(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 390 828**

(51) Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06844589 .9**
(96) Fecha de presentación: **28.11.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1960422**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

(54) Título: **Análogos potentes de la compstatina**

(30) Prioridad:
28.11.2005 US 740205 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

(73) Titular/es:
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER, 3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 191, US

(72) Inventor/es:
LAMBRIS, JOHN, D. y
KATRAGADDA, MADAN

(74) Agente/Representante:
IZQUIERDO FACES, José

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).

ES 2 390 828 T3

DESCRIPCIÓN

Análogos potentes de la compstatina.

[0001] La presente invención hace referencia a la activación de la cascada del complemento en el cuerpo. En particular, esta invención proporciona péptidos y peptidomiméticos capaces de unirse a la proteína C3 e inhibir la activación del complemento.

[0002] El sistema del complemento es la primera línea de defensa inmunológica contra los patógenos externos. Su activación a través de la vía clásica, alternativa o de las lectinas conduce a la generación de los péptidos anafilatóxicos C3a y C5a y a la formación del complejo de ataque a membrana C5b-9. El componente del complemento C3 desempeña un papel fundamental en la activación de las tres vías. La activación de C3 mediante convertasas de C3 de la vía del complemento y su posterior acoplamiento a la superficie objetivo conduce a la formación del complejo de ataque a membrana y a la larga a daños en o lisis en las células objetivo. C3 es único en que posee una rica arquitectura que proporciona una gran diversidad de sitios de unión a ligandos que son importantes en las vías de la supervisión inmunológica y de la respuesta inmunitaria.

[0003] La activación inadecuada del complemento puede conducir a daños en la célula huésped. El complemento está involucrado en varios estados de enfermedades, incluyendo diversas enfermedades autoinmunes, y se ha descubierto que contribuye a otras condiciones clínicas tales como el síndrome respiratorio del adulto, los ataques al corazón, el rechazo después de un xenotransplante y las lesiones por quemaduras. También se ha descubierto que las lesiones tisulares con mediación del complemento son el resultado de situaciones de bioincompatibilidad tales como las que se encuentran en los pacientes que se someten a diálisis o bypass cardiopulmonar.

[0004] En las lesiones tisulares con mediación del complemento actúa de mediador directo el complejo de ataque a membrana, e indirecto la generación de C3a y C5a. Estos péptidos inducen daños a través de sus efectos en diferentes células, incluyendo los neutrófilos y los mastocitos. *In vivo*, la regulación del complemento en los pasos de activación de C3 y C5 la proporcionan tanto las proteínas plasmáticas como las proteínas de membrana. Los inhibidores de las proteínas plasmáticas son el factor H y la proteína de unión a C4, y las proteínas de membrana reguladoras ubicadas en las superficies celulares son los receptores del complemento 1 (CR1), el factor acelerador de la degradación (DAF), y la proteína cofactor de membrana (MCP). Estas proteínas inhiben las convertasas de C3 y C5 (proteasas con múltiples subunidades), estimulando la disociación de los complejos con múltiples subunidades y/o inactivando los complejos a través de proteolisis (catalizados por el factor I). Se han identificado diferentes agentes farmacológicos que regulan o modulan la actividad del complemento mediante ensayo *in vitro*, pero *in vivo* la mayoría han demostrado ser de baja actividad o tóxicos.

[0005] Hasta la fecha, no se ha aprobado ningún inhibidor de activación del complemento para su uso clínico, aunque existen algunos candidatos para el uso clínico, en concreto, una forma recombinante del receptor del complemento 1 conocida como receptor soluble del complemento 1 (sCR1) y un anticuerpo antiC5 monoclonal humanizado (5G1.1-scFv). Estas dos sustancias se ha demostrado que suprimen la activación del complemento en modelos animales *in vivo* (Kalli KR *et al.*, 1994; y, Wang *et al.*, 1996). Sin embargo, cada sustancia posee la desventaja de ser una proteína de gran peso molecular (240 kDa y 26 kDa, respectivamente) que es difícil de fabricar y debe administrarse mediante infusión. De acuerdo con esto, investigaciones recientes han hecho hincapié en el desarrollo de agentes activos más pequeños que sean más fáciles de administrar, más estables y menos costosos de fabricar.

