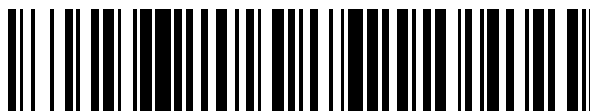


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 076**

51 Int. Cl.:

C07K 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2012 PCT/EP2012/060766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182240**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 12725830 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2859012**

54 Título: **Peptidomiméticos de horquilla β**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2017

73 Titular/es:

**POLYPHOR AG (100.0%)
Hegenheimermattweg 125
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**GOMBERT, FRANK OTTO;
OBRECHT, DANIEL;
LEDERER, ALEXANDER;
ZIMMERMANN, JOHANN y
OEFNER, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 647 076 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

Peptidomiméticos de horquilla β .

5 La presente invención da a conocer peptidomiméticos de horquilla β que tienen actividad antagonista de CXCR4.

10 Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención son ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre Cys⁴ y Cys¹¹, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, siendo Xaa³ Tyr, Tyr(Me), tal como se describe en el presente documento, a continuación, o Tyr(CF₃), tal como se describe en el presente documento, a continuación, siendo Xaa⁶ Ala o Acc, tal como se describe en el presente documento, a continuación, siendo Xaa⁸ Orn(iPr), tal como se describe en el presente documento a continuación, siendo Xaa¹³ Gin o Glu, siendo Xaa¹⁴ Lys(iPr), tal como se describe en el presente documento a continuación, siendo Xaa¹⁵ ^DLys(iPr), tal como se describe en el presente documento a continuación.

15 Además, la presente invención da a conocer un procedimiento de síntesis eficaz mediante el cual, si se desea, se pueden preparar estos compuestos en formato de biblioteca en paralelo. Estos peptidomiméticos de horquilla β tienen propiedades farmacológicas favorables y, además, muestran una unión adecuada a proteínas plasmáticas y velocidades de eliminación adecuadas. Por lo tanto, se pueden utilizar como principios activos en cantidades bajas para todo tipo de formulaciones de fármacos, en particular para formulaciones de fármacos de liberación prolongada.

20 Muchos procedimientos biológicos médicamente significativos están mediados por transducción de señales, que implica, en general, quimioquinas y sus receptores y, en particular, el factor 1 derivado del estroma (SDF-1/CXCL12) y su receptor CXCR4.

25 El CXCR4 y su ligando, el SDF-1 están implicados en el tráfico de las células B, células madre hematopoyéticas (HSC) y células progenitoras hematopoyéticas (HPC). Por ejemplo, el CXCR4 se expresa en células CD34+ y se ha implicado en el proceso de migración y retorno celular de CD34+ (S.M. Watt, S.P. Forde, *Vox sanguinis* 2008, 94, 18-32). También se ha mostrado que el receptor CXCR4 tiene una función importante en la liberación de células madre y células progenitoras de la médula ósea a la sangre periférica (L.M. Pelus, S. Fukuda, *Leukemia* 2008, 22, 466-473). Esta actividad del CXCR4 podría ser muy importante para recolecciones eficaces de células madre por aféresis de sangre periférica. Las células de sangre periférica autólogas dan a conocer una recuperación hematopoyética rápida y sostenida después de un autotrasplante, después de la administración de dosis altas de quimioterapia o radioterapia en pacientes con neoplasias hematológicas malignas y tumores sólidos (W.C. Liles y otros, *Blood* 2003, 102, 2728-2730).

35 Recientemente, se ha demostrado que el SDF-1 está localmente regulado por aumento en modelos animales de lesión que incluyen accidente cerebrovascular isquémico focal, isquemia cerebral global, infarto de miocardio e isquemia de extremidades posteriores, así como que está implicado en la recuperación después de una isquemia periférica o después de una lesión del hígado, riñón o pulmón (A.E. Ting, R.W. Mays, M.R. Frey, W. Van't Hof, S. Medicetty, R. Deans, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008, 65, 81-93 y bibliografía citada en la misma; F. Lin, K. Cordes, L. Li, L. Hood, W.G. Couser, S.J. Shankland y otros, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14, 1188-1199; C.C. Dos Santos, *Intensive Care Med.* 2008, 34, 619-630). Estos resultados sugieren que el SDF-1 puede ser un quimioatrayente para células madre positivas para CXCR4 para la reparación/regeneración de órganos y tejidos (M.Z. Ratajczak, M. Kucia, R. Reca, M. Majka, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, *Leukemia* 2004, 18, 29-40). Por lo tanto, la modulación del eje SDF-1/CXCR4 mediante inhibidores de CXCR4 debería dar como resultado un beneficio terapéutico significativo mediante la utilización de células madre liberados para regular la reparación de tejidos.

40 Más recientemente, se ha demostrado que la alteración del eje CXCR4/SDF-1 mediante inhibidores de CXCR4 tiene una función crucial en la movilización diferencial de las células progenitoras como HPC, células progenitoras endoteliales (EPC) y estromales (CCP) de la médula ósea (S.C. Pitchford, R.C. Furze, C.P. Jones, A.M. Wegner, S.M. Rankin, *Cell Stem Cell* 2009, 4, 62). Además, células madre muy pequeños similares a los embrionarios (VSEL) CXCR4+ derivados de médula ósea se movilizaron en pacientes con infarto agudo de miocardio, lo que indicaba un hipotético mecanismo reparador (W. Wojakowski, M. Tendra, M. Kucia, E. Zuba-Surma, E. Paczkowska, J. Ciosek, M. Halasa, M. Król, M. Kazmierski, P. Buszman, A. Ochala, J. Ratajczak, B. Machalinski, M. Z. Ratajczak, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009, 53, 1). Estos hallazgos se pueden explotar para dar a conocer terapias de células madre eficaces para la regeneración de tejidos.

50 Las células madre mesenquimales (MSC) son células no hematopoyéticas progenitoras que tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos tales como hueso y cartílago (D. J. Prockop, *Science* 1997, 276, 71). Dado que una pequeña proporción de MSC expresa fuertemente CXCR4 funcionalmente activo, la modulación del eje CXCR4/SDF-1 puede mediar la migración y retorno específicos de estas células (R.F. Wynn, C.A. Hart, C. Corradi-Perini, L. O'Neill, C.A. Evans, J.E. Wraith, L.J. Fairbairn, I. Bellantuono, *Blood* 2004, 104, 2643).

