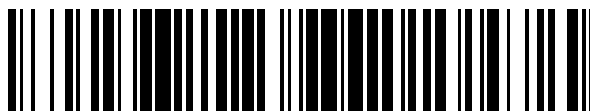


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 999**

51 Int. Cl.:

A61K 31/015	(2006.01)	A61P 27/02	(2006.01)
A61K 31/135	(2006.01)	A61P 27/06	(2006.01)
A61K 31/216	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)
A61K 31/09	(2006.01)	A61P 15/00	(2006.01)
A61K 31/155	(2006.01)		
A61K 31/4192	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05817221 .4**
- 96 Fecha de presentación: **04.10.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1802291**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Miméticos con conformación peptídica a base de calixareno, métodos de uso, y métodos para obtenerlos**

30 Prioridad:
04.10.2004 US 616133 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

73 Titular/es:
**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
1000 WESTGATE DRIVE, SUITE 160
SAINT PAUL, MN 55114-8658, US**

72 Inventor/es:
**MAYO, Kevin H.;
HOYE, Thomas R. y
CHEN, Xuemei**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 378 999 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

Miméticos con conformación peptídica a base de calixareno, métodos de uso, y métodos para obtenerlos

ANTECEDENTES

5 Los péptidos que destruyen la membrana bacteriana, que tienen su origen en péptidos catiónicos de origen natural, ofrecen alternativas prometedoras como antibióticos del futuro. Estos nuevos agentes demuestran generalmente un amplio espectro de actividad antibacteriana, y actúan destruyendo la integridad de toda la membrana celular bacteriana, reduciendo de ese modo el riesgo de resistencia a fármacos (M.L. Cohen, *Science* 257, 1050-55 (1992); y A.M.D. Virk et al., *Mayo Clinic Proc.* 75, 200-214 (2000)). Los péptidos antibacterianos tienen dos rasgos principales distintivos: una carga positiva neta, típicamente de +2 a +6, y un plegamiento anfipático global que proporciona caras polares e hidrófobas a la molécula (A. Giangaspero et al., *Eur. J. Biochem.* 268, 5589-5600 (2001)). La naturaleza catiónica de los péptidos antibacterianos promueve aparentemente la interacción selectiva con la superficie cargada negativamente de las membranas bacterianas con relación a la superficie más neutra de membranas eucariotas (K. Matsuzaki et al., *Biochemistry* 36, 9799-9806 (1997)). Una vez atraído a la superficie, el péptido, con su topología anfipática, dispara la lisis celular bacteriana (D. Andreu et al., *Biochemistry* 24, 1683-1688 (1985)).

20 La septicemia y el choque séptico son complicaciones sistémicas asociadas normalmente con elevados niveles de endotoxina de lipopolisacárido (LPS) en el torrente sanguíneo. Se sabe que muchos péptidos bactericidas se unen *in vitro* a y neutralizan LPS (por ejemplo, cecropinas, magaininas, péptidos ricos en prolina-arginina, sapecina, taquiplesina, y defensinas) (Andreu et al., *Biopolymers*, 47; 415-33 (1998)), así como, más recientemente, péptidos β pep (Mayo et al., *Protein Sci.*, 5; 13001-1315 (1996); Mayo et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1425; 81-92 (1998)), SC4 (Mayo et al., *Biochem. J.*, 349(3); 717-28 (2000)), y péptido a base de lactoferrina LF11 (Japelj et al., *J. Biol. Chem.*, 280; 16955-61 (2005)). Quizá el más prototípico es polimixina B (PmxB), un pequeño lipopéptido cíclico (Rifkind, *J. Bacteriol.*, 93; 1463-4 (1967)). Sin embargo, debido a su elevada neuro- y nefrotoxicidad, PmxB está limitado a la aplicación tópica, y la mayoría de otros agentes bactericidas no son muy efectivos frente a LPS *in vivo*.

25 Algunas proteínas bactericidas de origen natural también poseen propiedades neutralizadoras de endotoxinas. También se han identificado varios destructores de membranas no peptídicos (Lockwood et al., *Drugs of the Future* 28, 911-923 (2003)). El más sobresaliente de estos es escualamina, que es anfipático, no por la naturaleza de su estructura plegada, sino por la presencia de apéndices cargados (incluyendo la triamina policatiónica) en un núcleo esteroideo (Moore et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1354-1358 (1993)). El mecanismo de escualamina, a pesar de su pequeño tamaño, es similar a la de los péptidos destructores de membranas (Selinsky et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1370, 218-234 (1998); Selinsky et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1464, 135-141 (2000)).

35 Un estudio estructural de estos péptidos revela que, independientemente de su conformación plegada, destacan dos rasgos que son importantes para la unión a LPS: el carácter anfipático y una carga neta positiva (Lockwood et al., *Drugs of the Future*, 28; 911-923 (2003)). Presumiblemente, los restos cargados positivamente del péptido promueven la interacción con grupos cargados negativamente en LPS, es decir, fosfatos en las glucosaminas del lípido A y/o aquellos en la unidad de polisacárido del núcleo interno, mientras que los restos hidrófobos del péptido interaccionan con las cadenas acílicas en el lípido A. Los estudios estructurales de péptidos en complejo con LPS apoyan esta noción, y han proporcionado una comprensión adicional de los orígenes moleculares de la neutralización de LPS mediada por péptidos (Japelj et al., *J. Biol. Chem.*, 280; 16955-61 (2005); Ferguson et al., *Science*, 282; 2215-20 (1998); Pristovsek et al., *J. Med. Chem.*, 42; 4604-13 (1999)).

45 De forma interesante, el motivo de una estructura anfipática positivamente cargada (principalmente lámina β antiparalela) también se encuentra en un número de proteínas y péptidos que funcionan como agentes antiangiogénicos (Dings et al., *Angiogenesis*, 6; 83-91 (2003)). Por ejemplo, la angiostatina se pliega en una estructura de lámina β antiparalela con un sitio de unión rico en lisina muy electropositivo (Abad, *J. Mol. Biol.*, 318; 1009-17 (2002)). La endostatina tiene una estructura de lámina β predominantemente antiparalela (Hohenester et al., *EMBO J.*, 17; 1656-1664 (1998)) y está cargada muy positivamente, particularmente debido a la presencia de múltiples restos de arginina. La angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, es clave para el desarrollo normal de órganos, así como para diversos trastornos patológicos como cáncer, artritis, endometriosis, retinopatía diabética, y restenosis (Griffioen et al., *Pharmacol. Rev.*, 52; 237-68 (2000)). El uso de agentes que pueden inhibir la angiogénesis, particularmente en investigación antitumoral, ha indicado que la terapia antiangiogénica es una modalidad terapéutica prometedora (Boehm et al., *Nature*, 390; 404-7 (1997)).

55 En la pasada década más o menos, los investigadores han comenzado a desarrollar péptidos modificados o totalmente sintéticos (Sitaram et al., *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 166-173 (1995); Saberwal et al., *Biochim. Biophys. Acta* 984, 360-364 (1989); Tossi et al., *Eur. J. Biochem.* 250, 549-558 (1997); Blondelle et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1067-1071 (1996); Dathe et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 71-87 (1999); y Beven et al., *Eur. J. Biochem.* 270, 2207-2217 (2003)). Algunos péptidos anfipáticos resultantes muestran amplia actividad bactericida prometedora y especificidad por células bacterianas en lugar de células eucariotas (R.E. Hancock, *Lancet* 349, 418-

422 (1997); Hancock et al., Adv. Microb. Physiol. 37, 135-175 (1995). Se ha hecho poco para diseñar compuestos topomiméticos no peptídicos que imiten una porción de la superficie de una proteína o péptido. Todavía se necesitan compuestos topomiméticos adicionales.

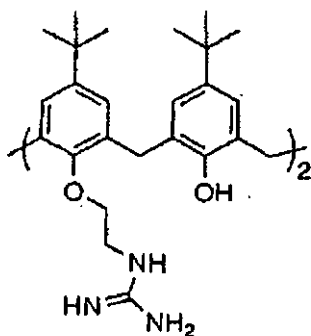
SUMARIO

5 La presente invención se refiere a una clase de compuestos topomiméticos que proporcionan una variedad de actividades biológicas. Estos compuestos topomiméticos incluyen miméticos peptídicos que usan un andamio orgánico y grupos particulares para modelar las características de superficie de moléculas bioactivas existentes. El uso de un andamio orgánico permite la preparación de compuestos que tienen una variedad de actividades biológicas y propiedades farmacocinéticas potencialmente superiores. Esta clase de compuestos incluye miméticos peptídicos a base de calixareno. Se ha preparado una librería de miméticos peptídicos a base de calixareno, y se muestra aquí que posee actividad biológica (por ejemplo, actividad bactericida, actividad angiogénica, y/o actividad antitumoral).

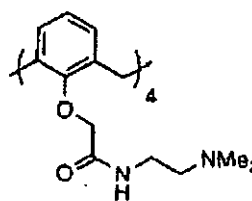
15 Un aspecto de la presente invención se basa en la capacidad para capturar más completamente las conformaciones plegadas de pequeños segmentos de topografía proteica (por ejemplo, hélice y lámina beta), ejemplificado en dos péptidos (β pep-25 y SC4) con actividades biológicas en cierto modo diferentes, usando calixareno en un método de enfoque a base de andamio. Ventajosamente, se puede emplear una librería a base de calixareno de compuestos análogos para buscar actividades en otros sistemas por lo cual se puede imitar la actividad biológica.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona los siguientes apartados:

20 1. Un método *in vitro* para inhibir la angiogénesis, comprendiendo el método poner en contacto células con una cantidad de una composición efectiva para inhibir la angiogénesis, comprendiendo la composición un mimético peptídico a base de calixareno seleccionado de

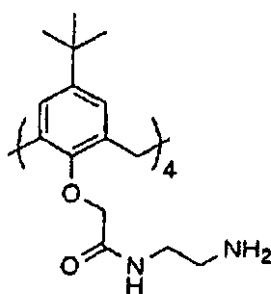


Compuesto 27



Compuesto 40

o derivados con puentes del compuesto 4, en el que el compuesto 4 es



Compuesto 4

25 2. Una composición que comprende un mimético peptídico a base de calixareno como se define en el apartado 1, en la que la composición es para uso en el tratamiento o prevención de crecimiento tumoral, artritis, restenosis, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, y endometriosis.

30 3. Una composición que comprende un mimético peptídico a base de calixareno como se define en el

apartado 1, en la que la composición es para uso en la inhibición de tumorigénesis.

4. Uso de un mimético peptídico a base de calixareno como se define en el apartado 1, para la preparación de un medicamento para inhibir la tumorigénesis.

5. Uso de un mimético peptídico a base de calixareno como se define en el apartado 1, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir crecimiento tumoral, artritis, restenosis, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, y endometriosis.

El término “comprende” y sus variaciones no tienen un significado limitante allí donde estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

10 Como se usan aquí, “un”, “una”, “el”, “al menos uno” y “uno o más” se usan de forma intercambiable. De este modo, por ejemplo, una composición que comprende “un” mimético peptídico a base de calixareno se puede interpretar que significa que la composición incluye “uno o más” miméticos peptídicos a base de calixareno. Además, una “composición”, como se usa aquí, puede consistir en sólo un mimético peptídico a base de calixareno, sin ningún otro componente (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable).

15 “Tratar”, “tratando”, y “tratamiento”, etc., como se usan aquí, se refieren a cualquier acción que proporciona un beneficio a un paciente afligido con una enfermedad, incluyendo la mejora en la afección mediante la disminución o supresión de al menos un síntoma, retraso en la progresión de la enfermedad, prevención o retraso en el comienzo de la enfermedad, etc.

20 La invención es inclusiva de los compuestos descritos aquí (incluyendo intermedios) en cualquiera de sus formas farmacéuticamente aceptables, incluyendo isómeros (por ejemplo, diastereómeros y enantiómeros), tautómeros, sales, solvatos, polimorfos, profármacos, y similares. Se debería entender que el término “compuesto” incluye cualquiera o todas las citadas formas, allí donde se señale explícitamente o no (aunque a veces se señalen explícitamente “sales”).

25 También, el término “compuesto” incluye la forma iónica del mimético peptídico a base de calixareno (por ejemplo, un mimético peptídico a base de calixareno cargado positivamente). Como se entendería por los expertos en la técnica, las formas iónicas de péptidos se encuentran generalmente asociadas con un contraión apropiado para dar como resultado un compuesto que tiene una carga global neutra. Sin embargo, el propio mimético peptídico a base de calixareno iónico retiene una carga (aunque una carga que está complementada por la carga opuesta del contraión correspondiente), y generalmente se encontrará en forma cargada cuando se disocia la sal, como ocurrirá cuando la forma salina del mimético peptídico a base de calixareno se coloca en un entorno acuoso, tal como cuando se administra y se libera en un entorno *in vivo*.

30 “Farmacéuticamente aceptable”, como se usa aquí, significa que el compuesto o composición es adecuado para la administración a un sujeto para lograr los tratamientos descritos aquí.

35 Temperatura ambiente, como se define aquí, es la temperatura ambiente a la que generalmente se mantiene una habitación usada para habitabilidad de seres humanos, y es generalmente una, temperatura de 20 a 25°C, siendo particularmente preferida 22,5°C.

Un grupo, como se define aquí, es un grupo de elementos que se denomina tradicionalmente como una entidad colectiva, ya sea en base a la funcionalidad o a la conveniencia de organización. Un grupo orgánico, como se define aquí, es un grupo que contiene al menos un átomo de carbono.

40 Como se usa aquí, los términos “alquilo”, y el prefijo “alc”, son inclusivos de grupos tanto de cadena lineal como de cadena ramificada, y de grupos cíclicos, por ejemplo cicloalquilo. Preferiblemente, estos grupos contienen de 1 a 20 átomos de carbono. En algunas realizaciones, estos grupos tienen un total de hasta 10 átomos de carbono, hasta 8 átomos de carbono, hasta 6 átomos de carbono, o hasta 4 átomos de carbono. El tamaño preferido del grupo variará dependiendo de la topografía deseada de la estructura que se imite. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos, y tienen preferiblemente de 3 a 10 átomos de carbono anulares. Los grupos cíclicos ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclopentilo, ciclohexilo, adamantilo, y bornilo sustituido y no sustituido, norbornilo, y norbornenilo.

45 El término “arilo”, como se usa aquí, incluye anillos o sistemas anulares aromáticos carbocíclicos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, fluorenilo e indenilo.

Excepto que se indique de otro modo, el término “heteroátomo” se refiere a los átomos O, S, o N.

50 El término “heteroarilo” incluye anillos aromáticos o sistemas anulares que contienen al menos un heteroátomo anular (por ejemplo, O, S, N). En algunas realizaciones, el término “heteroarilo” incluye un anillo o sistema anular que contiene 2 a 12 átomos de carbono, 1 a 3 anillos, 1 a 4 heteroátomos, y O, S, y/o N como los heteroátomos. Los grupos heteroarilo adecuados incluyen furilo, tienilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, isoindolilo, triazolilo,

pirrolilo, tetrazolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, carbazolilo, benzoxazolilo, pirimidinilo, bencimidazolilo, quinoxalinilo, benzotiazolilo, naftiridinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, purinilo, quinazolinilo, pirazinilo, l-oxidopiridilo, piridazinilo, triazinilo, tetrazinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, etc.

5 El término "heterociclilo" incluye anillos o sistemas anulares no aromáticos que contienen al menos un heteroátomo anular (por ejemplo, O, S, N), e incluye todos los derivados completamente saturados y parcialmente insaturados de los grupos heteroarilo mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, el término "heterociclilo" incluye un anillo o sistema anular que contiene 2 a 12 átomos de carbono, 1 a 3 anillos, 1 a 4 heteroátomos, y O, S, y N como los heteroátomos. Los grupos heterociclilo ejemplares incluyen pirrolidinilo, tetrahidrofurano, morfolinilo, tiomorfolinilo, 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, tiazolidinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, 10 tetrahidropirano, quinuclidinilo, homopiperidinilo (azepanilo), 1,4-oxazepanilo, homopiperazinilo (diazepanilo), 1,3-dioxolanilo, aziridinilo, azetidino, dihidroisoquinolin-(1*H*)-ilo, octahidroisoquinolin-(1*H*)-ilo, dihidroquinolin-(2*H*)-ilo, octahidroquinolin-(2*H*)-ilo, dihidro-1*H*-imidazolilo, 3-azabicyclo[3.2.2]non-3-ilo, y similares.

15 Los términos éster, amida, amina, hidroxilo, haluro, sulfonato, fosfonato, y guanidina se refieren a diversos grupos funcionales opcionales diferentes que se pueden incluir en grupos unidos a los sustratos topomiméticos de la invención. Los grupos funcionales se describen adicionalmente mediante las siguientes fórmulas químicas: éster = - (CO)-O-; amida = -(CO)-NH-; amina = -NH₂, hidroxilo = -OH; halógeno es un elemento seleccionado del grupo que consiste en F, Cl, Br, e I; sulfonato = -OSO₃⁻; fosfonato = -P(O)(OH)₂; y guanidina = -NH-C(=NH)-NH₂. Un ejemplo de un grupo usado en una realización de la invención que incluye un grupo funcional halogenado es un grupo trifluorometilo.

20 Como se usa aquí, los términos "alcoxi" y "tioalcoxi" se refieren a grupos en los que dos grupos alquilo hidrocarbonados están enlazados a un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, respectivamente. Por ejemplo, un grupo representado por la fórmula -O-R es un grupo alcoxi, mientras que un grupo representado por la fórmula -S-R es un grupo tioalcoxi. Por ejemplo, un grupo cicloalquilalcoxi es un grupo alcoxi unido a un grupo cicloalquilo, 25 mientras que un grupo aralquilo es un grupo alcoxi unido a un grupo aralquilo, como se define aquí. El R en un grupo alcoxi o tioalcoxi, descrito anteriormente, puede ser cualquier grupo arilo o alquilo, como se describe aquí.

Cuando un grupo está presente más de una vez en cualquier fórmula descrita aquí, cada grupo se selecciona independientemente, tanto si se señala explícitamente como si no.

30 El sumario anterior de la presente invención no está destinado a describir cada realización descrita o cada implementación de la presente invención. La descripción siguiente ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona una guía a través de listas de ejemplos, ejemplos los cuales se pueden usar en diversas combinaciones. En cada caso, la lista citada sirve sólo como un grupo representativo, y no se debe de interpretar como una lista exclusiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La Figura 1 muestra los rasgos del diseño topológico que influyen en la elección del andamio del calix[4]areno para colocar grupos hidrófobos e hidrófilos que imitan las características estructurales y composicionales de hélices y láminas anfipáticas. Las estructuras plegadas de SC4 y βpep-25 se muestran en la izquierda superior e inferior, respectivamente, indicándose los restos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos.

40 La Figura 2 muestra las estructuras químicas para los análogos de calixareno en la librería de topomiméticos de hélice/lámina. (a) Agentes que contienen grupos amina terciaria; (b) agentes que contienen grupos guanidina; (c) agentes que contienen otros grupos básicos y ácidos; (d) topología de una estructura de cono parcial genérica.

La Figura 3 muestra datos de la inhibición de la proliferación de células endoteliales (EC) para 3 derivados calixarénicos (**40**, **11** y **27**).

45 La Figura 4 muestra secciones transversales de tejidos tumorales, teñidas con anticuerpos anti-CD45 y anti-CD8, que muestran el efecto de los compuestos calixarénicos **40** y **27** sobre la infiltración de células T auxiliares y leucocitos en general, respectivamente, en tumores. La Figura 4A muestra los resultados con anticuerpos anti-CD8 y carcinoma ovárico humano MA148, mientras que la Figura 4B muestra los resultados con anticuerpos anti-CD45 y melanoma de ratón B16.

50 La Figura 5 proporciona gráficas que muestran que los topomiméticos de hélice/lámina protegen a ratones frente a LPS. Se usaron tres topomiméticos de hélice/lámina (**12**, **42**, y **46a**) en modelos de endotoxemia de ratón, para evaluar la eficacia *in vivo*. (A) Supervivencia de los ratones después de exponerlos a 600 μl de la forma de LPS de serotipo 055:B5 de *E. coli* con o sin uno de los compuestos. El porcentaje de supervivencia de tratamiento con el compuesto **12** y **42** mejora significativamente ($p = 0,03$ y $0,006$, respectivamente). (B) Supervivencia de ratones después de exponerlos a 500 μl de la forma de LPS de serotipo 0111:B4 de *E. coli* 55 con o sin uno de los compuestos. El porcentaje de supervivencia del tratamiento con el compuesto **42**

aumentó significativamente ($p = 1,3 \cdot 10^{-5}$). (C) Supervivencia de ratones después de exponerlos a 600 μl de la forma de LPS de *Salmonella* con o sin uno de los compuestos. El porcentaje de supervivencia del tratamiento con el compuesto **46a**, **12** y **42** aumentó significativamente ($p = 9 \times 10^{-8}$, 0,008 y 0,002 respectivamente). En todos los paneles, los símbolos se definen como: control (\square), **12** (\bullet), **46a** (\blacktriangle), **42** (\blacktriangledown).

5 La Figura 6 proporciona gráficas e ilustraciones que muestran la bioactividad de topomiméticos en ensayos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. (A) La proliferación de cultivos de HUVEC estimuladas con bFGF se midió usando un ensayo de incorporación de [^3H]-timidina. Las curvas de respuesta frente a la dosis hasta 25 μM de compuesto se realizaron para los derivados calixarénicos y $\beta\text{pep-25}$ de control. Los resultados se expresan como recuentos medios por minuto (\pm SD) de tres experimentos independientes a partir de cultivos triplicados.
10 (B) El efecto inhibitorio sobre la migración se determinó usando el ensayo de curación de lesiones. Se lesionó una capa confluyente de HUVECs, y se cultivó subsiguientemente con o sin compuestos (25 μM). Los resultados se expresan como anchuras medias de lesiones de cultivos duplicados a partir de tres experimentos independientes. (C) Inhibición de la angiogénesis *in vivo* en el ensayo de membrana corioalantoica (CAM). En el día 10, los compuestos se añadieron (25 μM) diariamente, y en el día 14 se tomaron fotografías de la CAM.
15

La Figura 7 proporciona gráficas que muestran que los topomiméticos inhiben el crecimiento tumoral en ratones. Ratones que poseen el tumor MA148 se trataron con $\beta\text{pep-25}$ (10 mg/kg/día), así como con las dosis farmacológicas y equivalentes molares de **40** y **27**. En todos los experimentos, el tratamiento se inició después de que los tumores se consolidaron. (A) Respuesta frente a la dosis para la inhibición del crecimiento del tumor MA148 mediante **40**. (B) **27** inhibe el crecimiento del tumor MA148. (C) El crecimiento del tumor melanómico B16 es inhibido por **40** y **27** cuando se administran continua y sistémicamente (minibomba osmótica). (D) El crecimiento del tumor melanómico B16 es inhibido por **40** y **27** cuando se administran dos veces al día mediante inyecciones intraperitoneales. En todos los estudios, los animales del control se trataron con PBS que contiene una cantidad equivalente de DMSO (30% v/v). Los volúmenes de tumores (\pm SEM) se representan gráficamente en mm^3 frente a días tras la inoculación. Para el modelo de MA148, $n = 5-7$ ratones en cada grupo; para el modelo de B16, $n = 6-10$ en cada grupo. Todos los grupos de tratamiento inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con el control ($p = 0,001$ usando el análisis de ANOVA de dos vías). En todos los paneles, los símbolos se definen como: control \blacksquare , $\beta\text{pep-25}$ ($\beta\text{pep-25}$, 10 mg/kg) \bullet , **40** (2,4 mg/kg) Δ , **40** (10 mg/kg) \blacktriangle , **27** (2,7 mg/kg) ∇ , y **27** (10 mg/kg) \blacktriangledown .
20
25
30

La Figura 8 proporciona fotos que muestran que los topomiméticos inhiben la angiogénesis tumoral. Para análisis histoquímico, se tiñeron secciones transversales de tumores para determinar la densidad de microvasos (MVD) usando tinción con el anticuerpo anti-CD31 marcado con PE, y, para determinar la apoptosis celular total, usando el análisis de TUNEL (marcado con FITC). La tinción de la sección del tumor MA148 (A-D) y la tinción de la sección del tumor B16F10 (E-H) se muestran para tratamiento con vehículo (A y E), tratamiento con $\beta\text{pep-25}$ (B y F), tratamiento con **40** (C y G), y tratamiento con **27** (D y H). Las imágenes son representativas de las medias para la dosis de 10 mg/kg. Aumento original X200; barra de escala = 50 μm . En la Tabla 3 se proporciona la cuantificación de la densidad de los microvasos y la apoptosis.
35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

40 La presente invención se refiere a ciertos compuestos topomiméticos que proporcionan una variedad de actividades biológicas. Un compuesto topomimético, como se define aquí, es un compuesto orgánico que proporciona una topografía superficial que se asemeja a la de una molécula bioactiva existente. Los compuestos topomiméticos de la presente invención son miméticos peptídicos que usan un andamio orgánico junto con grupos particulares para modelar las características de superficie de los péptidos $\beta\text{pep-25}$ y SC4.

45 Los compuestos topomiméticos de la presente invención son miméticos peptídicos a base de calixareno como se define anteriormente. Se ha preparado una librería de miméticos peptídicos a base de calixareno, y se muestra aquí que poseen una o más actividades biológicas. Estas actividades biológicas incluyen, por ejemplo, actividad antibacteriana, actividad antiangiogénica, y actividad antitumoral.

Un aspecto de la presente invención se refiere a la capacidad para imitar más completamente las conformaciones plegadas de pequeños segmentos de la estructura proteica secundaria de hélice y de lámina beta, ejemplificada en dos péptidos ($\beta\text{pep-25}$ y SC4) con actividades biológicas en cierto modo diferentes, usando calixareno en un método de enfoque a base de andamios. $\beta\text{pep-25}$, que tiene la secuencia ANIKLSVQMKLFKRHLKWKIIVKLNDRGRELSD (SEC ID NO:1), es un 33mero peptídico diseñado que forma una lámina β similar a citocina (K.H. Mayo et al., *Angiogenesis*, 4, 45-51 (2001); y S. Liekens et al., *J. Biochem. Pharm.*, 61, 253-270 (2001)). El otro péptido, SC4, que tiene la secuencia KLFKRHLKWKII (SEC ID NO:2), es un 12mero diseñado que forma una conformación de hélice anfipática, destruye selectivamente las membranas bacterianas, y presenta actividad bactericida (K. H. Mayo et al., *Biochem. J.* 2000, 349, 717-728). Aunque estos ejemplos proporcionan la demostración de su efectividad, la
50
55

invención y el propio enfoque tienen aplicaciones más amplias. A este respecto, se podría emplear una librería a base de calixareno de compuestos análogos para buscar actividades en otros sistemas por lo cual se puede imitar la actividad biológica.

5 Las estructuras en disolución derivadas de RMN de los péptidos diseñados β pep (por ejemplo, β pep-25) y SC (por ejemplo, SC4) proporcionaron dimensiones moleculares a partir de las cuales diseñar un andamio de presentación apropiado. Aunque se consideró un número de andamios potenciales, se escogió el calix[4]areno, basándose en parte en los resultados del modelado molecular por ordenador, principalmente debido a que representó la mayoría de las dimensiones moleculares apropiadas de un péptido pequeño en conformación de hélice o de lámina β , como se juzga mediante RMN o cristalografía de rayos X. Además, el calix[4]areno está comercialmente disponible, y se puede usar fácilmente para la preparación de derivados.

10 Para ejemplificar el enfoque de diseño de topomiméticos de la presente invención usando el andamio de presentación a base de calixareno, se usaron los péptidos β pep-25 y SC4. Para el diseño inteligente de compuestos más pequeños, la identificación de restos de aminoácidos específicos y sus relaciones espaciales proporcionó la entrada básica para elegir miméticos peptídicos a base de calixareno apropiados para ser sintetizados y ensayados. 15 En disolución, β pep-25 forma una lámina beta, mientras que SC4 forma una conformación helicoidal. Basándose en la topología de la superficie anfipática y en las dimensiones moleculares aproximadas de estas conformaciones derivadas de RMN (estructuras tridimensionales) de SC4 y β pep-25, el diseño de miméticos usando un andamio de calixareno (véase el esquema de diseño en la Figura 1) demostró ser exitoso. Estos miméticos son no peptídicos (estructuras enunciadas en la Figura 2), activos de forma potencialmente oral, y muestran actividades bactericida, antiangiogénica y otras actividades biológicas en el intervalo de μ M a sub- μ M. 20

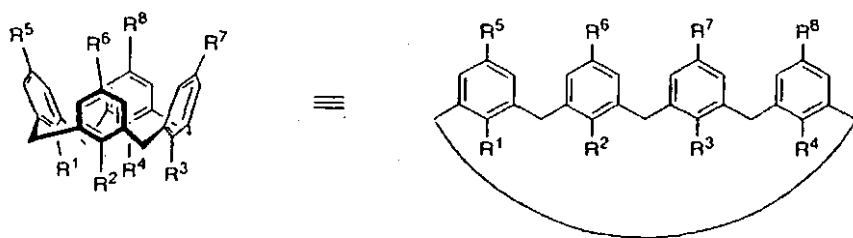
Obsérvese que las dimensiones moleculares de ambos péptidos plegados y la molécula de calixareno son razonablemente similares, siendo del orden de 5 Å a 10 Å en una cualquiera de las 3 dimensiones. La hélice de alrededor de 3 giros es un cilindro de alrededor de 12 Å de longitud (α -C_{N-term} a α -C_{C-term}) y alrededor de 6 Å de diámetro, similar a la de una pequeña lámina beta. El núcleo de calixareno tiene forma de cono, con el borde superior (como se dibuja) más ancho que el borde inferior (alrededor de 8-10 frente a alrededor de 4-5 Å). La altura del núcleo de calixareno (desde O hasta el primer átomo de unión del grupo *para*) es alrededor de 6 Å. Esta característica 3D diferencia a tales miméticos a base de calixareno de otros conocidos en la técnica. El esqueleto de calixareno constituye un molde excelente sobre el cual colocar conjuntos de grupos polares (catiónicos y aniónicos) y no polares (hidrófobos). Por ejemplo, se puede proporcionar un esqueleto de calixareno con grupos polares y no polares a fin de imitar las dos superficies de SC4, que incluye una superficie hidrófila que presenta restos de lisina y arginina cargados positivamente, y una superficie hidrófoba que incluye restos de leucina, isoleucina, triptófano y fenilalanina. 25 30

Aunque una realización de la invención usa como andamio una estructura con forma de cono calixarénica, una realización adicional de la invención usa una estructura de cono parcial como andamio, como se muestra en la Figura 2d. La estructura de cono parcial reduce la diferencia entre las dos caras de la estructura, invirtiendo la orientación de uno de los grupos arilo del anillo calixarénico, proporcionando una estructura alternativa que puede ser útil para imitar diferentes estructuras polipeptídicas. 35

Los miméticos peptídicos a base de calixareno se basan en las relaciones de estructura-función de los péptidos SC-4 y/o β pep-25 (preferiblemente de β pep-25). En particular, debido a que estos péptidos se pliegan como estructuras anfipáticas, pueden ser imitados por un andamio de compuesto químico que incluye un lado hidrófobo a la molécula y otro lado hidrófilo, cargado positivamente. Conociendo las relaciones de estructura-actividad en estos dos péptidos, las relaciones espaciales de grupos funcionales clave en ambos péptidos, así como las dimensiones moleculares presentes en estos péptidos plegados, se puede identificar un andamio orgánico. Aquí, el calixareno proporciona un andamio químico apropiado. El propio andamio de calixareno proporciona gran parte de las dimensiones moleculares apropiadas de una cadena principal de hélice o de lámina beta cuando está en el estado plegado. 40 45

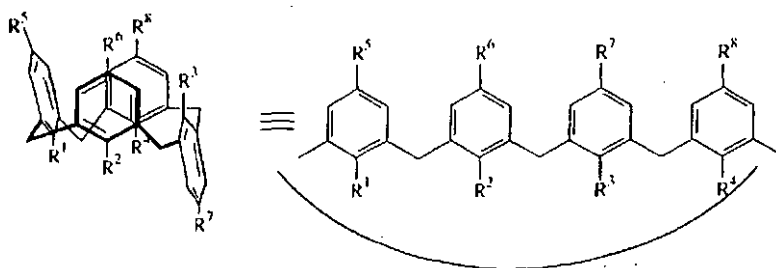
Los bis-anillos de calix[4]arenos son compuestos macrocíclicos usados a menudo en extracciones de metales. También se han descrito como útiles como agentes antitrombóticos en la patente U.S. n° 5.409.959. El calixareno se ha usado sólo en un estudio como andamio para presentar y restringir pequeños péptidos en bucle que se unen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (Blaskovich et al., Nat. Biotechnol, 18; 1065-1070 (2000)), pero no en el contexto de compuestos completamente no peptídicos, como se describe aquí. 50

Los miméticos peptídicos a base de calixareno que se describen en la presente memoria descriptiva incluyen aquellos que tienen las siguientes estructuras generales, representadas por la Fórmula I y II:



I

o



II

5 Se debería observar que la Fórmula I y la Fórmula II representan diferentes conformaciones de los miméticos peptídicos a base de calixareno, pero son de otro modo el mismo. En la estructura anterior, cada grupo R^1 a R^8 es independientemente hidrógeno o un grupo orgánico, en el que R^1 a R^4 son cada uno independientemente hidrógeno o un grupo orgánico de polaridad similar, y R^5 a R^8 son cada uno independientemente hidrógeno o un grupo orgánico de polaridad similar, que es de polaridad opuesta a aquella de R^1 a R^4 . Preferiblemente, R^1 a R^8 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, alcoxi, cicloalquilalcoxi, heterocicloalquilo, aralquilo, trifluorometilo, o haluro, incluyendo opcionalmente grupos éster, amida, amina, hidroxilo, sulfonato, fosfonato, guanidina, heteroarilo, heteroarilalquilo, y/o tialcoxi.