[0006] La patente estadounidense nº 6.319.897 de Lambris et al. describe el uso de una biblioteca aleatoria combinatoria de péptidos expresados en fago para identificar un péptido de 27 residuos que se une a C3 e inhibe la activación del complemento. Este péptido se fragmentó en un segmento cíclico de 13 residuos que mantenía una actividad completa, lo que se denomina en la técnica compstatina. La compstatina inhibe la división de C3 en C3a y C3b mediante convertasas de C3. La compstatina ha sido sometida a ensayo en una serie de experimentos de interfaz *in vitro, in vivo, ex vivo,* y *in vivo/ex vivo*, y se ha demostrado que: (1) inhibe la activación del complemento en el suero humano (Sahu A *et al.,* 1996); (2) inhibe la activación del complemento inducida por heparina/protamina en primates sin efectos secundarios significativos (Soulika AM *et al.,* 2000); (3) prolonga la vida de un xenoinjerto porcino a ser humano perfundido con sangre humana (Fiane AE *et al.,* 1999a; Fiane AE *et al.,* 1999b; y, Fiane AE *et al.,* 2000); (4) inhibe la activación del complemento en modelos de bypass cardiopulmonar, plasmaféresis, y circuitos extracorpóreos de diálisis (Nilsson B *et al.,* 1998); y (5) posee una baja toxicidad (Furlong ST *et al.,* 2000).

[0007] La compstatina es un péptido que comprende la secuencia ICVVQDWGHHRCT-NH_2 (ID DE SECUENCIA Nº: 1), en la que Cys2 y Cys12 forman un puente disulfuro. Se determinó su estructura tridimensional utilizando espectroscopia NMR en 2D homonuclear en combinación con dos metodologías computacionales distintas restringidas experimentalmente. La primera metodología implicaba geometría de distancia, dinámica molecular e hibridación simulada (Morikis D et al., 1998; WO99/13899) y la segunda metodología implicaba optimización global (Klepeis et al., J. Computational Chem., 20: 1344-1370, 1999). La estructura de la compstatina reveló una superficie molecular que comprende una zona polar y una zona no polar. La parte polar incluye un giro β de tipo I y la zona no polar incluye el puente disulfuro. Además, se sintetizaron una serie de análogos con sustituciones de alanina (un

barrido de alanina) y se sometieron a ensayo buscando actividad, lo que reveló que los cuatro residuos del giro β y el puente disulfuro con el conjunto hidrófobo de alrededor juegan papeles importantes en la actividad inhibidora de la compstatina (Morikis *et al.,* 1998; WO99/13899).

[0008] Utilizando un ensayo de la actividad del complemento que comprende medir la lisis eritrocitaria con mediación de la vía alternativa, se medido la IC_{50} de la compstatina en 12 μM. Algunos de los análogos sometidos a ensayo previamente han demostrado tener una actividad equivalente a o mayor que la de la compstatina. La solicitud de patente internacional publicada nº W02004/026328 revela análogos y miméticos de la compstatina con variaciones en los extremos N y C, y en las posiciones 4 y 9, que impartían una actividad mejorada en el antes mencionado ensayo. Se ha informado de mejoras de hasta 99 veces más que la compstatina para ciertos análogos (*véase también,* Mallik *et al.,* 2005). El desarrollo de análogos o miméticos de la compstatina con incluso mayor actividad constituiría un avance significativo en la técnica.

[0009] Katragadda et al (2006) J. Med. Chem., 49(15), pp 4616-4622 describe que el efecto hidrófobo y los enlaces de hidrógeno explican la actividad mejorada del inhibidor del complemento, la compstatina. WO2007/044668 describe el uso de la compstatina y de análogos de la misma inhibidores del complemento para tratar y/o prevenir afecciones oculares.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] La presente invención proporciona análogos y miméticos del péptido inhibidor del complemento, la compstatina (HOOC-ICVVQDWGHHRCT-NH_2; ID DE SECUENCIA Nº: 1), que poseen una actividad inhibidora del complemento mejorada en comparación con la compstatina.

[0011] En un aspecto, la invención presenta un compuesto que inhibe la activación del complemento, que comprende un péptido con la siguiente secuencia:

Xaa1 – Cys – Val – Xaa2 – Gln – Asp – Xaa3 – Gly – Xaa4 – His – Arg – Cys – Xaa5 (ID DE SECUENCIA Nº: 26); en la que:
Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu o un dipéptido Gly-Ile;
Xaa2 es Trp o un análogo de Trp, donde el análogo de Trp posee un carácter hidrófobo incrementado en comparación con Trp y se ha seleccionado de entre un triptófano halogenado, 5-metoxitriptófano, 5-metiltriptófano y 1-metiltriptófano, con la condición de que, si Xaa3 es Trp, Xaa2 sea el análogo de Trp;
Xaa3 es Trp o un análogo de Trp que posee un hidrógeno del indol sustituido por un átomo de flúor, incrementando así el potencial de enlace de hidrógeno del anillo de indol;
Xaa4 es His, Ala, Phe ó Trp;
Xaa5 es L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido Thr-Asn ó Thr-Ala, ó un tripéptido Thr-Ala-Asn, donde un –OH carboxi-terminal de cualquiera de entre L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ó Asn es sustituido de forma opcional por –NH2; y
los dos residuos de Cys están unidos mediante un enlace disulfúrico.