60 Cada vez hay más evidencias que sugieren que las quimioquinas en general y la interacción SDF-1/CXCR4 en

- particular tienen una función fundamental en la angiogénesis. Las quimioquinas inducen la angiogénesis directamente mediante la unión a sus receptores afines en las células endoteliales o indirectamente mediante la promoción de infiltrados de células inflamatorias, que suministran otros estímulos angiogénicos. Se ha demostrado que una serie de quimioquinas proinflamatorias, incluyendo la interleuquina 8 (IL-8), oncogén regulado por crecimiento, factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), eotaxina 1 e I-309 actúan como inductores directos de la angiogénesis (X. Chen, J.A. Beutler, T.G. McCloud, A. Loehfelm, L. Yang, H.F. Dong, O.Y. Chertov, R. Salcedo, J.J. Oppenheim, O.M. Howard. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9(8), 3115- 3123; R. Salcedo, J.J. Oppenheim, *Microcirculation* 2003, (3-4), 359-370).
- Los resultados obtenidos recientemente muestran que el receptor CXCR4 está implicado en la actividad quimiotáctica de las células cancerosas, tales como en la metástasis de cáncer de mama o en la metástasis de cáncer de ovario (A. Muller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphey, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, A. Zlotnik, *Nature* 2001, 50, 410; J.M. Hall, K.S. Korach, *Molecular Endocrinology* 2003, 17, 792-803), el linfoma no Hodgkin (F. Bertolini, C. Dell'Agnola, P. Manusco, C. Rabascio, A. Burlini, S. Monestiroli, A. Gobbi, G. Pruneri, G. Martinelli, *Cancer Research* 2002, 62, 3106-3112), o el cáncer de pulmón (T. Kijima, G. Maulik, P.C. Ma, E.V. Tibaldi, R.E. Turner, B. Rollins, M. Sattler, B.E. Johnson, R. Salgia, *Cancer Research* 2002, 62, 6304-6311), melanoma, cáncer de próstata, cáncer de riñón, neuroblastoma, cáncer pancreático, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorrectal, cáncer de endometrio y tumor de células germinales (H. Tamamura y otros, *FEBS Letters* 2003, 550, 79-83, referencias citadas; Z. Wang, Q. Ma, P. Liu, H. Yu, L. Zhao, S. Shen, J. Yao, *British Journal of Cancer* 2008, 99, 1695; B. Sung, S. Jhurani, K. S. Ahn, Y. Mastuo, T. Yi, S. Guha, M. Liu, B. Aggarwal, *Cancer Res.* 2008, 68, 8938; H. Liu, Z. Pan, A. Li, S. Fu, Y. Lei, H. Sol, M. Wu, W. Zhou, *Cellular and Molecular Immunology*, 2008, 5, 373; C. Rubie, O. Kollmar, V.O. Frick, M. Wagner, B. Brittner, S. Gräber, M.K. Schilling, *Scandinavian Journal of Immunology* 2008, 68, 635; S. Gelmini, M. Mangoni, F. Castiglione, C. Beltrami, A. Pieralli, K.L. Andersson, M. Fambrini, G.I. Taddie, M. Serio, C. Orlando, *Clin. Exp. Metastasis* 2009, 26, 261; D.C. Gilbert, I. Chandler, A. McIntyre, N.C. Goddard, R. Gabe, R.A. Huddart, J. Shipley, *J. Pathol.* 2009, 217, 94). El bloqueo de la actividad quimiotáctica con un inhibidor de CXCR4 debería detener la migración de las células cancerosas y, por lo tanto, la metástasis.
- El CXCR4 se ha implicado además en el crecimiento y la proliferación de tumores sólidos y leucemia/linfoma. Se demostró que la activación del receptor CXCR4 era crítica para el crecimiento tanto de tumores neuronales como gliales malignos. Además, la administración sistémica del antagonista de CXCR4 AMD3100 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de glioblastoma y de meduloblastoma intracraneales mediante el aumento de la apoptosis y la disminución de la proliferación de células tumorales (J.B. Rubin, A. L Kung, R. Klein S, J.A. Chan, Y. Sun, K. Schmidt, M.W Kieran, A.D. Luster, R.A. Segal, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2003, 100 (23), 13513-13518; S. Barbero, R. Bonavia, A. Bajetto, C. Porcile, P. Pirani, J.L. Ravetti, G.L. Zona, R. Spaziante, T. Florio, G. Schettini, *Cancer Res.* 2003, 63(8), 1969-1974; T. Kijima, G. Maulik, P.C. Ma, E.V Tibaldi, R.E. Turner, B. Rollins, M. Sattler, B.E. Johnson, R. Salgia. *Cancer Res.* 2002, 62 (21), 6304-6311). Los inhibidores del CXCR4 mostraron además eficacias prometedoras *in vitro* e *in vivo* en el cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, melanoma maligno, cáncer de ovario, rhabdomyosarcoma, cáncer de próstata, así como leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin (J.A. Burger, A. Peled, *Leukemia* 2009, 23, 43-52 y bibliografía citada en el presente documento).
- Está bien establecido que las quimioquinas están involucradas en una serie de patologías inflamatorias y algunas de ellas muestran una función fundamental en la modulación del desarrollo de los osteoclastos. La inmunotinción para SDF-1 (CXCL12) en biopsias de tejido óseo y sinovial tanto de muestras de artritis reumatoide (AR) como de osteoartritis (OA) han puesto de manifiesto fuertes aumentos en los niveles de expresión de las quimioquinas en afecciones inflamatorias (F. Grassi, S. Cristino, S. Toneguzzi, A. Piacentini, A. Facchini, G. Lisignoli, *J. Cell Physiol.* 2004; 199(2), 244-251). Parece probable que el receptor CXCR4 tenga una función importante en enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, aterosclerosis, o enfermedades oculares, tales como la retinopatía diabética y degeneración macular asociada con la edad (K.R. Shadidi y otros, *Scandinavian Journal of Immunology* 2003, 57, 192-198; J.A. Gonzalo, *J. Immunol.* 2000, 165, 499-508; S. Hatse y otros, *FEBS Letters* 2002, 527, 255-262 y las referencias citadas, A.T. Weeraratna, A. Kalehua, I. DeLeon, D. Bertak, G. Maher, M.S. Wade, A. Lustig, K.G. Becker, W. Wood, D. G. Walker, T.G. Beach, D.D. Taub, *Exp. Cell Res.* 2007, 313, 450; M. Shimoji, F. Pagan, E.B. Heaton, I. Mochetti, *Neurotox. Res.* 2009, 16, 318; A. Zernecke, E. Shagdarsuren, C. Weber, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28, 1897; R. Lima e Silva, J. Shen, S.F. Hackett, S. Kachi, H. Akiyama y otros, *FASEB* 2007, 21, 3219). La mediación del reclutamiento de células inmunitarias a sitios de inflamación debería ser detenida por un inhibidor de CXCR4.
- Hasta la fecha, las terapias disponibles para el tratamiento de las infecciones por VIH han conducido a una notable mejora en los síntomas y a la recuperación de la enfermedad de las personas infectadas. Aunque la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), que implica una combinación de inhibidores de la transcriptasa inversa/proteasa, ha mejorado mucho el tratamiento clínico de los individuos con SIDA o infección por el VIH, todavía se mantienen varios problemas importantes, tales como la multirresistencia a fármacos, efectos adversos significativos y unos costes elevados. Son particularmente deseados los agentes anti-VIH que bloquean la infección por VIH en una etapa temprana de la infección, tal como la entrada vírica. Recientemente se ha reconocido que,

para una entrada eficaz en las células diana, los virus de inmunodeficiencia humana requieren los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4, así como el receptor primario CD4 (N. Levy, *Engl. J. Med.* 1996, 335, 1528-1530). Por consiguiente, un agente que pueda bloquear los receptores de quimioquinas CXCR4 debería prevenir infecciones en individuos sanos y frenar o detener la progresión vírica en pacientes infectados (J. Cohen, *Science* 1997, 275, 1261- 64).

Entre los diferentes tipos de inhibidores de CXCR4 (M. Schwarz, T.N.C. Wells, A.E.I. Proudfoot, *Receptors and Channels* 2001, 7, 417-428; Y. Lavrovsky, Y.A. Ivanenkov, K.V. Balakin, D.A. Medvedewa, P.V. Ivachtchenko, *Mini Rev. Med. Chem.* 2008, 11, 1075-1087), una clase emergente se basa en análogos de péptidos catiónicos de origen natural derivados de polifemusina II que tienen una estructura de hoja β antiparalela, y una horquilla β que se mantiene por dos puentes disulfuro (H. Nakashima, M. Masuda, T. Murakami, Y. Koyanagi, A. Matsumoto, N. Fujii, N. Yamamoto, *Antimicrobial Agents and Chemoth.* 1992, 36, 1249-1255; H. Tamamura, M. Kuroda, M. Masuda, A. Otaka, S. Funakoshi, H. Nakashima, N. Yamamoto, M. Waki, A. Matsumoto, J.M. Lancelin, D. Kohda, S. Tate, F. Inagaki, N. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 209, 1163; documento WO 95/10534 A1).

El documento WO 2008/104090 A1 da a conocer peptidomiméticos de horquilla beta de molde fijo de fórmula general Ciclo(-Tyr-His-X-Cys-Ser-Ala-^DPro-Dab-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Gln-Lys-^DPro-Pro) que tienen un enlace disulfuro entre la Cys4 y Gys11, siendo X Ala o Tyr, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen propiedades antagonistas de CXCR4.

El documento WO 2010/127704 A1 da a conocer peptidomiméticos de horquilla beta de fórmula general Ciclo(-Xaa¹-Xaa²-Xaa³-Cys⁴-Xaa⁵-Xaa⁶-Xaa⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Xaa¹²-Xaa¹³-Xaa¹³-Xaa¹⁵-Xaa¹⁶-) que tienen un enlace disulfuro entre la Cys4 and Cys11, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen propiedades antagonistas de CXCR4.

El documento WO 2011/066869 A1 da a conocer peptidomiméticos de horquilla beta de fórmula general Ciclo(-Xaa¹-Xaa²-Xaa³-Cys⁴-Xaa⁵-Xaa⁶-Xaa⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Xaa¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Xaa¹⁶-), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen propiedades antagonistas de CXCR4.

El documento WO 2012/168336 A1 da a conocer peptidomiméticos de horquilla beta de fórmula general ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Ala⁶-Xaa⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-^DPro¹⁵-Pro¹⁶-), que tienen un enlace disulfuro entre la Cys4 y Cys11, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen propiedades farmacológicas favorables.

La síntesis de análogos estructurales y los estudios estructurales por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) han mostrado que los péptidos catiónicos adoptan conformaciones de horquilla β bien definidas, debido al efecto de restricción de uno o dos puentes disulfuro (H. Tamamura, M. Sugioka, Y. Odagaki, A. Omagari, Y. Kahn, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, S. C. Peiper, N. Hamanaka, A. Otaka, N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 359-362). Estos resultados muestran que la estructura en horquilla β tiene una función importante en la actividad antagonista de CXCR4.

Estudios estructurales adicionales han indicado que en la actividad antagonista puede influir además la modulación de la estructura anfífila y el farmacóforo (H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, K. Gotoh, T. Kanamoto, Y. Xu, E. Kodama, M. Matsuoka, T. Hattori, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka, N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 1897-1902; H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, S. Oishi, H. Habashita, T. Kanamoto, K. Gotoh, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 1417-1426; H. Tamamura, K. Hiramatsu, K. Miyamoto, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, Y. Kuroda, T. Nakagawa, A. Otaki, N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2002, 12, 923-928).

Los compuestos ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, de la presente invención son peptidomiméticos de horquilla β cíclicos que presentan una actividad antagonista de CXCR4 elevada, siendo útiles para las recolecciones por aféresis eficaces de células madre de sangre periférica movilizados y/o para la utilización de estas células movilizadas para regular la reparación de tejido, y/o que tienen actividad anticancerígena, actividad antiinflamatoria y/o actividad anti-VIH.

La conformación de horquilla β cíclica es inducida por el resto de D-aminoácido ^DPro⁷ y el resto de D-aminoácido Xaa¹⁵. Se consigue una estabilización adicional de la conformación de horquilla mediante los restos de aminoácidos Cys de las posiciones 4 y 11, que considerados conjuntamente, forman un enlace disulfuro.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que la introducción de los restos de aminoácidos básicos Orn(iPr) en la posición 8, Lys(iPr) en la posición 14, apoyada por la introducción opcional de ^DLys(iPr) en la posición 15 de ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, da como resultado peptidomiméticos de horquilla β que tienen propiedades farmacológicas favorables. Estas propiedades, combinadas con la unión adecuada a proteínas plasmáticas y velocidades de eliminación apropiadas conforman un perfil farmacológico que permite utilizar estos compuestos como principios activos en cantidades bajas para todo tipo de formulaciones de fármacos,

en particular formulaciones de fármacos de liberación prolongada.

Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención son compuestos de fórmula general

5 ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-) con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

en los que

10 Xaa³ es Tyr, Tyr(Me), es decir, el ácido (2S)-2-amino-(4-metoxifenil)-3-propiónico, o Tyr(CF₃), es decir, ácido (2S)-2-amino-(4-trifluorometoxifenil)-3-propiónico,
 Xaa⁶ es Ala o Acc, siendo este último el ácido 1-aminociclopropano-carboxílico,
 Xaa⁸ es Orn(iPr), es decir, el ácido (2S)-N^w-isopropil-2,5-diaminopentanoico,
 15 Xaa¹³ es Gln o Glu,
 Xaa¹⁴ es Lys(iPr), es decir, el ácido (2S)-N^w-isopropil-2,6-diaminohexanoico,
 Xaa¹⁵ es ^DLys(iPr), es decir, el ácido (2R)-N^w-isopropil-2,6-diaminohexanoico.