15 Por ejemplo, R^1 a R^4 podría ser alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, alcoxi, cicloalquilalcoxi, heterocicloalquilo, aralquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, trifluorometilo, o haluro, y R^5 a R^8 podría ser cualquiera de estos grupos que incorpora grupos éster, amida, amina, hidroxilo, sulfonato, fosfonato, guanidina, heteroarilo, heteroarilalquilo, y/o tialcoxi. Igualmente, R^5 a R^8 podría ser alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, alcoxi, cicloalquilalcoxi, heterocicloalquilo, aralquilo, heterocicloalquilo, aralquilo, trifluorometilo, o haluro, y R^1 a R^4 podría ser cualquiera de estos grupos que incorpora grupos éster, amida, amina, hidroxilo, sulfonato, fosfonato, guanidina, heteroarilo, heteroarilalquilo, y/o tialcoxi.

20 Tales miméticos peptídicos a base de calixareno son activos con respecto a al menos un número de actividades biológicas. Esto se ejemplifica mediante los datos mostrados aquí. Pueden ser tan efectivos como, o más efectivos que, β pep-25 en una o más de sus actividades biológicas (por ejemplo, inhibiendo la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis *in vitro*). Sin embargo, incluso si un mimético peptídico a base de calixareno no es tan efectivo como, o no es más efectivo que, β pep-25 en una o más de sus actividades biológicas, el compuesto puede ser útil. Esto es particularmente cierto si el compuesto está más biodisponible que β pep-25, tiene menores efectos secundarios que β pep-25 y/o es más barato de producir que β pep-25, por ejemplo.

25 Los compuestos tales como los miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí se pueden identificar y preparar usando un método para diseñar miméticos peptídicos. Aquí, tales miméticos peptídicos poseen propiedades de superficie y topología que imitan sustancialmente al menos una porción del péptido y tienen al menos una de las funciones biológicas del péptido.

30 En la Figura 1 se ilustra un método para preparar un mimético peptídico, e implica las siguientes etapas: identificar un péptido de estructura plegada de interés (β pep-25 (péptido de lámina β) y SC4 (péptido de hélice) en la Figura 1); determinar una región biológicamente activa del péptido y grupos funcionales clave en la región biológicamente activa responsables de la actividad biológica en esa región del péptido (elementos anfipáticos, es decir, una superficie principalmente hidrófoba, y una superficie principalmente hidrófila, en este caso cargada positivamente); identificar un andamio orgánico para presentar los grupos funcionales clave o sus análogos en una orientación espacial equivalente a aquella en la región biológicamente activa (calix[4]areno como se muestra en la Figura 1 con grupos funcionales genéricos (grupos hidrófobo e hidrófilo positivamente cargados) que varían como se muestra en la Figura 2, o similares; y sintetizar un compuesto que comprende el andamio y los grupos funcionales clave o sus

análogos para formar un mimético peptídico de péptido de interés (véase la Figura 2). En la Figura 2 se ilustran ejemplos de miméticos peptídicos preferidos a base de calixareno.

- 5 La región biológicamente activa es preferiblemente la región más pequeña del péptido que puede provocar una respuesta biológica. Los grupos funcionales clave en esta región son aquellos grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos responsables principalmente de la respuesta biológica provocada por la región identificada. La región biológicamente activa y los grupos funcionales clave se pueden identificar usando métodos estándar de estructura-actividad, tales como el truncamiento del péptido, usando barrido de alanina, y similares. Estos grupos funcionales clave o sus análogos son grupos hidrófobos, grupos alifáticos y/o aromáticos e hidrófilos, cargados positiva o negativamente o no cargados. Los grupos orgánicos análogos se pueden usar como grupos para el anillo calixarénico para imitar diversas cadenas laterales de aminoácidos. Por ejemplo, se puede usar un grupo alquilo para imitar las cadenas laterales de valina, isoleucina, y leucina; los grupos alquilamina imitan las cadenas laterales de lisina; los grupos alquilguanidina imitan las cadenas laterales de arginina; los grupos éster alquílico imitan las cadenas laterales de aspartato y glutamato; los grupos alquilamida imitan las cadenas laterales de asparaginas y glutamina; y los grupos heteroarilo imitan las cadenas laterales de histidina y triptamina.
- 10 Estos grupos orgánicos se combinan entonces con un andamio orgánico. A fin de imitar una molécula anfifílica, los grupos se pueden colocar de manera que presenten grupos hidrófobos principalmente en una cara de un andamio orgánico, y grupos hidrófilos principalmente en la cara opuesta de un andamio orgánico. Un andamio orgánico provisto de grupos hidrófobos e hidrófilos debería tener una dimensión molecular similar a la región biológicamente activa del péptido de interés, y grupos funcionales clave o sus análogos en una orientación espacial que sea sustancialmente la misma que la de los grupos funcionales en la región biológicamente activa del péptido de interés. En este contexto, "equivalente" no significa que los grupos funcionales o sus análogos tengan que estar precisamente en la misma orientación espacial como en el péptido de interés, sino que deberían estar en una orientación sustancialmente similar de manera que el mimético peptídico resultante posea al menos una de las mismas funciones biológicas que la del péptido de interés (aunque no tiene que ser al mismo nivel de actividad).
- 15 El andamio orgánico puede tener una amplia variedad de estructuras, que pueden estar en una amplia variedad de formas. Es particularmente deseable que la forma del andamio sea con forma de disco. Preferiblemente, el grosor o altura de tal disco es hasta 10 ángstrom (y típicamente, en un intervalo de 5-7,5 ángstrom). Preferiblemente, la dimensión más larga (típicamente, el diámetro) del disco es hasta 20 ángstrom (y típicamente, en un intervalo de 10-15 ángstrom (Å)). En un mimético peptídico típico, al menos se modifican dos superficies (típicamente, teniendo las superficies las áreas más grandes, y más típicamente, las caras opuestas de un disco) para incluir los grupos funcionales clave o sus análogos. Típicamente, independientemente del tamaño del núcleo del andamio, la "piel" de la superficie del andamio (formada por los grupos funcionales sobre la superficie o superficies) es típicamente sustancialmente similar a β pep-25 y/o SC4.
- 20 El andamio orgánico es calixareno, y el péptido mimético es un mimético peptídico a base de calixareno (véase la Figura 1). El péptido de interés es β pep-25 o SC4.
- 25 En un conjunto inicial de experimentos, las actividades *in vitro* se evaluaron usando principalmente ensayos bactericidas y de proliferación de células endoteliales, como se describe en el Ejemplo 36. Este ejemplo usó miméticos peptídicos a base de calixareno preparados como se describe en los Ejemplos 1-35. A partir de esta pequeña librería, se encontró que dos de estos compuestos tienen una actividad bactericida razonablemente buena (Compuestos **3** y **11**) en el intervalo micromolar (Tabla 1), y se encontró que otros dos diferentes tienen actividad antiangiogénica excepcional (compuesto **27** y **40**) (Tabla 1 y Figura 3). Otros, mostrados en la Tabla 1, son mucho menos activos en estos ensayos, pero podrían ser activos si se evalúan en otros ensayos en busca de actividades biológicas diferentes.
- 30
- 35
- 40

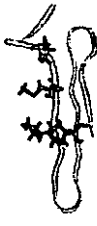


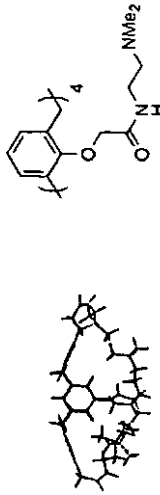
Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>βpep-25</p> <p>Val Lys</p> <p>Met</p> <p>Leu</p> <p>Ile</p> 	5,5	28% (75%, BJ)	60%	Fibro 85% MA148 30% SCK 60%		Ninguna a 10 ⁻⁴ M	3 mM en NaCl 0,15M
<p>6DBF7</p> <p>Val</p> <p>Met</p> <p>Leu</p> <p>Ile</p> 	25	Sin efecto					DMSO H ₂ O
<p>SC4</p> <p>Lys</p> <p>Leu</p> <p>Arg</p> <p>Ile</p> 	Ninguna hasta 100	Sin efecto			0,5	Ninguna a 10 ⁻⁴ M	3 mM en NaCl 0,15M
<p>40</p> 	2,5	Sin efecto	Sin efecto	Fibro 0% MA148 80% SCK 40%	Ninguna hasta 3,8	Ninguna a 10 ⁻⁵ M	H ₂ O hasta 30 mg/ml a pH<7,0, r.t.

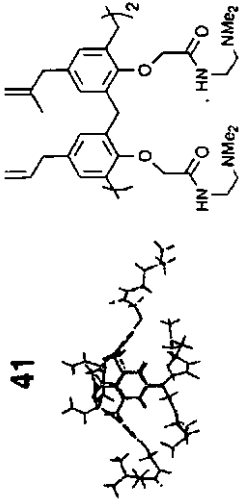
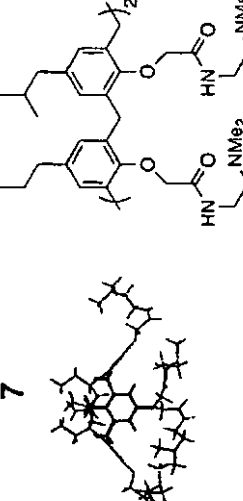
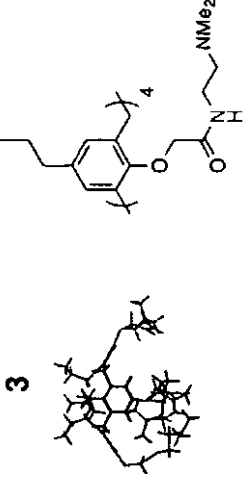
Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>41</p> 	Ninguna hasta 25				2,4	100% a 10 ⁻³	Pasa a la disolución en H ₂ O después de disolverse en DMSO
<p>7</p> 	Ninguna hasta 25				1,6	100% a 10 ⁻⁶ M	DMSO/H ₂ O
<p>3</p> 	Ninguna hasta 25	Sin efecto	Sin efecto	Fibro 100%	1,3	100% a 10 ⁻⁶ M	DMSO/H ₂ O

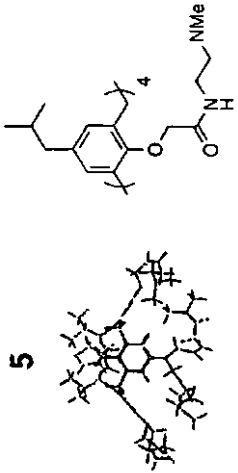
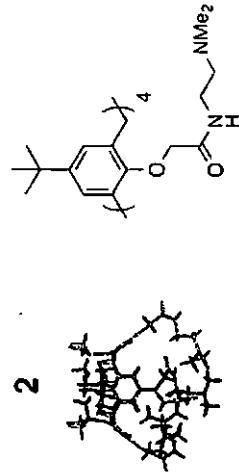
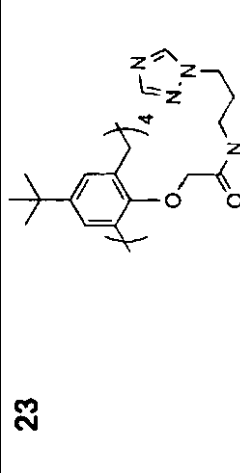
Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>5</p> 	Ninguna hasta 25				0,7	100% a 10 ⁻⁸ M	DMSO/H ₂ O
<p>2</p> 	Ninguna hasta 25				1,1	100% a 10 ⁻⁸ M	DMSO/H ₂ O
<p>23</p> 	Ninguna hasta 25				Ninguna hasta 3,8		DMSO/H ₂ O

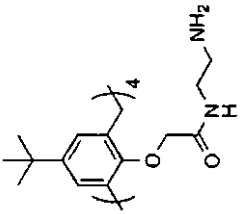


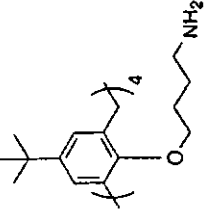
Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>4</p> 	Ninguna hasta 25				Ninguna hasta 3,8		DMSO/H ₂ O
<p>4</p> <p>+ con puentes</p>  <p>+ derivados con puentes</p> 	10				Ninguna hasta 3,8		DMSO/H ₂ O
<p>45</p> 	Ninguna hasta 25				Ninguna hasta 3,8		Pasa a la disolución en H ₂ O después de disolverse en etanol

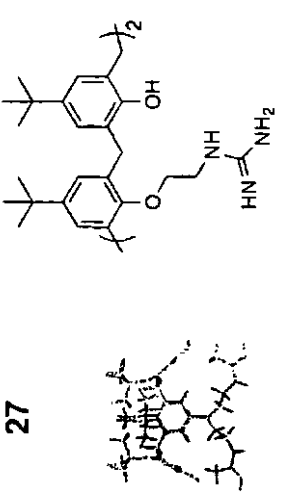
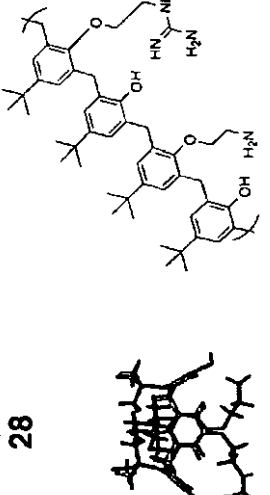
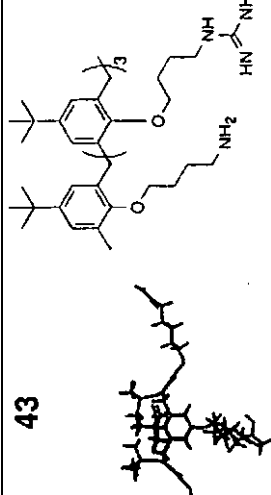
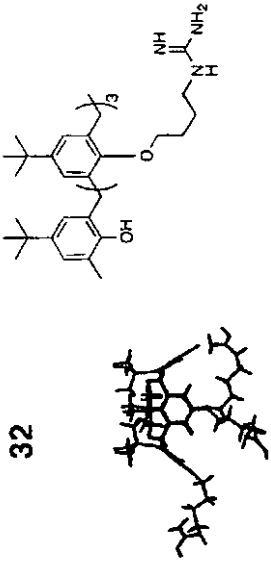
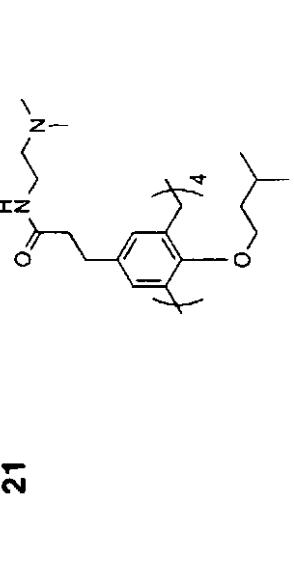
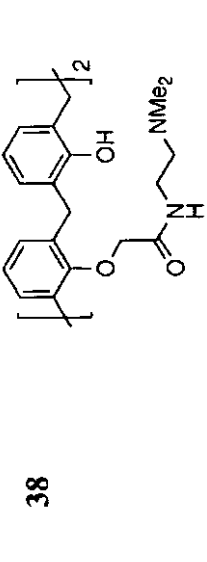
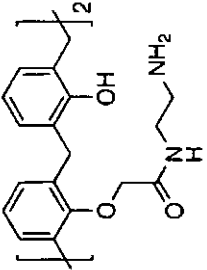
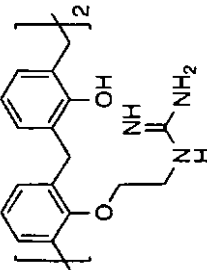
Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>27</p> 	8,3	Sin efecto	65%	Fibro 100% MA148 100% SCK 100%	Ninguna hasta 3,8	100% a 10 ⁻⁶ M	DMSO/H ₂ O (30/70%) hasta 30 mg/ml a >80°C, sin infl. de pH 2+11
<p>28</p> 	Ninguna hasta 25			-	2,5		DMSO/H ₂ O
<p>43</p> 	Ninguna hasta 25				1,4		DMSO/H ₂ O

Tabla 1: Compuesto y estructura	Proliferación de EC IC ₅₀ (conc, μM)	EC % de apoptosis 25 μM	EC % de muerte celular total	Otras células 25 μM	Actividad bacteriana en J96 IC ₅₀ (conc, μM)	Hemolisis	Solubilidad
<p>32</p> 	Ninguna hasta 25				1,3		DMSO/H ₂ O
<p>21</p> 	Ninguna hasta 25				1,2		DMSO/H ₂ O
<p>38</p> 							

<p>Tabla 1: Compuesto y estructura</p>	<p>Proliferación de EC IC₅₀ (conc, μM)</p>	<p>EC % de apoptosis 25 μM</p>	<p>EC % de muerte celular total</p>	<p>Otras células 25 μM</p>	<p>Actividad bacteriana en J96 IC₅₀ (conc, μM)</p>	<p>Hemolisis</p>	<p>Solubilidad</p>
<p>39</p> 							
<p>36</p> 							

3 mM en 100% DMSO → 0,03 mM en H₂O

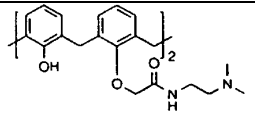
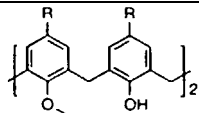
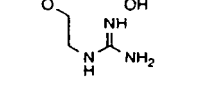
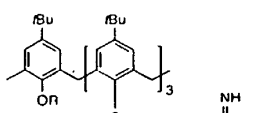
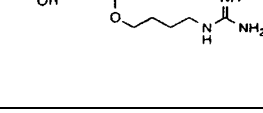
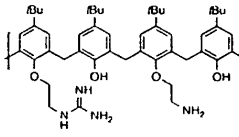
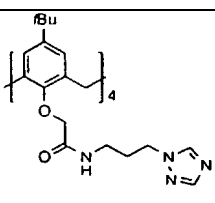
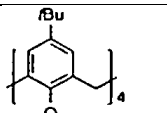
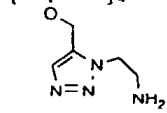
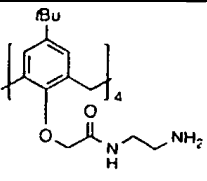
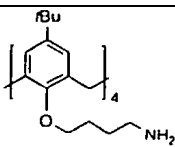
3 mM en 100% de etanol → 0,03 mM en H₂O

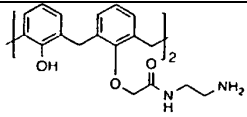
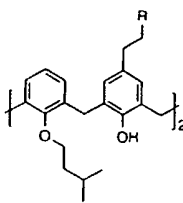
Se trataron ratones que poseen tumores con dos de los compuestos (KM01 18 (**40**) y Compuesto **27**), y se encontró que el crecimiento tumoral (carcinoma ovárico humano MA148, y melanoma de ratón B16) se inhibió significativamente en cada caso (Figura 4A (MA148) y Figura 4B (B16)), igual o mejor que con β pep-25.

5 En un conjunto adicional de experimentos, se evaluaron las actividades in vitro para determinar su capacidad para neutralizar LPS (es decir, entotoxina), su capacidad para inhibir la proliferación y migración de células endoteliales, su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, y su actividad antiangiogénica, como se describe en el Ejemplo 47. En la Tabla 2 se muestra la capacidad de diversos compuestos para inhibir la unión de LPS. En la Tabla 3, en la sección de Ejemplos, se proporcionan datos adicionales sobre la capacidad de los compuestos para inhibir la unión de LPS. Estos experimentos usaron miméticos peptídicos a base de calixareno preparados como se describe en los
 10 Ejemplos 1-35 y Ejemplos 37-46. A partir de esta librería de 23 compuestos, que se muestran en la Figura 2, se demostró que los compuestos **12**, **42**, **43**, **15**, **46a**, y **19** son los más efectivos para neutralizar LPS, mientras que los compuestos **27** y **40** fueron los más activos como agentes antiangiogénicos. Ninguno de los compuestos ensayados mostró toxicidad significativa. Los miméticos peptídicos a base de calixareno que presentaron grupos hidrófobos y cargados positivamente fueron particularmente efectivos para neutralizar endotoxina. Los compuestos **27** y **40**,
 15 antiangiogénicos y antitumorales altamente efectivos, tienen igualmente una carga neta positiva y carácter anfipático.

Tabla 2. Derivados calixarénicos. Valores de IC₅₀ (μM) para la unión de LPS

Muestras	055:84 de <i>E. coli</i>	0111:B4 de <i>E. coli</i>	<i>P. a. Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>	
Derivados de amina terciaria						
40 R = H	3,4	>5	ND	1,5	ND	>5
2 R = <i>t</i> -butilo	>5	1,4	>5	1,5	0,6	3,4
3 R = propilo	4,4	>5	ND	0,08	4,1	ND
4 R = propilo Cono parcial*	0,05	2,7	ND	0,4	0,8	ND
5 R = isobutilo	0,006	3,1	4,2	1	0,4	ND
6 R ₁ = metililo R ₂ = alilo	3,6	4,7	>5	ND	>5	ND
7 R ₁ = isobutilo R ₂ = propilo	3,8	3,7	>5	2,1	3,1	ND
8	>5	>5	ND	2,4	3,2	ND

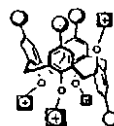
	9	>5	>5	ND	ND	>5	ND
Derivados de guanidina							
	10 R = <i>t</i> -butilo	>5	ND	ND	ND	4,4	ND
	11 R = H	4,1	3,9	ND	ND	>5	ND
	42 R = (CH ₂) ₄ NHC(=NH)NH ₂	0,04	0,7	1,5	1	0,6	ND
	43 R = (CH ₂) ₄ NH ₂	0,1	0,4	0,8	0,5	0,6	3,2
	12	4,1	>5	ND	ND	2,6	ND
Derivados de triazol							
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Derivados de amina primaria							
	46a	0,05	2,2	2,6	1	1,1	>5
	46b Cono parcial*	0,6	1,5	1	0,9	ND	ND
	19	0,9	1,6	0,8	0,3	0,6	1,5
	45	1,3	0,1	0,5	1	0,2	4,5

	20	>5	>5	ND	ND	1,2	ND
Derivados cargados negativamente							
	47 R = CO ₂ H	>5	>5	ND	ND	ND	ND
	48 R = CH ₂ P(O)(OH) ₂	>5	ND	ND	ND	ND	ND
	49 R = CH ₂ OSO ₃ H	5	5	ND	2,1	ND	4,2
Péptidos							
SC4		4,2	>5	4	ND	4	>5
β-pep-25		2,5	2	1,2	2	2,5	4,1
PmxB		0,03	0,03	0,03	0,01	0,1	ND

ND = sin actividad detectable a 5×10^{-6} M

>5 = actividad mínima a 5×10^{-6} M; no se determinó IC₅₀.

Los valores en el intervalo submicromolar se muestran en negrita.



* Estructura Genérica de Calixareno en Conformación de Cono Parcial

- 5 Un mimético peptídico preferido a base de calixareno se caracteriza por tener al menos una de las actividades biológicas descritas aquí. La actividad biológica de un compuesto se puede determinar, por ejemplo, como se describe aquí, o por métodos bien conocidos por un experto en la técnica.

- 10 Las composiciones que incluyen uno o más de los miméticos peptídicos a base de calixareno de esta invención con un vehículo opcional (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable) se pueden añadir a células en cultivo, o se pueden usar para tratar pacientes, tales como mamíferos. Cuando los miméticos peptídicos a base de calixareno se usan para tratar un paciente, el mimético peptídico a base de calixareno se combina preferiblemente en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una molécula mayor para promover la estabilidad, o un tampón farmacéuticamente aceptable que sirve como vehículo.

- 15 El tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico. De este modo, el tratamiento se puede iniciar antes, durante o después del desarrollo de la afección (por ejemplo, infección bacteriana o endotoxemia). Como tal, las frases "inhibición de" o "efectivo para inhibir" una afección tal como infección bacteriana y/o endotoxemia, por ejemplo, incluye tratamiento tanto profiláctico como terapéutico (es decir, prevención y/o inversión de la afección).

- 20 Los miméticos peptídicos a base de calixareno de la presente invención se pueden administrar solos o en un tampón farmacéuticamente aceptable, como un antígeno en asociación con otra proteína, tal como una proteína inmunoestimulante o con un vehículo proteico tal como, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina, o similar. También se puede usar en terapia adyuvante, en combinación con, por ejemplo, un agente quimioterapéutico como carboplatino u otros conocidos por un experto en la técnica.

- 25 Los miméticos peptídicos a base de calixareno se pueden combinar con una variedad de vehículos fisiológicamente aceptables para el suministro a un paciente, incluyendo una variedad de diluyentes o excipientes conocidos por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, para la administración parenteral, se prefiere disolución salina

isotónica. Para la administración tópica, se puede usar una crema, que incluye un vehículo tal como dimetilsulfóxido (DMSO), u otros agentes encontrados típicamente en cremas tópicas que no bloquean o inhiben la actividad del péptido. Otros vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcohol, disolución salina tamponada con fosfato, u otras disoluciones salinas balanceadas.

- 5 Los miméticos peptídicos a base de calixareno de esta invención demuestran actividad biológica y se pueden administrar en una variedad de formas, incluyendo intravenosa, tópica, oral, e intramuscular, a una variedad de mamíferos, incluyendo seres humanos, ratones y conejos. Los miméticos peptídicos a base de calixareno se pueden administrar como una monodosis, o en múltiples dosis. Preferiblemente, la dosis es una cantidad efectiva como se determina mediante los métodos estándar descritos aquí, e incluye un pretratamiento con alrededor de 1
- 10 microgramo a alrededor de 1.000 microgramos, más preferiblemente un pretratamiento con alrededor de 50 a alrededor de 250 microgramos. Los expertos en la técnica de ensayos clínicos serán capaces de optimizar las dosis de miméticos peptídicos particulares a base de calixareno a través de estudios de ensayos estándar.

En una realización, los miméticos peptídicos a base de calixareno son antiangiogénicos. La angiogénesis está implicada en numerosas funciones biológicas en el organismo, desde procesos normales como la embriogénesis y curación de lesiones hasta procesos anormales como el crecimiento tumoral, artritis, restenosis, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, y endometriosis. El uso de agentes que pueden inhibir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, particularmente en investigación antitumoral, ha indicado que la terapia antiangiogénica es una

15 modalidad terapéutica prometedora. La investigación en busca de inhibidores angiogénicos se ha centrado en controlar dos de los procesos que promueven la angiogénesis: el crecimiento y la adhesión de células endoteliales (EC), principalmente debido a que las ECs son más accesibles que otras células a agentes farmacológicos suministrados vía la sangre, y porque las ECs son genéticamente estables y no mutan fácilmente en variantes resistentes a fármacos. La mayoría de los agentes antiangiogénicos se han descubierto identificando moléculas endógenas, principalmente proteínas, que inhiben el crecimiento de EC.

También se ha postulado que el crecimiento tumoral se puede controlar mediante la privación de la vascularización (Folkman J. Natl. Cancer. Inst. 82, 4-6 (1990); Folkman et al., J. Biol. Chem., 267, 10931-10934 (1992)). Se ha descrito un número creciente de inhibidores endógenos de la angiogénesis, tales como el factor 4 plaquetario (PF4), la proteína 10 inducible por interferón γ (IP-10), trombospondina 1 (TSP-1), angiostatina, así como agentes sintéticos, por ejemplo talidomida, TNP-470, e inhibidores de metaloproteinasas. Algunos de estos agentes están siendo ensayados en ensayos clínicos de fase I/II. La investigación previa descrita en Griffioen et al., Blood, 88, 667-673 (1996), y Griffioen et al., Cancer Res., 56, 1111-1117 (1996) ha mostrado que los factores proangiogénicos en tumores inducen la disminución de moléculas de adhesión en células endoteliales en la vasculatura tumoral, e inducen anergia a señales inflamatorias tales como factor α de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 1, e interferón γ . EC expuestas al factor de crecimiento de células endoteliales vascular (VEGF) (Griffioen et al., Blood, 88, 667-673 (1996)) y al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Griffioen et al., Blood, 88, 667-673 (1996); y Melder et al., Nature Med., 2, 992-997 (1996)) han impedido duramente el aumento de la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la inducción de la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y selectina E. Este fenómeno, que se denominó anergia de EC inducida por tumores, es una forma mediante la cual los tumores con un fenotipo angiogénico pueden escapar a la infiltración por leucocitos citotóxicos.

