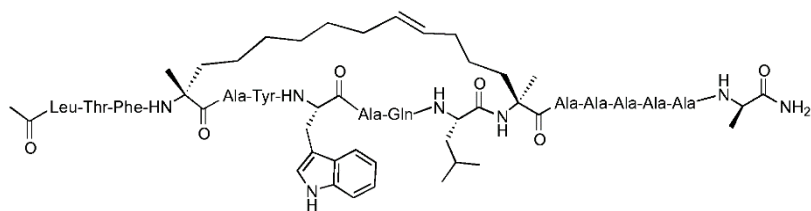
50

55

(SEQ ID NO: 360)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

60

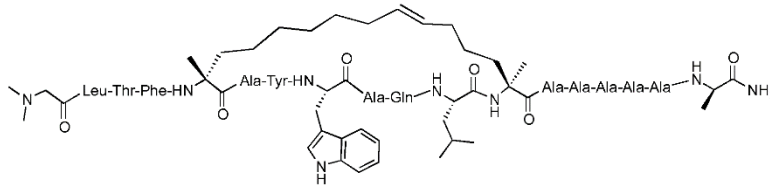


65

(SEQ ID NO: 324)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

5

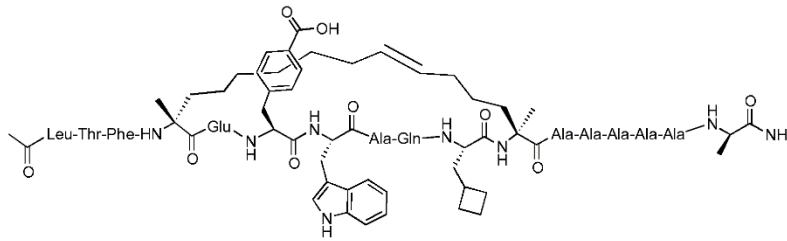


10

(SEQ ID NO: 446)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

15

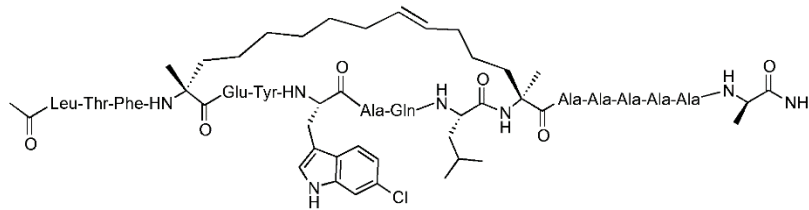


20

(SEQ ID NO: 358)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

25

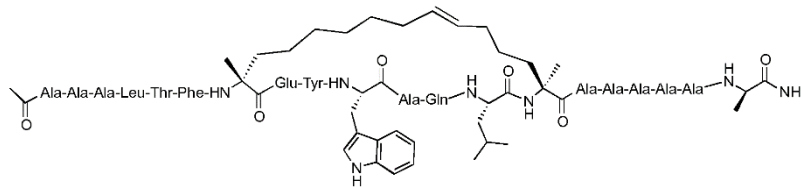


30

(SEQ ID NO: 464)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

35

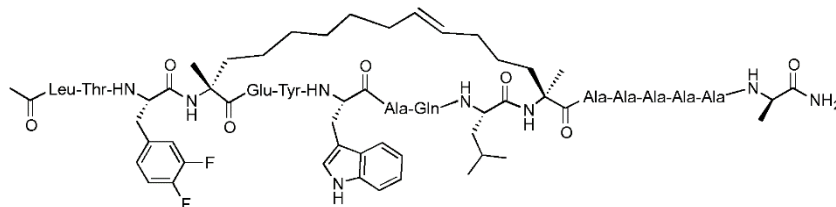


40

(SEQ ID NO: 466)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

45



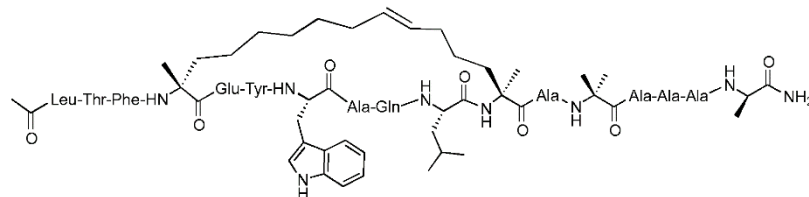
50

55

(SEQ ID NO: 467)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

60

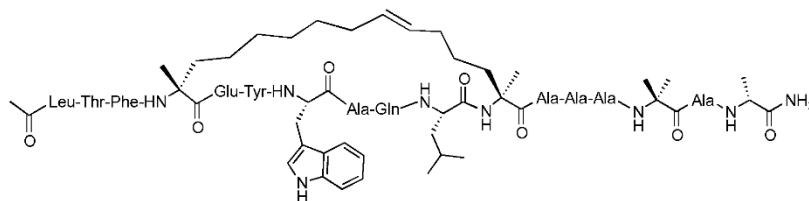


65