20 En una realización particular de la presente invención, el compuesto es el ciclo(-Tyr¹-His²-Tyr³-Cys⁴-Ser⁵-Ala⁶-^DPro⁷-Orn(iPr)⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Gln¹³-Lys(iPr)¹⁴-^DLys(iPr)¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, estos peptidomiméticos de horquilla β se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende

25 (a) el acoplamiento de un soporte sólido funcionalizado de forma adecuada con un derivado de Pro protegido de forma adecuada en el N, que en el producto final deseado está en la posición 16;
 (b) la eliminación del grupo protector de N del producto obtenido de este modo;
 (c) el acoplamiento del producto obtenido de este modo con un derivado del aminoácido protegido de forma
 30 adecuada en el N que en el producto final deseado está en la posición 15, estando también protegido de forma adecuada cualquier grupo funcional que pueda estar presente en dicho derivado de aminoácido protegido en el N;
 (d) la eliminación del grupo protector de N del producto obtenido en la etapa (c);
 (e) la realización de las etapas que corresponden sustancialmente a las etapas (c) y (d) utilizando derivados
 35 de los aminoácidos protegidos de forma adecuada en N que en el producto final deseado están en las posiciones 14 a 1, estando también protegidos de forma adecuada cualquier grupo o grupos funcionales que puedan estar presentes en dichos derivados de aminoácidos protegidos en N;
 (f) si se desea, la formación de un enlace disulfuro entre las cadenas laterales de los restos de Cys de la
 40 posición 4 y la posición 11; o alternativamente, formación del enlace mencionado después de la etapa (i), tal como se describe en el presente documento a continuación;
 (g) el desprendimiento del producto así obtenido del soporte sólido;
 (h) la ciclación del producto escindido del soporte sólido;
 (i) eliminación de cualquier grupo protector presente en los grupos funcionales de cualquier miembro de la
 45 cadena del resto de aminoácido; y
 (j) si se desea, la unión de uno o varios grupos isopropilo
 (k) si se desea, la conversión del producto así obtenido en una sal farmacéuticamente aceptable o conversión
 de una sal farmacéuticamente aceptable o no aceptable así obtenida en el compuesto libre correspondiente, o en una sal farmacéuticamente aceptable diferente.

50 Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden producir, por ejemplo, siguiendo un procedimiento que comprende la síntesis del péptido lineal sobre resina, mientras que el resto o restos de aminoácidos que llevan grupo isopropilo Orn(iPr), Lys(iPr) o ^DLys(iPr) se incorporarán como unidad o unidades estructurales de aminoácidos que están disponibles en el mercado o se sintetizan previamente; o un procedimiento que comprende la síntesis de un péptido lineal sobre resina y la derivatización de las cadenas laterales que llevan
 55 grupo amino de los restos de aminoácidos protegidos mediante grupos protectores lábiles frente a ácidos adecuados para la estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida basada en Fmoc por acoplamiento de grupo isopropilo en solución en una etapa muy tardía de la cascada de síntesis; o siguiendo un procedimiento que comprende una combinación adecuada de los procedimientos descritos anteriormente.

60 La elección adecuada del soporte sólido funcionalizado (es decir, el soporte sólido más la molécula conectora) y el sitio de ciclación tienen funciones clave en el procedimiento de síntesis de los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención.

65 El soporte sólido funcionalizado deriva de forma conveniente de poliestireno reticulado, preferentemente, con el 1-5% de divinilbenceno; poliestireno recubierto con espaciadores de polietilenglicol (Tentagel®); y resinas de poliacrilamida (véase, D. Obrecht, J. M. Villalgorido, "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-

Molecular-Weight Compound Libraries", *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

El soporte sólido se funcionaliza mediante un conector, es decir, una molécula espaciadora bifuncional que contiene en un extremo un grupo de anclaje para la fijación al soporte sólido y, en el otro extremo, un grupo funcional escindible selectivamente, utilizado para las transformaciones químicas posteriores y procedimientos de escisión. Para los propósitos de la presente invención se utilizan dos tipos de conectores:

Los conectores de tipo 1 están diseñados para liberar el grupo amida en condiciones ácidas (H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 3783-3790). Los conectores de este tipo forman amidas con el grupo carboxilo de los aminoácidos; entre los ejemplos de resinas funcionalizadas mediante dichas estructuras conectoras se incluyen la resina de 4-[[((2,4-dimetoxi-fenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido)aminometil] PS, resina de 4-[[((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxi-acetamido)aminometil]-4-metil-bencidrilamina PS (resina de amida de Rink MBHA PS), y resina de 4-[[((2,4-dimetoxi-fenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido)aminometil]bencidrilamina PS (resina de amida de Rink - BHA-PS). Preferentemente, el soporte deriva de poliestireno reticulado, lo más preferentemente, con el 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado mediante el conector 4-[[((2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido).

Los conectores de tipo 2 están diseñados para liberar finalmente el grupo carboxilo en condiciones ácidas. Los conectores de este tipo forman ésteres lábiles frente a ácido con el grupo carboxilo de los aminoácidos, por lo general ésteres de bencilo, bencidriilo y tritilo lábiles frente a ácido; los ejemplos de dichas estructuras conectoras incluyen 2-metoxi-4-hidroximetilfenoxi (conector Sasrin®), 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi (conector de Rink), ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (conector HMPB), tritilo y 2-clorotritilo. Preferentemente, el soporte deriva de poliestireno reticulado, de la forma más preferente, con el 1-5% de divinilbenceno y funcionalizado mediante el conector 2-clorotritilo.

Cuando se llevan a cabo como síntesis en paralelo en matriz, los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo ventajosamente como se describe en el presente documento a continuación, pero será inmediatamente evidente para los expertos en la materia cómo deberán ser modificados estos procedimientos en caso de que se desee sintetizar un único compuesto de la presente invención.

Se carga un número de recipientes de reacción igual al número total de compuestos que se van a sintetizar mediante el método en paralelo, con 25 a 1.000 mg, preferentemente 60 mg, del soporte sólido funcionalizado adecuado, preferentemente poliestireno reticulado del 1 al 3% o resina Tentagel.

El disolvente que se va a utilizar debe ser capaz de hinchar la resina e incluye, pero sin limitación a los mismos, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), N-metil-pirrolidona (NMP), dioxano, tolueno, tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), trifluoroetanol (TFE), alcohol isopropílico y similares. Las mezclas de disolventes que contienen, como mínimo, un componente de disolvente polar (por ejemplo, el 20% de TFE/DCM, el 35% de THF/NMP) son beneficiosas para asegurar una elevada reactividad y solvatación de las cadenas de péptidos unidas a la resina (G.B. Fields, C.G., Fields, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4202-4207).

Con el desarrollo de diversos conectores que liberan el grupo ácido carboxílico C-terminal en condiciones ácidas suaves, que no afectan a los grupos lábiles frente a ácidos que protegen los grupos funcionales en la cadena o cadenas laterales, se han hecho importantes progresos en la síntesis de fragmentos peptídicos protegidos. El conector derivado de alcohol 2-metoxi-4-hidroxibencilico (conector Sasrin®, Mergler y otros, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 4005-4008) se puede escindir con ácido trifluoroacético diluido (TFA al 0,5-1% en DCM) y es estable en las condiciones de desprotección de Fmoc durante la síntesis de péptidos, siendo compatibles con este esquema de protección los grupos protectores adicionales basados en Boc/tBu. Otros conectores que son adecuados para el procedimiento de la presente invención incluyen el conector lábil frente a super ácidos 4-(2,4-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi (conector de Rink, H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 3787-3790), en el que la eliminación del péptido requiere ácido acético al 10% en DCM o ácido trifluoroacético al 0,2% en DCM; el conector derivado del ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (conector HMPB, Flörsheimer y Riniker, *Peptides*, 1991, 1990 131) que también se escinde con TFA al 1%/DCM para dar un fragmento de péptido que contiene todos los grupos protectores de las cadenas laterales lábiles frente a ácidos; y, además, el conector cloruro de 2-clorotritilo (Barlos y otros, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 3943-3946), que permite la escisión del péptido utilizando una mezcla de ácido acético glacial/trifluoroetanol/DCM (1:2:7) durante 30 minutos.

Los grupos protectores adecuados para aminoácidos y, respectivamente, para sus restos son, por ejemplo,

- para el grupo amino (como está presente, por ejemplo, además en la cadena lateral de la lisina u ornitina)

Cbz	benciloxicarbonilo
Boc	terc-butiloxicarbonilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Teoc	trimetilsililetoxicarbonilo

Tcc tricloroetoxicarbonilo
 Nps o-nitrofenilsulfonilo;
 Trt trifenilmetilo o tritilo
 ivDde (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo

5 - para el grupo carboxilo (como está presente, por ejemplo, también en la cadena lateral del ácido glutámico) por conversión en ésteres con componentes alcohol

10 tBu terc-butilo
 Bn bencilo
 Me metilo
 Ph fenilo
 Pac fenacil-alilo
 Tse trimetilsililetilo
 15 Tce tricloroetilo;
 ivDde (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo

- para el grupo guanidino (como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de la arginina)

20 Pmc 2,2,5,7,8-pentametilmroman-6-sulfonilo
 Ts tosilo (es decir, p-toluensulfonilo)
 Cbz benciloxicarbonilo
 Pbf pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo

25 - para el grupo hidroxilo (como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de la serina)

tBu terc-butilo
 Bn bencilo
 Trt tritilo
 30 Alloc aliloxicarbonilo

- y para el grupo mercapto (como está presente, por ejemplo, en la cadena lateral de la cisteína)

35 Acm acetamidometilo
 tBu terc-butilo
 Bn bencilo
 Trt tritilo
 Mtr 4-metoxitritilo.

40 Los derivados de aminoácido protegidos con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) se utilizan preferentemente como unidades estructurales para la construcción de los miméticos de bucle de horquilla β de la presente invención. Para la desprotección, es decir, la escisión del grupo Fmoc, se puede utilizar piperidina al 20% en DMF o DBU al 2%/piperidina al 2% en DMF.