Debido a que la disminución, mediada por angiogénesis, de moléculas de adhesión endotelial (EAM) puede promover la excrecencia tumoral evitando la respuesta inmunitaria (Griffioen et al., Blood, 88, 667-673 (1996); Kitayama et al., Cancer. Res., 54, 4729-4733 (1994); y Piali et al., J. Exp. Med., 181, 811-816 (1995)), se cree que la inhibición de la angiogénesis podría resolver la disminución de moléculas de adhesión y la insensibilidad a señales inflamatorias. En respuesta a esta hipótesis, se ha dado a conocer una relación entre el aumento de selectina E y el agente angiostático AGM-1470 (Budson et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 225, 141-145 (1996)). También se ha mostrado que la inhibición de la angiogénesis por PF-4 aumenta ICAM-1 en EC estimuladas mediante bFGF. Además, la inhibición de la angiogénesis por PF4 resuelve la anergia de EC asociada a angiogénesis a señales inflamatorias.

De este modo, la presente invención proporciona los compuestos para inhibir la proliferación de células endoteliales en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición (típicamente una composición farmacéutica) efectiva para inhibir el crecimiento de células endoteliales, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. De forma análoga, la presente invención proporciona los compuestos para inhibir la proliferación de células endoteliales *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo celular). Esto implica poner en contacto células con una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir el crecimiento de células endoteliales, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí.

Para determinar la cantidad de proliferación de células endoteliales *in vivo*, se podrían usar diversos métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, para la evaluación del crecimiento de células endoteliales en tumores, se pueden teñir apropiadamente secciones tisulares para cuantificar la densidad de los vasos. Para determinar la cantidad de proliferación de células endoteliales *in vitro*, se puede usar un ensayo de proliferación de

EC, que implica la captación de timidina tritiada por células en un cultivo celular. Un mimético peptídico a base de calixareno que es "activo" para inhibir la proliferación de células endoteliales es preferiblemente aquel que provoca una reducción de al menos 10% en la proliferación de células endoteliales a una concentración menor que 10^{-4} M. Como alternativa, la inhibición de la proliferación de células endoteliales para un mimético peptídico a base de calixareno "activo" *in vitro* es preferiblemente a un nivel de IC50 menor que 80 μ M (más preferiblemente menor que 50 μ M, e incluso más preferiblemente menor que 25 μ M), según se determina usando el ensayo descrito en la Sección de Ejemplos.

La presente invención también proporciona los compuestos para inhibir la disminución de la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM) mediada por factores angiogénicos (y/o promover la expresión de ICAM) en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir la cantidad de disminución de la expresión de ICAM, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. De forma análoga, la presente invención proporciona los compuestos para inhibir la disminución de la expresión de la molécula de adhesión intercelular mediada por factores angiogénicos (y/o promover la expresión de ICAM) *in vitro*, (por ejemplo, en un cultivo celular). Esto implica poner en contacto células con una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir la cantidad de disminución de expresión de ICAM, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí.

La presente invención también proporciona los compuestos para incrementar la infiltración de leucocitos en tejido tumoral en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición efectiva para incrementar la cantidad de glóbulos blancos (leucocitos) que se pueden infiltrar en el tejido tumoral a través de los vasos sanguíneos, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. El uso de agentes que pueden incrementar la infiltración leucocitaria en tejido tumoral, particularmente en investigación antitumoral, se ha buscado durante cierto tiempo y en el área general de inmunoterapia, y será una modalidad terapéutica prometedora en el futuro. Esto se ejemplifica en la Figura 4, que muestra los efectos de dos de estos agentes (KM0118 (**40**) y Compuesto **27**) incrementando la infiltración leucocitaria en tumores de ratones que poseen tumores.

La presente invención proporciona los compuestos para inhibir angiogénesis (es decir, formación de nuevos vasos sanguíneos) en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir la angiogénesis, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. De forma análoga, la presente invención proporciona los compuestos para inhibir angiogénesis *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo celular). Esto implica poner en contacto células con una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir la angiogénesis, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí.

Para determinar la cantidad de angiogénesis *in vivo*, se podrían usar diversos métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, para la evaluación de angiogénesis en tumores, se podrían teñir apropiadamente secciones tisulares para cuantificar la densidad de vasos. Para determinar la cantidad de angiogénesis *in vitro*, se puede usar un ensayo de angiogénesis que implica la desaparición de la germinación de EC en el cultivo celular. Un polipéptido que es "activo" para la inhibición de la angiogénesis es preferiblemente aquel que provoca una reducción de al menos 10% en la germinación de células endoteliales a una concentración menor que 10^{-4} M. Como alternativa, la inhibición de angiogénesis para un mimético peptídico a base de calixareno *in vitro* es preferiblemente a un nivel de germinación menor que 85% (más preferiblemente una germinación menor que 75%, incluso más preferiblemente una germinación de 50%, e incluso más preferiblemente menor que 35%), según se determina usando el ensayo a base de gel de colágeno descrito en la Sección de Ejemplos.

De forma similar, tales composiciones antiangiogénicas se pueden usar para controlar trastornos patológicos tales como aterosclerosis, restenosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide, y endometriosis. Esto se puede demostrar usando técnicas estándar y modelos conocidos por un experto en la técnica.

La presente invención proporciona los compuestos para inhibir la tumorigénesis en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición efectiva para prevenir y/o reducir el crecimiento tumoral, en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. Los métodos para determinar la inhibición de tumorigénesis son bien conocidos por aquellos de pericia en la técnica, incluyendo evaluación de la contracción tumoral, supervivencia, etc.

La presente invención también proporciona los compuestos para inhibir la cantidad de TNF- α en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Esto implica administrar a un paciente una cantidad de una composición efectiva para inhibir la cantidad de TNF- α en un sistema del paciente según se determina evaluando los niveles séricos de TNF- α , en el que la composición incluye uno o más miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. De forma análoga, la presente invención proporciona un método para inhibir la cantidad de TNF- α *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo celular). Este método implica incubar células con una cantidad de una composición efectiva para disminuir cantidades de TNF- α en el cultivo celular, en el que la composición incluye uno o más

5 miméticos peptídicos a base de calixareno descritos aquí. Para los métodos tanto *in vivo* como *in vitro*, se puede usar el ensayo de WEHI para la detección de TNF- α (Battafarano et al., Surgery, 118, 318-324 (1995)) en un cultivo celular o en suero de un paciente. Como alternativa, la cantidad de TNF- α en una muestra se puede evaluar usando un anticuerpo anti-TNF- α . Un mimético peptídico a base de calixareno "activo" para disminuir TNF- α se puede evaluar usando un ensayo *in vitro*, y preferiblemente muestra una disminución de al menos 10% en la cantidad de TNF- α .

EJEMPLOS

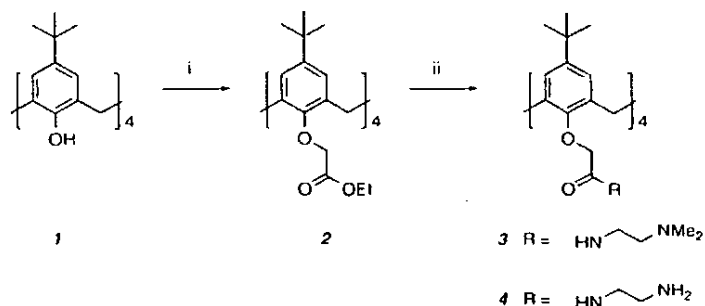
La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar adicionalmente las diversas realizaciones y técnicas específicas preferidas.

10 Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. o Acros Organics, excepto N,N-dimetiletildiamina, que se obtuvo de Lancaster Synthesis, Inc.

Ejemplos 1-35: Preparación de compuestos

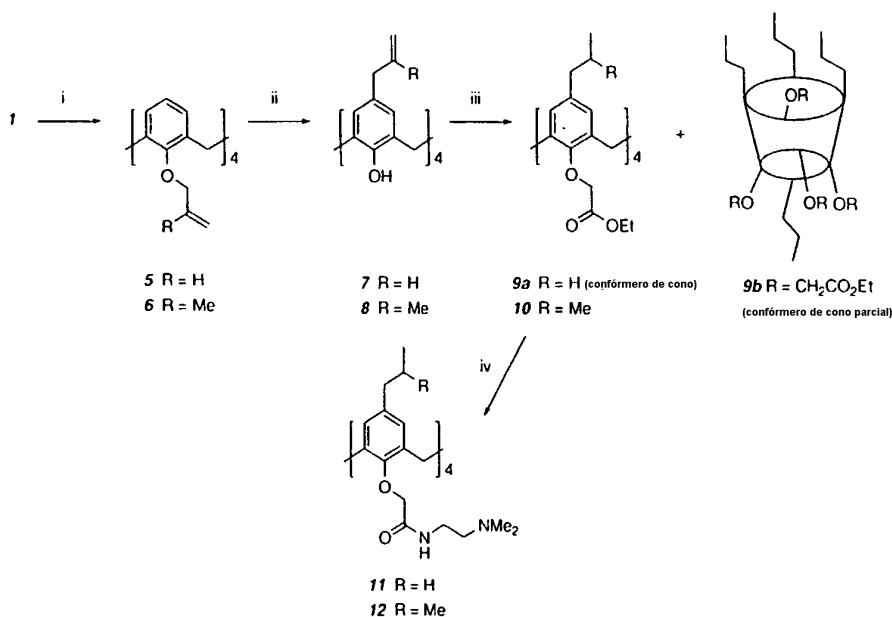
15 Los derivados calixarénicos ejemplares se pueden obtener según los siguientes esquemas y ejemplos. Sólo el compuesto 27, el compuesto 40 y los derivados con puentes del compuesto 4 son ejemplos de la presente invención. Los otros compuestos se dan con fines de referencia.

Esquema 1



i. bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona, reflujo; ii. para 3, N,N-dimetiletildiamina, tolueno, reflujo; para 4, a) N-Boc etildiamina, tolueno, reflujo; b) TFA, 5% de anisol en CH_2Cl_2 .

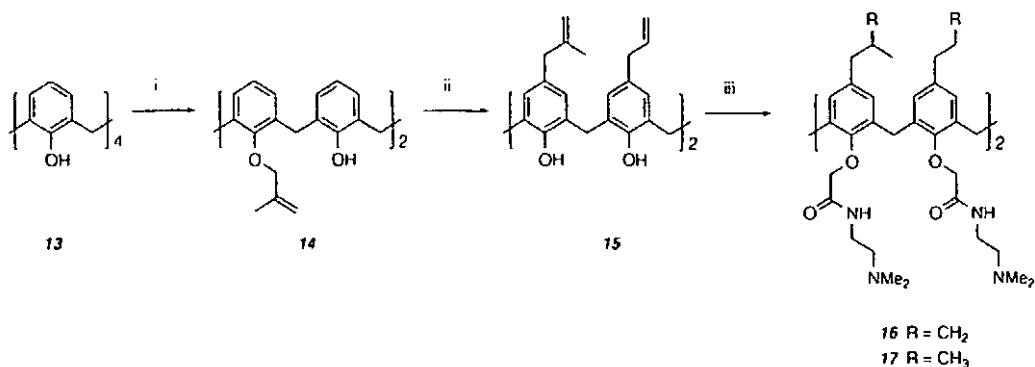
20 Esquema 2



i. a) AlCl_3 , PhOH, tolueno, rt; b) para 5, NaH, bromuro de alilo, THF, DMF; para 6, NaH, cloruro de metilalilo,

THF, DMF; ii. N,N-dimetilanilina, 200°C; iii). a) bromoacetato de etilo, K₂CO₃, acetona, reflujo; b) Pd/C, H₂, EtOAc; iv. para **11**, AlMe₃, N,N-dimetiletilendiamina, CH₂Cl₂, 40°C; para **12**, N,N-dimetiletilendiamina, tolueno, reflujo.

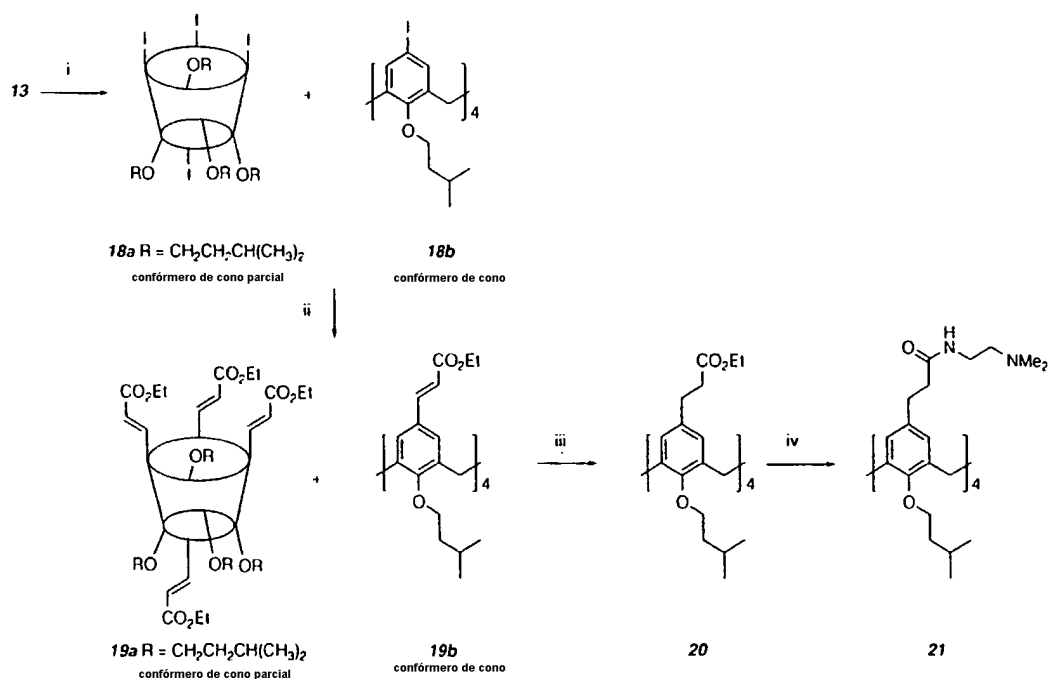
Esquema 3



5

i. cloruro de metilalilo, NaI, K₂CO₃, acetona, reflujo; ii. a) NaH, bromuro de alilo, THF, DMF; b) bis-(trimetilsilil)-urea, N,N-dimetilanilina, 200°C; c) HCl 3N, iii. a) bromoacetato de etilo, K₂CO₃, acetona, reflujo; b) para **16**, N,N-dimetiletilendiamina, tolueno, reflujo; para **17**, i) Pd/C, H₂, EtOAc; ii) N,N-dimetiletilendiamina, tolueno.

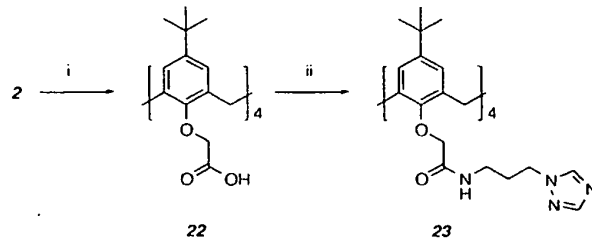
Esquema 4



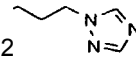
10

i. a) 1-bromo-3-metilbutano, NaH, THF, DMF, reflujo; b) AgCO₂CF₃, I₂, CHCl₃, reflujo; ii. acrilato de etilo, Pd(OAc)₂, tri(O-tolueno)fosfina, Et₃N, DMF, 80°C; iii. Pd/C, HCO₂NH₄, EtOH, THF, 60°C; iv. N,N-dimetiletilendiamina, 140°C, tubo cerrado herméticamente.

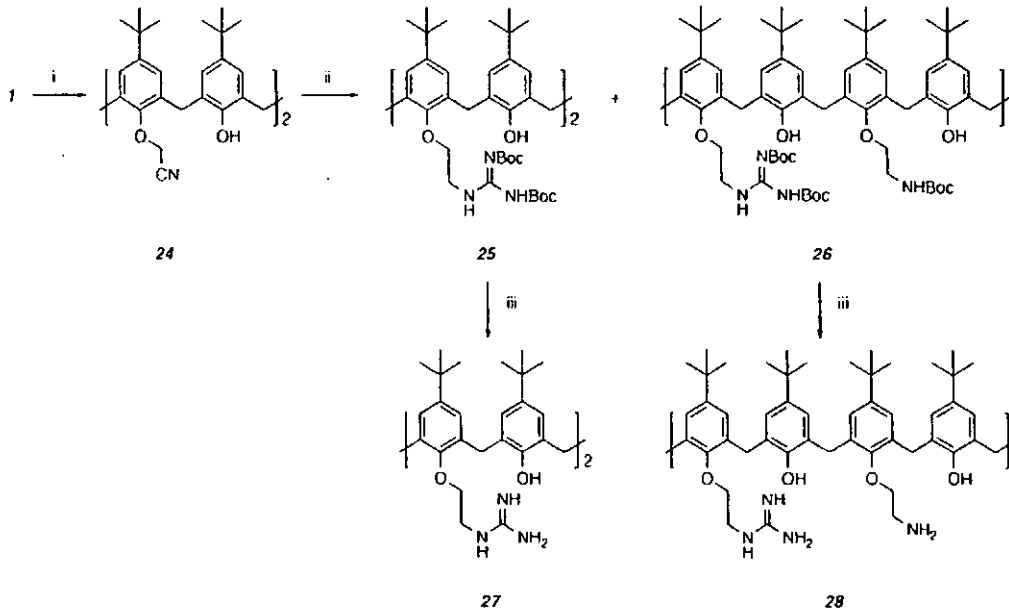
Esquema 5



i. NaOH, EtOH, H₂O, reflux; ii. a) SO₂Cl₂ puro, reflux; b) Et₃N, THF, NH₂

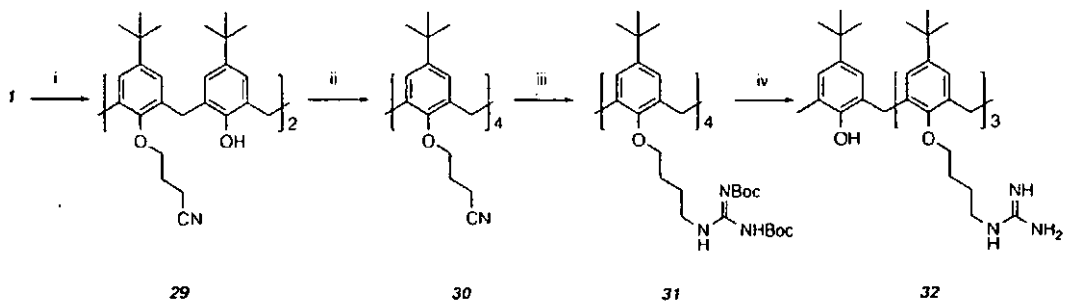


Esquema 6



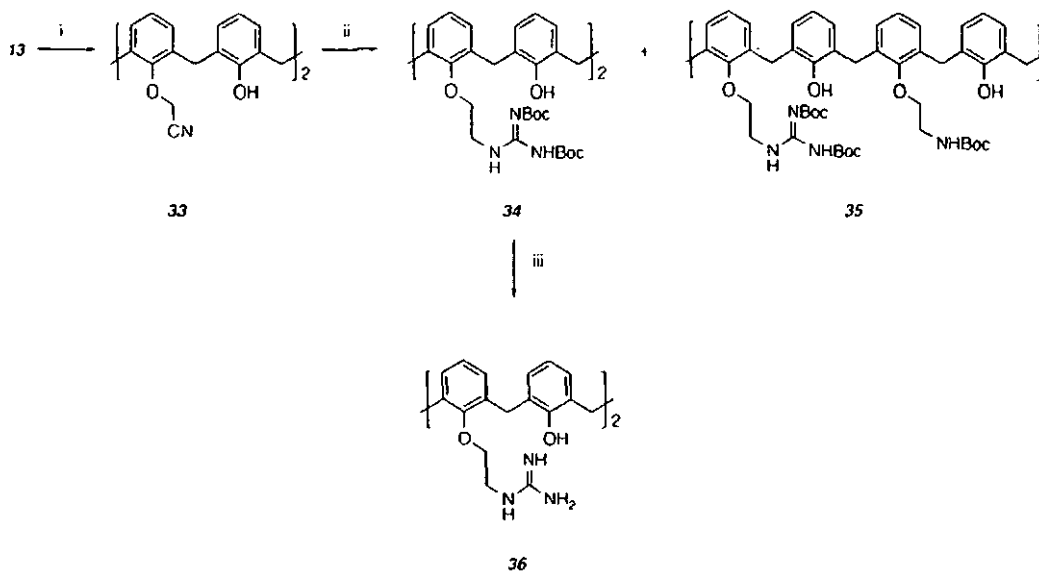
5 i. cloroacetronitrilo, NaI, K₂CO₃, acetona, reflux; ii. a) LiAlH₄, Et₂O, THF; b) 1,3-bis(terc-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea, HgCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; iii. TFA, 5% de anisol en CH₂Cl₂.

Esquema 7



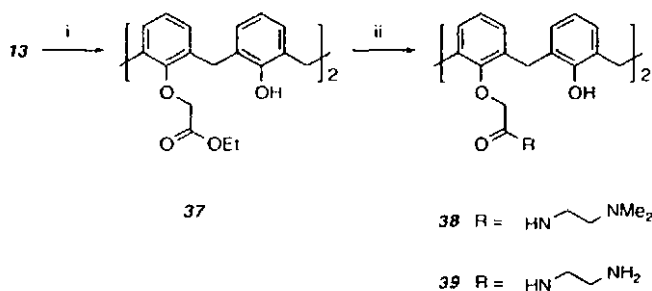
10 i. 4-bromo-butironitrilo, K₂CO₃, acetona; ii. 4-bromo-butironitrilo, NaH, DMF; iii. a) NaBH₄, CoCl₂, MeOH; b) 1,3-bis(terc-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea, HgCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; iv. TFA, 5% de anisol en CH₂Cl₂.

Esquema 8



i. cloroacetnitrilo, NaI, K₂CO₃, acetona, reflujo; ii. a) LiAlH₄, Et₂O, THF; b) 1,3-bis(terc-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea, HgCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂; iii. TFA, 5% de anisol en CH₂Cl₂.

Esquema 9



5
i. bromoacetato de etilo, K₂CO₃, acetona, reflujo; ii. para **40**, N,N-dimetiletilendiamina, tolueno, reflujo; para **41** a) N-Boc etiletilendiamina, tolueno, reflujo; b) TFA, 5% de anisol en CH₂Cl₂.

Ejemplo 1

10 Tetra-éster **2**. Se pusieron a reflujo 4-*t*-butilcalix[4]areno **1** (3,2 g, 5,0 mmoles) y K₂CO₃ (4,1 g, 30 mmoles) en acetona durante una hora, y después se añadió bromoacetato de etilo (4,4 ml, 40 mmoles). Esta mezcla de reacción se puso a reflujo durante 24 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se enjuagó con CH₂Cl₂. El filtrado se concentró a vacío para dar un aceite amarillo. El tetra-éster **2** (4,0 g, 81%) se obtuvo como cristal similar a agujas blancas mediante cristalización en una disolución de CH₂Cl₂ y etanol (~1:4). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,78 (s, 8H), 4,86 (d, J = 12,6 Hz, 4H), 4,80 (s, 8H), 4,21 (q, J = 7,3 Hz, 8H), 3,19 (d, J = 12,6 Hz, 4H), 1,29 (t, J = 7,3 Hz, 12 H), 1,07 (s, 36H).

Ejemplo 2

20 Tetra-amina **3**. Se disolvieron el tetra-éster **2** (198,6 mg, 0,2 mmoles) y N,N-dimetiletilendiamina (0,88 ml, 40 mmoles) en tolueno (0,2 ml), y la reacción se monitorizó mediante ESI. Después de agitar a temperatura ambiente durante 36 horas, los componentes volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se trituró en éter para dar tetra-amina **3** (196,6 mg, 85%) como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (br t, J = 6,0 Hz, 4H), 6,77 (s, 8H), 4,52 (s, 8H), 4,49 (d, J = 13,0, 4H), 3,45 (br dt, J = 6,5, 6,0 Hz, 8H), 3,23 (d, J = 13,0 Hz, 4H), 2,47 (t, J = 6,5 Hz, 8H), 2,23 (s, 24 H), 1,07 (s, 36 H); RMN ¹³C (125 MHz) δ 170,0 (4C), 153,2 (4C), 145,8 (4C), 132,9 (8C), 125,9 (8C), 74,8 (4C), 67,6 (4C), 58,3 (4C), 45,5 (8C), 37,3 (4C), 34,1 (4C), 31,5 (12C); HRMS (ESI) m/z Cal. para C₆₈H₁₀₅N₈Na₁O₈ (M+H+Na)²⁺ 592,3977, encontrado 592,3992.

25 Ejemplo 3

Tetra-amina **4**. Se disolvió el tetra-éster **2** (49,7 mg, 0,05 mmoles) y *N*-Boc etilendiamina (A. Eisenfuhr et al., Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 235-249) (320,2 mg, 2,0 mmoles) en tolueno (0,4 ml). La disolución limpia amarilla clara se calentó a 80°C. Después de dos horas, la mezcla de reacción se volvió turbia. Después de 18 horas, la reacción estaba terminada, como se indica mediante ESI. La mezcla de reacción se enfrió y se repartió entre CH₂Cl₂ y agua. La fase orgánica se combinó, se secó (Na₂SO₄), y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se precipitó mediante éter para dar la tetra-amina protegida con Boc como un sólido blanco.

Este sólido se disolvió en una disolución de CH₂Cl₂ con 40% de TFA y 5% de anisol, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Los componentes volátiles se eliminaron a vacío, y el residuo se trituró en éter para dar la sal de TFA de la tetra-amina **4** (52,5 mg, 70%) como un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, 55°C) δ 6,95 (br s, 8H), 4,59 (s, 8H), 4,50 (d, *J* = 12,9 Hz, 4 H), 3,64 (t, *J* = 5,9 Hz, 8H), 3,33 (d, *J* = 12,9 Hz, 4H), 3,19 (t, *J* = 6,0 Hz, 8H), 1,13 (s, 36H); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₆₀H₉₀N₈O₈ (M+2H)²⁺ 525:3441, encontrado 525,3446.

Ejemplo 4

O-Alil calix[4]areno **5**. A una suspensión de *t*-butil calix[4]areno **1** (3,2 g, 5,0 mmoles) en tolueno (30,0 ml) se añadió AlCl₃ (5,2 g, 40 mmoles) y fenol (3,8 g, 40 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas, y después se añadió HCl 0,2 N (50,0 ml). Después de 5 min., la mezcla de reacción se extrajo mediante CH₂Cl₂, y la fase orgánica combinada se concentró. Se añadió metanol (50,0 ml) a los residuos para crear una suspensión, a partir de la cual se recogió calix[4]areno des-*t*-butilado (2,0 g, 94%) como un sólido blanco.

A una disolución de este tetrafenol (746 mg, 1,8 mmoles) en THF (45,0 ml) y DMF (4,5 ml) se añadió NaH (697 mg, 29 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 1 hora, y se añadió bromuro de alilo (7,6 ml, 88 mmoles). Calentada continuamente durante 5 horas, la mezcla de reacción se enfrió y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera. La fase orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Se obtuvo *O*-Alil calix[4]areno **5** (703,2 mg) mediante cristalización en etanol como cristales similares a agujas blancas. Después de que el licor madre se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (1% de EtOAc en hexanos), se recogió más calix[4]areno **5** (277,9 mg) para proporcionar 95% de rendimiento total. El espectro de RMN ¹H mostró que la muestra era una mezcla de más de dos rotámeros (cono y cono parcial) (CD Gutsche et al., Tetrahedron 1983, 39, 409). RMN ¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ 7,29 - 6,43 (m, 12 H, ArH), 6,38 - 5,80 (m, 4H, C=CH- C, 5,44 - 4,74 (m, 8H, CH₂=C), 4,47 - 3,87 (m, 8H, OCH₂C), 4,43 - 3,68 (muchos ds, *J* = 13 Hz, 4H, ArCH₂Ar), 3,62 - 3,05 (muchos ds, *J* = 13 Hz, 4H, ArCH₂Ar).

Ejemplo 5

O-Metalil calix[4]areno **6**. Según el procedimiento descrito para el calix[4]areno **5**, el calix[4]areno (212,2 mg, 0,5 mmoles) en THF (5,0 ml) y DMF (0,5 ml) se trató con NaH (200,0 mg, 8,2 mmoles) y cloruro de metilalilo (2,2 ml, 25 mmoles). El tratamiento estándar y la purificación con cromatografía ultrarrápida (1% de EtOAc en hexanos) dio el *O*-metalil calix[4]areno **6** (320,3 mg, 100%) como un aceite incoloro. RMN ¹H (500 MHz, CD₃Cl) δ 7,30 - 6,21 (m, 12H, ArH), 5,24 - 4,68 (m, 8H, CH₂=C), 4,49 - 3,66 (muchos ds, *J* ≈ 13 Hz, 4H, ArCH₂Ar), 4,41 - 4,03 (m, 8H, OCH₂C), 3,61 - 3,07 (muchos ds, *J* ≈ 13 Hz, 4H, ArCH₂Ar), 1,92 - 1,53 (m, 12H, C=CCH₃-C).

Ejemplo 6

4-Alil calix[4]areno **7**. El *O*-alil calix[4]areno **5** (338,8 mg, 0,58 mmoles) se disolvió en *N,N*-dimetilanilina pura (6 ml), y se agitó a 210°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió en agua con hielo (50,0 ml) con HCl concentrado (50,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 min. y se extrajo mediante CHCl₃. La fase orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), y se concentró. La cristalización en etanol proporcionó el 4-alil calix[4]areno **7** (271,0 mg) como cristales blancos finos. El licor madre se concentró y se cristalizó para dar más producto deseado (15,1 mg), hasta proporcionar 84% de rendimiento total. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 10,16 (s, 4H), 6,84 (s, 8H), 5,86 (ddt, *J* = 17,0, 10,5, 6,8 Hz, 4H), 5,04 (br d, *J* = 17,0 Hz, 4H), 5,03 (br d, *J* = 10,5 Hz, 4H), 4,19 (br d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 3,45 (br d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 3,18 (d, *J* = 6,8 Hz, 8H).