(SEQ ID NO: 471)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

5

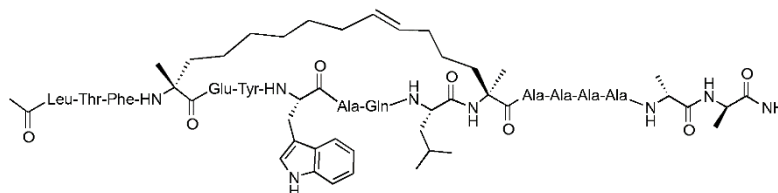


10

(SEQ ID NO: 473)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

15

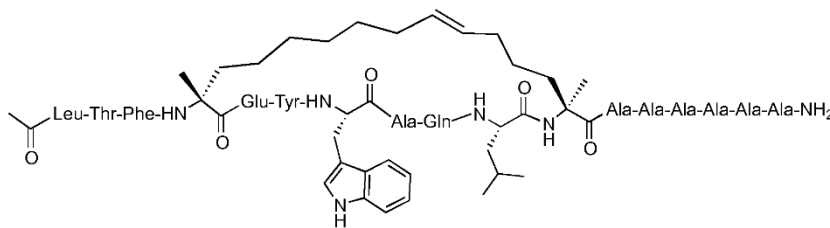


20

(SEQ ID NO: 481)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

25

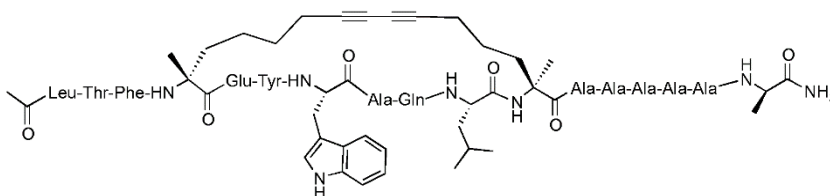


30

(SEQ ID NO: 482)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este; o

35



40

(SEQ ID NO: 572)

o una sal aceptable farmacéuticamente de este.

45

14. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 570.
15. El macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10-457.
16. Una composición farmacéutica que comprende un macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
17. Un macrociclo peptidomimético, o una sal aceptable farmacéuticamente de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para usar en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