45 Se conoce en la técnica la unión de grupos isopropilo a las cadenas laterales que llevan un grupo amino de los derivados de aminoácidos protegidos con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) para formar las cadenas laterales que llevan grupo amino isopropilado de derivados de aminoácidos protegidos con (Fmoc). El procedimiento para introducir un grupo isopropilo se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante alquilación reductora, por ejemplo, tratamiento del grupo amino de la cadena lateral que lleva un grupo amino de una unidad estructural de aminoácido como, por ejemplo, Orn con acetona en presencia de un agente reductor adecuado tal como, por ejemplo, triacetoxiborohidruro de sodio. Los grupos protectores como, por ejemplo, Boc, adecuados para las cadenas laterales que llevan un grupo amino isopropilado de derivados de aminoácidos protegidos con (Fmoc), se pueden introducir por una reacción posterior con dicarbonato de di-terc-butilo en presencia de una base, tal como bicarbonato sódico.

55 La cantidad de reactivo, es decir, del derivado de aminoácido, es normalmente de 1 a 20 equivalentes basado en los miliequivalentes por gramo (meq/g) de carga del soporte sólido funcionalizado (típicamente de 0,1 a 2,85 meq/g para resinas de poliestireno) pesados originalmente en el tubo de reacción. Se pueden utilizar equivalentes adicionales de los reactivos, si es necesario, para conducir la reacción hasta que se complete en un tiempo razonable. Las estaciones de trabajo preferentes (no estando, sin embargo, limitadas a las mismas) son la estación de Labsource Combi-chem, Symphony de Protein Technologies y el sintetizador MultiSyn Tech's-Syro, este último equipado además con una unidad de transferencia y un contenedor de depósito durante el procedimiento de desprendimiento del péptido lineal totalmente protegido del soporte sólido. Todos los sintetizadores son capaces de proporcionar un entorno controlado, por ejemplo, las reacciones se pueden llevar a cabo a temperaturas diferentes de la temperatura ambiente, así como en atmósferas de gas inerte, si se desea.

La formación de enlaces amida requiere la activación del grupo α -carboxilo para la etapa de acilación. Cuando esta activación se lleva a cabo por medio de las carbodiimidas utilizadas habitualmente, tales como dicitclohexilcarbodiimida (DCC, Sheehan y Hess, *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 10671068) o diisopropilcarbodiimida (DIC, Sarantakis y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 73, 336-342), la dicitclohexilurea resultante es insoluble y, respectivamente, la diisopropilurea es soluble en los disolventes utilizados generalmente. En una variación del procedimiento de carbodiimida, se incluye 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, König y Geiger, *Chem. Ber* 1970, 103, 788-798) como aditivo a la mezcla de acoplamiento. El HOBt impide la deshidratación, suprime la racemización de los aminoácidos activados y actúa como catalizador para mejorar las reacciones de acoplamiento lentas. Se han utilizado algunos reactivos de fosfonio como reactivos de acoplamiento directo, tales como el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris- (dimetilamino)fosfonio (BOP, Castro y otros, *Tetrahedron Lett.* 1975, 14, 1219-1222; *Synthesis*, 1976, 751-752), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-BOP, Coste y otros, *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 205-208), o terafluoroborato [2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio] (TBTU), o hexafluorofosfato (HBTU, Knorr y otros, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 1927-1930); estos reactivos de fosfonio también son adecuados para la formación *in situ* de ésteres de HOBt con los derivados de aminoácidos protegidos. Más recientemente se han utilizado también como reactivos de acoplamiento difenoxifosforil-azida (DPPA) o tetrafluoroborato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TATU) o hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU)/7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt, Carpino y otros, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2279-2281) o tetrafluoroborato de (6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-1,1,3,3-tetrametiluronio (TCTU), o hexafluorofosfato (HCTU, Marder, Shivo y Albericio: "HCTU and TCTU: New Coupling Reagents: Development and Industrial Applications", Poster Presentation, Gordon Conference febrero 2002), así como hexafluorofosfato de 1,1,3,3-bis(tetrametilen)clorouronio (PyCIU), especialmente para el acoplamiento de aminoácidos N-metilados, (J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 1967) o difenil-fosfinato de pentafluorofenilo (S. Chen, J. Xu, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 6711).

Debido al hecho de que son esenciales reacciones de acoplamiento casi cuantitativas, es conveniente tener una evidencia experimental de la terminación de las reacciones. El ensayo de ninhidrina (Kaiser y otros, *Anal. Biochemistry* 1970, 34, 595), en el que una respuesta colorimétrica positiva a una parte alícuota de péptido unido a resina indica cualitativamente la presencia de la amina primaria, se puede llevar a cabo de forma fácil y rápida después de cada etapa de acoplamiento. La química del Fmoc permite la detección espectrofotométrica del cromóforo de Fmoc cuando se libera con la base (Meienhofer y otros, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1979, 13, 35-42).

El compuesto intermedio unido a la resina dentro de cada recipiente de reacción, se lava del exceso de reactivos retenidos, de disolventes y de subproductos mediante exposición repetitiva al disolvente o disolventes puros por uno de los dos procedimientos siguientes:

- 1) Los recipientes de reacción se llenan con disolvente (preferentemente 5 ml), se agitan durante 5 a 300 minutos, preferentemente 15 minutos, y se drenan para expulsar el disolvente;
- 2) Los recipientes de reacción se llenan con disolvente (preferentemente 5 ml) y se drenan a un recipiente receptor, tal como un tubo o vial de ensayo.

Ambos procedimientos de lavado anteriores se repiten hasta aproximadamente 50 veces (preferentemente, aproximadamente 10 veces), siguiendo la eficiencia de la eliminación de reactivos, disolventes y subproductos mediante procedimientos tales como TLC, GC o inspección de las aguas de lavado.

El procedimiento descrito anteriormente de hacer reaccionar el compuesto unido a resina con reactivos dentro de los tubos de reacción, seguido de la eliminación de los reactivos en exceso, los subproductos y los disolventes, se repite con cada transformación sucesiva hasta que se haya obtenido el péptido lineal final completamente protegido unido a la resina.

Antes de que este péptido lineal completamente protegido se desprenda del soporte sólido, se puede formar un enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹.

Para la formación de un enlace disulfuro se aplica preferentemente una solución de 10 equivalentes de solución de yodo en DMF o en una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH durante 1,5 horas, lo cual se repite durante otras 3 horas con una solución de yodo de nueva aportación después de filtrar la solución de yodo, o en una mezcla de DMSO y solución de ácido acético, tamponada con NaHCO₃ al 5% a pH 5-6 durante 4 horas, o en agua después de ajustar a pH 8 con solución de hidróxido de amonio por agitación durante 24 horas, o en una solución de NMP y tri-n-butilfosfina (preferentemente 50 eq).

Alternativamente, la formación del enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹ se puede llevar a cabo posteriormente al procedimiento de tratamiento 2), tal como se describe en el presente documento más adelante, mediante agitación del péptido bruto totalmente desprotegido y ciclado durante 24 horas en agua que contiene DMSO hasta el 15% en volumen, tamponado con NaHCO₃ al 5% a pH 5-6, o tamponado con acetato de amonio a pH 7-8, o ajustado con hidróxido de amonio a pH 8. Después de la evaporación a sequedad, se obtiene el ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa^{6-D}-Pro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, como producto final.

El desprendimiento del péptido lineal completamente protegido del soporte sólido se consigue mediante la exposición de la resina cargada con una solución del reactivo utilizado para la escisión (preferentemente 3 a 5 ml). El control de temperatura, la agitación, y el seguimiento de la reacción se implementan como se ha descrito anteriormente. A través de una unidad de transferencia, los recipientes de reacción están conectados con un contenedor de depósito que contiene tubos de depósito para recoger eficazmente las soluciones de producto escindido. Las resinas que quedan en los recipientes de reacción se lavan a continuación, de 2 a 5 veces, tal como anteriormente, con de 3 a 5 ml de un disolvente adecuado para extraer (arrastrar por lavado) el máximo de productos desprendidos como sea posible. Las soluciones de productos así obtenidas se combinan, teniendo cuidado de evitar la mezcla cruzada. Después, las soluciones/extractos individuales se manipulan según sea necesario para aislar los compuestos finales. Las manipulaciones típicas incluyen, pero no se limitan a, evaporación, concentración, extracción líquido/líquido, acidificación, basificación, neutralización o reacciones en solución adicionales.

Las soluciones que contienen derivados de péptidos lineales completamente protegidos que han separado por escisión del soporte sólido y neutralizado con una base, se evaporan. La ciclación se lleva a cabo, a continuación, en solución utilizando disolventes tales como DCM, DMF, dioxano, THF y similares. Se pueden utilizar para la ciclación varios reactivos de acoplamiento que se han mencionado anteriormente. La duración de la ciclación es de aproximadamente 6-48 horas, preferentemente de aproximadamente 16 horas. El avance de la reacción se sigue, por ejemplo, por RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa). Después, se separa el disolvente por evaporación, el derivado de péptido cíclico completamente protegido se disuelve en un disolvente que no es miscible con agua, tal como DCM, y la solución se extrae con agua o una mezcla de disolventes miscibles con agua, con el fin de eliminar cualquier exceso del reactivo de acoplamiento.

Finalmente, el derivado de péptido completamente protegido se trata con el 95% de TFA, el 2,5% de H₂O, el 2,5% de TIS u otra combinación de depuradores para llevar a cabo la escisión de los grupos protectores. El tiempo de reacción de escisión es habitualmente de 30 minutos a 12 horas, preferentemente de aproximadamente 2,5 horas.

Alternativamente, el desprendimiento y la desprotección completa del péptido completamente protegido del soporte sólido se puede lograr manualmente en recipientes de vidrio.