Ejemplo 7

4-Metalil calix[4]areno **8**. Según el procedimiento descrito para el 4-alil calix[4]areno **7**, el *O*-metalil calix[4]areno **6** (44,5 mg, 0,069 mmoles) se sometió a transposición de Claisen en *N,N*-dimetilanilina pura (1 ml). El tratamiento estándar y la cristalización dieron el 4-metalil calix[4]areno **8** (27,6 mg). La purificación adicional del licor madre proporcionó más producto deseado (2,4 mg), hasta proporcionar 67% de rendimiento total. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 10,19 (s, 4H), 6,88 (s, 8H), 4,77 (br s, 4H), 4,68 (br s, 4H), 4,21 (br d, *J* = 12,5 Hz, 4H), 3,45 (br d, *J* = 12,5 Hz, 4H), 3,10 (s, 8H), 1,63 (s, 12H); RMN ¹³C (125 MHz) δ 147,3 (4C), 145,4 (4C), 133,3 (8C), 129,5 (8C), 128,2 (4C), 112,0 (4C), 44,0 (4C), 32,0 (4C), 22,3 (4C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₄₄H₄₈Na₁O₄ (M+Na)⁺ 663,3450, encontrado 663,3446.

Ejemplo 8

Tetra-éster **9a** y **9b**. Según el procedimiento descrito para el tetra-éster **2**, el 4-alil calix[4]areno **7** (116,9 mg, 0,2 mmoles) en acetona (4,0 ml) se trató con K_2CO_3 (221,1 mg, 1,6 mmoles) y bromoacetato de etilo (0,18 ml, 1,6 mmoles). El tratamiento estándar dio el producto bruto como un aceite, que se disolvió en EtOAc (4 ml). Tras la adición de Pd sobre carbón activado (10%, 95,6 mg), la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de H_2 durante 2 horas, y después se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró, y la cristalización en una disolución de CH_2Cl_2 y metanol (~1:4) produjo el tetra-éster **9a** (111,9 mg) en la conformación de cono como cristales similares a agujas transparentes. El licor madre se purificó adicionalmente mediante MPLC (20% de EtOAc en hexanos) para dar más tetra-éster **9a** (4,2 mg) y **9b** (en conformación de cono parcial, 4,0 mg) para proporcionar 62% de rendimiento total para el rotámetro cónico y 2% de rendimiento para el rotámetro cónico parcial. Confórmero cónico **9a**: RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6,48 (s, 8H), 4,80 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 4,73 (s, 8H), 4,20 (q, $J = 7,5$ Hz, 8H), 3,13 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 2,24 (t, $J = 7,3$ Hz, 8H), 1,40 (tq, $J = 7,3, 7,3$ Hz, 8H), 1,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 12H), 0,81 (t, $J = 7,3$ Hz, 12H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170,6 (4C), 153,8 (4C), 136,8 (4C), 134,2 (8C), 128,6 (8C), 71,6 (4C), 60,6 (4C), 37,4 (4C), 31,7 (4C), 24,7 (4C), 14,4 (4C), 13,9 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $C_{56}H_{72}Na_4O_{12}$ (M+Na) $^+$ 959,4921, encontrado 959,4921. Confórmero de cono parcial **9b**: RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,23 (s, 2H), 6,83 $^+$ (d, $J \approx 2,2$ H), 6,83 $^-$ (s, 2H), 6,12 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 4,40 (d, $J = 14,0$ Hz, 2H), 4,38 (s, 4H), 4,31 - 4,24 (m, 6H), 4,21 (s, 2H), 4,07 (s, 2H), 4,01 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,80 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H), 3,69 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H), 3,08 (d, $J = 14,0$ Hz, 2H), 2,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 2,54 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,22 (ddd, $J = 14,0, 9,1, 7,2$ Hz, 2H), 2,12 (ddd, $J = 14,0, 8,8, 6,9$ Hz, 2H), 1,70 (tq, $J = 7,8, 7,4, 2$ H), 1,65 (tq, $J = 7,4, 7,3$ Hz, 2H), 1,37 - 1,30 (m, 4H), 1,35 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,33 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H), 1,18 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H), 1,01 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,94 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,82 (t, $J = 7,4$ Hz, 6H).

Ejemplo 9

Tetra-éster **10**. Según el procedimiento descrito para el tetra-éster **2**, el 4-metalil calix[4]areno **8** (96,1 mg, 0,15 mmoles) en acetona (3,0 ml) se trató con K_2CO_3 (165,8 mg, 1,2 mmoles) y bromoacetato de etilo (0,13 ml, 1,2 mmoles). El tratamiento estándar dio el producto bruto, que se sometió a hidrogenación con Pd sobre carbón activado (10%, 70 mg) en EtOAc (3 ml). La purificación del producto reducido bruto con cromatografía ultrarrápida (15% de EtOAc en hexanos) proporcionó el tetra-éster **10** similar a un aceite (148,0 mg, 100%) en la conformación de cono. RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6,47 (s, 8H), 4,80 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 4,75 (s, 8H), 4,20 (q, $J = 7,4$ Hz, 8H), 3,14 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 2,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 8H), 1,59 (m, 4H), 1,28 (t, $J = 7,4$ Hz, 12H), 0,75 (d, $J = 6,1$ Hz, 24H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170,7 (4C), 153,7 (4C), 135,8 (4C), 134,0 (8C), 129,4 (8C), 71,5 (4C), 60,5 (4C), 44,9 (4C), 31,6 (4C), 30,4 (4C), 22,4 (8C), 14,4 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $C_{60}H_{80}Na_4O_{12}$ (M+Na) $^+$ 1015,5547, encontrado 1015,5575.

Ejemplo 10

Tetra-amina **11a**. Se trató *N,N*-dimetiletilendiamina (0,22 ml, 2,0 mmoles) en CH_2Cl_2 (0,5 ml) con $AlMe_3$ (2,0 M en tolueno, 1,0 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante 15 min. Se añadió el tetra-éster **9** (93,1 mg, 0,1 mmoles) en CH_2Cl_2 (1,0 ml) a través de una cánula, y la mezcla se calentó hasta 40°C y se agitó durante toda la noche. La reacción se paralizó cuidadosamente con HCl 1N. Después de que la capa acuosa se ajustó hasta pH = 8 mediante $NaHCO_3$ ac. sat., y la mezcla se extrajo con $CHCl_3$. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró para proporcionar la tetra-amina **11a** como un sólido espumoso amarillo claro (98,9 mg, 90%). RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,58 (br t, $J = 6,4$ Hz, 4H), 6,42 (s, 8H), 4,46 (s, 8H), 4,41 (d, $J = 13,8$ Hz, 4H), 3,42 (dt, $J = 6,9, 6,4$ Hz, 8H), 3,15 (d, $J = 13,8$ Hz, 4H), 2,44 (t, $J = 6,9$ Hz, 8H), 2,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 8H), 2,20 (s, 24 H), 1,44 (sextete ap., $J = 7$ Hz, 8H), 0,84 (t, $J = 7,2$ Hz, 12H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 169,8 (4C), 153,8 (4C), 137,0 (4C), 133,6 (8C), 128,8 (8C), 74,4 (4C), 58,2 (4C), 45,5 (8C), 37,4 (4C), 37,2 (4C), 31,3 (4C), 24,6 (4C), 13,8 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $C_{64}H_{97}N_8O_8$ (M+H) $^+$ 1105,7429, encontrado 1105,7471.

Ejemplo 11

Tetra-amina **12**. Se trató el tetra-éster **10** (146,8 mg, 0,15 mmoles) en tolueno (1,5 ml) y metanol (1,5 ml) con *N,N*-dimetiletilendiamina (0,32 ml, 2,96 mmoles) y se agitó en un tubo cerrado herméticamente a 80°C durante 24 horas. Los componentes volátiles se eliminaron a vacío (~60°C temperatura del baño) para dar un sólido pegajoso marrón claro. El sólido se disolvió en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 , y se obtuvo la tetra-amina **12** (103,6 mg, 60%) como un sólido amarillo claro mediante la secuencia de adición gota a gota de éter (relación final ~10:1 de $Et_2O:CH_2Cl_2$), centrifugación, decantación, y secado. RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,74 (br t, $J = 5,8$ Hz, 4H), 6,39 (s, 8H), 4,48 (s, 8H), 4,44 (d, $J = 13,5$ Hz, 4H), 3,46 (dt, $J = 6,2, 5,8$ Hz, 8H), 3,16 (d, $J = 13,5$ Hz, 4H), 2,50 (t, $J = 6,2$ Hz, 8H), 2,25 (s, 24 H), 2,10 (d, $J = 7,0$ Hz, 8H), 1,65 (m, 4H), 0,80 (d, $J = 6,2$ Hz, 24H); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170,0 (4C), 153,8 (4C), 136,2 (4C), 133,4 (8C), 129,7 (8C), 74,5 (4C), 58,2 (4C), 45,4 (8C), 45,0 (4C), 37,1 (4C), 31,3 (4C), 30,5 (4C), 22,4 (8C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $C_{68}H_{105}N_8O_8$ (M+H) $^+$ 1161,8055, encontrado 1161,8091.

Ejemplo 12

25,27-Di-(2-metalloxi)-26,28-dihidroxicalex[4]areno **14**. A la suspensión de calix[4]areno (42,4 mg, 0,1 mmoles) en acetona (5 ml) se añadió K₂CO₃ (221,1 mg, 1,6 mmoles), y la mezcla se puso a reflujo durante 1 hora. Después de enfriar, se añadió NaI (749,4 mg, 5,0 mmoles) y cloruro de 2-metil-alilo (0,49 ml, 5,0 mmoles) a la mezcla de reacción, que después se puso a reflujo toda la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite, y se enjuagó con CH₂Cl₂. El filtrado combinado se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), y se concentró. La cristalización del residuo en una disolución de CH₂Cl₂ y etanol (~ 1:4) dio 25,27-dimetalloxi-26,28-dihidroxicalex[4]areno **14** como agujas cristalinas amarillas (40 mg, 75%). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,03 (s, 2H), 7,06 (d, *J* = 7,2 Hz, 4H); 6,90 (d, *J* = 7,0 Hz, 4H), 6,74 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 6,65 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 5,46 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,38 (s, 4H), 4,32 (d, *J* = 13,3 Hz, 4H), 3,38 (d, *J* = 13,3 Hz, 4H), 2,07 (s, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 153,6 (2C), 151,9 (2C), 140,9 (2C), 133,5 (2C), 129,2 (4C), 128,7 (4C), 128,1 (4C), 125,6 (4C), 119,1 (2C), 113,6 (2C), 80,4 (2C), 31,5 (4C), 20,1 (2C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₃₆H₃₆Na₁O₄ (M+Na)⁺ 555,2511, encontrado 555,2520.

Ejemplo 13

5,17-Di-(2-metalil)-11,23-dialilcalix[4]areno **15**. Según el procedimiento descrito para el calix[4]areno **5**, se trató el calix[4]areno **14** (35,7 mg, 0,07 mmoles) en THF (1,0 ml) y DMF (0,1 ml) con NaH (26,5 mg, 1,1 mmoles) y bromuro de alilo (0,3 ml, 3,3 mmoles). El tratamiento estándar y la purificación con cromatografía ultrarrápida (1% de EtOAc en hexanos) dio 25,27-dimetalloxi-26,28-dialiloxicalix[4]areno (40,1 mg, 98%) como un aceite incoloro.

El derivado de calix[4]areno anterior (122,6 mg, 0,2 mmoles) y bis-(trimetilsilil)-urea (327,1 mg, 1,6 mmoles) en *N,N*-dimetilanilina (4 ml) se agitaron a 210°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió en agua con hielo (30,0 ml) con HCl concentrado (30,0 ml). La mezcla se agitó durante 10 min., se extrajo mediante CHCl₃, y se concentró. El residuo resultante se disolvió en MeOH-CH₂Cl₂ (2 ml, 1:1). Tras añadir HCl 3 N (0,7 ml), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas. Tras eliminar los componentes volátiles, se obtuvo 5,17-di-(2-metalil)-11,23-dialilcalix[4]areno **15** (82,5 mg, 67%) como un sólido blanquecino tratando el residuo concentrado con MeOH. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 10,2 (s, 4H), 6,84 (s, 4H), 6,83 (s, 4H), 5,85 (ddt, *J* = 17,1, 10,5, 6,9 Hz, 2H), 5,03 (br d, *J* = 17,1 Hz, 2H), 5,02 (br d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 4,77 (s, 2H), 4,69 (s, 2H), 4,21 (br d, *J* = 12,7 Hz, 4H), 3,45 (brd, *J* = 12,7 Hz, 4H), 3,17 (d, *J* = 6,9 Hz, 4H), 3,11 (s, 4H), 1,64 (s, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 147,3 (2C), 147,2 (2C), 145,4 (2C), 137,8 (2C), 133,7 (2C), 133,3 (2C), 129,5 (4C), 129,2 (4C), 128,4 (4C), 128,2 (4C), 115,8 (2C), 112,0 (2C), 43,9 (2C), 39,6 (2C), 32,0 (4C), 22,3 (2C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₄₂H₄₄Na₁O₄, (M+H)⁺ 635,3137, encontrado 635,3145.

Ejemplo 14

5,17-Di-(2-metalil)-11,23-dialil-25,26,27,28-tetraquis-*N*-(*N,N*-dimetil-2-aminoetil)carbamoilmetoxi calix[4]areno **16**. Según el procedimiento descrito para el tetra-éster **2**, el calix[4]areno **15** (61,3 mg, 0,1 mmoles) en acetona (2,0 ml) se trató con K₂CO₃ (110,5 mg, 0,8 mmoles) y bromoacetato de etilo (0,09 ml, 0,8 mmoles). El tratamiento estándar, y la cromatografía (20% de EtOAc en hexanos) dio el tetraéster deseado (66,4 mg, 69%) como un aceite.

El tetraéster anterior (30,7 mg, 0,03 mmoles) en MeOH (0,3 ml) y tolueno (0,3 ml) se trató con *N,N*-dimetiletilediamina (0,14 ml, 1,28 mmoles) y se agitó en un tubo cerrado herméticamente a 80°C durante 48 horas. Después de eliminar los componentes volátiles, el residuo se trituró con éter para dar la tetraamina **16** (24,5 mg, 73%) como un sólido amarillo pálido. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,94 (br t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 7,33 (br t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 6,73 (s, 4H), 6,17 (s, 4H), 5,65 (ddt, *J* = 17,1, 10,5, 6,8 Hz, 2H), 4,91 (dd, *J* = 10,5, 1,4 Hz, 2H), 4,85 (dd, *J* = 17,1, 1,4 Hz, 2H), 4,80 (s, 2H), 4,65 (s, 2H), 4,61 (s, 4H), 4,45 (d, *J* = 13,5 Hz, 4H), 4,33 (s, 4H), 3,50 (dt, *J* = 6,6 Hz, 4H), 3,37 (dt, *J* = 6,6 Hz, 4H), 3,17 (d, *J* = 14,7 Hz, 4H), 3,16 (s, 4H), 2,86 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H), 2,52 (t, *J* = 6,4 Hz, 4H), 2,40 (t, *J* = 6,4 Hz, 4H), 2,24 (s, 12H), 2,19 (s, 12H), 1,68 (s, 6H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 170,2 (2C), 169,5 (2C), 154,9 (2C), 153,4 (2C), 145,9 (2C), 137,8 (2C), 134,9 (4C), 134,4 (2C), 134,3 (2C), 132,9 (4C), 130,1 (4C), 128,5 (4C), 115,4 (2C), 111,6 (2C), 74,7 (2C), 74,2 (2C), 58,3 (2C), 58,1 (2C), 45,5 (4C), 45,4 (4C), 44,1 (2C), 39,6 (2C), 37,1 (2C), 37,1 (2C), 31,3 (4C), 22,3 (2C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₆₆H₉₃N₈O₈ (M+H)⁺ 1125,7116, encontrado 1125,7213.

Ejemplo 15

5,17-Di-(2-metilpropil)-11,23-dipropil-25,26,27,28-tetraquis-*N*-(*N,N*-dimetil-2-aminoetil)carbamoilmetoxi calix[4]areno **17**. El tetraéster (35,1 mg, 0,04) descrito en el procedimiento para el calix[4]areno **16** se disolvió en EtOAc (1 ml), y se trató con Pd sobre carbón activado (10%, 20 mg) a una atmósfera de H₂. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite, y se enjuagó con CH₂Cl₂. El filtrado combinado se concentró y se purificó mediante MPLC (15% de EtOAc en hexanos) para dar el tetraéster saturado (32,6 mg, 91%) como un aceite incoloro.

El tetraéster saturado anterior (32,6 mg, 0,03 mmoles) se agitó en *N,N*-dimetiletilediamina pura (0,15 ml, 1,37 mmoles) a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de concentrarlo, el residuo se trituró con éter para dar la tetraamina **17** (21,4 mg, 56%) como un sólido amarillo pálido. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,87 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H),

7,36 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 6,63 (s, 4H), 6,20 (s, 4H), 4,58 (s, 4H), 4,43 (d, $J = 13,9$ Hz, 4H), 4,36 (s, 4H), 3,48 (td, $J = 7,6$ Hz, 4H), 3,38 (td, $J = 6,6$ Hz, 4H), 3,15 (d, $J = 13,9$ Hz, 4H), 2,49 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H), 2,39 (t, $J = 6,2$ Hz, 4H), 2,28 (d, $J = 2,7$ Hz, 4H), 2,23 (s, 12H), 2,18 (s, 12H), 2,06 (t, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,78 (m, 2H), 1,30 (tq, $J = 7,5, 7,0$ Hz, 4H), 0,87 (d, $J = 6,8$ Hz, 12H), 0,78 (t, $J = 7,5$ Hz, 6H); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 170,3 (2C), 169,7 (2C), 154,4 (2C), 153,1 (2C), 137,1 (2C), 136,2 (2C), 134,4 (4C), 132,7 (4C), 130,1 (4C), 128,4 (4C), 74,7 (2C), 74,2 (2C), 58,3 (2C), 58,1 (2C), 45,4 (4C), 45,4 (4C), 44,9 (2C), 37,4 (2C), 37,1 (2C), 37,1 (2C), 31,3 (4C), 30,7 (2C), 24,5 (2C), 22,4 (4C), 14,0 (2C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{66}\text{H}_{101}\text{N}_8\text{O}_8$ (M+H) $^+$ 1133,7742, encontrado 1133,7813.

Ejemplo 16

5,11,17,23-Tetrayodo-25,26,27,28-tetra(3-metilbutoxi)calix[4]areno (**18a** y **18b**). El calix[4]areno **13** (424,5 mg, 1,0 mmoles) en THF (25 ml) y DMF (2,5 ml) se trató con NaH (384,0 mg, 16,0 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 1 hora, seguido de la adición de 1-bromo-3-metilbutano (6,0 ml, 50,0 mmoles), y la reacción se continuó durante otras 18 horas a reflujo. Después de enfriar, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite, y el filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró. El residuo se purificó con cromatografía ultrarrápida (2% de EtOAc en hexanos) para dar tetra-*iso*-amiloxicalix[4]areno (690,6 mg, 98%) como un aceite incoloro.

A la suspensión de Ag_2CO_3 (71 1,4 mg, 2,6 mmoles) y TFA (0,4 ml, 5,2 mmoles) en CHCl_3 (40 ml, grado reactivo, etanol estabilizante no eliminado) se añadió el tetra-*iso*-amiloxicalix[4]areno (672,2 mg, 0,9 mmoles), y la mezcla de reacción se puso a reflujo durante 3 horas. Después de enfriar, se añadió I_2 (3324,9 mg, 13,1 mmoles), y la mezcla de reacción se puso a reflujo durante otras 18 horas. Después de enfriar, se eliminó AgI mediante filtración a través de Celite, y el filtrado violeta se blanqueó mediante lavado con 10% (p/v) de hidrogenosulfito de sodio (50 ml). El extracto orgánico se recogió, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Se recogió 4-yodo-3-metilbutoxicalix[4]areno **18a** y **18b** (881,9 mg, 77%) como un sólido rosa pálido tras la cromatografía ultrarrápida (2% de EtOAc en hexanos). La RMN ^1H indicó que es una mezcla de conformero cónico **18b** y conformero de cono parcial **18a** en una relación de 1,8 a 1. Para el conformero cónico **18b**: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,0 (s, 8H), 4,27 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 3,89 (br t, $J = 7,6$ Hz, 8H), 3,06 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 1,7 (m, 12H), 0,94 (d, $J = 6,3$ Hz, 24H); Para conformero de cono parcial: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,54 (s, 2H), 7,38 (s, 2H), 7,28 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H), 6,64 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H), 3,97 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H), 3,81 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,63 - 3,45 (m, 4H), 3,53 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 3,48 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 2,98 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H), 1,94 (nonet, 1H), 1,85 (td, $J = 6,6$ Hz, 2H), 1,78 - 1,70 (m, 6H), 1,31 - 1,26 (m, 3H), 1,12 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H), 1,03 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H), 0,99 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H), 0,88 (d, $J = 6,3$ Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{Na}_1\text{O}_4$ (M+Na) $^+$ 1231,0568, encontrado 1231,0641.

Ejemplo 17

Tetra-éster **19a** y **19b** insaturado. Un tubo dimensionable con 4-yodo calix[4]arenos **18a** y **18b** (241,7 mg, 0,2 mmoles), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (27,0 mg, 0,12 mmoles), y tri-*o*-tolilfosfina (121,8 mg, 0,4 mmoles) se trató con vacío, y se rellenó con Ar tres veces. Se añadieron DMF (2,0 ml), Et_3N (0,66 ml, 4,8 mmoles), y acrilato de etilo (0,52 ml, 4,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 80°C, y se monitorizó mediante espectrometría de masas ESI. Después de 6 horas, se añadieron más $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (13,5 mg, 0,12 mmoles) y tri-*o*-tolilfosfina (30,5 mg, 0,1 mmoles). Después de que la reacción terminó según se indicó mediante ESI, la mezcla de reacción se enfrió y se filtró a través de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (20% de EtOAc en hexanos) del residuo proporcionó el tetra-éster **19a** insaturado en conformación de cono parcial (64,6 mg, 29%) y **19b** en conformación de cono (111,5 mg, 51%). Para conformero de cono parcial **19a**: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,73 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,46 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 7,16 (d, $J = 15,6$ Hz, 2H), 7,13 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 6,43 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 6,38 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 5,97 (d, $J = 15,6$ Hz, 2H), 4,31 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,26 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 4,23 - 4,15 (m, 4H), 4,05 (d, $J = 13,5$ Hz, 2H), 3,92 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,80 (m, 2H), 3,64 (m, 6H), 3,38 (m, 2H), 3,08 (d, $J = 3,5$ Hz, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,92 (m, 4H), 1,80 (m, 4H), 1,37 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,33 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 1,26 (m, 3H), 1,14 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H), 1,04 (d, $J = 5,9$ Hz, 6H), 1,01 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H), 0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); para conformero cónico **19b**: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (d, $J = 16,0$ Hz, 4H), 6,80 (s, 8H), 6,08 (d, $J = 16,0$ Hz, 4H), 4,41 (d, $J = 13,3$ Hz, 4H), 4,22 (q, $J = 7,1$ Hz, 8H), 3,95 (t, $J = 6,9$ Hz, 8H), 3,17 (d, $J = 13,3$ Hz, 4H), 1,77 (m, 12H), 1,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 12H), 0,96 (d, $J = 6,7$ Hz, 24H); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 167,3 (4C), 158,6 (4C), 144,7 (4C), 135,5 (8C), 129,1 (4C), 128,5 (8C), 116,4 (4C), 74,0 (4C), 60,4 (4C), 39,0 (4C), 31,2 (4C), 25,5 (4C), 23,0 (8C), 14,5 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{68}\text{H}_{88}\text{Na}_1\text{O}_{12}$ (M+Na) $^+$ 1119,6173, encontrado 1119,6274.

Ejemplo 18

Tetra-éster **20**. El tetra-éster **19b** insaturado en conformación de cono (86,5 mg, 0,08 mmoles) en THF (0,6 ml) y EtOH (0,6 ml) bajo N_2 se trató con Pd sobre carbón activado (10%, 20 mg) y formiato de amonio (200 mg, 3,17 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 60°C en un tubo cerrado herméticamente, y se monitorizó mediante ESI. Después de que la hidrogenación estuvo terminada (~10 horas), la mezcla de reacción se enfrió y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró y se purificó mediante MPLC (20% de EtOAc en hexanos) para dar el tetra-éster **20** (67,9 mg, 78%) como un aceite incoloro. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6,44 (s, 8H), 4,35 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 4,11

(q, $J = 7,4$ Hz, 8H), 3,88 (t, $J = 1,5$ Hz, 8H), 3,04 (d, $J = 13,0$, 4H), 2,62 (br t, $J = 8,2$ Hz, 8H), 2,39 (br t, $J = 8,2$ Hz, 8H), 1,77 (m, 2H), 1,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 12H), 0,95 (d, $J = 6,1$ Hz, 24H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 173,3 (4C), 155,0 (4C), 134,9 (8C), 133,8 (4C), 128,0 (8C), 73,7 (4C), 60,4 (4C), 39,0 (4C), 36,5 (4C), 31,2 (4C), 30,6 (4C), 25,6 (4C), 23,0 (8C), 14,5 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{68}\text{H}_{96}\text{Na}_1\text{O}_{12}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 1127,6799, encontrado 1127,6825.

5 Ejemplo 19

Tetra-amina **21**. Se agitó a 140°C durante 20 horas el tetra-éster **20** (112,8 mg, 0,1 mmoles) y *N,N*-dimetiletilendiamina (0,44 ml, 4,0 mmoles) en un tubo cerrado herméticamente. Después de enfriar, la mezcla de reacción se repartió entre CH_2Cl_2 y agua. La fase orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4), y se concentró a vacío para dar la tetra-amina **21** (115,8 mg, 91%) como un sólido amarillo claro. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,56 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H), 6,45 (s, 8H), 4,35 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 3,87 (t, $J = 7,2$ Hz, 8H), 3,32 (td, $J = 6, 6$ Hz, 8H), 3,40 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 5,27 (br t, $J = 7,8$ Hz, 8H), 2,41 (t, $J = 6,1$ Hz, 8H), 2,27 (br t, $J = 7,8$ Hz, 8H), 2,22 (s, 24H), 1,79 (m, 12H), 0,95 (d, $J = 7,0$ Hz, 24H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 173,0 (4C), 154,9 (4C), 134,9 (8C), 134,3 (4C), 128,0 (8C), 73,8 (4C), 58,3 (4C), 45,4 (8C), 39,1 (4C), 38,8 (4C), 37,2 (4C), 31,3 (4C), 31,2 (4C), 25,6 (4C), 23,0 (8C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{76}\text{H}_{122}\text{N}_8\text{O}_8$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 637,4693, encontrado 637,4686.

15 Ejemplo 20

Tetra-ácido **22**. El tetra-éster **2** (2,0 g, 2,0 mmoles) en etanol (30 ml) y agua (20 ml) se trató con NaOH (2,0 g, 50 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 24 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se acidificó con H_2SO_4 al 50% hasta pH = 1. El precipitado se recogió tras la filtración, se lavó con agua, y se secó a vacío para proporcionar el tetra-ácido **21** (1,8 g, 100%) como un sólido blanco. RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 12,2 (s, 4H), 6,93 (s, 8H), 4,77 (d, $J = 12,5$ Hz, 4H), 4,59 (s, 8H), 3,21 (d, $J = 12,5$ Hz, 4H), 1,06 (s, 36H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{Na}_1\text{O}_{12}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 903,4295, encontrado 903,4314.

Ejemplo 21

Tetra-triazol **23**. La suspensión del tetra-ácido **23** (264,3 mg, 0,3 mmoles) en benceno se trató con cloruro de tionilo (1,3 ml, 18,0 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 3 horas. Después de eliminar los componentes volátiles a vacío, el residuo se coevaporó con benceno. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 , se filtró a través de algodón, y se concentró. Sin purificación adicional, el cloruro de acilo bruto en THF (5,0 ml) se trató con 1H, 1,2,4-triazol-1-propanamina (Wright, Jr. et al., J. Med. Chem. 29, 523-530 (1986)) (227,1 mg, 1,8 mmoles) y Et_3N (0,33 ml, 2,4 mmoles) a 0°C, y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. La reacción se monitorizó mediante ESI. Después de 18 horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró, y después se repartió entre CH_2Cl_2 y disolución acuosa de NH_4Cl . La capa acuosa se ajustó hasta pH = 1 con HCl 1N. La fase orgánica se recogió y se lavó con salmuera. Después, la fase orgánica se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró para dar el tetra-triazol **23** (233,0 mg, 59%) como un sólido blanco. HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{72}\text{H}_{96}\text{N}_{16}\text{Na}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+2\text{Na}$) $^{2+}$ 679,3696, encontrado 679,3747.

35 Ejemplo 22

Dinitrilo **24**. A una suspensión de 4-*t*-butilcalix[4]areno **1** (649,0 mg, 1,0 mmoles) en acetona (20 ml) se añadió K_2CO_3 (552,8 mg, 4,0 mmoles). Después de que la mezcla de reacción se pusiera a reflujo durante 1 hora, se añadieron cloroacetonitrilo (0,25 ml, 4,0 mmoles) y NaI (599,6 mg, 4,0 mmoles), y la mezcla se calentó a reflujo durante otras 15 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el filtrado se lavó mediante salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró. El dinitrilo **24** (418,8 mg) se obtuvo como un cristal blanco mediante cristalización en una disolución de CH_2Cl_2 y etanol (~1:4). Se recogió más dinitrilo **24** (62,3 mg) a partir del licor madre mediante cromatografía ultrarrápida (20% de EtOAc en hexanos) para proporcionar 66% de rendimiento total. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,12 (s, 4H), 6,72 (s, 4H), 5,55 (s, 2H), 4,80 (s, 4H), 4,22 (d, $J = 13,1$ Hz, 4H), 3,44 (d, $J = 13,1$ Hz, 4H), 1,33 (s, 18H), 0,88 (s, 18H); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 150,1 (2C), 148,9 (2C), 148,7 (2C), 142,7 (2C), 132,0 (4C), 128,0 (4C), 126,3 (4C), 125,5 (4C), 115,3 (2C), 60,6 (2C), 34,1 (2C), 34,1 (2C), 31,9 (6C), 31,8 (4C), 31,0 (6C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{Na}_1\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 749,4294, encontrado 749,4264.

Ejemplo 23

Diguanidina **25** protegida con Boc y mono-guanidina-mono-amina **26** protegida con Boc. A una disolución del dinitrilo **24** (746,3 mg, 1,0 mmoles) en éter (10 ml) y THF (5,0 ml) a 0°C se añadió LiAlH_4 (0,8 M en éter, 3,8 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante 6 horas. La reacción se paralizó cuidadosamente con agua (360 μl) y NaOH al 15% (120 μl) secuencialmente, la mezcla de reacción se filtró a través de papel de filtro, y el filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró para dar la diamina como un sólido blanco.