55

Figura 1

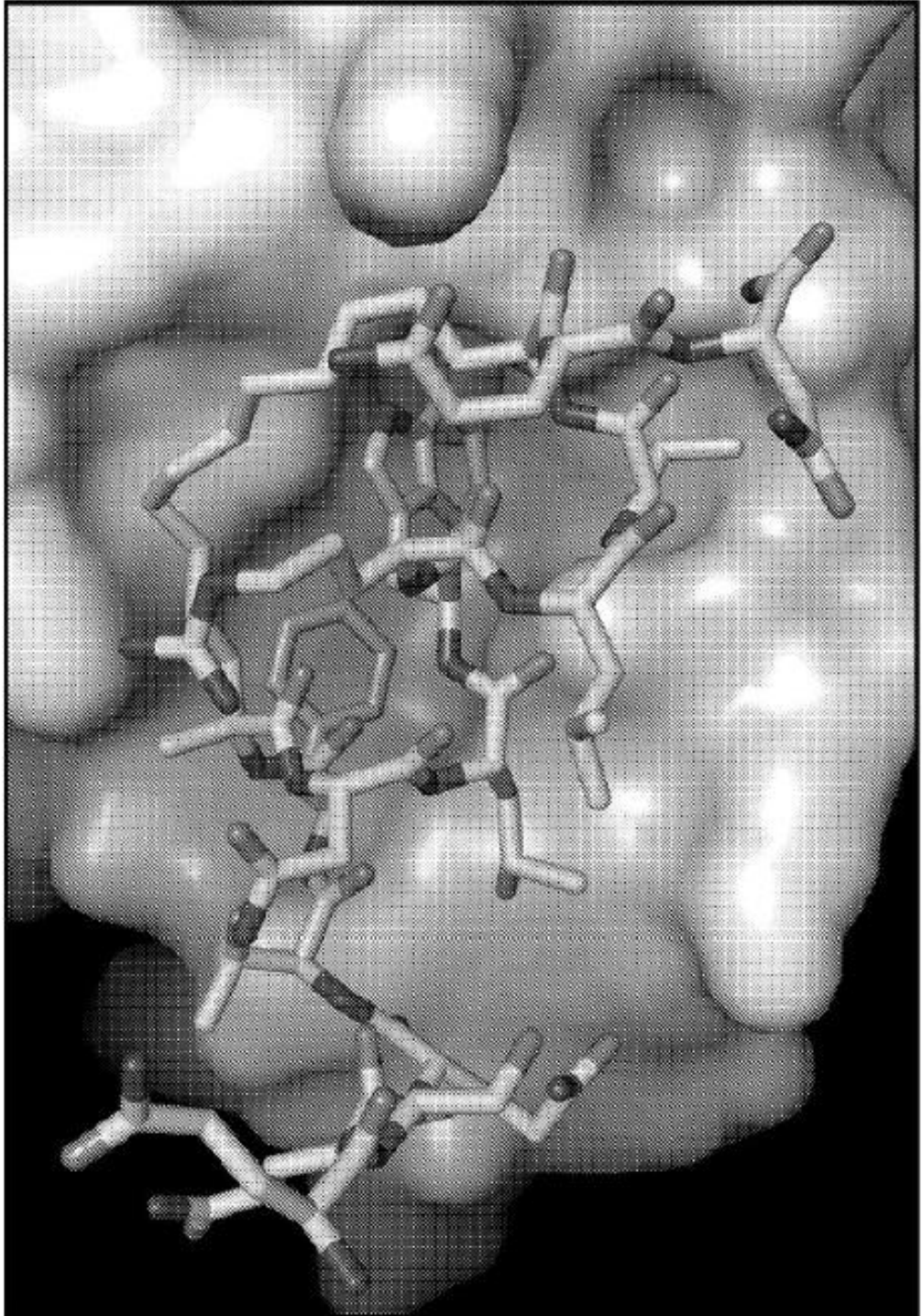


Figura 2