Después de la desprotección completa, por ejemplo, se pueden utilizar los siguientes métodos para el procesamiento adicional:

1) Los componentes volátiles se evaporan hasta sequedad y el péptido bruto se disuelve en AcOH al 20% en agua y se extrae con éter isopropílico u otros disolventes que son adecuados para ello. La capa acuosa se recoge y se evapora hasta sequedad, y se obtiene el péptido cíclico completamente protegido, ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa^{6,D}-Pro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, como producto final;

2) La mezcla de desprotección se concentra a vacío. Después de la precipitación del péptido completamente desprotegido en éter dietílico, preferentemente a 0°C, el sólido se lava hasta aproximadamente 10 veces, preferentemente 3 veces, se seca, y se obtiene el péptido cíclico completamente desprotegido, ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa^{6,D}-Pro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, como producto final, si se ha formado un enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹ en el soporte sólido como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Si se ha seguido la estrategia mencionada anteriormente de grupos protectores ortogonales para la introducción de uno o más grupos isopropilo en solución, entonces todos los grupos amino de los restos de aminoácidos anteriormente protegidos por grupos protectores lábiles frente a ácidos, se han liberado en esta etapa de la cascada de síntesis. Por lo tanto, es posible, si se desea, acoplar un grupo isopropilo. Este acoplamiento se puede lograr, por ejemplo, aplicando una alquilación reductora utilizando acetona en presencia de un agente reductor adecuado como, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio. Por lo tanto, por ejemplo, el péptido se disuelve en MeOH (4,4 mM) que contiene ácido acético (0,2 M). Después de añadir un exceso de acetona (780 eq) la mezcla de reacción se completa con una solución de cianoborohidruro de sodio en MeOH (0,6 M; 1,3 eq por grupo isopropilo que se desea introducir) y se agita enérgicamente a temperatura ambiente. Tras la terminación de la conversión seguida por LC-MS, se añade agua y se evaporan los disolventes.

Tal como se ha mencionado anteriormente, después, si se desea, se puede convertir el producto cíclico completamente desprotegido obtenido de este modo en una sal farmacéuticamente aceptable o convertir una sal farmacéuticamente aceptable, o no aceptable, obtenida de este modo en el correspondiente compuesto libre o en una sal farmacéuticamente aceptable diferente. Cualquiera de estas operaciones se puede llevar a cabo por procedimientos bien conocidos en la materia.

Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden utilizar en una amplia variedad de aplicaciones con el fin de prevenir las infecciones por VIH en individuos sanos y retrasar o detener el avance vírico

en pacientes infectados, o en los casos en los que el cáncer está mediado por la actividad del receptor CXCR4 o es resultado de la misma, o en los casos en los que las enfermedades inmunológicas están mediadas por la actividad del receptor CXCR4 o son resultado de la misma; o estos peptidomiméticos de horquilla β se pueden utilizar para tratar la inmunosupresión, o se pueden utilizar durante recolecciones por aféresis de células madre de sangre periférica y/o como agentes para inducir la movilización de células madre para regular la reparación de tejidos.

Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden administrar por sí mismos o se pueden aplicar como una formulación adecuada junto con vehículos, diluyentes o excipientes bien conocidos en la materia.

Cuando se utilizan para tratar o prevenir infecciones por VIH o cáncer, como cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer endometrial, tumor de células germinales, cáncer de ojo, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, rhabdomyosarcoma, melanoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple y el linfoma no Hodgkin; metástasis, angiogénesis y tejidos hematopoyéticos; o trastornos inflamatorios, tales como el asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, neumonías eosinofílicas, hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), fibrosis pulmonar idiopática, ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, anafilaxis o respuestas de hipersensibilidad sistémicas, alergias a medicamentos, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, aterosclerosis, miastenia grave, diabetes de inicio juvenil, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, rechazo de injerto, incluyendo el rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades inflamatorias del intestino y dermatosis inflamatoria; o para tratar enfermedades oculares, tales como glaucoma, retinopatía diabética y degeneración macular asociada con la edad; o para tratar el accidente cerebrovascular isquémico focal, isquemia cerebral global, infarto de miocardio, isquemia de las extremidades posteriores o isquemia periférica; o para tratar lesiones del hígado, riñón o pulmón; o para tratar la inmunosupresión, incluyendo inmunosupresión inducida por quimioterapia, radioterapia o rechazo de injerto/trasplante, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden administrar solos, como mezclas de varios peptidomiméticos de horquilla β , en combinación con otros agentes anti-VIH, o agentes antimicrobianos o agentes anticancerígenos o agentes antiinflamatorios, o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden administrar por sí mismos o como composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden fabricar por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de comprimidos recubiertos, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables, que facilitan el procesamiento de los peptidomiméticos de horquilla β activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende del método de administración elegido.

Para la administración tópica, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden formular como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, polvos, etc., bien conocidos en la materia.

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para la administración por inyección, por ejemplo., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, oral o pulmonar.

Para las inyecciones, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden formular en soluciones adecuadas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón fisiológico salino. Las soluciones pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención pueden estar en forma de polvo para la combinación con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes de utilizar.

Para la administración transmucosa, se utilizan penetrantes adecuados para la barrera a permear en la formulación, como se conoce en la materia.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los peptidomiméticos de horquilla β activos de la presente invención con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia. Dichos vehículos permiten que los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, polvos, etc., para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar. Para formulaciones orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir

agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidonas reticuladas, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas farmacéuticas sólidas se pueden recubrir con azúcar o con recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar.

5 Para las preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

10 Para administración bucal, la composición puede estar en forma de comprimidos, pastillas, etc. formulados de la forma habitual.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios, junto con bases de supositorio adecuadas, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

15 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención también se pueden formular como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Para la fabricación de dichas preparaciones de depósito, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un
20 aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como sales poco solubles.

Además, se pueden utilizar otros sistemas de suministro farmacéutico, tales como liposomas y emulsiones bien conocidos en la materia. También se pueden utilizar algunos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido. Adicionalmente, los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se pueden suministrar utilizando un
25 sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico (por ejemplo, para endoprótesis vasculares recubiertas). Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del agente terapéutico, se pueden utilizar
30 estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Dado que los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención contienen restos cargados, se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como tales o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes
35 próticos que las formas libres correspondientes. Las sales farmacéuticamente aceptables particularmente adecuadas incluyen sales con ácidos carboxílicos, fosfónicos, sulfónicos y sulfámicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido
40 metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metanosulfónico o etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftalenodisulfónico, ácido 2-metil-bencenosulfónico, 3-metil-bencenosulfónico o 4-metil-bencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-sulfámico, N-etil-sulfámico o N-propil-sulfámico, y otros ácidos protónicos orgánicos, tales como ácido
45 ascórbico. Los ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, hidroácidos halogenados, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención, o composiciones de los mismos, en general se utilizarán en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Debe entenderse que la cantidad utilizada
50 dependerá de la aplicación particular.

Para la administración tópica para tratar o prevenir infecciones por VIH, una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar utilizando, por ejemplo, los ensayos *in vitro* proporcionados en los ejemplos. El tratamiento se puede
55 aplicar cuando la infección por VIH es visible, o incluso cuando no es visible. El experto en la materia será capaz de determinar cantidades terapéuticamente eficaces para tratar infecciones por VIH tópicas sin experimentación indebida.

Para la administración sistémica, se puede calcular inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de
60 concentración en la circulación de peptidomimético de horquilla β que incluye la CI_{50} determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también se pueden determinar a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, de modelos animales, utilizando técnicas que son bien conocidas en la materia. Un experto en la materia podría optimizar fácilmente la
65 administración a seres humanos basándose en los datos en animales.

Las cantidades de dosis para aplicaciones como agentes anti-VIH se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Los niveles séricos terapéuticamente eficaces se pueden lograr mediante la administración de múltiples dosis cada día.

En caso de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz de los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención puede no estar relacionada con la concentración plasmática. El experto en la materia será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin excesiva experimentación.

La cantidad administrada de peptidomiméticos de horquilla β dependerá, por supuesto, del sujeto que se va a tratar, el peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y el criterio del médico que prescribe.

La terapia anti-VIH se puede repetir intermitentemente mientras las infecciones son detectables o incluso cuando no son detectables. La terapia se puede proporcionar sola o en combinación con otros fármacos, tales como, por ejemplo, otros agentes anti-VIH o agentes anticancerígenos, u otros agentes antimicrobianos.

Normalmente, una dosis terapéuticamente eficaz de los peptidomiméticos de horquilla β descritos en el presente documento dará a conocer un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial.

La toxicidad de los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, mediante la determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para 50% de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para 100% de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación que no es tóxico para utilizar en seres humanos. La dosificación de los peptidomiméticos de horquilla β de la presente invención se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en la circulación que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro del intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosis exactas pueden ser elegidas por el médico individual en vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl y otros, 1975, En: "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, pág. 1).

La presente invención también puede incluir compuestos, que son idénticos a los compuestos de fórmula general ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-), con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, excepto porque uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o el número másico encontrados normalmente en la naturaleza, por ejemplo, compuestos enriquecidos en ²H (D), ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ¹²⁹I, etc. Estos análogos isotópicos y sus sales y formulaciones farmacéuticas se consideran agentes útiles en la terapia y/o el diagnóstico, por ejemplo, pero no están limitados, cuando un ajuste fino del tiempo de semivida *in vivo* podría conducir a un régimen de dosificación optimizado.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención, pero no deben interpretarse en ningún modo como limitantes de su alcance.

Ejemplos

1. Síntesis de péptidos

Acoplamiento del primer resto de aminoácido protegido a la resina

Se cargó 1 g (1,4 mmol) de resina de cloruro de 2-clorotritilo (1,4 mmol/g; n° de malla 100-200, matriz polimérica de copoli(estireno-1% DVB); Barlos y otros, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 3943-3946) en un matraz seco. La resina se suspendió en CH₂Cl₂ (5 ml) y se dejó hinchar a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 minutos. Se añadió una solución de 0,98 mmol (0,7 eq) del primer resto de aminoácido protegido de forma adecuada (véase más adelante) en CH₂Cl₂ (5 ml) mezclada con 960 μ l (4 eq) de diisopropiletilamina (DIEA). Después de agitar la mezcla de reacción durante 4 horas a 25 °C, la resina se separó por filtración y se lavó de forma sucesiva con CH₂Cl₂ (1x), DMF (1x) y CH₂Cl₂ (1x). Se añadió una solución de CH₂Cl₂/MeOH/DIEA (17/2/1, 10 ml) a la resina y la suspensión se agitó durante 30 minutos. Después de filtración, la resina se lavó en el siguiente orden con CH₂Cl₂ (1x), DMF (1x), CH₂Cl₂ (1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (1x), MeOH (1x), CH₂Cl₂ (2x), Et₂O (2x) y se secó con vacío durante 6 horas.