La diamina anterior, y 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (656,2 mg, 2,3 mmoles) se disolvieron en CH_2Cl_2 (5 ml), seguido de la adición de HgCl_2 (613,6 mg, 2,3 mmoles) y Et_3N (0,9 ml, 6,8 mmoles). Después de

- agitar durante 15 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró. El residuo se purificó mediante MPLC (14% de EtOAc en hexanos) para dar la diguanidina **25** protegida con Boc (476,4 mg, 40%) y la mono-guanidina-mono-amina **26** protegida con Boc (152,9 mg, 14%).
- 5 Compuesto **25**: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 11,45 (s, 2H), 8,94 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 7,00 (s, 4H), 6,98 (s, 2H), 6,74 (s, 4H), 4,23 (d, $J = 12,9$ Hz, 4H), 4,15 (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), 4,04 (dt, $J = 6,3, 5,1$ Hz, 4H), 3,28 (d, $J = 12,9$ Hz, 4H), 1,50 (s, 18H), 1,37 (s, 18H), 1,28 (s, 18H), 0,93 (s, 18H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,7 (2C), 156,6 (2C), 152,8 (2C), 150,9 (2C), 149,8 (2C), 147,0 (2C), 141,3 (2C), 132,5 (4C), 127,8 (4C), 125,7 (4C), 125,2 (4C), 83,0 (2C), 79,4 (2C), 74,6 (2C), 41,1 (2C), 34,1 (2C), 34,0 (2C), 31,9 (6C), 31,8 (4C), 31,2 (6C), 28,5 (6C), 28,1 (6C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{70}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{O}_{12}$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 610,3856, encontrado 610,3785.
- 10 Compuesto **26**: RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 11,46 (s, 1H), 8,99 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 7,80 (s, 2H), 7,01 (m, 4H), 6,91 (s, 2H), 6,87 (s, 2H), 6,48 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,23 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 4,23 (d, $J = 13,3$, 2H), 4,16 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 4,09 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 4,04 (dt, $J = 5,5, 5,0$ Hz, 2H), 3,79 (dt, $J = 5,0, 5,0$ Hz, 2H), 3,33 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 3,32 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H), 1,50 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,34 (s, 9H), 1,25 (s, 18H),), 1,06 (s, 9H), 1,03 (s, 9H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{64}\text{H}_{93}\text{N}_4\text{O}_{10}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1077,6892, encontrado 1077,6906.
- 15 Ejemplo 24
- Sal del ácido trifluoroacético de 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,27-bis(2-guanidinoetoxi)-26,28-dihidroxi calix[4]areno **27**. La diguanidina **25** (476,4 mg, 0,39 mmoles) se disolvió en una disolución de CH_2Cl_2 con 40% de TFA y 5% de anisol (5,0 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Los componentes volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se repartió entre CH_2Cl_2 y agua, y la fase acuosa se ajustó hasta pH = 8. La fase orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4), y se concentró para dar la sal de calixareno **27**·2TFA (407,8 mg, 100%) como un sólido blanquecino. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,19 (s, 4H), 7,02 (s, 4H), 4,26 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 4,22 (t, $J = 5,2$ Hz, 4H), 3,81 (t, $J = 5,2$ Hz, 4H), 3,48 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 1,27 (s, 18H), 1,03 (s, 18H); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 y CD_3OD) δ 157,6 (2C), 148,9 (2C), 128,4 (2C), 148,1 (2C), 143,9 (2C), 132,5 (4C), 127,9 (4C), 126,1 (4C), 125,5 (4C), 74,0 (2C), 41,5 (2C), 34,1 (2C), 33,8 (2C), 31,5 (4C), 31,3 (6C), 30,8 (6C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{50}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{O}_4$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 410,2808, encontrado 410,2787.
- 25 Ejemplo 25
- Sal del ácido trifluoroacético de 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25-(2-aminoetoxi)-27-(2-guanidinoetoxi)-26,28-dihidroxi calix[4]areno **28**. Según el procedimiento descrito para el calixareno **27**, la mono-guanidina-mono-amina **26** (152,9 mg, 0,14 mmoles) se trató con una disolución en CH_2Cl_2 (2,0 ml) de TFA (40%) y anisol (5%). El tratamiento estándar y la purificación dan la sal de calixareno **28**·2TFA (139,6 mg, 99%) como un sólido blanquecino. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,21 (s, 4H), 6,98 (m, 4H), 4,26 (m, 4H), 4,22 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 4,18 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 3,80 (m, 2H), 3,61 (m, 2H), 3,50 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 3,49 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 1,29 (s, 18H), 1,00 (m, 18H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{49}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_4$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 389,2698, encontrado 389,2686.
- 30 Ejemplo 26
- 35 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butil-25,27-bis(3-cianopropiloxi)-26,28-dihidroxi calix[4]areno **29**. El 4-*tert*-butilcalixareno **1** (1,3 g, 2,0 mmoles) en acetona (20 ml) se trató con K_2CO_3 (1,6 g, 12,0 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 1 hora, seguido de la adición de 4-bromo-butironitrilo (1,6 ml, 16,0 mmoles). Después de 16 horas, la mezcla de reacción se enfrió y se filtró a través de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), y se concentró. La cristalización en etanol dio el dinitrilo **29** (1,3 g) como un cristal blanco. Se recogió más producto deseado (158,6 mg, 91% en total) del licor madre mediante cromatografía ultrarrápida (20% de EtOAc en hexanos). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,44 (s, 2H), 7,06 (s, 4H), 6,86 (s, 4H), 4,17 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 4,09 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H), 3,38 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 3,05 (t, $J = 7,0$ Hz, 4H), 2,34 (tt, $J = 7,0, 5,5$ Hz, 4H), 1,28 (s, 18H), 1,00 (s, 18H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{52}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{Na}_1\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 805,4920, encontrado 805,4908.
- 40 Ejemplo 27
- 45 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetraquis(3-cianopropiloxi) calix[4]areno **30**. El dinitrilo (1,4 g, 1,8 mmoles) en DMF (20 ml) se trató con NaH (432 mg, 18,0 mmoles) a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de la adición de 4-bromo-butironitrilo (9,0 ml, 90,0 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 75°C durante 20 horas, y después se repartió entre CH_2Cl_2 y disolución acuosa saturada de NH_4Cl . La capa orgánica se lavó con disolución acuosa saturada de NH_4Cl (3 x 100 ml), se secó (Na_2SO_4), y se concentró. Tras eliminar el 4-bromo-butironitrilo restante a 68°C a vacío, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (35% de EtOAc en hexanos) para dar el tetra-nitrilo **30** (1,3 g, 81%) como un sólido blanco. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6,80 (s, 8H), 4,26 (d, $J = 12,3$ Hz, 4H), 4,02 (t, $J = 7,5$ Hz, 8H), 3,22 (d, $J = 12,3$ Hz, 4H), 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 8H), 2,28 (tt, $J = 7,5, 7,5$ Hz, 8H), 1,08 (s, 36H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 152,6 (4C), 145,6 (4C), 133,4 (8C), 125,6 (8C), 119,6 (4C), 73,1 (4C), 34,1 (4C), 31,5 (12C), 31,2 (4C), 26,0 (4C), 14,4 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{Na}_1\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 939,5764, encontrado 939,5776.
- 55

Ejemplo 28

Tetra-guanidina protegida con Boc **31**. A la disolución de tetranitrilo (458,5 mg, 0,5 mmoles) y CoCl_2 (519,4 mg, 4,0 mmoles) en metanol (10 ml) se añadió de forma discontinua NaBH_4 (756,6 mg, 20 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 26 horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 . Se añadió HCl 3N (~30 ml), y se agitó vigorosamente hasta que el precipitado negro estuvo completamente disuelto. La capa acuosa se ajustó hasta pH = 10 con NaOH al 15%, y después se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase de CH_2Cl_2 combinada se secó (Na_2SO_4), y se concentró para proporcionar la tetra-amina bruta (438,2 mg) como un sólido rosa oscuro.

A una disolución de la tetra-amina anterior (166,5 mg, ~0,19 mmoles) se añadió secuencialmente 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (227,4 mg, 0,8 mmoles), HgCl_2 (212,6 mg, 0,8 mmoles), y Et_3N (0,33 ml, 2,3 mmoles). Después de agitar durante 15 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el filtrado se repartió entre CH_2Cl_2 y una disolución acuosa de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La purificación con MPLC (15% de EtOAc en hexanos) proporcionó la tetra-guanidina **31** protegida con Boc (103,6 mg, 29%). RMN^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 11,51 (s, 4H), 8,38 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), 6,75 (s, 8H), 4,33 (d, $J = 12,6$ Hz, 4H), 3,90 (t, $J = 7,6$ Hz, 8H), 3,48 (td, $J = 7,3, 5,0$ Hz, 8H), 3,12 (d, $J = 12,6$ Hz, 4H), 2,00 (m, 8H), 1,68 (m, 8H), 1,48⁺ (s, 36H), 1,48⁻ (s, 36H), 1,07 (s, 36H); RMN^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,8 (4C), 156,3 (4C), 153,5 (4C), 153,4 (4C), 144,6 (4C), 133,9 (8C), 125,1 (8C), 83,0 (4C), 79,2 (4C), 74,6 (4C), 41,1 (4C), 34,0 (4C), 31,6 (12C), 31,4 (4C), 28,5 (12C), 28,3 (12C), 27,7 (4C), 25,9 (4C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{104}\text{H}_{165}\text{N}_{12}\text{NaO}_{20}$ (M+H+Na)²⁺ 962,6080, encontrado 962,6090.

Ejemplo 29

Sal del ácido trifloroacético de 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27-tris(4-guanidinobutiroxi)-28-hidroxi calix[4]areno **32**. Según el procedimiento descrito para el calixareno **27**, la tetra-guanidina **31** (80,6 mg, 0,04 mmoles) se trató con una disolución de TFA (1,0 ml) (40%) y anisol (5%) en CH_2Cl_2 . El tratamiento estándar y la purificación da la sal de calixareno **32**·3TFA (54,5 mg, 98%) como un sólido blanquecino. RMN^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,22 (s, 2H), 7,14 (s, 2H), 6,61 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 6,56 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 4,38 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H), 4,31 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 3,98 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,28 (m, 4H), 3,28 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H), 3,24 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H), 2,34 (m, 2H), 2,05 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 1,33 (s, 9H), 0,84 (s, 18H); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{59}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_4$ (M+2H)²⁺ 494,8597, encontrado 494,8576.

Ejemplo 30

Dinitrilo **33**. Según el procedimiento descrito para el dinitrilo **24**, el calix[4]areno **13** en acetona (5,0 ml) se trató con K_2CO_3 (138,2, 1,0 mmoles), cloroacetnitrilo (0,13 ml, 2,0 mmoles), y NaI (299,8 mg, 2,0 mmoles). El tratamiento estándar y la purificación mediante cristalización dieron el dinitrilo **33** (106,8 mg, 43%) y el análogo trisustituido (74,1 mg, 27,4%). Para el dinitrilo **33**: RMN^1H δ 7,13 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H), 6,82 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H), 6,77 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 6,75 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 6,02 (s, 2H), 4,85 (s, 4H), 4,25 (d, $J = 13,6$ Hz, 4H), 3,52 (d, $J = 13,6$ Hz, 4H).

Ejemplo 31

Diguanidina **34** protegida con Boc y mono-guanidina-mono-amina **35** protegida con Boc. Según el procedimiento descrito para la preparación de la diguanidina **25** y la mono-guanidina-mono-amina **26**, el dinitrilo **33** (106,8 mg, 0,21 mmoles) en THF (4,0 ml) se trató con LiAlH_4 (0,8 M en éter, 0,8 ml). Tras el tratamiento estándar, la diamina correspondiente se obtuvo como un sólido blanco. Sin purificación adicional, la diamina se disolvió en CH_2Cl_2 (5 ml), y se trató con 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (133,6 mg, 0,46 mmoles), HgCl_2 (124,9 mg, 0,46 mmoles), y Et_3N (0,19 ml, 1,39 mmoles). El tratamiento estándar y la cromatografía (20% de EtOAc en hexanos) dio la diguanidina **34** (54,1 mg, 26%) y la mono-guanidina-mono-amina **35** (23,6 mg, 13%). Para la diguanidina **34**: RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 11,48 (s, 2H), 9,00 (br t, $J \approx 5$ Hz, 2H), 7,58 (s, 2H), 7,02 (d, $J = 7,9$ Hz, 4H), 6,83 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H), 6,68 (dd, $J = 7,8, 6,9$ Hz, 2H), 6,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,24 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 4,14 (m, 8H), 3,35 (d, $J = 13,2$ Hz, 4H), 1,50 (s, 18H), 1,35 (s, 18H); RMN^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,7 (2C), 156,6 (2C), 153,6 (2C), 152,8 (20), 151,7 (2C), 133,1 (4C), 129,2 (4C), 128,6 (4C), 127,9 (4C), 125,6 (2C), 118,8 (2C), 83,0 (2C), 79,4 (2C), 75,0 (2C), 41,0 (2C), 31,5 (4C), 28,5 (6C), 28,0 (6C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{Na}_1\text{O}_{12}$ (M+Na)⁺ 1017,4949, encontrado 1017,5015.

Para la mono-guanidina-mono-amina **35**: RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 11,49 (s, 1 H), 9,02 (br t $J = 5,4$ Hz, 1H), 8,07 (s, 2H), 7,04 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,03 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 6,93 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,76 (dd, $J = 7,3, 7,1$ Hz, 1H), 6,75 (dd, $J = 7,3, 7,1$ Hz, 1H), 6,64 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 6,44 (br t, $J \approx 5$ Hz, 1H), 4,26 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), 4,24 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), 4,17 (m, 2H), 4,12 (m, 4H), 3,84 (br dt, $J \approx 5,5$ Hz, 2H), 3,39 (d, $J = 12,9$ Hz, 4H), 1,50 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,33 (s, 9H); RMN^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,7, 156,6, 153,3, 152,8, 151,3, 151,2, 133,5 (2C), 133,4 (2C), 129,4 (4C), 128,7 (4C), 128,2 (2C), 127,7 (2C), 126,0 (2C), 125,9 (2C), 119,4 (2C), 83,0 (2C), 79,4, 75,6, 75,2, 41,1, 40,9, 31,7 (2C), 31,6 (2C), 28,6 (3C), 28,5 (3C), 28,0 (3C); HRMS (ESI) m/z Cal. para $\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{Na}_1\text{O}_{10}$ (M+Na)⁺ 875,4207, encontrado 875,4196.

Ejemplo 32

Sal del ácido trifluoroacético de 25,27-bis(2-guanidinoetoxi)-26,28-dihidroxi calix[4]areno **36**. Según el procedimiento descrito para la preparación del derivado de calixareno **27**, diguanidina **34** (53,0 mg, 0,05 mmoles) se trató con una disolución (1,0 ml) de TFA (40%) y anisol (5%) en CH₂Cl₂. El tratamiento estándar y la purificación da la sal de calixareno **36**·2TFA (139,6 mg, 99%) como un sólido blanco (40,3 mg, 92%). RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,14 (d, J = 7,3 Hz, 4H), 6,79 (d, J = 7,3 Hz, 4H), 6,74 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 6,60 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 4,28 (d, J = 12,0 Hz, 4H), 4,18 (t, J = 4,9 Hz, 4H), 3,81 (t, J = 4,9 Hz, 4H), 3,47 (d, J = 13,0 Hz, 4H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 159,4 (2C), 153,8 (2C), 152,8 (2C), 134,3 (4C), 130,5 (4C), 130,1 (4C), 129,6 (4C), 126,7 (2C), 121,1 (2C), 75,6 (2C), 42,9 (2C), 32,0 (4C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₃₄H₃₉N₆O₄ (M+H)⁺ 595,3033, encontrado 595,2967.

10 Ejemplo 33

25,27-Bis[(etoxicarbonil)metoxi]-26,28-dihidroxi calix[4]areno **37**. Según el procedimiento descrito para la preparación del tetra-éster **2**, el calix[4]areno **13** (339,6 mg, 0,8 mmoles) en acetona (10 ml) se trató con K₂CO₃ (221,1 mg, 1,6 mmoles) y bromoacetato de etilo (0,35 ml, 3,2 mmoles). El tratamiento estándar y la cromatografía (3% de EtOAc en CH₂Cl₂) proporcionó el derivado diéster de calixareno **37** (254,5 mg, 53%). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,61 (s, 2H), 7,04 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,90 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,74 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 6,65 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 4,72 (s, 4H), 4,48 (d, J = 13,2 Hz, 4H), 4,33 (t, J = 7,1 Hz, 4H), 3,39 (d, J = 13,2 Hz, 4H), 1,35 (t, J = 7,1 Hz, 6H); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₃₆H₃₆Na₁O₈ (M+H)⁺ 619,2308, encontrado 619,2306.

Ejemplo 34

25,27-Bis[*N,N,N*-dimetil-2-aminoetil]carbamoilmetoxi]-26,28-dihidroxi calix[4]areno **38**. Según el procedimiento descrito para la preparación de la tetra-amina **3**, el diéster **37** (29,8 mg, 0,05 mmoles) en tolueno (0,2 ml) se trató con *N,N*-dimetiletilendiamina (0,11 ml, 1,0 mmoles) a 80°C durante 36 horas. Después de la purificación estándar, se obtuvo la diamina **38** (24,0 mg, 70%) como un sólido marrón claro. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7,14 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,93 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,73 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 4,62 (s, 4H), 4,23 (d, J = 13,0 Hz, 4H), 3,61 (t, J = 6,6 Hz, 4H), 3,51 (d, J = 13,0 Hz, 4H), 2,65 (t, J = 6,6 Hz, 4H), 2,29 (s, 12H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 170,6 (2C), 153,2 (2C), 152,4 (2C), 134,3 (4C), 130,6 (4C), 130,1 (4C), 128,9 (4C), 127,4 (2C), 121,4 (2C), 75,4 (2C), 59,2 (2C), 45,5 (4C), 37,7 (2C), 32,3 (4C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₄₀H₄₉N₄O₆ (M+H)⁺ 681,3652, encontrado 681,3628.

Ejemplo 35

25,27-Bis[*N*-(2-aminoetil)carbamoilmetoxi]-26,28-dihidroxi calix[4]areno **39**. El diéster **37** (29,8 mg, 0,05 mmoles) en tolueno (0,2 ml) se trató con *N*-Boc etilendiamina (320,2 mg, 2,0 mmoles) a 80°C durante 24 horas. Tras eliminar el componente volátil, el residuo se disolvió en éter. El precipitado se eliminó mediante centrifugación, y la disolución etérea se combinó y se concentró. El residuo se disolvió en una disolución de CH₂Cl₂ (0,6 ml) con 40% de TFA y 5% de anisol, y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras eliminar los componentes volátiles, el residuo se repartió entre agua y CH₂Cl₂. La fase acuosa se ajustó hasta pH = 10, y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂, y la diamina **39** (42,5 mg, 100%) se precipitó con éter y se recogió como un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9,00 (br t, J = 4,8 Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 7,10 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,97 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 6,83 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 6,75 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 4,60 (s, 4H), 4,18 (d, J = 13,2 Hz, 4H), 3,48 (m, 8H), 2,93 (t, J = 6,0 Hz, 4H), 1,82 (br s, 4H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168,7 (2C), 152,0 (2C), 151,2 (2C), 133,0 (4C), 129,9 (4C), 129,2 (4C), 127,8 (4C), 126,9 (2C), 120,9 (2C), 75,2 (2C), 42,7 (2C), 41,8 (2C), 31,8 (4C); HRMS (ESI) *m/z* Cal. para C₃₆H₄₁N₄O₆ (M+H)⁺ 625,3026, encontrado 625,2997.

Ejemplo 36:

Efectos antibacterianos y otros efectos de los miméticos peptídicos a base de calixareno

Parte experimental

Cepas bacterianas (no según la invención)

45 *Pseudomonas aeruginosa* tipo I es un aislado clínico de cepa lisa, serotipado usando el esquema de Homma et al., Japan. J. Exp. Med. 46, 329-336 (1976), y mantenido en el laboratorio mediante transferencia mensual en placas de agar sangre. J96, IA2, y H5 de *E. coli* son aislados clínicos uropatogénicos de cepa lisa mantenidos y proporcionados amablemente por J.R. Johnson y descritos en Johnson et al., J. Infect. Disease 173, 920-926 (1996) para J96 e IA2, y en Johnson et al., J. Infect. Disease 173, 746-749 (1996) para H5. J5 es una cepa rugosa de *E. coli* citada inicialmente por G.R. Siber y discutida en Warren et al., Infect. Immunity 55, 1668-1673 (1987), y es análoga a la cepa lisa 0111:B4 de *E. coli* usada en el kit de detección y cuantificación de endotoxina de LAL de BioWhittaker descrito más abajo. MN8 y MNHO grampositivos son dos aislados de *Staphylococcus aureus* de pacientes, que se proporcionaron amablemente por P.M. Schlievert y se describen en Bohach et al., Rev. Infect. Diseases 11, 75-82 (1989) para MNHO, y en Schlievert et al., J. Infect. Diseases 147, 236-242 (1983) para MN8. Todos los cultivos se

mantuvieron en placas de agar nutriente.

Ensayo bactericida (no según la invención)

A lo largo del ensayo se usaron disoluciones libres de pirógenos. Se obtuvieron bacterias en fase logarítmica transfiriendo un cultivo nocturno o raspando cristales de disoluciones madre de glicerol a -85°C de cultivos nocturnos. Las bacterias se lavaron y se resuspendieron en cloruro de sodio al 0,9%, con ajuste hasta una densidad óptica a 650 nm, que produce 3×10^8 CFU/ml. Las bacterias se diluyeron entonces 1:10 en tampón de citrato-fosfato 0,08 M, pH 7,0 (preparado mezclando ácido cítrico 0,08 M con fosfato sódico dibásico 0,08 M). Las bacterias (0,15 ml) se incubaron con el compuesto de ensayo en un volumen final de 1,0 ml de tampón. El ensayo se realizó en tubos de polipropileno de 17 x 100 en un agitador de baño de agua recíproco a 37°C durante 30 minutos. Después de esta incubación de 30 minutos (min.), se realizaron diluciones de 10 veces en cloruro de sodio al 0,9%. Las diluciones se realizaron hasta 10^{-4} , y se rayaron 20 μ l de cada disolución a lo largo de una placa de agar. Los organismos grampositivos se cultivaron en placas de agar nutriente que contienen 2% de agar, y los organismos gramnegativos se cultivaron en agar MacConkey (2%). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C, y se contaron a la mañana siguiente. La dilución que contiene 10-100 bacterias se contó, y el número se multiplicó por 50 para ajustar todos los recuentos al número de bacterias exterminadas por mililitro. Las concentraciones de compuesto se convirtieron en logaritmo de base diez, y se representaron gráficamente. La actividad bactericida se determinó mediante la respuesta frente a la dosis, en la que los valores LD50 se determinaron mediante los mejores ajustes de una curva sigmoideal a los datos de respuesta frente a la dosis.

Células, cultivos, y reactivos

Se cosecharon EC derivadas de vena umbilical humana (HUVEC) de cordones umbilicales humanos normales mediante perfusión con 0,125% de tripsina/EDTA como se describe en Groenewegen et al., J. Exp. Med. 164, 131-143 (1986). Para la determinación del fenotipo de EC quiescente, las ECs aisladas se fijaron inmediatamente en 1% de paraformaldehído. Se aislaron ECs microvasculares (MVECs) humanas. Las ECs se cultivaron en matraces de cultivo tisular revestidos con fibronectina en medio de cultivo (RPMI-1640 con 20% de suero humano (HS), suplementado con 2 mM de glutamina y 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin).

Ensayo de proliferación de ECs

La proliferación de ECs se midió usando un ensayo de incorporación de [3 H]timidina. Las ECs se sembraron a 5000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano, y se hicieron crecer durante 3 días, en ausencia o en presencia de reguladores, en medio de cultivo. Durante las últimas 6 horas del ensayo, el cultivo se pulsó con 0,5 μ Ci de [metil- 3 H]timidina/pocillo.

Estudios de modelos tumorales

Se usaron ratones atímicos hembra (nu/nu, 5-6 semanas). Estos ratones se adquirieron del National Cancer Institute, y se dejó que se aclimatasen a las condiciones locales durante al menos una semana. A los animales se les dio agua y pienso estándar *a voluntad*, y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de University of Minnesota Research Animal Resources. Los ratones se distribuyeron al azar y se dividieron en tres grupos: 1) seroalbúmina humana (10 mg/kg/día), 2) β pep-25 (10 mg/kg/día), y 3) agente mimético peptídico (5 mg o 10 mg/kg/día). Los compuestos de ensayo se diluyeron en DMSO y se administraron usando minibombas osmóticas (Durect, Cupertino, CA). Células de carcinoma de ovario humano MA148 que crecen exponencialmente, proporcionadas amablemente por Prof. Ramakrishnan (R.P. Dings et al., Cancer Res., 63, 382-385 (2003)), o células de melanoma de ratón B16, se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY). Este medio se suplementó con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomycin (Cellgro, Mediatech, Washington, DC) a 37°C y 5% de CO₂. Entonces se inyectaron subcutáneamente cien microlitros (100 μ l) de esta suspensión de células tumorales (2×10^7 células/ml) en el flanco derecho de cada ratón. Las bombas se implantaron en el flanco izquierdo de los ratones, para la administración subcutánea de compuesto durante un intervalo de tiempo de 28 días de tratamiento.

Se usaron dos variantes de este modelo: prevención e intervención. Para la variante de prevención, el tratamiento se inició en el momento de la inoculación con las células MA148. Para la variante de intervención, se dejó que los tumores crecieran hasta un tamaño medio de 50 mm³ (habitualmente día 7 después de la inoculación) antes de que se iniciase el tratamiento. Con cualquiera de las variantes, los animales se distribuyeron al azar antes del inicio del tratamiento. El tratamiento se administró vía minibombas osmóticas (Durect, Cupertino, CA), que se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de los ratones. Se formularon disoluciones concentradas de β pep-25 o análogos de DBF, de manera que se pudiese cubrir el período de tratamiento de 28 días mediante implantación de una única bomba. En cada estudio, a los grupos de animales de control se les administró PBS o PBS que contiene seroalbúmina humana.

Inmunohistoquímica

Tumores de tamaño similar sin necrosis extendida aparente se embebieron en medio de congelación de tejido (Miles Inc.; Elkart, IN) y se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido. La preparación y los procedimientos se llevaron a cabo como se describe previamente (17). Las muestras se incubaron subsiguientemente en una dilución 1:50 con anticuerpo monoclonal anti-CD-31 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (PECAM-1) (Pharmingen; San Diego, CA), o un anticuerpo anti-PCNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Ab-1) (Oncogene; San Diego, CA), para la tinción para determinar la densidad de los microvasos (MVD) o la proliferación, respectivamente. Al mismo tiempo, las secciones también se tiñeron para determinar la muerte celular usando un ensayo de TUNEL (marcado del extremo de muesca con d-UTP mediado por desoxirribonucleotidil transferasa terminal) llevado a cabo según las instrucciones del fabricante (kit de detección de muerte celular *in situ*, fluoresceína; TUNEL, Roche). La densidad de los vasos y la arquitectura se cuantificaron como se describe previamente [Griffioen et al., Biochemical Journal 354, 233-242 (2001)]. Para la infiltración leucocitaria, se usó un procedimiento similar con anticuerpos anti-CD45 y anti-CD8.

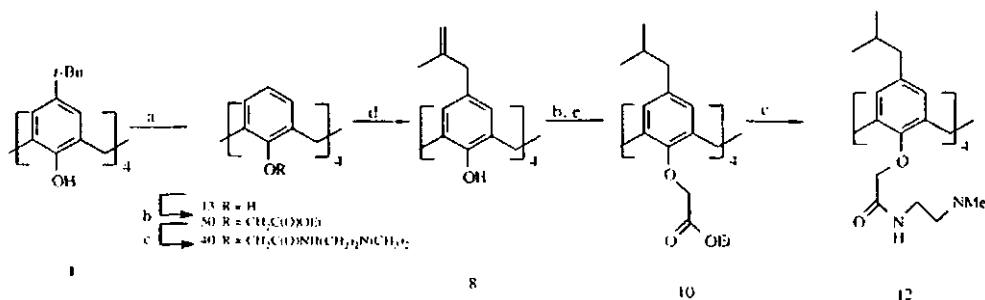
Resultados

Actualmente, se han sintetizado aproximadamente 12 miméticos peptídicos a base de calixareno, y las estructuras químicas de algunos de estos se ilustran en la Figura 2. Las actividades *in vitro* se evaluaron usando los ensayos bactericidas y de proliferación de células endoteliales descritos anteriormente. A partir de esta pequeña librería, se encontró que dos de estos compuestos tienen una actividad bactericida razonablemente buena (Compuesto 3 y Compuesto 11a) en el intervalo micromolar (Tabla 1), y se encontró que otros dos diferentes presentan excelente actividad antiangiogénica (Compuesto 27 y KM0118 (40)) (Figura 3 y Tabla 1), que es alrededor de 5 a 10 veces mejor que β pep-25.

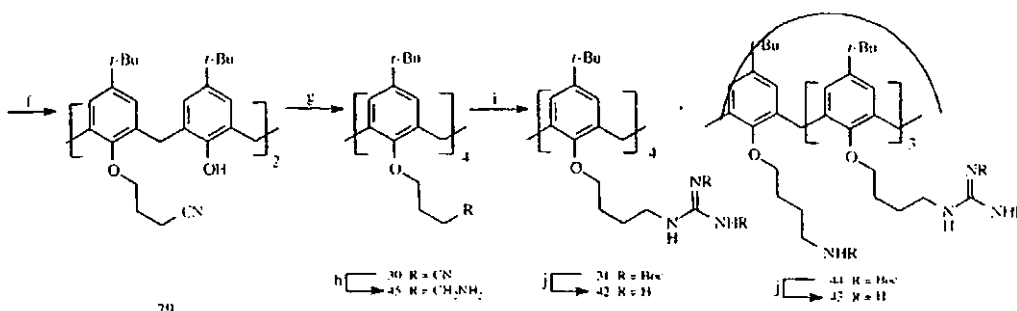
La efectividad de estos miméticos peptídicos como agentes que potencian la infiltración de leucocitos *in vivo* se ejemplifica por los efectos de KM0118 (40) y Compuesto 27 sobre la infiltración de leucocitos en tumores de ratones que poseen tumores durante estudios descritos anteriormente. Los leucocitos se pueden identificar (Figura 4) en secciones transversales de tumores teñidas con anticuerpos anti-CD45 (general para leucocitos) y anti-CD8 (específico para células T auxiliares, una subpoblación de leucocitos) marcados fluorescentemente. Estos agentes son claramente más efectivos incrementando la infiltración leucocitaria en tumores que β pep-25 (es decir, "Anginex") (Figura 4).

Ejemplos 37-47: Preparación de compuestos adicionales

Otros derivados calixarénicos ejemplares se pueden obtener según los siguientes esquemas y ejemplos.