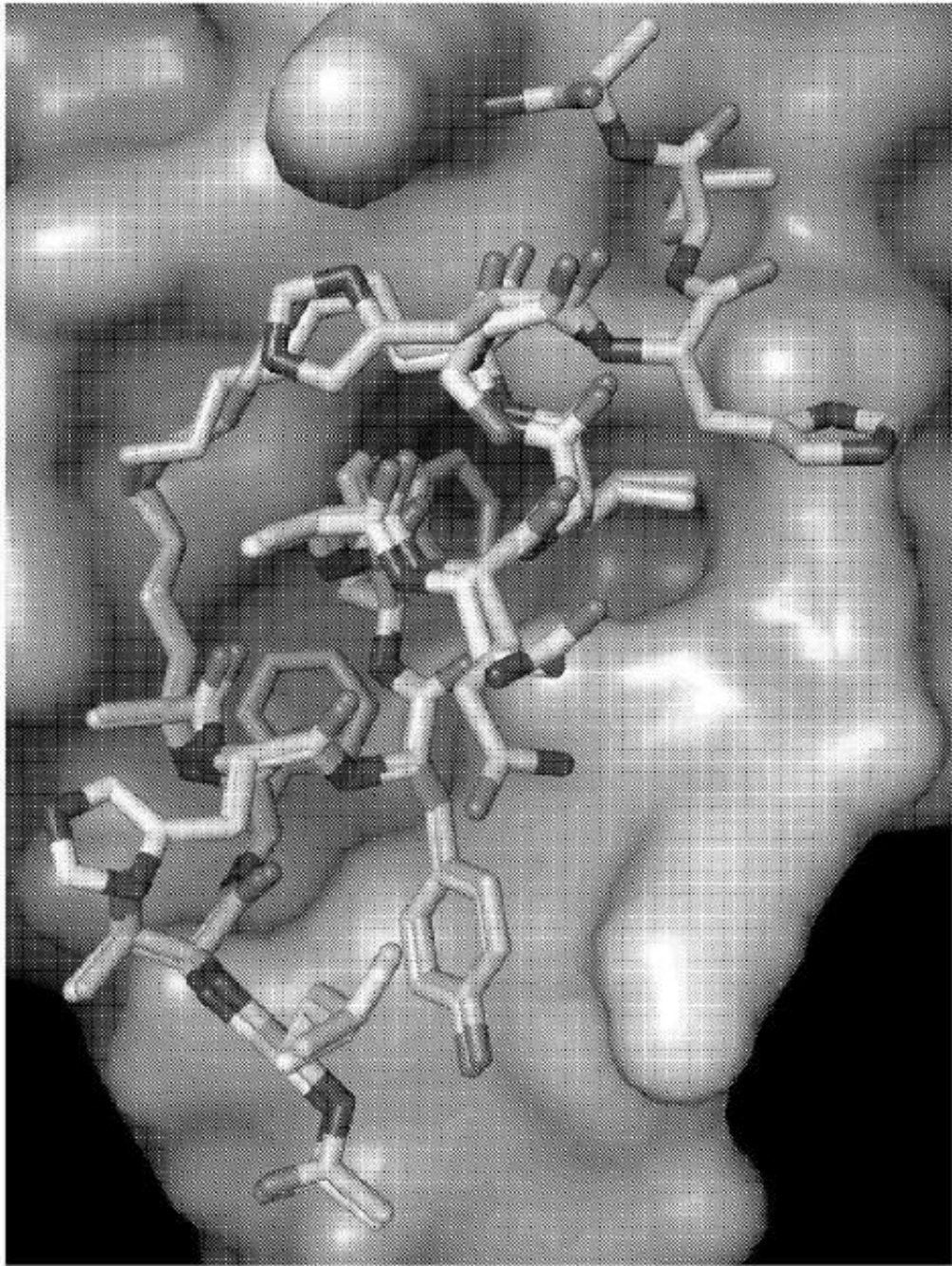


Figura 3

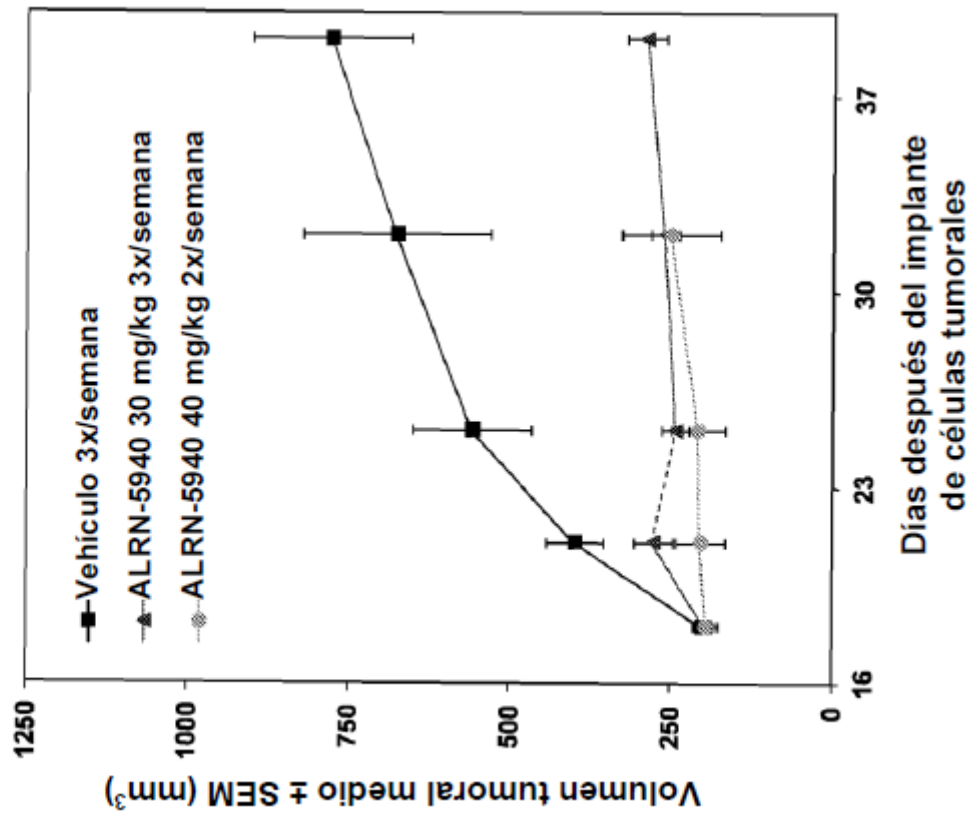