La carga fue típicamente de 0,6 a 0,7 mmol/g.

Se prepararon las siguientes resinas precargadas:

Resina Fmoc-Pro-O-2-clorotritilo.

La síntesis se llevó a cabo utilizando un sintetizador Syro-peptide (MultiSynTech) utilizando 24-96 recipientes de reacción. En cada recipiente se colocaron 0,04 mmol de la resina anterior y la resina se hinchó en CH₂Cl₂ y DMF durante 15 minutos, respectivamente. Se programaron los siguientes ciclos de reacción y se llevaron a cabo:

Etapa	Reactivo	Tiempo
1	DMF, lavado	2 x 1 min
2	piperidina al 20%/DMF	1 x 5 min, 1x15 min
3	DMF, lavado	5 x 1 min
4	5 eq Fmoc-aminoácido/DMF + 5 eq Py-BOP/DMF, 10 eq DIEA/DMF	1 x 60 min
5	DMF, lavado	3 x 1 min

La etapa 4 se repitió una vez.

10 A menos que se indique lo contrario, al acoplamiento final de un aminoácido le seguía la desprotección de Fmoc mediante la aplicación de las etapas 1-3 del ciclo de reacción descrito anteriormente.

Síntesis de las unidades estructurales de aminoácidos

15 Síntesis de Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH

La síntesis del ácido (2S)-N^α-fluorenilmetoxicarbonil-N^ω,N^ω-terc-butiloxicarbonil-isopropil-2,5-diaminopentanoico se llevó a cabo por suspensión de 15,2 g de Fmoc-Orn-OH*HCl en 150 ml de THF (0,26 M) seguido de la adición de 375 ml de acetona (132 eq) y 20,6 g de triacetoxiborohidruro de sodio (2,5 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas y, tras completarse la reacción (seguimiento por LC-MS) se añadieron 120 ml de solución saturada de Na₂CO₃ y 10,2 g de Boc₂O (1,2 eq). Después de agitar durante toda la noche, se añadieron de nuevo solución saturada de Na₂CO₃ y Boc₂O dos veces en partes de acuerdo con el material de partida que quedaba. Después de completarse la introducción de Boc, se añadió hexano dos veces, se separó, y la capa acuosa se acidificó con HCl_{ac}. 5 N (pH = 1) y después se extrajo tres veces con acetato de etilo. Finalmente, las capas orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y se evaporaron para obtener el producto en forma de una espuma blanca.

Las unidades estructurales de los aminoácidos Fmoc-D³Lys(iPr,Boc)-OH y Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH se podían sintetizar de forma análoga; el último también está disponible en el mercado.

30 Ciclación y tratamiento de los péptidos de cadena principal ciclada

Escisión del fragmento de péptido completamente protegido

Después de completarse la síntesis, la resina (0,04 mmol) se suspendió en 1 ml (0,13 mmol, 3,4 eq) de TFA al 1% en CH₂Cl₂ (v/v) durante 3 minutos, se filtró, y el filtrado se neutralizó con 1 ml (0,58 mmol, 14,6 eq) de DIEA al 10% en CH₂Cl₂ (v/v). Este procedimiento se repitió tres veces para asegurar que se completaba la escisión. El filtrado se evaporó a sequedad y una muestra del producto se desprotegió totalmente utilizando una mezcla de escisión que contenía 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de agua y 2,5% de triisopropilsilano (TIS) para analizar por HPLC de fase inversa (columna C₁₈) y ESI-MS para vigilar la eficacia de la síntesis del péptido lineal.

Ciclación del péptido lineal completamente protegido

El péptido lineal completamente protegido (0,04 mmol) se disolvió en DMF (4 μmol/ml). Después se añadieron 30,4 mg (0,08 mmol, 2 eq) de HATU, 10,9 mg (0,08 mmol, 2 eq) de HOAt y 28 μl (0,16 mmol, 4 eq) de DIEA, y la mezcla se agitó con agitador vorticial a 25 °C durante 16 horas y posteriormente se concentró con alto vacío. El residuo se repartió entre CH₂Cl₂ y H₂O/CH₃CN (90/10: v/v). La fase de CH₂Cl₂ se evaporó para dar el péptido cíclico completamente protegido.

Desprotección completa del péptido cíclico

El péptido cíclico completamente protegido obtenido se disolvió en 3 ml de la mezcla de escisión que contenía 82,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de agua, 5% de tioanisól, 5% de fenol y 2,5% de etanoditiol (EDT). La mezcla se dejó en reposo a 25 °C durante 2,5 horas y después se concentró a vacío. Después de la precipitación del péptido cíclico completamente desprotegido en éter dietílico (Et₂O) a 0°C, el sólido se lavó dos veces con Et₂O y se secó.

Formación del enlace disulfuro de cadena β y purificación

Después de la desprotección completa, el péptido bruto se disolvió en tampón de acetato amónico 0,1 M (1 mg/1 ml,

pH = 7-8). Se añadió DMSO (hasta 5% en volumen) y la solución se agitó durante toda la noche. Después de evaporación, el residuo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa.

5 Después de liofilización, los productos se obtuvieron en forma de polvos blancos y se analizaron por el siguiente procedimiento analítico: Los tiempos de retención en HPLC analítica (RT, en minutos) se determinaron utilizando una columna C18 Ascentis Express, 50 x 3,0 mm, (cod. 53811-U-Supelco) con los siguientes disolventes A (H₂O + TFA al 0,1%) y B (CH₃CN + TFA al 0,1%) y el gradiente: 0-0,05 min: 97% de A, 3% de B; 3,4 min: 33% de A, 67% de B; 3,41-3,65 min: 3% de A, 97% de B; 3,66 a 3,7 min: 97% de A, 3% de B. Caudal = 1,3 ml/min; UV-Vis = 220 nm.

10 **Ejemplo 1:** La resina de partida era la resina Fmoc-Pro-O-2-clorotritilo, que se preparó como se ha descrito anteriormente. En esta resina se injertó ^DLys(iPr) en la posición final 15. El péptido lineal se sintetizó sobre un soporte sólido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la siguiente secuencia:

Resina-Pro¹⁶-^DLys(iPr)¹⁵-Lys(iPr)¹⁴-Gln¹³-Tyr¹²-Cys¹¹-Tyr¹⁰-Arg⁹-Orn(iPr)⁸-^DPro⁷-Ala⁶-Ser⁵-Cys⁴-Tyr³-His²-Tyr¹.

15 Después de una desprotección final de Fmoc, como se ha descrito anteriormente, el péptido se escindió de la resina, se cicló, se desprotegió y, después de la formación del enlace disulfuro de cadena β, como se ha descrito anteriormente, se purificó como se ha indicado anteriormente.

20 El tiempo de retención de HPLC (minutos) se determinó utilizando el método analítico como se ha descrito anteriormente (pureza por UV [después de HPLC preparativa]: 95%; RT: 1,54; [M + 3H]/3 = 709,9).

2. Métodos biológicos

2.1. Preparación de los péptidos

25 Los péptidos liofilizados se pesaron en una microbalanza (Mettler MT5) y se disolvieron en DMSO a una concentración final de 10 mM. Las soluciones madre se mantuvieron a +4°C, protegidas de la luz. Los ensayos biológicos se llevaron a cabo en condiciones de ensayo que tenían menos de 1% de DMSO, a menos que se indique lo contrario.

2.2. Cultivo de células

30 Se cultivaron células Namalwa (células no adherentes que expresan CXCR4 de forma natural, ATCC CRL-1432) en RPMI 1640 más 10% de FBS, y pen/estrept. Se mantuvieron células HELA en RPMI 1640 más el 10% de FBS, pen/estrept y L-glutamina 2 mM. Se cultivaron células Cos-7 en medio DMEM con 4500 mg/ml de glucosa complementado con 10% de FCS, pen/estrept y L-glutamina 2 mM. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂. Los medios celulares, complementos de medios, tampón de PBS, HEPES, antibiótico/antimicótico, pen/estrept, aminoácido no esencial, L-glutamina, β-mercaptoetanol y el suero se adquirieron en Gibco (Pailsey, Reino Unido). Todos los productos de química fina fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

2.3. Ensayo quimiotáctico (ensayo de migración celular)

35 La respuesta quimiotáctica de las células Namalwa (ATCC CRL-1432) a un gradiente de factor derivado de células estromales 1α (SDF-1) se midió utilizando un sistema de quimiotaxis de cámara de Boyden modificada (ChemoTX; Neuroprobe). En este sistema, la cámara superior de cada pocillo está separada de la cámara inferior que contiene el SDF-1 quimioatrayente por una membrana de policarbonato (tamaño de poros de 5 μm). Un área circular de esta membrana en la región que cubre cada pocillo inferior está rodeada por una máscara hidrófoba para retener la suspensión celular dentro de este área. El sistema se preparó cargando los pocillos de fondo con partes alícuotas de 30 μl de medio de quimiotaxis (RPMI 1640 sin rojo fenol + 0,5% de BSA) que comprendían bien diluciones seriadas adecuadas de péptidos o bien ningún péptido en combinación con SDF-1 (0,9 nM), o sin el quimioatrayente. La membrana se colocó sobre los pocillos de fondo, y se administraron partes alícuotas de 50 μl de una suspensión de células Namalwa (3,6 x 10⁶ células/ml) en medio de quimiotaxis, premezcladas con medio de quimiotaxis que comprendía o diluciones seriadas adecuadas de péptidos o bien ningún péptido en absoluto, sobre cada una de las regiones limitadas hidrofóticamente de la superficie superior de la membrana. Las células se dejaron migrar hacia la cámara inferior durante 5 horas a 37°C en el 5% de CO₂. Después de este período, la membrana se retiró y su cara superior se limpió cuidadosamente y se lavó con PBS para eliminar las células no migradas. Las células migradas se transfirieron utilizando un adaptador de "embudo" a una placa de recepción de 96 pocillos y el número de células se determinó utilizando el ensayo de proliferación celular CyQuant NF® (Invitrogen), basado en la medición del contenido de ADN celular por la unión a colorante fluorescente. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 50 μl de reactivo colorante de CyQuant®/tampón de HBSS (1/500 [v/v]) a cada pocillo de la placa de recepción de 96 pocillos mencionada anteriormente. Después de la incubación durante 0,5 horas a temperatura ambiente, la placa se selló y se midió la intensidad de fluorescencia de cada muestra utilizando un lector de placas Wallac 1420 VICTOR²® (PerkinElmer) con excitación a 485 nm y detección de emisión a 535 nm. Por último, los datos se normalizaron utilizando los controles y los valores de CI₅₀ se determinaron utilizando GraphPad Prism[®] (GraphPad) ajustando una curva logarítmica a los puntos de datos promediados.