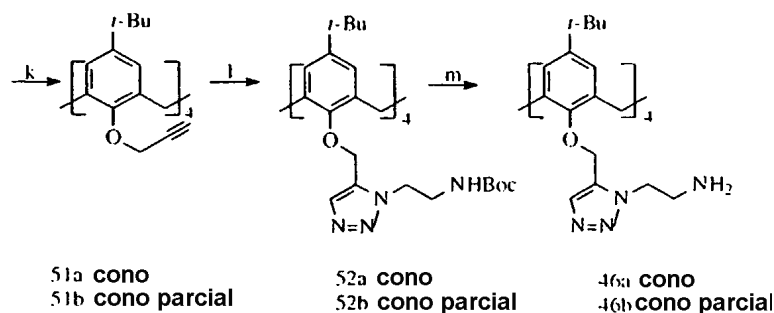


Esquema 7a



Esquema 7b

30



Esquema 7c

Ejemplo 37

Síntesis de materiales de partida

- 5 El calix[4]areno **13** (Gutsche et al., J. Am. Chem. Soc. 104, 2652-2653 (1982)), el calix[4]arenotetraacetato de tetraetilo **50** (Arnaud-Neu, et al. J. Am. Chem. Soc. 111, 8681-8691 (1989)) y la calix[4]arenotetraamida **40** (Bryant, Jr. et al, Angew. Chem. Int. Ed. 39, 1641-1643 (2000)) se prepararon según los procedimientos de la bibliografía.

Ejemplo 38

- 10 Tetra-amina **45**. Según el procedimiento de la bibliografía (Wu et al., Angew. Chem. Int. Ed. 43, 3928-3932 (2004)), se añadió NaBH₄ (227,0 mg, 6,0 mmoles) por lotes a la disolución de tetranitrilo (137,5 mg, 0,15 mmoles) y CoCl₂ (155,8 mg, 1,2 mmoles) en metanol (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 26 horas, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂. Se añadió HCl 3N (~30 ml) y se agitó vigorosamente hasta que el precipitado negro se disolvió completamente. La capa acuosa se ajustó hasta pH = 10 con NH₄OH concentrado, y después se extrajo con CH₂Cl₂. La fase de CH₂Cl₂ combinada se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), y se concentró para proporcionar la tetraamina **45** bruta conocida (140,0 mg, 100%) como un sólido blanquecino. Sin purificación posterior, este sólido se llevó a la siguiente etapa. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6,77 (s, 8H), 4,37 (d, J = 12,5 Hz, 4H), 3,87 (t, J = 7,7 Hz, 8H), 3,12 (d, J = 12,5 Hz, 4H), 2,79 (t, J = 7,4 Hz, 8H), 2,02 (tt, J ≈ 7,5, 7,5 Hz, 8H), 1,55 (tt, J = 7,5, 7,5 Hz, 8H), 1,07 (s, 36 H).

Ejemplo 39

- 20 Tetra-guanidina **31** protegida con Boc y tri-guanidina-mono-amina **44** protegida con Boc. A una disolución de la tetra-amina **45** (140,0 mg, 0,15 mmoles) se añadió secuencialmente 1,3-bis(*terc*-buloxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (191,6 mg, 0,66 mmoles), HgCl₂ (179,2 mg, 0,66 mmoles), y Et₃N (0,26 ml, 2,0 mmoles). Después de agitar durante 15 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el filtrado se repartió entre CH₂Cl₂ y una disolución acuosa de NaHCO₃. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación con MPLC (15% de EtOAc en hexanos) proporcionó la tetra-guanidina **31** protegida con Boc (101,9 mg, 36%) y la tri-guanidina-mono-amina **44** protegida con Boc (35,4 mg, 13%). Para **31**: RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 11,51 (s, 4H), 8,38 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 6,75 (s, 8H), 4,33 (d, J = 12,6 Hz, 4H), 3,90 (t, J = 7,6 Hz, 8H), 3,48 (td, J = 7,3, 5,0 Hz, 8H), 3,12 (d, J = 12,6 Hz, 4H), 2,00 (m, 8H), 1,68 (m, 8H), 1,48⁺ (s, 36H), 1,48⁻ (s, 36H), 1,07 (s, 36H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 163,8 (4C), 156,3 (4C), 153,5 (4C), 153,4 (4C), 144,6 (4C), 133,9 (8C), 125,1 (8C), 83,0 (4C), 79,2 (4C), 74,6 (4C), 41,1 (4C), 34,0 (4C), 31,6 (12C), 31,4 (4C), 28,5 (12C), 28,3 (12C), 27,7 (4C), 25,9 (4C); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₁₀₄H₁₆₅N₁₂NaO₂₀ (M+H+Na)²⁺ 962,6080, encontrado 962,6090, para **44**: RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 11,52 (s, 3H), 8,39 (m, 3H), 6,79 (s, 4H), 6,74 (s, 4H), 5,25 (m, 1H), 4,34 (d, J = 12,5 Hz, 2H), 4,33 (d, J = 12,5 Hz, 2H), 3,88 (m, 8H), 3,48 (m, 6H), 3,21 (m, 2H), 3,12⁺ (d, J = 12,5 Hz, 2H), 3,12⁻ (d, J = 12,5 Hz, 2H), 2,01 (m, 8H), 1,69 (m, 8H), 1,48 (s, 54 H), 1,41 (s, 9H), 1,09 (s, 18H), 1,05 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) 163,8 (3C), 156,3 (4C), 153,7 (1C), 153,4⁺ (4C), 153,4⁻ (2C), 144,6⁺ (1C), 144,6 (1C), 144,5 (2C), 134,0 (4C), 133,8 (2C), 133,7 (2C), 125,1 (8C), 83,1 (4C), 79,3 (3C), 74,7 (4C), 41,2 (1C), 41,1 (3C), 34,0⁺ (2C), 34,0⁻ (2C), 31,7 (6C), 31,6 (6C), 31,5 (2C), 31,4 (2C), 28,6 (3C), 28,5 (9C), 28,3 (9C), 27,8 (4C), 26,0 (3C), 25,9 (1C); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₉₈H₁₅₄N₁₀O₁₈Na₂ (M+2Na)²⁺ 902,5619, encontrado 902,5723.

Ejemplo 40

- 40 Sal del ácido trifluoroacético de 5,11,17,23-tetra-*terc*-butil-25,26,27,28-tetraquis(4-guanidinobutoxi) calix[4]areno **42**. La tetra-guanidina **31** (101,9 mg, 0,05 mmoles) se disolvió en una disolución de CH₂Cl₂ con 40% de TFA y 5% de anisol (1,0 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Los componentes volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se repartió entre CH₂Cl₂ y agua, y la fase acuosa se ajustó a pH = 8 con disolución

acuosa de NaHCO₃. La fase orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), y se concentró para dar la sal de calixareno **42**·TFA (104,5 mg, 98% suponiendo una sal de octafluoroacetato) como un sólido blanquecino. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 6,81 (s, 8H), 4,42 (d, *J* = 12,8 Hz, 4H), 3,96 (t, *J* = 7,2 Hz, 8H), 3,29 (m, 8H), 3,15 (d, *J* = 12,8 Hz, 4H), 2,08 (m, 8H), 1,79 (m, 8H), 1,08 (s, 36H); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₆₄H₁₀₂N₁₂O₄ (M+2H)²⁺ 551,4073, encontrado 551,4107.

Ejemplo 41

Sal del ácido trifluoroacético de 5,11,17,23-tetra-*terc*-butil-25,26,27-tris(4-guanidinobutiroxi)-28-(4-aminobutiroxi) calix[4]areno **43**. Según el procedimiento descrito para la tetra-guanidina **42**, la mono-amino-tri-guanidina **44** protegida con Boc (34,5 mg, 0,02 mmoles) en disolución en CH₂Cl₂ de anisol al 5% (0,6 ml) se trató con TFA (0,4 ml) a temperatura ambiente. El tratamiento estándar y la purificación dieron lugar a la sal de calixareno **43**·TFA (30,4 mg, 82% suponiendo una sal de heptafluoroacetato). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 6,97 (s, 4H), 6,67 (s, 4H), 4,42⁺ (d, *J* = 12,4 Hz, 2H), 4,42⁻ (d, *J* = 12,4 Hz, 2H), 4,07 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,91 (m, 6H), 3,28 (m, 8H), 3,15 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H), 3,13 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,02 (m, 6H), 1,77 (m, 6H), 1,66 (m, 2H), 1,20⁺ (s, 9H), 1,20⁻ (s, 9H), 0,97 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ y CD₃OD) 157,4 (3C), 153,5 (2C), 153,3 (1C), 153,2 (1C), 144,6⁺ (3C), 144,6⁻ (1C), 133,7⁺ (2C), 133,7⁻ (2C), 133,4 (4C), 125,1 (4C), 125,0 (4C), 74,6 (4C), 41,8 (1C), 41,5 (3C), 33,8⁺ (2C), 33,8⁻ (2C), 31,4 (6C), 31,4 (6C), 31,2 (4C), 27,8⁺ (2C), 27,8⁻ (2C), 25,9 (4C); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₆₃H₁₀₀N₁₀O₄ (M+2H)²⁺ 530,3964, encontrado 530,4001.

Ejemplo 42

O-Propargil-4-*terc*-butil calix[4]areno **51a** y **51b**. Una suspensión de 4-*terc*-butil calix[4]areno (649,0 mg, 1,0 mmoles) en THF y DMF (15 ml, 10:1) se trató con NaH (192,0 mg, 8,0 mmoles) y bromuro de propargilo (80% en tolueno, 2,23 ml, 20 mmoles). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 18 horas, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Tras filtrar a través de Celite, el filtrado se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), y se concentró. El residuo se purificó primero mediante cromatografía ultrarrápida (3% de EtOAc en hexanos) para dar el confórmero de cono **51a** (255,9 mg). Los componentes con confórmero de cono **51a**, y el análogo de cono parcial **51b** como una mezcla se purificaron adicionalmente mediante MPLC para dar más compuesto **51a** (146,3 mg, 50% en total) y compuesto **51b** (297,3 mg, 37%). Para **51a**, RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,79 (s, 8H), 4,80 (d, *J* = 2,3 Hz, 8H), 4,60 (d, *J* = 12,9 Hz, 4H), 3,16 (d, *J* = 12,9 Hz, 4H), 2,47 (t, *J* = 2,3 Hz, 4H), 1,07 (s, 36H); RMN ¹³C (75 MHz) δ 152,6 (4C), 145,7 (4C), 134,5 (8C), 125,2 (8C), 81,4 (4C), 74,5 (4C), 61,2 (4C), 34,1 (4C), 32,6 (4C), 31,6 (12C); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₅₆H₆₄Na₁O₄ (M+Na)⁺ 823,4702, encontrado 823,4725, para **51b**, RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,43 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 6,99 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 6,52 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 4,48 (dd, *J* = 15,3, 2,5 Hz, 2H), 4,44 (dd, *J* = 15,3, 2,5 Hz, 2H), 4,35 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 4,31 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H), 4,24 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 3,85 (d, *J* = 14,0 Hz, 2H), 3,73 (d, *J* = 14,0 Hz, 2H), 3,08 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H), 2,50 (t, *J* = 2,3, 2H), 2,44 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 2,24 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,33 (s, 9H), 1,04 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz) δ 154,3 (1C), 153,3 (2C), 151,8 (1C), 146,1 (1C), 145,2 (2C), 144,3 (1C), 136,5 (2C), 133,1 (2C), 132,5 (2C), 132,1 (2C), 128,8 (2C), 126,3 (2C), 125,7 (2C), 125,6 (2C), 82,2 (1C), 81,2 (2C), 80,9 (1C), 74,7 (2C), 74,5 (1C), 73,9 (1C), 61,0 (2C), 59,3 (1C), 58,8 (1C), 37,9 (2C), 34,3 (2C), 34,0 (2C), 32,6 (2C), 32,0 (3C), 31,8 (3C), 31,6 (6C).

Ejemplo 43

Derivado 1,2,3-triazólico del calix[4]areno **52a**. Se añadió agua (0,4 ml) a la disolución del alquino **52a** (80,1 mg, 0,1 mmoles) y *N*-Boc-2-azido-etilamina (149,0 mg, 0,8 mmoles) en *t*-BuOH (0,4 ml) y THF (0,2 ml). La mezcla de reacción se puso turbia, y después se añadió ácido ascórbico (7,0 mg, 0,04 mmoles), NaOAc (6,6 mg, 0,08 mmoles), y CuSO₄·5H₂O (5,0 mg, 0,02 mmoles) a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 36 h. Se añadió una disolución acuosa de NH₄Cl (3 ml) para parar la reacción. Después de agitar durante 5 min., la mezcla de reacción se extrajo mediante CH₂Cl₂. La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (4% de MeOH en CH₂Cl₂) para dar el tetra-triazol **52a** (75,7 mg, 50%) como un sólido amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 55°C) δ 7,81 (br s, 4H), 6,77 (s, 8H), 5,68 (br s, 4H), 5,00 (br s, 8H), 4,45 (br m, 8H), 4,32 (d, *J* = 12,8 Hz, 4H), 3,55 (br m, 8H), 3,09 (d, *J* = 12,8 Hz, 4H), 1,42 (s, 36H), 1,08 (br s, 36H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 156,3 (4C), 152,6 (4C), 145,4 (4C), 144,7 (4C), 134,0 (8C), 125,3 (8C), 124,8 (4C), 79,7 (4C), 67,2 (4C), 49,9 (4C), 40,9 (4C), 34,0 (4C), 31,5 (16C), 28,6 (12C); HRMS (ESI) *m/z* calc. para C₈₄H₁₂₀N₁₆Na₂O₁₂ (M+2Na)²⁺ 795,4534, encontrado 795,4567.

Ejemplo 44

Derivado 1,2,3-triazólico del calix[4]areno **52b**. Según el procedimiento descrito para el tetra-triazol **52b**, se trataron el alquino **52a** (58,6 mg, 0,07 mmoles) y *N*-Boc-2-azido-etilamina (114,3 mg, 0,58 mmoles) en *t*BuOH (0,3 ml), THF (0,2 ml), y agua (0,4 ml) con ácido ascórbico (5,1 mg, 0,03 mmoles), NaOAc (4,8 mg, 0,06 mmoles), y CuSO₄·5H₂O (3,6 mg, 0,01 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 36 h. El tratamiento estándar y la purificación como se describen para el tetra-triazol **52a** dieron el tetra-triazol **52b** (80,0 mg, 88%) en conformación de cono parcial como un sólido amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, CD₃Cl) 8,04 (br s, 2H), 7,49 (br s, 2H), 7,13 (s, 2H), 6,92 (s, 2H), 6,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 6,42 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 5,19 (br s, 2H), 4,99⁺ (d, *J* = 11,0 Hz, 2H), 4,99⁻ (br s, 1H), 4,93 (br

s, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,74 (d, $J = 11,0$ Hz, 2H), 4,73 (s, 2H), 4,44 (m, 6H), 4,35 (br m, 2H), 4,09 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 3,79 (d, $J = 13,8$ Hz, 2H), 3,72 (d, $J = 13,8$ Hz, 2H), 3,67 (br m, 2H), 3,59 (m, 4H), 3,35 (br m, 2H), 2,95 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 1,45⁺ (s, 9H), 1,45⁻ (s, 9H), 1,43 (s, 18H), 1,25 (s, 9H), 0,95 (s, 9H), 0,92 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz) δ 156,1 (1C), 156,0 (3C), 154,3 (1C), 153,4 (2C), 151,0 (1C), 145,3 (1C), 144,7 (3C), 144,6 (2C), 144,2 (1C), 143,4 (1C), 136,6 (2C), 133,0 (2C), 132,2 (2C), 132,1 (2C), 128,6 (2C), 126,2 (2C), 125,3 (3C), 125,0 (1C), 124,8 (2C), 124,2 (2C), 80,2 (1C), 80,0 (2C), 79,9 (1C), 67,0 (2C), 65,1 (1C), 62,3 (1C), 50,2 (3C), 49,9 (1C), 41,1 (1C), 40,6 (2C), 40,5 (1C), 37,4 (2C), 34,2 (1C), 33,8 (2C), 33,7 (1C), 32,2 (2C), 31,7 (3C), 31,4 (6C), 31,3 (3C), 28,6 (3C), 28,5 (9C); HRMS (ESI) m/z calc. para C₈₄H₁₂₀N₁₆Na₂O₁₂ (M+2Na)²⁺ 795,4534, encontrado 795,4547.

Ejemplo 45

- 10 Derivado aminoetil triazólico del calix[4]areno **46a**. El tetra-triazol **52a** (30,9 mg, 0,02 mmoles) se disolvió en una disolución de CH₂Cl₂ con 5% de anisol (0,6 ml), y después se enfrió hasta 0°C. Se añadió gota a gota TFA (0,4 ml), y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo se trituró en éter para dar la sal de aminoetil triazol **46a**-TFA (24,8 mg, 77% suponiendo un tetratrilfluoroacetato) como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) 8,08 (s, 4H), 6,83 (s, 8H), 5,05 (s, 8H), 4,81 (t, $J = 6,0$ Hz, 8H), 4,15 (d, $J = 12,7$ Hz, 4H), 3,58 (t, $J = 6,0$ Hz, 8H), 2,97 (d, $J = 12,7$ Hz, 4H), 1,09 (s, 36H); RMN ¹³C (75 MHz) δ 153,7 (4C), 146,7 (4C), 146,3 (4C), 135,4 (8C), 127,0 (4C), 126,6 (8C), 67,8 (4C), 48,6 (4C), 40,5 (4C), 35,0 (4C), 32,7 (4C), 32,1 (12C); HRMS (ESI) m/z calc. para C₆₄H₈₉N₁₆O₄ (M+H)⁺ 1145,7247, encontrado 1145,7275.

Ejemplo 46

- 20 Derivado aminoetil triazólico del calix[4]areno **46b**. Según el procedimiento descrito para el aminoetil triazol **46a**, se trató el tetra-triazol **52b** (50,8 mg, 0,03 mmoles) en una disolución de CH₂Cl₂ con 5% de anisol (0,6 ml) con TFA (0,4 ml). Después de 3 horas, la mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo se trituró en éter para dar la sal de aminoetil triazol **46b**-TFA (55,8 mg, 100% suponiendo un tetratrilfluoroacetato) en conformación de cono parcial como un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) 8,28 (s, 2H), 8,22 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,18 (s, 2H), 6,95 (s, 2H), 6,94 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 6,42 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 4,93 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H), 4,90 (s, 4H), 4,84 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H), 4,74 (m, 8H), 3,96 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), 3,81 (br s, 4H), 3,54 (m, 8H), 2,85 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), 1,27 (s, 9H), 1,01 (s, 9H), 0,91 (s, 18H); RMN ¹³C (75 MHz) δ 156,0 (1C), 154,7 (2C), 152,3 (1C), 146,6 (1C), 146,1 (2C), 146,0 (2C), 145,8 (2C), 144,5 (1C), 137,7 (2C), 134,3 (2C), 133,4 (4C), 129,8 (2C), 127,8 (2C), 127,5 (1C), 127,2 (2C), 127,1 (1C), 126,8 (2C), 126,4 (2C), 67,5 (2C), 65,9 (1C), 63,5 (1C), 48,9 (1C), 48,4 (2C), 48,2 (1C), 40,4 (4C), 38,0 (2C), 35,0 (1C), 34,8⁺ (2C), 34,8⁻ (1C), 33,2 (2C), 32,2 (3C), 32,1 (6C), 32,0 (3C); HRMS (ESI) m/z calc. para C₆₄H₉₀N₁₆O₄ (M+2H)²⁺ 573,3660, encontrado 573,3675.

Ejemplo 47:

Datos de RMN procedentes de la caracterización espectroscópica de derivados de calixareno adicionales

- 35 Tetra-amina **41**: RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,94 (br t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 7,33 (br t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 6,73 (s, 4H), 6,17 (s, 4H), 5,65 (ddt, $J = 17,1, 10,5, 6,8$ Hz, 2H), 4,91 (dd, $J = 10,5, 1,4$ Hz, 2H), 4,85 (dd, $J = 17,1, 1,4$ Hz, 2H), 4,80 (s, 2H), 4,65 (s, 2H), 4,61 (s, 4H), 4,45 (d, $J = 13,5$ Hz, 4H), 4,33 (s, 4H), 3,50 (dt, $J \approx 6, 6$ Hz, 4H), 3,37 (dt, $J \approx 6,6$ Hz, 4H), 3,17 (d, $J = 14,7$ Hz, 4H), 3,16 (s, 4H), 2,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H), 2,52 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H), 2,40 (t, $J \approx 6,4$ Hz, 4H), 2,24 (s, 12H), 2,19 (s, 12H), 1,68 (s, 6H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 170,2 (2C), 169,5 (2C), 154,9 (2C), 153,4 (2C), 145,9 (2C), 137,8 (2C), 134,9 (4C), 134,4 (2C), 134,3 (2C), 132,9 (4C), 130,1 (4C), 128,5 (4C), 115,4 (2C), 111,6 (2C), 74,7 (2C), 74,2 (2C), 58,3 (2C), 58,1 (2C), 45,5 (4C), 45,4 (4C), 44,1 (2C), 39,6 (2C), 37,1 (2C), 37,1 (2C), 31,3 (4C), 22,3 (2C); HRMS (ESI) m/z calc. para C₆₆H₉₃N₈O₈ (M+H)⁺ 1125,7116, encontrado 1125,7213.

- 45 5,17-Di-(hidroxibonil)etil-25,27-di-(3-metilbutoxi)-26,28-dihidroxicalex[4]areno **47**: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 6,96 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H), 6,95 (s, 4H), 6,75 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,27 (d, $J = 13,0$ Hz, 4H), 4,01 (t, $J = 6,7$ Hz, 4H), 3,37 (d, $J = 13,0, 4$ Hz), 2,77 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,52 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,18 (tqq, $J \approx 7,7, 7$ Hz, 2H), 1,97 (dt, $J \approx 7,7$ Hz, 4H), 1,11 (d, $J = 6,6$ Hz, 12H); RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 177,3 (2C), 153,6 (2C), 152,7 (2C), 135,1 (4C), 132,7 (2C), 130,1 (4C), 129,6 (4C), 129,5 (4C), 126,3 (2C), 76,5 (2C), 40,3 (2C), 37,5 (2C), 32,3 (4C), 31,5 (2C), 26,1 (2C), 23,4 (4C); HRMS (ESI) m/z calc. para C₄₄H₅₁O₈ (M-H)⁻ 707,3589, encontrado 707,3568.

- 50 Ácido di-fosfónico **48**: RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 6,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 4H), 6,93 (s, 4H), 6,76 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 4,29 (d, $J = 12,6$ Hz, 4H), 4,03 (t, $J = 6,9$ Hz, 4H), 3,38 (d, $J = 12,6$ Hz, 4H), 2,57 (t, $J = 7,0$ Hz, 4H), 2,19 (tqq, $J \approx 7, 6, 6$ Hz, 2H), 1,98 (dt, $J \approx 7, 7$ Hz, 4H), 1,84 (nfom, 4H), 1,61 (nfom incluyendo JPH = 18,0 Hz, 4H), 1,12 (d, $J = 6,5$ Hz, 12H); RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 153,4 (2C), 152,4 (2C), 135,0 (4C), 133,1 (2C), 129,9 (4C), 129,6 (4C), 129,4 (4C), 126,2 (2C), 76,4 (2C), 40,1 (2C), 36,6 (d, JCP = 17,1 Hz, 2C), 32,2 (6C), 27,3 (d, JCP = 137,9 Hz, 2C), 26,0 (2C), 23,4 (4C); ³¹P (121 MHz, CD₃OD) δ 31,0; HRMS (ESI) m/z calc. Para C₄₄H₅₆O₁₀P₂ (M-2H)²⁻ 403,1680, encontrado 403,1682.

- 55 Bis-sulfonato **49**: RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 6,96 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H), 6,95 (s, 4H), 6,76 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,27

(d, $J = 12,8$ Hz, 4H), 4,02 (t, $J = 6,8$ Hz, 4H), 3,98 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H), 3,36 (d, $J = 12,8$ Hz, 4H), 2,58 (l, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,18 (tq, $J \approx 7, 6, 6$ Hz, 2H), 1,97 (td, $J \approx 7, 7$ Hz, 4H), 1,89 (tt, $J \approx 7, 6$ Hz, 4H), 1,11 (d, $J = 6,2$ Hz, 12H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 153,6 (2C), 152,5 (2C), 135,2 (4C), 133,4 (2C), 130,1 (4C), 129,8 (4C), 129,5 (4C), 126,3 (2C), 76,4 (2C), 68,5 (2C), 40,4 (2C), 32,8 (2C), 32,3 (4C), 32,2 (2C), 26,1 (2C), 23,5 (4C); HRMS (ESI) m/z calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{O}_{12}\text{S}_2$ (M-2Na) $^{2-}$ 419,1534, encontrado 419,1524.

Ejemplo 48:

Efectos antitumorales y otros efectos de miméticos peptídicos a base de calixareno

Este ejemplo demuestra que los compuestos no peptídicos de andamiaje calixarénico, que capturan la topología de superficie anfipática común a la unión de LPS bactericida, son biológicamente activos *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que los miembros de la librería de compuestos preparados neutralizan LPS de múltiples especies de bacterias gramnegativas, y promueven la supervivencia de ratones expuestos a LPS, e inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral en ratones.

Parte experimental

Síntesis peptídica

El péptido β pep-25 se sintetizó usando un sintetizador en fase sólida de péptidos Milligen/Biosearch 9600, usando química de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), y se purificó como se dio a conocer previamente (Mayo et al., Journal of Biological Chemistry 278, 45746-52 (2003)). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se confirmaron mediante secuenciación N-terminal y espectrometría de masas.

Ensayo de neutralización de LPS (no según la invención)

La capacidad de los compuestos para neutralizar endotoxina se detectó *in vitro* usando el kit cromogénico QCL-1000 de BioWhittaker, Inc. (Walkersville, MD), y como se describe en su protocolo. Este ensayo de lisado de amebocito de *Limulus* (LAL) es cuantitativo para endotoxina bacteriana gramnegativa (lipopolisacárido, LPS). En este ensayo, los compuestos que son activos inhiben la activación mediada por LPS de una proenzima cuya forma activa liberaría p-nitroanilina (pNA) a partir de un sustrato sintético incoloro (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA) (SEC ID NO: 3), produciendo un color amarillo (pNA) cuya absorción se monitoriza espectrofotométricamente a 405-410 nm. La velocidad inicial de activación enzimática es proporcional a la concentración de endotoxina presente.

Se usaron variantes de LPS procedentes de seis bacterias gramnegativas: serotipos 0111:B4 (Combrex, Walkersville, MD) y 055:B5 (Sigma, St. Louis, MO) de *E. coli*; *Klebsiella pneumoniae* (List Biologics, San José, CA); *Pseudomonas aeruginosa* (List Biologics, San José, CA); *Salmonella typhimurium* (List Biologics, San José, CA), y *Serratia marcescens* (List Biologics, San José, CA). La concentración de compuesto requerida para neutralizar una LPS dada, y por lo tanto para inhibir el lisado de amebocito de *Limulus* conducido por 0,04 unidades de cualquier LPS dado, se determinó mediante ajuste de curvas de respuesta frente a la dosis usando una función sigmoidal estándar para determinar el valor de IC_{50} para cada compuesto topomimético. Las 0,04 unidades corresponden a 0,01 ng de LPS del serotipo 055:B5 de *E. coli*, 0,01 ng de LPS del serotipo 0111:B4 de *E. coli*, 0,003 ng de LPS de *K. pneumoniae*, 0,01 ng LPS de *P. aeruginosa*, 0,03 ng de LPS de *S. typhimurium*, y 0,03 ng de LPS de *S. marcescens*.

En tres estudios separados, estos compuestos se ensayaron frente a LPS derivado del serotipo 0111:B4 de *E. coli*, LPS de serotipo 055:B5 de *E. coli*, y de *Salmonella*. Los compuestos (en una concentración final de 2% de DMSO v/v) se mezclaron primero individualmente con LPS, y se incubaron durante 30 minutos antes de la inyección i.p. en ratones C57/BL6 ($n = 4-8$ /grupo). Los ratones del control se trataron con DMSO (2% v/v) solo. Cada ratón recibió una dosis letal de LPS, con o sin uno de los compuestos.

Estudios de endotoxemia en ratones (no según la invención)

Se inyectaron i.p. a ratones macho negros C57 con una disolución que contenía una dosis letal de LPS [600 μg de LPS de 055:B5 de *E. coli* y de *Salmonella*, y 500 μg de LPS de 011:B4 de *E. coli*] y 1,25 mg del compuesto topomimético (una dosis de 50 mg/kg) (Rifkind, D. J. Bacteriol 93, 1463-4 (1967)). A los ratones se les proporcionó comida y agua a voluntad como es costumbre, y se monitorizaron durante varios días. Cuando se observó que los ratones estaban sufriendo y la muerte era inminente, los animales se sacrificaron; en algunos casos, los ratones murieron durante la noche y fueron encontrados muertos a la mañana siguiente. Los datos se representan gráficamente como el número de ratones supervivientes frente al tiempo en horas. Se llevó a cabo un análisis estadístico sobre la cantidad media de tiempo de supervivencia por grupo, con un máximo de 120 horas (ratones supervivientes), usando la prueba de la t de Student.

Proliferación celular

La proliferación de EC se midió usando un ensayo de incorporación de [³H]-timidina. La proliferación de cultivos de ECs vasculares umbilicales humanas (HUVEC) estimuladas con bFGF (10 ng/ml) se midió mediante cuantificación de la incorporación de ³H-timidina. La proliferación se expresó como recuentos medios por minuto (cpm) de cultivos cuádruplicados en tres experimentos independientes (\pm SEM). Las ECs se sembraron a 5000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano, y se hicieron crecer durante 3 días en ausencia o presencia de reguladores, en medio de cultivo. Durante las últimas 6 horas del ensayo, el cultivo se pulsó con 0,5 μ Ci de [metil-³H]-timidina/pocillo. Las ECs derivadas de vena umbilical humana (HUVEC) se cosecharon de cordones umbilicales humanos normales mediante perfusión con 0,125% de tripsina/EDTA. Las HUVECs cosechadas se cultivaron en matraces de cultivo tisular revestidos con gelatina, y se subcultivaron 1:3 una vez a la semana en medio de cultivo (RPMI-1640 con 20% de suero humano (HS), suplementado con 2 mM de glutamina y 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin). El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la *t* de Student.

Migración de células endoteliales

La migración de ECs se midió en el ensayo de curación de lesiones. Se cultivaron HUVEC por triplicado en un revestimiento de fibronectina de 1 mg/ml en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Las células se hicieron crecer durante 3 días hasta confluencia. Cuando fueron confluentes, se realizó una lesión en el pocillo, usando una pipeta de vidrio roma. El medio se sustituyó por medio que contiene 10 ng/ml de bFGF con o sin 25 μ M de compuesto, y, a 0, 2, 4, 6 y 8 horas, la anchura de la lesión se midió en cuatro lugares predefinidos diferentes. Se hicieron fotografías usando un microscopio invertido y una cámara Contax 167 MT 35 mm.

Ensayo de membrano corioalantoica (CAM)

Se incubaron huevos fertilizados de gallinas blancas Lohmann Selected Leghorn durante 3 días a 37°C y 55% de humedad relativa, y se giraron una vez cada hora. En el día 3 se hizo una ventana rectangular (1 cm x 2 cm) en la cáscara del huevo. La ventana se cubrió con una cinta para prevenir la deshidratación. La ventana permitió la observación sin perturbación de la vasculatura en desarrollo de la CAM. En el día 7 se colocó un anillo de silicona (10 mm de diámetro) en la CAM, para permitir la administración local de fármaco en el anillo. Los compuestos se aplicaron diariamente en alícuotas de 60 μ l (25 μ M) desde el día 10 al día 13. En el día 14, las CAMs se fotografiaron.