Figura 4

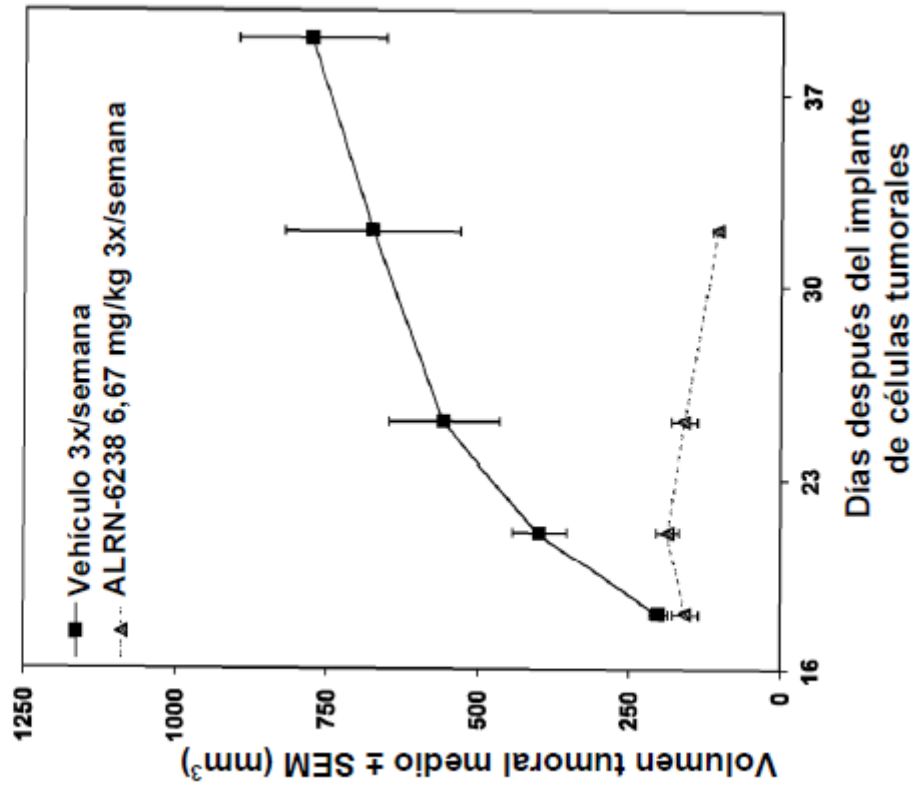


Figura 5

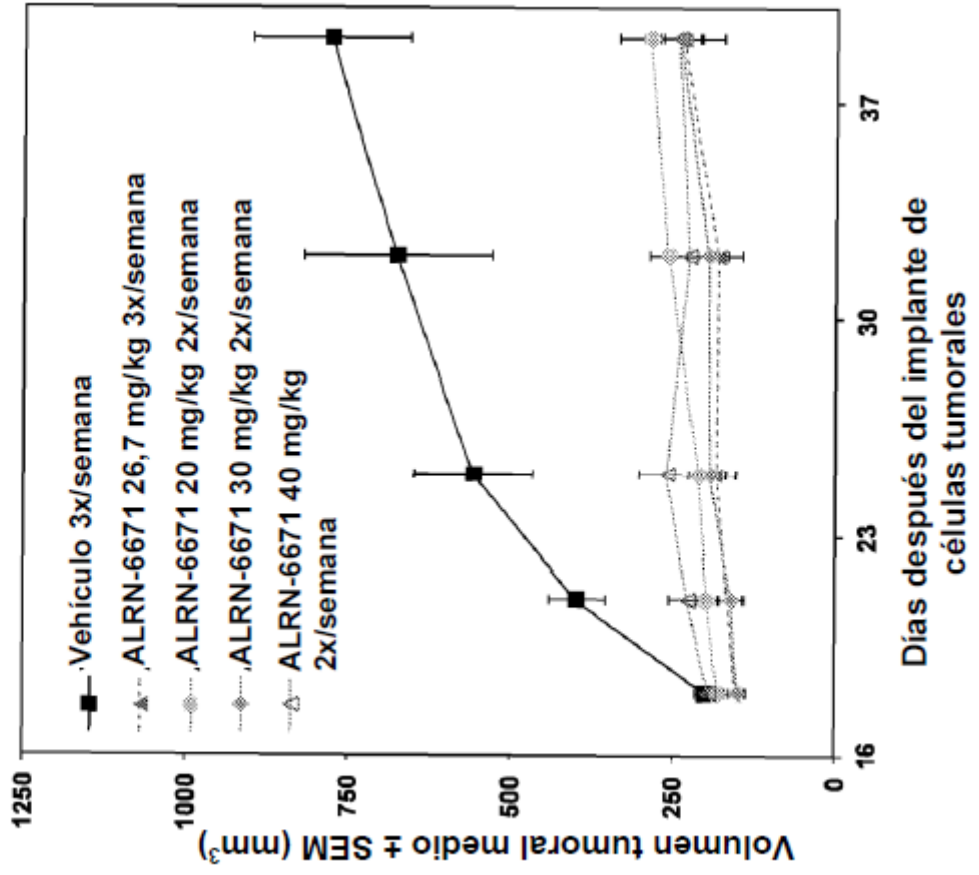