2.4. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los péptidos en células HELA (Acc57) y células COS-7 (CRL-1651) se determinó utilizando el ensayo de reducción de MTT (T. Mossman, *J. Immunol. Meth.* 1983, 65, 55-63; M.V. Berridge, A.S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 303, 474-482). Brevemente, el procedimiento era el siguiente: se sembraron 4.000 células HELA/pocillo y 3.400 células COS-7/pocillo y se cultivaron en placas de microvaloración de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C con el 5% de CO₂. A continuación, se determinó el tiempo cero (Tz) por reducción de MTT (véase a continuación). El líquido sobrenadante de los pocillos restantes se descartó y se añadió mediante pipeta en los pocillos medio de nueva aportación y compuestos en diluciones seriadas (12,5, 25 y 50 µM, triplicados, 0 µM, blanco). Después de incubación de las células durante 48 horas a 37°C con el 5% de CO₂, el líquido sobrenadante se descartó de nuevo y se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo MTT (0,5 mg/ml en RPMI1640 y DMEM, respectivamente). Después de incubación a 37°C durante 2-4 horas, se aspiraron los medios y se enriquecieron las células (100 µl de isopropanol/pocillo). Se midió la absorbancia a 595 nm del formazán solubilizado (DO₅₉₅péptido). Para cada concentración se calcularon promedios de los triplicados. El porcentaje de crecimiento se calculó como sigue: $(DO_{595}péptido - DO_{595}Tz) / (DO_{595}blanco - DO_{595}Tz) \times 100\%$. Las concentraciones IC₅₀ (Inhibición de Crecimiento) se calcularon para cada péptido utilizando una función de línea de tendencia para las concentraciones (50, 25, 12,5 y 0 µM), los correspondientes porcentajes y el valor 50 (=TREND (C₅₀:C₀, %₅₀, %₀, 50)).

2.5. Hemólisis

Se ensayó en los péptidos su actividad hemolítica contra glóbulos rojos humanos (hRBC). Se lavaron hRBC recientes cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron durante 10 min a 3000 x g. Los compuestos (100 µM) se incubaron con hRBC al 20% (v/v) durante 1 hora a 37°C y agitación a 300 rpm. La concentración de eritrocitos final era aproximadamente 0,9 x 10⁹ células/ml. Se determinó un valor de 0% y 100% de lisis celular, respectivamente, por incubación de hRBC en presencia de PBS que contenía 0,001% de ácido acético y el 2,5% de Triton X-100 en H₂O, respectivamente. Las muestras se centrifugaron, los líquidos sobrenadantes se diluyeron 8 veces en tampón de PBS y se midieron las densidades ópticas (DO) a 540 nm. El valor de 100% de lisis (DO₅₄₀H₂O) dio una DO₅₄₀ de aproximadamente 0,5-1,0.

El porcentaje de hemólisis se calculó como sigue: $(DO_{540}péptido / DO_{540}H_2O) \times 100\%$.

2.6. Estabilidad plasmática

La estabilidad de los péptidos en plasma humano y de ratón se determinó aplicando el siguiente método: se enriquecieron 346,5 µl/pocillo profundo de plasma humano recién descongelado (Basler Blutspende-dienst) y plasma de ratón (Harlan Sera-Lab, Reino Unido), respectivamente, con 3,5 µl/pocillo de compuesto disuelto en DMSO/H₂O (90/10 [v/v], 1 mM, por triplicado) y se incubaron a 37°C. En t = 0, 15, 30, 60, 120, 240 y 1440 min se transfirieron partes alícuotas de 50 µl a pocillos de placa de filtración que contenían 150 µl/pocillo de ácido fórmico al 2% en acetonitrilo. Después de agitar durante 2 minutos, las suspensiones que se generaron se filtraron al vacío. Se transfirieron 100 µl de cada filtrado a una placa de microvaloración de propileno y se secaron bajo N₂. Los sólidos residuales se reconstituyeron mediante la adición de 100 µl/pocillo de agua/acetonitrilo, 95/5 (v/v) + 0,2% de ácido fórmico y se analizaron por LC/MS como sigue: Columna: Waters, XBridge C18, fases móviles: (A) agua + 0,1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo/agua, 95/5 (v/v) + 0,1% de ácido fórmico, gradiente: 5%-100% (B) en 1,8 minutos, ionización por electropulverización, detección MRM (triple cuadrupolo). Se determinaron las áreas de los picos y se promediaron los valores triplicados. La estabilidad se expresa en porcentaje del valor inicial en t = 0. $(t_x/t_0 \times 100)$. Utilizando la función TREND de Excel (Microsoft Office 2003) se determinaron los T1/2.

2.7. Unión a proteínas plasmáticas

Se pusieron 495 µl de partes alícuotas de plasma humano (Basler Blutspendedienst), así como 495 µl de partes alícuotas de PBS en pocillos profundos individuales de una placa de polipropileno (Greiner) y se enriqueció cada uno con 5 µl de soluciones 1 mM de péptidos en DMSO al 90%. Después de agitar la placa durante 2 minutos a 600 rpm se transfirieron partes alícuotas de 150 µl de las mezclas de plasma/péptidos por triplicado a la placa de filtración de polipropileno (10 kDa, Millipore), a la vez que se transfirieron partes alícuotas de 150 µl de las mezclas de PBS/péptido bien a los pocillos individuales de la placa de filtración (controles filtrados) o bien directamente a los pocillos individuales de la placa receptora (Greiner) (controles sin filtrar). El sándwich de placas, que consistía en la placa de filtración y la placa de recepción se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se centrifugó a 3220 g durante 2 horas a 15°C. Los filtrados en la placa receptora se analizaron por LC/MS como sigue: Columna: Waters, XBridge C18, fases móviles: (A) agua + 0,1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo/agua, 95/5 (v/v) + 0,1% de ácido fórmico, gradiente: 5%-100% de (B) en 1,8 minutos, ionización por electropulverización, detección MRM (triple cuadrupolo). Se determinaron las áreas de los picos y se promediaron los valores triplicados. La unión se expresa en porcentaje de los controles filtrados y no filtrados por $100 - (100 \times T_{1h} / T_{ctr})$. Finalmente se calcula el promedio de estos valores.

Los resultados de los experimentos descritos en los puntos 2.3 – 2.7 se indican en las tablas 1, 2, 3 y 4 en el presente documento a continuación.

2.8. Estudio farmacocinético (PK)

5 Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos para el compuesto del ejemplo 1, después de administración intravenosa (iv).

10 Se utilizaron ratones macho CD-1 de 30 gramos (\pm 20%) obtenidos de Charles River Laboratories Deutschland GmbH. Se añadió el vehículo, solución salina tamponada con fosfato, para dar una concentración final de 0,5 mg/ml del compuesto. El volumen era de 2 ml/kg y el compuesto se inyectó para dar una dosis intravenosa final de 1 mg/kg. Se extrajeron aproximadamente 300-400 μ l de sangre bajo anestesia de isoflurano ligera por punción cardiaca a intervalos predeterminados de tiempo (5, 15, 30 minutos y 1, 2, 3, 4, horas) y se añadieron a tubos heparinizados. El plasma se separó de las células sedimentadas tras la centrifugación y se congeló a -80°C antes del análisis por HPLC-MS.

15 *Preparación de muestras de plasma de calibración y de plasma de estudio*

Partes alícuotas de 50 μ l de cada plasma de ratón de animales no tratados (plasma de ratón "blanco") se enriquecieron con cantidades conocidas del compuesto del ejemplo 1 con el fin de obtener 10 muestras de plasma de calibración para cada compuesto en el intervalo de 1-4000 ng/ml. Se utilizaron partes alícuotas de 50 μ l de cada plasma de ratón de animales tratados como muestras de plasma de estudio.

Extracción de muestras de plasma de calibración y muestras de plasma de estudio

25 Todas las muestras de plasma se enriquecieron con un patrón interno adecuado y se extrajeron con acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 2%. Los líquidos sobrenadantes se evaporaron a sequedad bajo nitrógeno y los sólidos que quedaban se reconstituyeron en agua + ácido fórmico al 0,2%/acetonitrilo 95/5 (v/v).

Análisis de LC-MS/MS

30 A continuación, los extractos se analizaron por cromatografía de fase inversa (columna Acquity HSS C18 SB, 100 x 2,1 mm, 1,8 μ m Waters), utilizando las siguientes condiciones: fases móviles: (A) agua + ácido fórmico al 0,1%/acetonitrilo 95/5 (v/v), (B) acetonitrilo/agua + ácido fórmico al 0,1% 95/5 (v/v), gradiente: 1% de (B) 0-0,1 minutos, 40% de (B) 0,1-2,5. La detección y cuantificación se realizaron por espectrometría de masas, con la interfaz de electropulverización en modo positivo y fragmentación selectiva de analitos (espectrómetro de masas 4000 Q Trap, AB Sciex).

Evaluación farmacocinética

40 Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el software WinNonLin[®] versión 5.3 (Pharsight-A Certara[®] Company, Mountain View, California 94041 EE.UU.) utilizando un análisis de modelo monocompartimental. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron por ajuste de mínimos cuadrados del modelo a los datos experimentales.