Estudios de modelo tumoral en ratones

Los ratones atímicos hembras (nu/nu, 5-6 semanas) o ratones macho C57BL/6 se adquirieron del National Cancer Institute, y se dejó que se aclimasen a las condiciones locales durante al menos una semana. A los animales se les proporcionó agua y pienso estándar *a voluntad*, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos siguieron protocolos aprobados por el University of Minnesota Research Animal Resources Ethical Committee. Se cultivaron células de carcinoma de ovario humano MA148 que crecen exponencialmente, proporcionadas amablemente por Prof. Ramakrishnan (Dings et al., Cancer Res., 63, 382-385 (2003)), y células de melanoma murino B16F10, proporcionadas amablemente por Prof. Fidler, en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) (van der Schaft, et al., Faseb J 16, 1991-1993 (2002)). Este medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomycin (Cellgro, Mediatech, Washington, DC) a 37°C y 5% de CO₂. Entonces, se inyectaron subcutáneamente 100 μ l de esta suspensión de células tumorales (2 x 10⁷ células MA148/ml y 2 x 10⁶ células B16F10/ml) en el flanco posterior derecho de cada ratón (atímico o C57BL/6), respectivamente).

Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño medio de al menos 50 mm³ antes de iniciar el tratamiento, y los animales se distribuyeron al azar antes del inicio del tratamiento. El tratamiento se administró en una de dos maneras: s.c. desde minibombas osmóticas, e inyección i.p. Las minibombas osmóticas (Durect, Cupertino, CA) se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de los ratones, y se formularon disoluciones concentradas de análogos de calixareno o β pep-25 en PBS que contiene 30% (v/v) de DMSO, de manera que el período de tratamiento de 14 días o 28 días estaría cubierto por la implantación de una única bomba. En cada estudio, a los grupos de control de los animales se les administró PBS (30% de DMSO v/v) o PBS que contiene seroalbúmina humana, para controlar el contenido proteico. Se encontró que las curvas de crecimiento tumoral son idénticas en cualquiera de estos casos de control.

El volumen tumoral se determinó midiendo los diámetros de los tumores usando calibradores (Scienceware, Pequannock, NJ) usando la ecuación para el volumen de un esferoide ($a^2 \times b \times \pi/6$), en la que "a" es la anchura y "b" la longitud del tumor. Las mediciones se llevaron a cabo dos o tres veces por semana. Al final del experimento, también se tomaron los pesos tumorales tras la escisión de los tumores de los animales eutanasiados. Los pesos tumorales se correlacionan bien con los volúmenes tumorales calculados de esta manera. Las diferencias estadísticas en las curvas de crecimiento tumoral se analizaron usando la prueba de ANOVA de dos vías.

55 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se usó para evaluar la densidad de los microvasos y el grado de apoptosis celular total. Aproximadamente, se seleccionaron para el procesamiento tumores del mismo tamaño y sin necrosis aparente. En el último día de tratamiento, los ratones se sacrificaron, y los tumores se cortaron. El tejido tumoral se embebió en medio de congelación de tejido (Miles Inc, Elkart, IN) y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Se prepararon secciones de tejido (10 μm de grosor) para el análisis inmunohistoquímico. Para esto, las secciones tisulares se llevaron a temperatura ambiente, se secaron al aire toda la noche, y después se fijaron en acetona durante 10 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar al aire durante al menos 30 minutos, y se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Las muestras se bloquearon entonces con PBS que contiene 0,1% de seroalbúmina bovina y 3% de seroalbúmina humana durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en una caja humidificada. Las muestras se incubaron subsiguientemente con anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE) frente a CD31 (PECAM-1) en una dilución 1:50 (Pharmigen, San Diego, CA) para la tinción para determinar la densidad de los microvasos.

Para evaluar el grado de apoptosis celular total, se tiñeron secciones de tejido tumoral usando el ensayo de TUNEL (marcado del extremo de muesca con d-UTP mediado por desoxirribonucleotidil transferasa terminal), que se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (kit de detección de muerte celular *in situ*, fluoresceína; TUNEL, Roche). Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los portaobjetos se lavaron con PBS, e inmediatamente se formaron imágenes usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX-60 a un aumento de 200 X.

Las imágenes digitales se almacenaron y se procesaron usando Adobe Photoshop (Adobe Inc., Mountain View CA). La cuantificación de la densidad de los microvasos se determinó como se describe previamente (Dings et al., Cancer Res 63, 382-385 (2003)). El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la *t* de Student.

Ensayos de toxicidad

Como medida indirecta de la toxicidad general, los pesos corporales de los ratones se monitorizaron dos veces a la semana, usando una balanza digital (Ohaus Florham, NJ). Para determinar los niveles de hematocrito, se extrajeron muestras de sangre mediante sangrados de la vena de la cola un día después de terminar el tratamiento, y la sangre se recogió en microtubos capilares de hematocrito heparinizados (Fisher; Pittsburgh, PA). Las muestras se hicieron girar durante 10 minutos en una microcentrífuga de hematocrito (Clay-Adams; NY), y la cantidad de hematocrito se determinó usando un lector de microcapilar internacional (IEC; Needham, Mass).

Resultados

30 Diseño de topomiméticos de hélice/lámina

El diseño de topomiméticos de hélice/lámina se basó en las estructuras plegadas de dos péptidos: SC4 (Mayo et al., Biochem J 349 Pt 3, 717-28. (2000)) y $\beta\text{pep-25}$ (Griffioen et al, Biochem J 354, 233-42 (2001)). SC4 es un 12mero peptídico que forma una hélice, que es principalmente bactericida y se une a y neutraliza LPS, y $\beta\text{pep-25}$ es un 33mero peptídico que forma una lámina β , que es antiangiogénico y selecciona específicamente como diana un receptor de adhesión/migración en células endoteliales (EC) activadas angiogénicamente. En modelos de ratón, $\beta\text{pep-25}$ inhibe efectivamente la angiogénesis tumoral y el crecimiento tumoral. Al igual que la mayoría de los agentes antiangiogénicos, $\beta\text{pep-25}$ también es bactericida, y se puede unir a y neutralizar LPS. SC4, que deriva de $\beta\text{pep-25}$, captura la mayoría de las actividades bactericida y de unión a LPS de $\beta\text{pep-25}$.

En la Figura 1 se ilustran las estructuras representativas tanto de SC4 como de $\beta\text{pep-25}$, destacándose sus superficies hidrófobas e hidrófilas. Los aminoácidos funcionalmente clave en $\beta\text{pep-25}$ están contenidos en el segmento central de su lámina β , alrededor de 4 restos de longitud en cada hebra β (Mayo et al., Journal of Biological Chemistry 278, 45746-52 (2003)). Esto se traduce dimensionalmente en una unidad de alrededor de 9 Å de $C_{\alpha}(i)$ a $C_{\alpha}(i+3)$ a lo largo de la hebra β , y alrededor de 5 Å hebra a través desde C_{β} a C_{β} . El grosor de una hebra β desde un $C_{\beta}(i)$ al siguiente $C_{\beta}(i+1)$ es alrededor de 5 Å. Estas dimensiones son aproximadamente las mismas para alrededor de dos vueltas de la hélice α de SC4, es decir, un cilindro de alrededor de 5 Å de diámetro de cadena principal, y 8 Å a lo largo del eje. En cualquier caso, estas dimensiones de la cadena principal se aproximan mucho a las del andamio de calix[4]areno, como se ilustra a escala en el centro superior de la Figura 1.

La adición de diversos grupos químicos (grupos alifáticos hidrófobos y grupos catiónicos hidrófilos) a este andamio calixarénico produce compuestos que se aproximan a las dimensiones moleculares, topología superficial y polaridad de segmentos de la lámina β y la hélice α como en $\beta\text{pep-25}$ y SC4, respectivamente. Se sintetizó una librería de 23 compuestos a base de calixareno, y sus estructuras se proporcionan en la Figura 2. Las reacciones químicas ejemplares usadas para sintetizar estos análogos de calix[4]areno se ilustran en los Esquemas 7a-c, que proporcionan métodos representativos para la preparación de varios de los derivados calixarénicos más activos. El Esquema 7a muestra la síntesis de los derivados calixarénicos de amina terciaria **40** y **12**. El Esquema 7(b) muestra la síntesis de derivados calixarénicos de guanidina **42** y **43**, y del derivado calixarénico de amina primaria **45**. El Esquema 7(c) muestra la síntesis de los derivados calixarénicos de amina primaria enlazados a triazol **46a** y **46b**.

Las condiciones de reacción citadas por letras en el esquema son: a) AlCl_3 , PhOH, tolueno, temperatura ambiente (rt); b) bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona, reflujo; c) *N,N*-dimetiletilendiamina, tolueno, reflujo; d) i. NaH, cloruro de metilalilo, THF, DMF, 80°C; ii. *N,N*-dimetilanilina, 200°C; e) Pd/C, H_2 , 1 atmósfera (atm), EtOAc, rt; f) 4-bromobutironitrilo, K_2CO_3 , acetona, reflujo; g) 4-bromobutironitrilo, NaH, DMF, 75°C; h) NaBH_4 , CoCl_2 , MeOH; i) 1,3-bis(*terc*-butoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea, HgCl_2 , Et_3N , CH_2Cl_2 ; j) TFA, 5% de anisol en CH_2Cl_2 , rt; k) NaH, bromuro de propargilo, THF, DMF, reflujo; l) ácido ascórbico, NaOAc, CuSO_4 , *t*-BuOH, H_2O , THF; m) TFA, 5% de anisol en CH_2Cl_2 , 0°C hasta rt.

La mayoría de los compuestos mostrados en la Figura 2 tienen grupos alifáticos de cadena corta (principalmente *iso*-butilo y *terc*-butilo) en su cara hidrófoba, y una cara hidrófila más variada que presenta aminas primarias y terciarias, grupos triazol y guanidinio, o en algunos casos grupos cargados negativamente como controles negativos.

Los topomiméticos de hélice/lámina neutralizan LPS (no según la invención).

Inicialmente, la librería se examinó en busca de la actividad bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa*, la bacteria gramnegativa frente a la cual SC4 y βpep -25 son los más efectivos, pero se encontró que sólo unos pocos compuestos tuvieron una actividad solamente modesta (valores de LD_{50}) en el intervalo de 10 micromolar. Sin embargo, usando el ensayo de neutralización de LPS, se demostró que varios miembros de la librería de topomiméticos fueron muy efectivos uniéndose a y neutralizando LPS de seis especies de bacterias. En la Tabla 3 se dan los valores de IC_{50} determinados a partir de las curvas de respuesta frente a la dosis para todos los análogos. Aunque muchos compuestos tienen valores de IC_{50} en el intervalo micromolar de un solo dígito, algunos caen en el intervalo submicromolar, y unos pocos son activos en el intervalo de 5 a 50 nanomolar. Los mejores compuestos neutralizantes de LPS son **12**, **42**, **43**, **15**, **46a**, y **19**. Los valores de IC_{50} en el intervalo de 5 nM a 50 nM son excepcionales, no sólo debido a que este nivel de actividad es mejor que para SC4 y βpep -25, sino debido a que está en igualdad con el factor bactericida/aumentador de la permeabilidad de la proteína de unión a LPS de 55 kiloDalton y polimixina B (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Derivados calixarénicos. Valores de IC_{50} (μM) para la unión de LPS*

Compuesto	055:B5 de <i>E. coli</i>	0111:B4 de <i>E. coli</i>	<i>P.a.</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>
Derivados de amina terciaria						
40	3,4	>5	ND	1,5	ND	>5
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11a	4,4	>5	ND	0,08	4,1	ND
11b	0,05	2,7	ND	0,4	0,8	ND
12	0,006	3,1	4,2	1	0,4	ND
41	3,6	4,7	>5	ND	>5	ND
17	3,8	3,7	>5	2,1	3,1	ND
21	>5	>5	ND	2,4	3,2	ND
38	>5	>5	ND	ND	>5	ND
Derivados de guanidina						
27	>5	ND	ND	ND	4,4	ND
36	4,1	3,9	ND	ND	>5	ND
28	4,1	>5	ND	ND	2,6	ND
42	0,04	0,7	1,5	1	0,6	ND
43	0,1	0,4	0,8	0,5	0,6	3,2
Derivado de triazol						
45	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Derivados de amina primaria						
23	1,3	0,1	0,5	0,5	0,2	4,5
46a	0,05	2,2	2,6	1	1,1	>5
46b	0,6	1,5	1	0,9	ND	ND
4	0,9	1,6	0,8	0,3	0,6	1,5
39	>5	ND	ND	ND	>5	ND
Derivados cargados negativamente						
47	>5	>5	ND	ND	ND	ND
48	>5	ND	ND	ND	ND	ND
49	5	5	ND	2,1	ND	4,2
Péptidos						
SC4	4,2	>5	4	ND	4	>5
Ppep-25	2,5	2	1,2	2	2,5	4,1
PmxB	0,03	0,03	0,003	0,01	0,3	ND

ND = actividad no detectable a 5×10^{-6} M

>5 = actividad mínima a 5×10^{-6} M; no se determinó IC₅₀.

* se estima que los errores son $\pm 30\%$ del valor indicado en la tabla.

Los valores en el intervalo submicromolar se muestran en negrita.

5 Los topomiméticos de hélice/lámina protegen a los ratones de la endotoxina LPS (no según la invención)

Para demostrar la eficacia *in vivo*, se seleccionó un compuesto de cada subconjunto de derivados (amina primaria, amina terciaria, y grupo guanidinio, véase la Tabla 3 y Figura 2) para tratar a ratones expuestos a LPS. La selección se basó en qué compuestos fueron los más activos *in vitro* frente a LPS del serotipo 055:B5 de *E. coli*, a saber **12**, **42** y **46a**. Para este estudio *in vivo*, a los ratones se les administró una dosis letal de LPS de 055:B5 de *E. coli* (600 μ g), y se trataron con cada compuesto a las dosis de 5 mg/kg y 50 mg/kg. Aunque la dosis de 5 mg/kg fue inefectiva, la dosis de 50 mg/kg de **12** y **42** demostró protección frente a la exposición a LPS, con una supervivencia de 60% y 40%, respectivamente, en comparación con 0% para los controles (Figura 5A). Este resultado alentador impulsó el ensayo de estos compuestos frente a LPS procedente de la otra cepa 0111:B4 de *E. coli*, en el que las actividades *in vitro* fueron significativamente menores (véase la Tabla 3). Nuevamente, a los ratones se les administró una dosis letal de LPS de 0111:B4 de *E. coli* (500 μ g), y se trataron (50 mg/kg) con cada uno de estos tres compuestos. En este estudio, los ratones tratados con **42** y **46a** tuvieron una supervivencia de 100% y 25%, respectivamente, comparada con 0% para los controles (Figura 5B). Finalmente, estos compuestos se ensayaron en ratones expuestos a una dosis letal de LPS de *Salmonella* (600 μ g). En este caso, los tres compuestos fueron efectivos, mostrando **46a** una supervivencia de 100%, y mostrando **5** y **42** una supervivencia de 80% y 60%, respectivamente, en comparación con 0% para los controles (Figura 5C). En conjunto, el compuesto **42** fue el mejor.

Los topomiméticos de hélice/lámina retienen la actividad antiangiogénica

El ensayo de proliferación de células endoteliales (EC) mediante ³H-timidina se usa generalmente para evaluar el potencial angiogénico (Griffioen et al., Pharmacol Rev 52, 237-68 (2000)). Usando este ensayo, se demostró que dos miembros de la librería de 23 compuestos (**40** y **27**) fueron efectivos inhibiendo el crecimiento de las ECs. Las curvas de respuesta frente a la dosis para estos dos compuestos se muestran en la Figura 6A, junto con aquellas para β pep-25 como control positivo y **11a** como control negativo. Aunque el compuesto **11a** es inactivo en este ensayo *in vitro*, al menos hasta la dosis más elevada ensayada (25 μ M), algunos de los otros compuestos muestran actividad mínima a la dosis de 25 μ M. Con respecto a los dos compuestos más activos, **40** (IC₅₀ 2 μ M) es ligeramente más activo que β pep-25 (IC₅₀ 4 μ M), y considerablemente más activo que **17** (IC₅₀ 8 μ M). Como una comprobación inicial de la toxicidad celular general, se realizaron experimentos de proliferación similares usando fibroblastos, estirpes celulares de carcinoma ovárico humano MA148, y estirpes celulares de tumor de melanoma B16 murino. Frente a los fibroblastos, **40** y β pep-25 no mostraron efectos detectables, mientras que **11a** y **27**

mostraron una inhibición del crecimiento de 50% a alrededor de 20 μM . $\beta\text{pep-25}$ y **40** también fueron ambos efectivos frente a las células tumorales MA148 (IC_{50} de 10 μM y 1 μM , respectivamente), mientras que ninguno de ellos demostró actividad frente a las células tumorales B16F10. Por otro lado, **11a** y **27** fueron efectivos frente a tanto las estirpes tumorales celulares MA148 (IC_{50} de 8 μM y 3 μM , respectivamente) como B16F10 (IC_{50} de 15 μM y 10 μM , respectivamente).

La Figura 6B muestra los resultados de estos compuestos en el ensayo de lesión, en el que se evaluó el efecto sobre la migración de las EC, otro valor de pronóstico de la angiogénesis. En este ensayo, el compuesto **27** es tan efectivo como $\beta\text{pep-25}$ y más efectivo que **40**, mientras que **11a** y los otros análogos calixarénicos fueron inefectivos.

Debido a que cualquiera de estos ensayos *in vitro* proporciona sólo información limitada en términos de potencial angiogénico, estos compuestos también se ensayaron en el ensayo de membrana corioalantoica (CAM) en huevos de pollo fertilizados. En la Figura 6C es manifiesto que la angiogénesis es inhibida en embriones tratados con **40** y **27**, pero no con **11a**, en comparación con aquella en embriones de control, no tratados. Obsérvese que mientras que algunos vasos todavía son manifiestos en estos grupos tratados, la arquitectura de los vasos está claramente afectada como se observa por la aparición de vasos más cortos y más finos. Se observaron efectos angiostáticos similares en el ensayo de CAM con $\beta\text{pep-25}$.

Los compuestos **40** y **27** inhiben la angiogénesis tumoral y el crecimiento tumoral en ratones

Debido a que **40** y **27** son compuestos antiangiogénicos efectivos *in vitro*, se evaluó su eficacia *in vivo* usando dos modelos de crecimiento tumoral en ratones. En el modelo de tumor de carcinoma ovárico humano MA148 en ratones atímicos (Figuras 5A y 5B), la terapia se inició cuando los tumores tuvieron un tamaño de aproximadamente 70 mm^3 . El tratamiento con **40**, **27** y $\beta\text{pep-25}$ se administró subcutáneamente (s.c.) durante 28 días vía minibombas osmóticas implantadas. $\beta\text{pep-25}$ se administró a 10 mg/kg/día , una dosis que se mostró previamente en este modelo de ratón que inhibe el tumor MA148 en alrededor de 60 a 70% (Dings et al., Cancer Lett 194, 55-66 (2003)). Los agentes **40** y **27** se administraron a dos dosis: la dosis farmacológicamente equivalente (10 mg/kg/día) y la dosis equivalente molar (2,4 mg/kg/día para **40** y 2,7 mg/kg/día para **27**). Al final de 28 días de tratamiento, **40** a 10 mg/kg y 2,4 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral en una cantidad media de 81% y alrededor de 65%, respectivamente. Los niveles de inhibición del crecimiento para **40** y $\beta\text{pep-25}$ en una base equivalente molar son muy similares (Figura 7A). Después de 28 días de tratamiento, la velocidad del crecimiento tumoral comenzó a aumentar, pero, incluso dos semanas después del tratamiento, la inhibición del crecimiento tumoral siguió en los mismos niveles que la observada al final del tratamiento. En el mismo modelo de MA148, **27** inhibió el crecimiento tumoral en alrededor de 65% a cualquier dosis ensayada (Figura 7B). Este nivel de inhibición fue también el mismo que aquel para $\beta\text{pep-25}$ a 10 mg/kg .

Para evaluar la eficacia en otro modelo tumoral, **40** y **27** se ensayaron frente al melanoma B16 más agresivo, un modelo singénico en ratones inmunocompetentes. Se dejó que los tumores crecieran hasta aproximadamente 80 mm^3 , y el tratamiento con **40**, **27** y $\beta\text{pep-25}$ se inició mediante administración s.c. vía minibombas osmóticas implantadas (Figura 7C), y, en otro estudio, mediante inyección intraperitoneal (i.p.) dos veces al día durante 7 días (Figura 7D). Los tres compuestos ($\beta\text{pep-25}$, **40** y **27**) se administraron a una dosis de 10 mg/kg/día . En este modelo de tumor, **40** inhibió el crecimiento tumoral en una cantidad media de 80% cuando se administró s.c., y 75% cuando se administró i.p., mientras que **27** inhibió el crecimiento tumoral en 55% y 75%, respectivamente. $\beta\text{pep-25}$ fue comparablemente efectivo a 45% y 60% cuando se administró s.c. e i.p., respectivamente.

El potencial antiangiogénico *in vivo* se demostró inmunohistoquímicamente tiñendo secciones transversales de tumores MA148 y B16F10 de animales tratados con **40** y **27** con anticuerpo anti-CD31 marcado fluorescentemente, para identificar los vasos sanguíneos. Como se muestra y cuantifica en la Figura 2 y Tabla 3, respectivamente, la densidad de los vasos en tumores tratados con relación a aquella en tumores de control (Figs. 8A y 8E) se redujo significativamente mediante tratamiento con $\beta\text{pep-25}$ (Figs. 8B y 8F), **40** (Figs. 8C y 8G), y **27** (Figs. 8D y 8H). Estos compuestos tuvieron un efecto significativo igualmente sobre la arquitectura de los vasos, demostrando una caída en el número de puntos finales, puntos de ramificación, y longitud de los vasos (Tabla 3). Además, el tratamiento antiangiogénico también incrementó la velocidad de apoptosis de las células tumorales, como se determina usando tinción inmunohistoquímica mediante TUNEL en criosecciones de tumores (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis histológico de la densidad de los microvasos^a

MA148	Densidad de los vasos ^b	Puntos finales ^c	Puntos de ramificación ^d	Longitud de los vasos ^e	Apoptosis ^f
Control	9157 ± 787	48,3 ± 7,4	3,6 ± 0,7	7,5 ± 0,6	1604 ± 258

ES 2 378 999 T3

β pep-25 (10 mg/kg)	7415 ± 686*	16,6 ± 1,8*	2,0 ± 0,5*	4,9 ± 0,6*	2418 ± 77*
40 (2,4 mg/kg)	7148 ± 844*	15,7 ± 2,1*	1,6 ± 0,3*	5,3 ± 0,7*	2919 ± 144*
40 (10 mg/kg)	5112 ± 439*	23,0 ± 2,9* ^a	1,0 ± 0,2*	3,3 ± 0,5*	2323 ± 171*
27 (2,7 mg/kg)	6046 ± 533*	32,7 ± 6,0*	1,1 ± 0,3*	4,2 ± 0,6*	2418 ± 72*
27 (10 mg/kg)	7402 ± 763	14,7 ± 2,2*	2,3 ± 0,6	5,0 ± 0,7*	2333 ± 173*
B16F10	Densidad de los vasos	Puntos finales	Puntos de ramificación	Longitud de los vasos	Apoptosis ^f
Control	18193 ± 1683	34,4 ± 6,0	6,6 ± 1,0	13,4 ± 1,2	2216 ± 133
β pep-25 (10 mg/kg)	14050 ± 1826*	31,9 ± 3,8	4,5 ± 0,6*	10,2 ± 1,2*	3303 ± 606*
40 (10 mg/kg)	10231 ± 1330*	21,9 ± 2,6*	5,2 ± 0,7*	8,6 ± 1,2*	2807 ± 140*
27 (10 mg/kg)	10743 ± 764*	35,2 ± 4,0	3,5 ± 0,5*	7,5 ± 0,6*	2357 ± 103

^a En el último día de tratamiento, los tumores se cortaron. Los tumores de tamaños similares sin necrosis extendida aparente se embobieron en medio de congelación de tejidos (Miles Inc.; Elkart, IN) y se congelaron de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido. La preparación y los procedimientos son como se describe en la sección de Métodos.

5 ^b Tras la binarización de las imágenes de tinción con CD31, la densidad de los microvasos se estimó puntuando el número total de píxeles blancos por campo.

^c Número medio de puntos finales de los vasos según se determina tras la esqueletonización de las imágenes.

^d Número medio de puntos de ramificación/nodos de vasos por imagen.

^e Longitud media total de los vasos por imagen.

10 ^f Tras la binarización de las imágenes a partir de la tinción de TUNEL, la apoptosis se estimó puntuando el número total de píxeles blancos por campo.

Todos los resultados se expresan como recuentos medios de píxeles por imagen ± error estándar a partir de 20 imágenes.

* $p \leq 0,05$; prueba de la t de Student.

15 Ausencia de toxicidad de los compuestos topomiméticos

En todos los experimentos *in vivo*, el tratamiento con **40**, **27** y β pep-25 no mostró generalmente signos de toxicidad, como se evalúa mediante el comportamiento inalterado, ganancia normal de peso durante los experimentos, y niveles de hematocrito en la sangre. En la Figura 7 se da como insertos el porcentaje de cambios en los pesos corporales. En general, los pesos corporales aumentaron para los animales en todos los grupos, con una excepción. En el modelo de B16, la administración i.p. de **27** provocó que los pesos cayesen alrededor de 5% de media durante el transcurso del tratamiento (inserto a la Figura 7D). En el último día de tratamiento con cualquiera de los modelos, se extrajo sangre y se determinaron los niveles de hematocrito como una medida de la toxicidad de la médula ósea.

Los niveles de hematocrito, dados como un porcentaje de glóbulos rojos \pm SD, fueron: vehículo $47 \pm 5,7$, β pep-25 $47 \pm 2,8$, **40** (2,4 mg/kg) $50 \pm 1,4$, **40** (10 mg/kg) $49,5 \pm 2,1$, **27** (2,7 mg/kg) $46,5 \pm 0,7$, y **27** (10 mg/kg) $47 \pm 4,2$. El estudio con tumores B16 en ratones inmunocompetentes mostró niveles de hematocrito similares (vehículo $51 \pm 1,4$, β pep-25 $52,5 \pm 3,5$, **40** 53 ± 0 , y **27** $49 \pm 1,4$ en porcentaje de glóbulos rojos \pm SD). Con la autopsia, también se observó que la morfología macro- y microscópica de los órganos internos era normal en todos los grupos experimentales de animales.

En los experimentos de modelo de endotoxemia, los ratones no demuestran ningún signo de toxicidad aguda con la administración i.p. de los compuestos **12**, **42**, o **46a** a una dosis única de 50 mg/kg. Aunque estos animales se trataron simultáneamente con LPS, que en sí mismo indujo un efecto letárgico, más ratones sobrevivieron generalmente cuando se trataron con los compuestos topomiméticos. Además, **12**, **42** y **46a** pertenecen a la misma clase de compuestos a base de calixareno, haciéndolos que sean probablemente tan no tóxicos como **40** y **27**.

Discusión

Aunque todos los miméticos peptídicos a base de calixareno preparados son anfipáticos y tienen dimensiones moleculares globales similares como un segmento de β pep-25 plegado en lámina β o SC4 formador de hélice, ninguno concuerda exactamente con la topología superficial de cualquiera de los péptidos. Por ejemplo, las cadenas laterales clave en β pep-25 (valina, leucina e isoleucina en la superficie hidrófoba, y lisina (principalmente) y arginina en el lado hidrófilo) se mezclan y son heterogéneas en el contexto de la superficie anfipática. Los miméticos peptídicos a base de calixareno, por otro lado, presentan principalmente los mismos grupos químicos en cada superficie respectiva del andamio calixarénico. Además, debido a que los compuestos a base de calixareno no son tan internamente flexibles como los péptidos, el cambio más pequeño de la entropía conformacional negativa que se produce al unirse a su diana puede contribuir de hecho a su actividad biológica.

Los topomiméticos **40** y **27** son agentes antiangiogénicos muy efectivos, y son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Incluso aunque estos dos compuestos comparten una carga neta positiva y carácter anfipático, tienen diferencias estructurales y funcionales obvias. Basándose en respuestas similares de células en cultivo, parece que el compuesto **40** selecciona como diana el mismo receptor que β pep-25, mientras que **27** no lo hace.

Otro de los compuestos topomiméticos preparados selecciona como diana claramente a LPS. Estos compuestos a base de calixareno presentan grupos hidrófobos y cargados positivamente, de manera que les permiten unirse efectivamente a y neutralizar la endotoxina bacteriana mejor que los péptidos SC4 y β pep-25 progenitores. Aunque la actividad de unión a LPS de un topomimético dado depende de la fuente bacteriana de LPS, la presencia de cadenas alquílicas en la cara hidrófoba del andamio de calix[4]areno es importante. En conjunto, los mejores topomiméticos que se unen a LPS tienen grupos *terc*-butilo en la cara hidrófoba del andamio de calixareno, y aminas primarias o grupos guanidinio en la cara hidrófila.

Al menos cuando se comparan estos compuestos con su variabilidad limitada de grupos alifáticos, las diferencias de actividad de unión a LPS son generalmente mínimas y parecen depender más de qué grupos cargados positivamente están en la cara hidrófila. De hecho, parece que la selección de grupos cargados positivamente es mucho más importante para la unión a LPS que la elección de qué grupos alquilo de cadena corta están en la superficie hidrófoba. Esto puede implicar que los topomiméticos interactúan con los grupos fosfato en el lípido A, lo que sería consistente con estudios estructurales de péptidos que se complejan con LPS de *E. coli*. Japelj et al (2005) dieron a conocer que dos de los grupos guanidino de arginina, en el péptido LF11, están situados próximos a los dos grupos fosfato del resto de lípido A (Japelj et al., J Biol Chem 280, 16955-61 (2005)). La distancia de alrededor de 13 Å que separa los dos grupos fosfato en LPS coincide con aquella entre estos dos grupos guanidinio en el LF11, así como entre grupos guanidinio en el topomimético **42**. Por otro lado, aunque las separaciones de cargas son similares, las aminas primarias de los restos de lisina del péptido FhuA dominan la interacción con el resto de lípido A de LPS del serotipo K-12 de *E. coli* (Ferguson et al., Science 282, 2215-20 (1998)). Se puede hacer una afirmación similar para PmxB en complejo con LPS del serotipo 055:B5 de *E. coli*, en el que cuatro grupos ácido α,γ -diaminobutírico corresponden a los grupos catiónicos de arginina y lisina en LF11 y en FhuA.