Figura 6

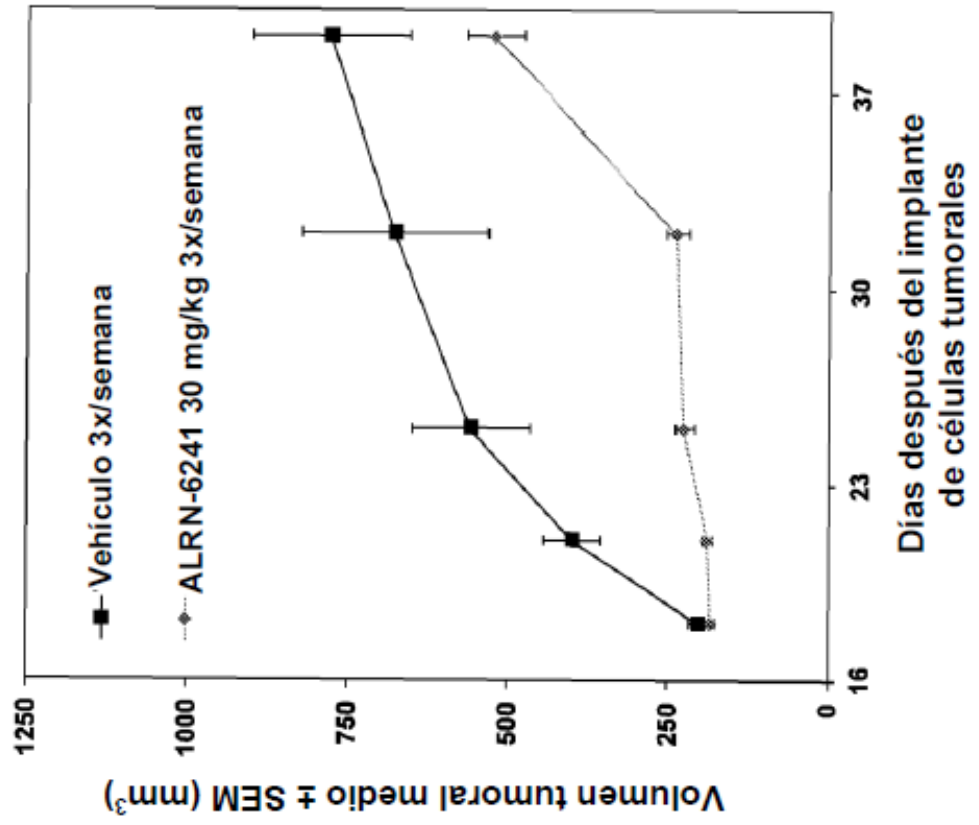


Figura 7