45 Los resultados de los experimentos descritos en 2.8 se indican en las tablas 5a y 5b en el presente documento a continuación.

2.9. Cálculos de carga de fármaco mediante la tasa de dosis de mantenimiento (velocidad de infusión)

50 La carga de fármaco para un implante que comprendía un péptido de la presente invención se calculó siguiendo los principios básicos de la farmacocinética (véase también, J. Gabrielsson, D. Weiner, "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Data Analysis: Concepts and Applications" 4^a edición, Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo, Suecia, 2006), por los cuales la tasa de dosis de mantenimiento (velocidad de infusión, R_{in}) se puede definir como la tasa con la que un fármaco debe administrarse para alcanzar un estado estacionario de una cierta dosis en el plasma. La tasa de dosis de mantenimiento se puede expresar mediante la correlación $R_{in} [\text{g}/(\text{h}\cdot\text{kg})] = \text{CL}_{iv} [\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg})] \times C_{ss,eff} [\text{g}/\text{l}]$, en la que CL_{iv} es la eliminación (administración i.v.) y $C_{ss,eff}$ es la concentración efectiva del fármaco en el plasma en estado estacionario considerando un margen de eficacia A: $C_{ss,eff} [\text{g}/\text{l}] = A \times (\text{Cl}_{50}/f_u) \times \text{PM} [(\text{mol}/\text{l})\cdot(\text{g}/\text{mol})]$. Por lo tanto, la cantidad total de un fármaco cargado en un implante que proporciona una concentración eficaz constante de ese fármaco en el plasma durante un determinado período de tiempo en un sujeto de un determinado peso corporal se puede calcular aplicando la siguiente correlación:

$$60 \quad \text{Fármaco}_{\text{carga}} [\text{g}/\text{sujeto}] = R_{in} [\text{g}/(\text{h}\cdot\text{kg})] \times \text{duración} [\text{h}] \times \text{PC} [\text{kg}/\text{sujeto}].$$

Los resultados de los cálculos descritos en 2.9 se indican en la tabla 6 a continuación en el presente documento y se basan en los datos dados de las tablas 1, 4 y 5b. Otras condiciones previas son un margen de eficacia de $A = 3$, una duración del estudio de 672 horas (28 días) y un peso corporal de un sujeto humano de 70 kg. La velocidad de filtración glomerular (GFR), que influye principalmente en la eliminación de los péptidos, es muy dependiente de la

especie. En general, la GFR de los seres humanos se promedia a 107 ml/(h*kg) en comparación con la GFR del ratón, que es 840 ml/(h*kg). Por lo tanto, los valores CL_{iv} de ratón indicados en la tabla 5b se aumentaron de escala alométricamente por $107 \text{ ml}/(\text{h}\cdot\text{kg})/840 \text{ ml}/(\text{h}\cdot\text{kg}) = 0,127$ antes de utilizarse en las correlaciones descritas anteriormente.

5

Tabla 1

Ej.	CI_{50} [nM] \pm DE, receptor CXCR4
1	0,17 \pm 0,1

Tabla 2

Ej.	Citotoxicidad		Hemolisis a 100 μ M [%]
	Células Hela IC_{50} [μ M]	Células Cos-7 IC_{50} [μ M]	
1	> 42	> 50	1.0

10

Tabla 3

Ej.	Estabilidad plasmática			
	pl. humano $T_{1/2}$ [min]	pl. human cpto dejado a los 1440 min [%]	pl. de ratón $T_{1/2}$ [min]	pl. de ratón cpto dejado a los 1440 min [%]
1	1440	100	1440	100

Tabla 4

Ej.	Unión a proteínas del plasma [%]	Fracción no unida, f_u
1	55	0,45

Tabla 5a

Ej. 1, vía i.v., Dosis: 1 mg/kg		
Tiempo [h]	Conc. Calc. [ng/ml]	Núm. de anim. mezclados
0,083	1693	3
0,25	1050	1
0,5	749	3
1	385	3
2	61	3
3	< LoQ	3
4	< LoQ	3
< LoQ por debajo del límite de cuantificación		

15

Tabla 5b

vía i.v.	Ej. 1
Dosis [mg/kg]	1
V_{dis} [ml/kg]	532
CL_{iv} [ml/h/kg]	984
$AUC_{0-\infty}$ [ng*h/ml]	1016
$C_{m\acute{a}x}$ [ng/ml]	1881
Semivida [h]	0,4

Tabla 6

Ej.	Peso molecular (sin sal), PM [g/mol]	CL_{iv} , humano (aumento de escala alométrico) [ml/h/kg]	Fármaco _{carga} [mg]
1	2127,53	125	14,2 \pm 8,4

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general

- 5 ciclo(-Tyr¹-His²-Xaa³-Cys⁴-Ser⁵-Xaa⁶-^DPro⁷-Xaa⁸-
Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Xaa¹⁵-Pro¹⁶-)
con enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo,
en el que
Xaa³ es Tyr; Tyr(Me); o Tyr(CF₃),
10 Tyr(Me) es ácido (2S)-2-amino-(4-metoxifenil)-3-propiónico,
Tyr(CF₃) es ácido (2S)-2-amino-(4-trifluorometoxifenil)-3-propiónico,
Xaa⁶ es Ala; o Acc
Acc es ácido 1-aminociclopropano-carboxílico,
Xaa⁸ es Orn(iPr),
15 Orn(iPr) es ácido (2S)-N^w-isopropil-2,5-diaminopentanoico,
Xaa¹³ es Gin; o Glu,
Xaa¹⁴ es Lys(iPr),
Lys(iPr) es ácido (2S)-N^w-isopropil-2,6-diaminohexanoico,
Xaa¹⁵ es ^DLys(iPr),
20 ^DLys(iPr) es ácido (2R)-N^w-isopropil-2,6-diaminohexanoico,
con la condición de que si Xaa⁶ es Ala, entonces Xaa¹⁵ es ^DLys(iPr).

2. Ciclo(-Tyr¹-His²-Tyr³-Cys⁴-Ser⁵-Ala⁶-^DPro⁷-Orn(iPr)⁸-Arg⁹-Tyr¹⁰-Cys¹¹-Tyr¹²-Gln¹³-Lys(iPr)¹⁴-^DLys(iPr)¹⁵-Pro¹⁶-), con
enlace disulfuro entre la Cys⁴ y Cys¹¹, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 25 3. Compuesto, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para utilizar como sustancias terapéuticamente
activas, en particular, como sustancias que tienen actividad antagonista de CXCR4, anticancerígena y/o actividad
antiinflamatoria y/o actividad de movilización de células madre.
- 30 4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y
un vehículo farmacéuticamente inerte, en particular en una forma adecuada para la administración oral, tópica,
transdérmica, por inyección, bucal o transmucosa, tal como un comprimido, gragea, cápsula, solución, líquido, gel,
parche, crema, pomada, jarabe, lechada, suspensión, polvo o supositorio.
- 35 5. Utilización de un compuesto, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como un medicamento que tiene
actividad antagonista de CXCR4, anticancerígena y/o actividad antiinflamatoria y/o actividad de movilización de
células madre, en particular para prevenir las infecciones por VIH en individuos sanos; para retrasar o detener el
avance vírico en un paciente infectado por el VIH; para tratar o prevenir un cáncer o una enfermedad inmunológica
que está mediada por la actividad del receptor CXCR4 o es resultado de la misma; para tratar la inmunosupresión;
40 para asistir la recolección por aféresis de células madre de la sangre periférica; o para inducir la movilización de
células madre para regular la reparación de tejido.
- 45 6. Utilización de un compuesto, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un
medicamento que tiene actividad antagonista de CXCR4, anticancerígena y/o actividad antiinflamatoria y/o actividad
de movilización de células madre, en particular para prevenir las infecciones por VIH en individuos sanos; para
retrasar o detener el avance vírico en un paciente infectado por el VIH; para tratar o prevenir un cáncer o una
enfermedad inmunológica que está mediada por la actividad del receptor CXCR4 o es resultado de la misma; para
tratar la inmunosupresión; para asistir la recolección por aféresis de células madre de la sangre periférica; o para
inducir la movilización de células madre para regular la reparación de tejido.
- 50 7. Procedimiento para fabricar compuestos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo procedimiento
comprende
- 55 (a) el acoplamiento de un soporte sólido funcionalizado de forma adecuada con un derivado de Pro protegido de
forma adecuada en el N, que en el producto final deseado está en la posición 16;
(b) la eliminación del grupo protector de N del producto así obtenido;
(c) el acoplamiento del producto así obtenido con un derivado del aminoácido protegido de forma adecuada en
el N que en el producto final deseado está en la posición 15, estando también protegido de forma adecuada
cualquier grupo funcional que pueda estar presente en dicho derivado de aminoácido protegido en el N;
60 (d) la eliminación del grupo protector de N del producto obtenido en la etapa (c);
(e) la realización de las etapas que corresponden sustancialmente a las etapas (c) y (d) utilizando derivados de
los aminoácidos protegidos de forma adecuada en N que en el producto final deseado están en las posiciones
n-2 a 1, estando también protegidos de forma adecuada cualquier grupo o grupos funcionales que puedan estar
presentes en dichos derivados de aminoácidos protegidos en N;
65 (f) si se desea, la formación de un enlace disulfuro entre las cadenas laterales de los restos de Cys de la P4 y la
P11; o alternativamente, formación del enlace mencionado después de la etapa (i), como se describe en el

presente documento más adelante;

(g) el desprendimiento del producto así obtenido del soporte sólido;

(h) la ciclación del producto escindido del soporte sólido;

5 (i) la eliminación de cualquier grupo protector presente en los grupos funcionales de cualquier miembro de la cadena del resto de aminoácido; y

(j) si se desea, la unión de uno o varios grupos isopropilo

(k) si se desea, la conversión del producto así obtenido en una sal farmacéuticamente aceptable o conversión de una sal farmacéuticamente aceptable o no aceptable así obtenida en el compuesto libre correspondiente, o en una sal farmacéuticamente aceptable diferente.