Desafortunadamente, todos los complejos de péptidos y LPS obtenidos hasta la fecha sólo han usado LPS de los serotipos (055:B5 o K-12) de *E. coli*. La mayoría de los compuestos topomiméticos preparados demuestran sus mejores actividades frente a LPS procedente de las dos cepas de *E. coli* que se ensayaron. Para LPS derivado de otras bacterias gramnegativas, la unión de los compuestos a LPS disminuye generalmente y quizás es más selectiva, posiblemente debido a que la complejidad de su LPS es mayor que la encontrada en *E. coli* (Rietschel et al., Curr Top Microbiol Immunol 216, 39-81 (1996)). Por otro lado, los tres compuestos (**12**, **42**, **46a**) ensayados en el modelo de endotoxemia en ratones demostraron una mejor actividad global frente a LPS de *Salmonella* que frente a cualquier LPS de *E. coli*.

El ejemplo demuestra que se puede diseñar un compuesto no peptídico simple para imitar las dimensiones moleculares y la topología de superficie anfipática de los péptidos de hélice y de lámina β que se unen a LPS, e inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Estos agentes pueden ser clínicamente útiles, proporcionando un

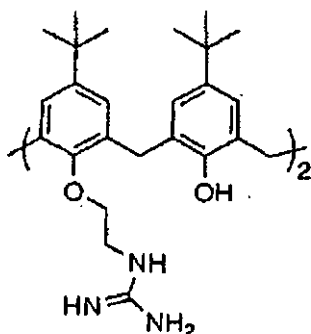
5 medio para prevenir el choque séptico con la infección bacteriana y/o detener el crecimiento canceroso. Como agentes antiangiogénicos, estos topomiméticos también pueden tener utilidad frente a otros trastornos patológicos que implican angiogénesis, a saber, artritis, restenosis, aterosclerosis, endometriosis y retinopatía diabética. Además, debido a que los motivos estructurales de hélice y de lámina β son comunes para muchos otros péptidos (Laskowski et al., *Nucleic Acids Research* 33, D266-268 (2005)), los compuestos topomiméticos se podrían visualizar de manera que comprenden una librería genérica de topomiméticos de superficie proteica, y pueden ser útiles en el estudio de efectos biológicos adicionales más allá de los mostrados por proteínas neutralizantes de LPS y antiangiogénicas.

Texto libre de listado de secuencias

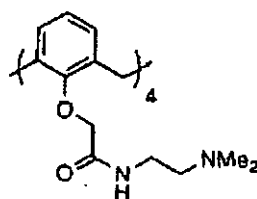
- 10 SEC ID NO: 1; polipéptido artificial β pep-25
SEC ID NO: 2; polipéptido artificial SC4
SEC ID NO: 3; polipéptido artificial como sustrato del ensayo de LAL.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inhibir la angiogénesis, comprendiendo el método poner en contacto células con una cantidad de una composición efectiva para inhibir la angiogénesis, comprendiendo la composición un mimético peptídico a base de calixareno seleccionado de



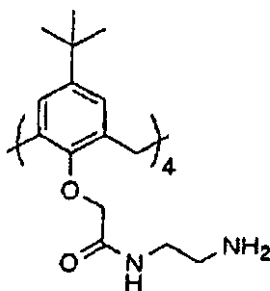
Compuesto 27



Compuesto 40

5

o derivados con puentes del compuesto 4, en el que el compuesto 4 es



Compuesto 4

- 10 2. Una composición que comprende un mimético peptídico a base de calixareno como se define en la reivindicación 1, en la que la composición es para uso en el tratamiento o prevención de crecimiento tumoral, artritis, restenosis, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, y endometriosis.
3. Una composición que comprende un mimético peptídico a base de calixareno como se define en la reivindicación 1, en la que la composición es para uso en la inhibición de tumorigénesis.
- 15 4. Uso de un mimético peptídico a base de calixareno como se define en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para inhibir la tumorigénesis.
5. Uso de un mimético peptídico a base de calixareno como se define en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir crecimiento tumoral, artritis, restenosis, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, y endometriosis.
- 20 6. El método, composición o uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los miméticos peptídicos a base de calixareno se proporcionan como una sal farmacéuticamente aceptable.
7. El método, composición o uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mimético peptídico a base de calixareno comprende una forma iónica que está cargada positivamente.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, en el que las células están presentes en un cultivo celular, un tejido, un órgano, o un organismo.
9. El método de la reivindicación 1, en el que las células son células de mamífero.
10. El método de la reivindicación 9, en el que las células son células humanas.
11. El método, composición o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el mimético peptídico a

base de calixareno es compuesto **27**.

12. El método, composición o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el mimético peptídico a base de calixareno es compuesto **40**.

5 13. El método, composición o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el mimético peptídico a base de calixareno es los derivados en puente de compuesto **4**.

Fig. 2A

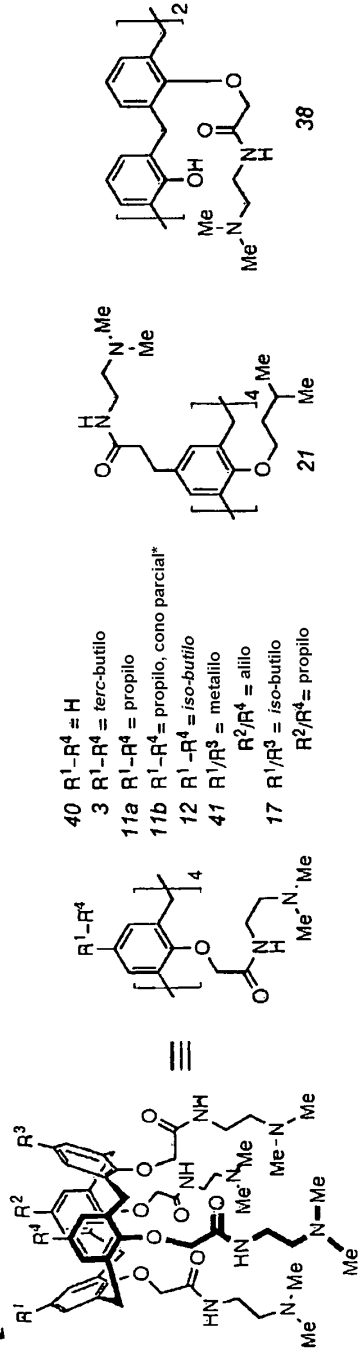


Fig. 2B

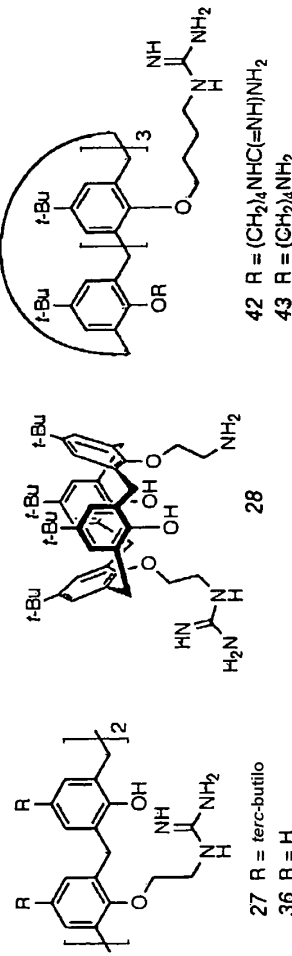


Fig. 2D

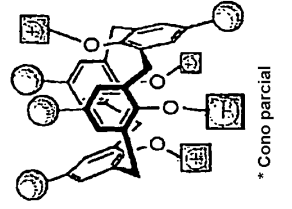


Fig. 2C

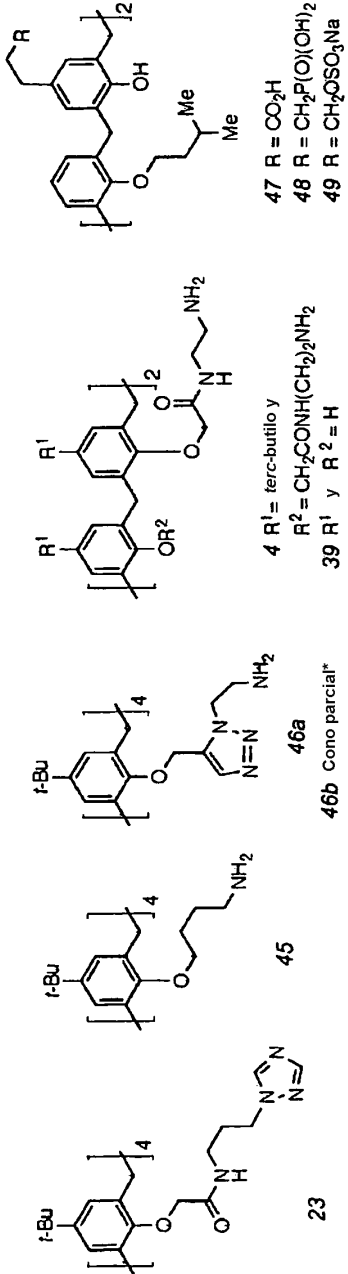
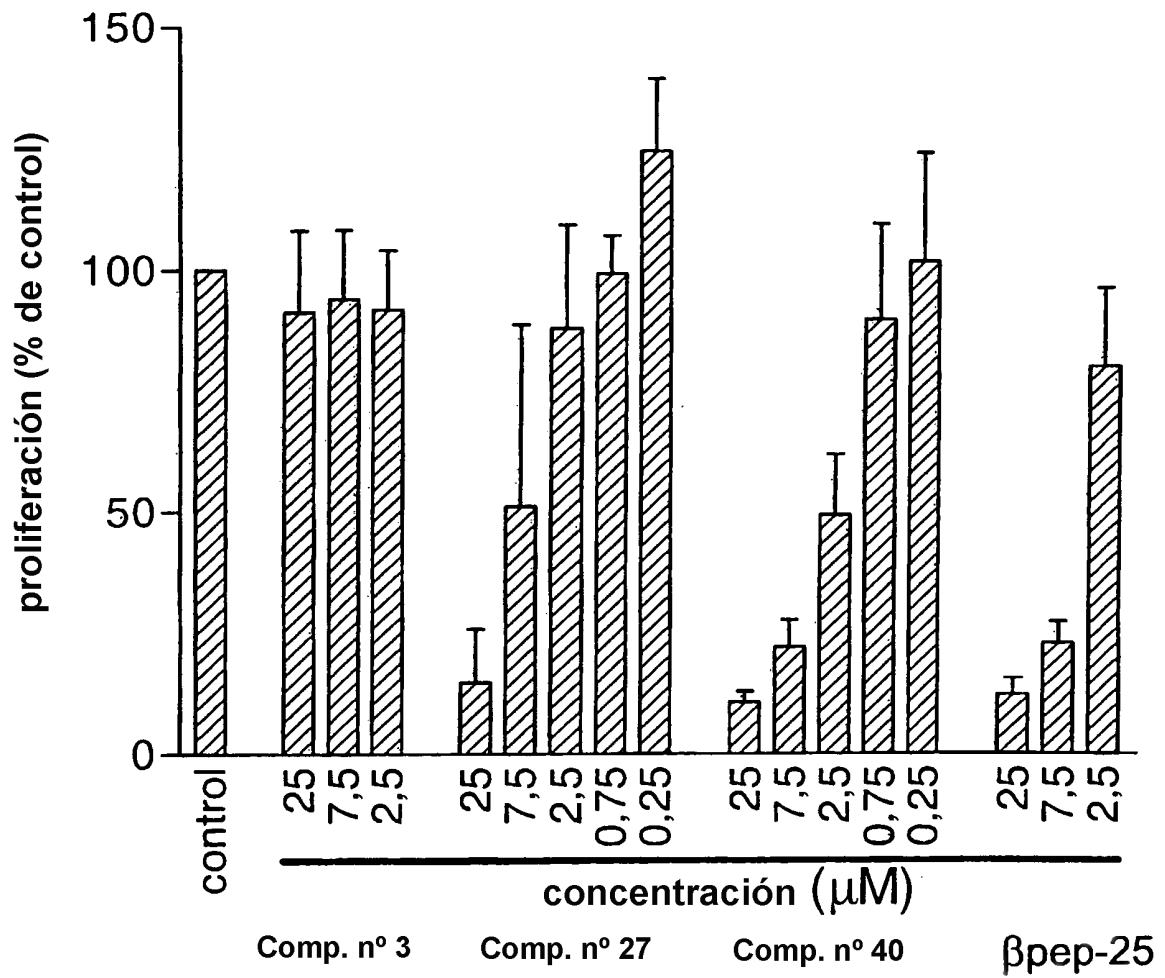


Fig. 3

β pep-25 y miméticos de β pep-25
inhiben la proliferación de ECs



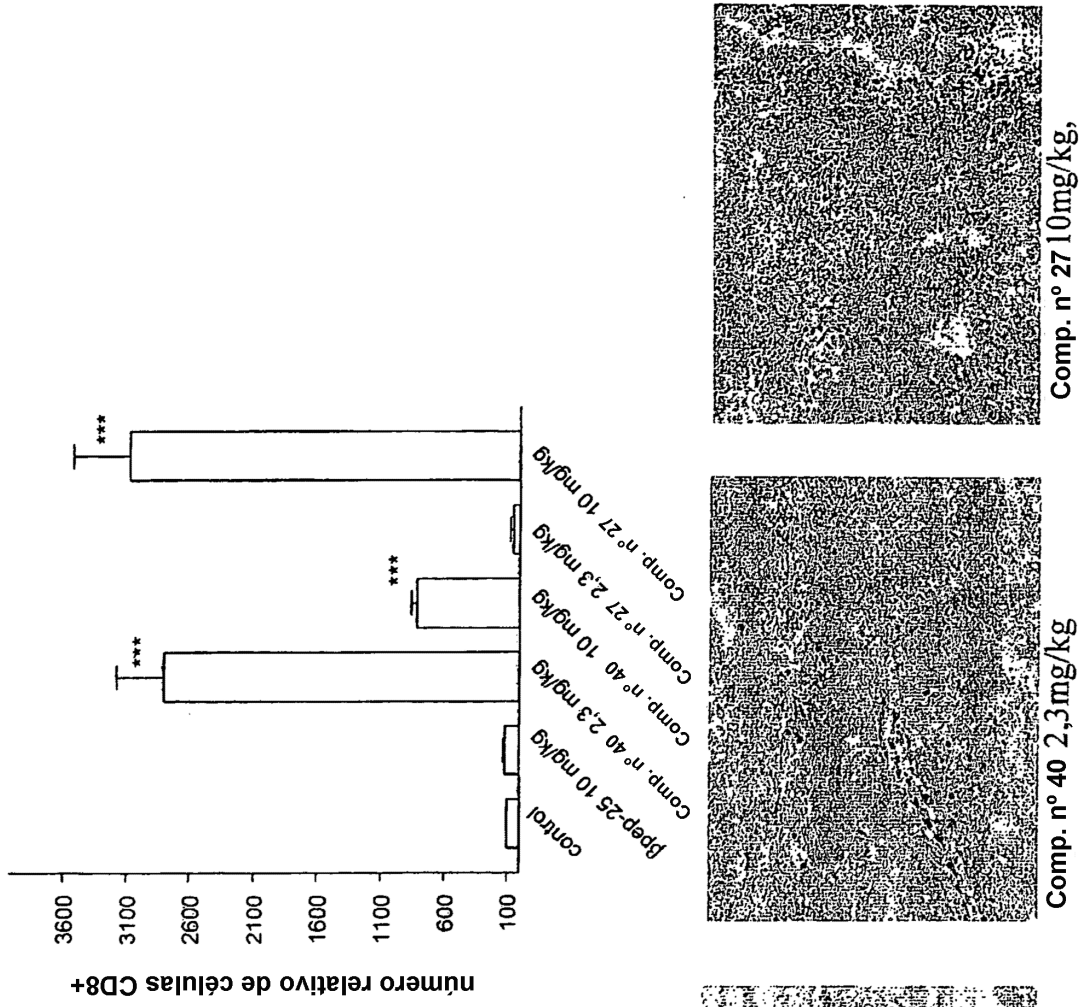


Fig. 4A

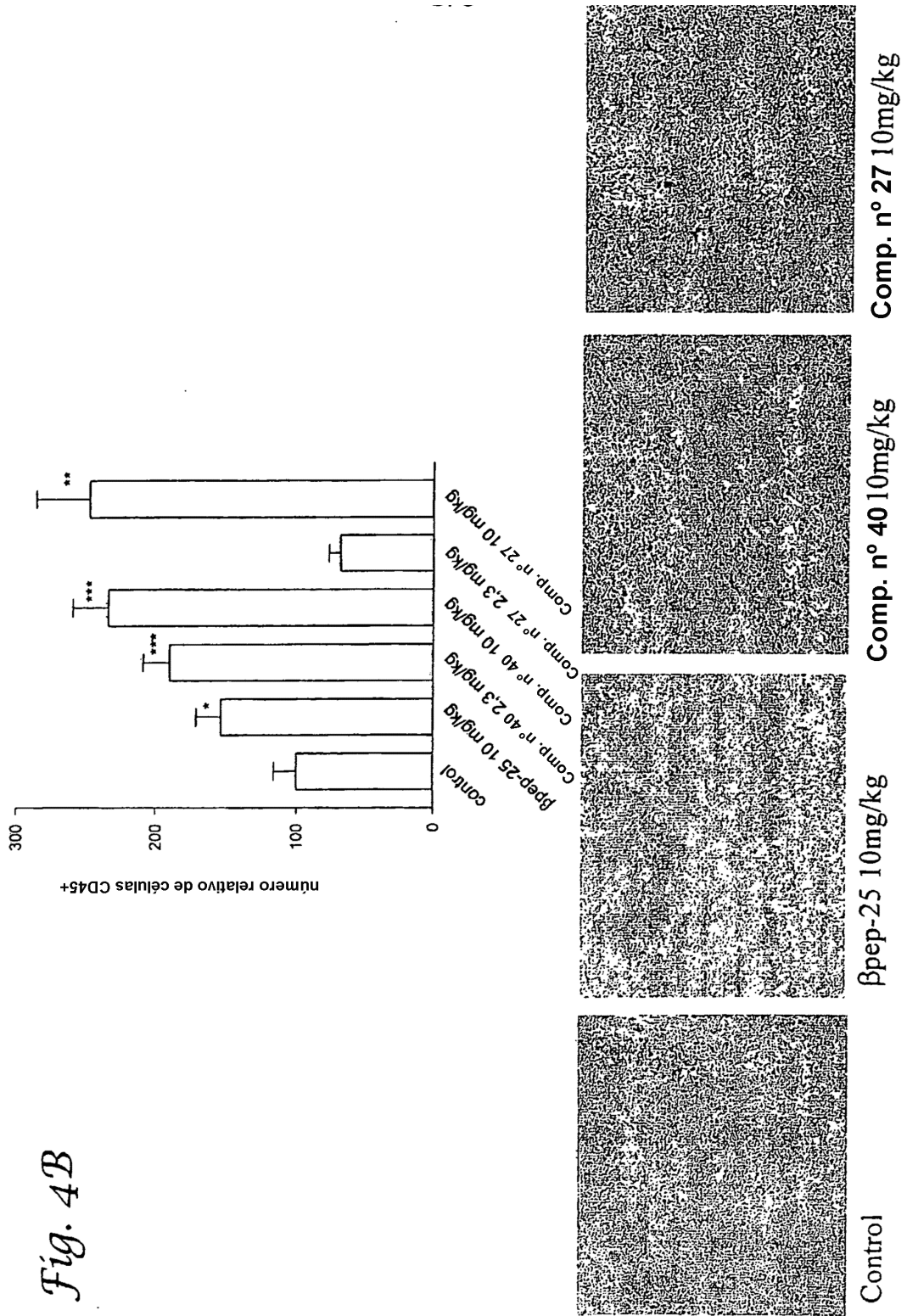


Fig. 4B

Fig. 5A

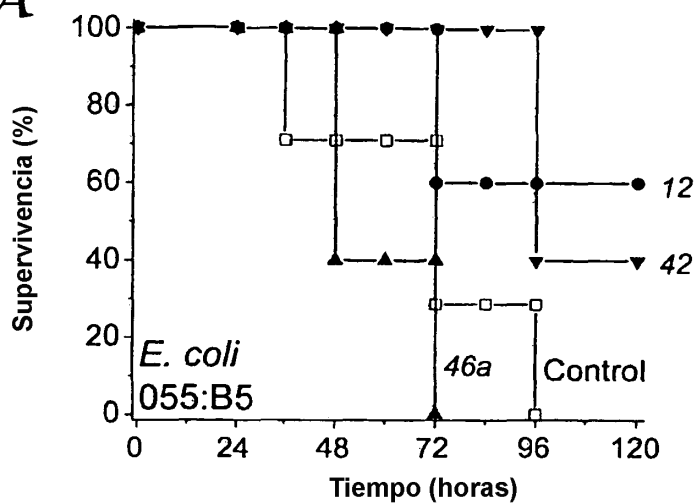


Fig. 5B

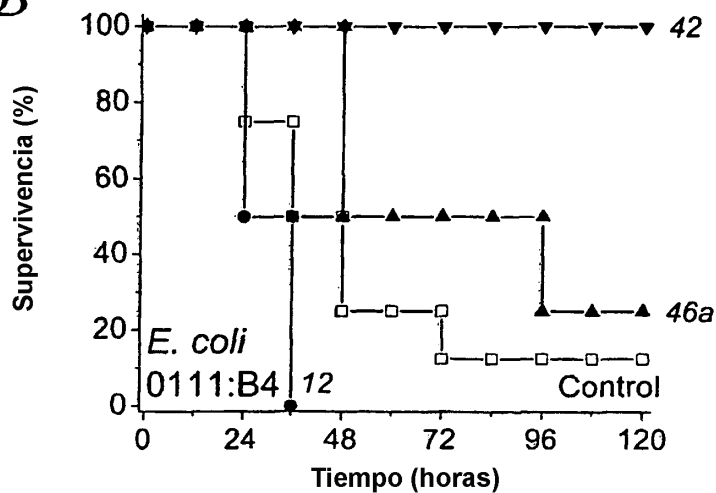
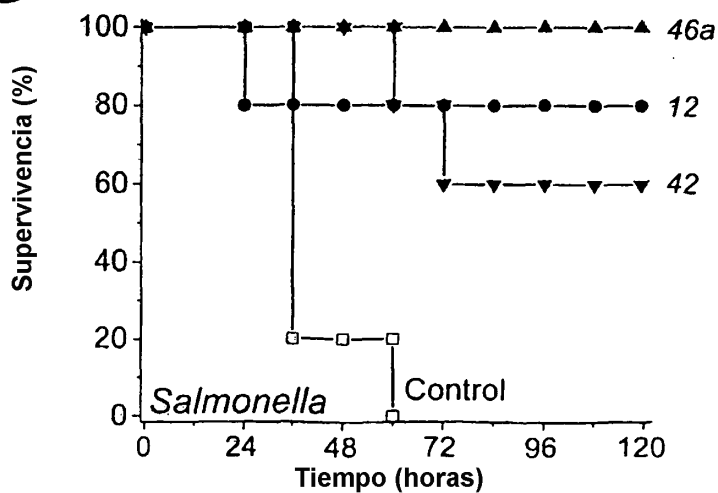
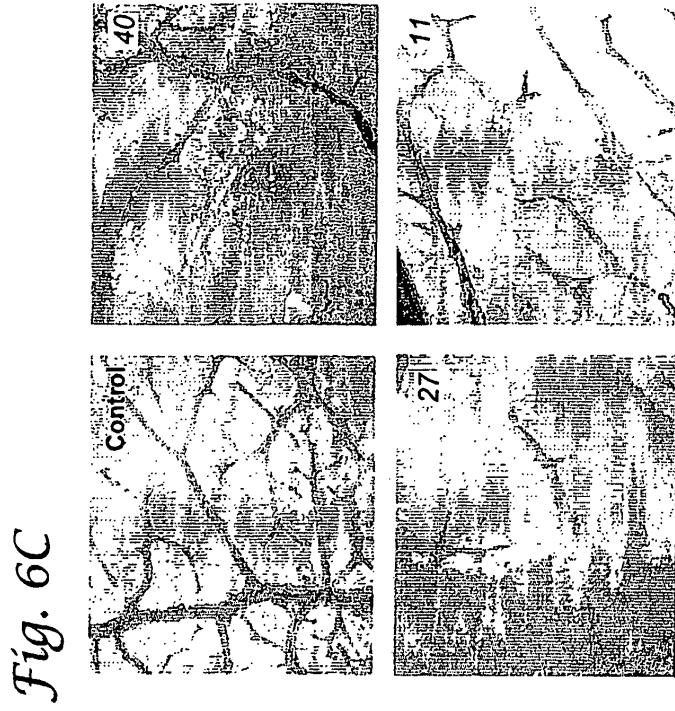
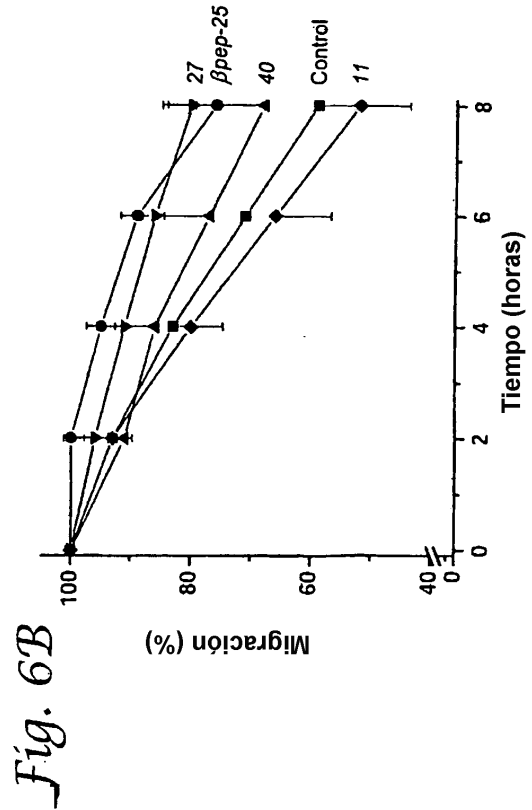
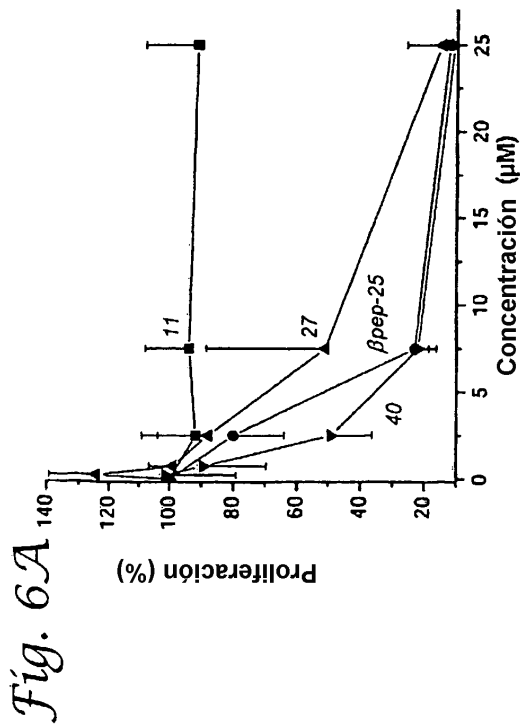


Fig. 5C





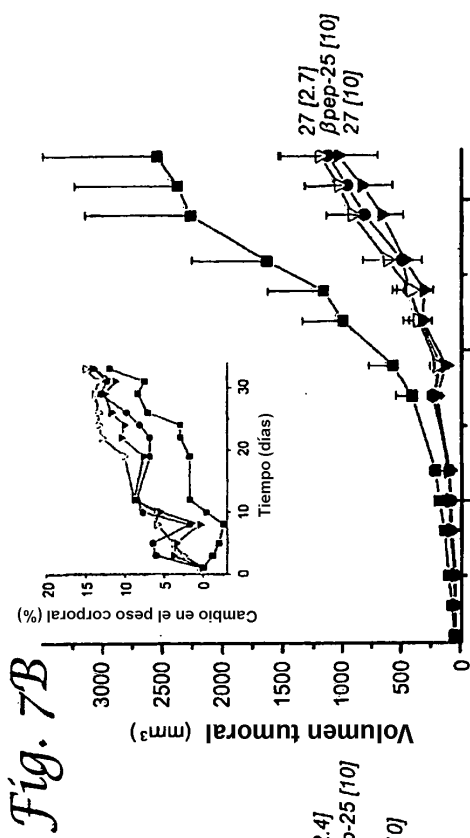


Fig. 7B

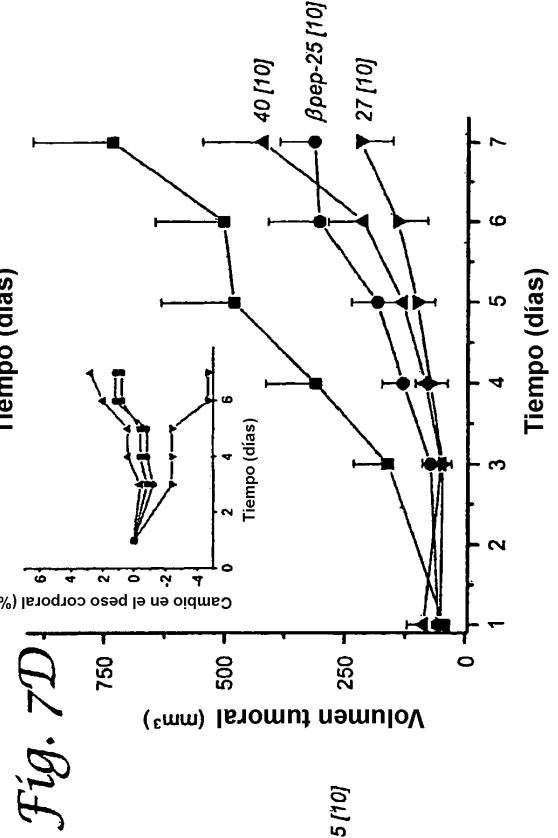
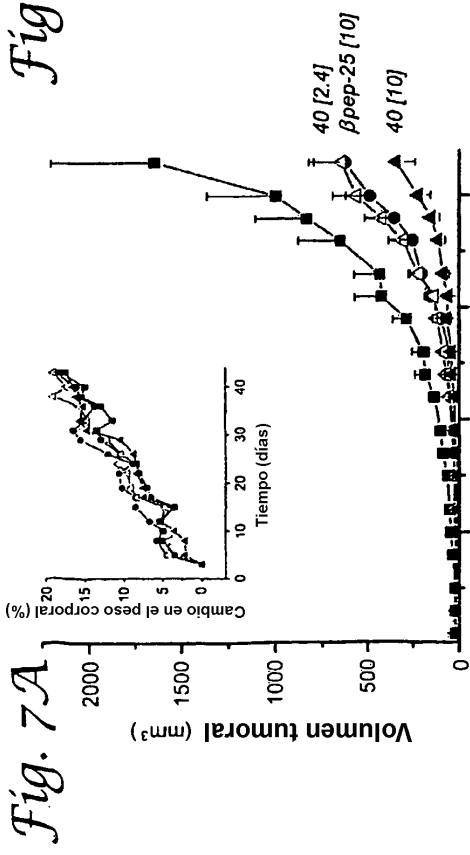


Fig. 7D