[0012] En ciertas realizaciones, Xaa2 participa en una interacción no polar con C3. En otras realizaciones, Xaa3 participa en un enlace de hidrógeno con C3. En otras realizaciones, Xaa2 participa en una interacción no polar con C3, y Xaa3 participa en un enlace de hidrógeno con C3.

[0013] En ciertas realizaciones, Xaa2 comprende un sustituyente metilo en la posición 1 del triptófano, Xaa3 comprende un triptófano fluorado y Xaa4 comprende Alanina. En realizaciones concretas,

[0014] Xaa3 comprende 5-fluoro-1-triptófano. Algunos compuestos ejemplo de la invención comprenden cualesquiera de las ID DE SECUENCIA Nº: 16-24.

[0015] En otro aspecto, la invención presenta un compuesto que inhibe la activación del complemento, comprendiendo un péptido que posee la secuencia: Xaa1 - Cys - Val - Xaa2 - Gln - Asp - Xaa3 - Gly - Xaa4 - His - Arg - Cys - Xaa5 (ID DE SECUENCIA Nº: 26); en la que: Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ó un dipéptido Gly-Ile; Xaa2 es Trp o un análogo de Trp, donde el análogo de Trp es un análogo que tiene un sustituyente alcanoilo inferior en la posición 1 del triptófano y que tiene un carácter hidrófobo incrementado en comparación con Trp, con la condición de que, si Xaa3 es Trp, Xaa2 sea el análogo de Trp; Xaa3 es Trp o un análogo de Trp que es un triptófano halogenado, que una modificación química de su anillo de indol que incrementa el potencial de enlace de hidrógeno del anillo de indol; Xaa4 es His, Ala, Phe ó Trp; Xaa5 es L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido Thr-Asn ó Thr-Ala, ó un tripéptido Thr-Ala-Asn, donde un –OH carboxi-terminal de cualquiera de entre L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ó Asn es sustituido de forma opcional por –NH2; y
los dos residuos de Cys están unidos mediante un enlace disulfúrico.

[0016] En algunas realizaciones, el compuesto comprende un péptido producido mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el péptido. En otras realizaciones, el compuesto es producido al menos en parte mediante síntesis peptídica. También puede utilizarse una combinación de métodos sintéticos.

[0017] En ciertas realizaciones, los análogos de la compstatina son, donde el compuesto esté PEGilado, tal y como lo ilustra el compuesto que comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 36.

[0018] En otras realizaciones, el análogo de la compstatina además comprende un componente peptídico adicional que extiende la retención *in vivo* del compuesto. Por ejemplo, el componente peptídico adicional puede ser un péptido de unión a albúmina. Un conjugado péptido-compstatina de unión a albúmina ejemplo comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 39.

[0019] Los análogos, conjugados y miméticos de la compstatina descritos en el presente documento son de uso práctico para cualquier propósito para el que se utilice la compstatina misma, tal y como se conoce en la técnica y se describe en mayor detalle aquí. Algunos de estos usos implican la formulación de los compuestos en composiciones farmacéuticas para su administración a un paciente. Dichas formulaciones pueden comprender sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, así como uno o más diluyentes, portadores, excipientes farmacéuticamente aceptables y otros parecidos, tal y como estaría dentro del ámbito de los expertos en la técnica.

[0020] Diferentes características y ventajas de la presente invención se comprenderán al leer la descripción detallada, los dibujos y ejemplos que siguen a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] Figura 1. Actividad de la compstatina expresada y sus análogos. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) (cuadrados) y la compstatina expresada con triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 15) (círculos), 5-fluoro-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 16) (triángulos), 6-fluoro-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 17) (estrellas), 5-hidroxi-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 27) (hexágonos), 7-aza-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 28) (diamantes).

[0022] Figura 2. Actividad de los análogos sintéticos de la compstatina. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) (cuadrados) y los análogos de la compstatina con incorporación de 5-fluoro-l-triptófano en la posición 4 (ID DE SECUENCIA Nº: 18) (círculos), en la posición 7 (ID DE SECUENCIA Nº: 19) (triángulos), en ambas posiciones 4 y 7 (ID DE SECUENCIA Nº: 20) (diamantes).

[0023] Figura 3. Actividad de los análogos sintéticos adicionales de la compstatina. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para (A) Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) (triángulos) en comparación con Ac-V4(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 18) (triángulo invertido), Ac-V4(5-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 22) (círculos), Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23) (diamantes), Ac-V4(2-Nal)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 7) (cuadrados); (B) Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) (triángulos) en comparación con Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 19) (hexágonos); y, (C) compstatina de tipo salvaje (ID DE SECUENCIA Nº: 1) (triángulos) en comparación con Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 24) (triángulos apuntando hacia la izquierda).

[0024] Figura 4. Caracterización termodinámica de la interacción de los análogos adicionales de la compstatina con C3. Datos ITC que representan la unión de (A) Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5); (B) Ac-V4(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 18); (C) Ac-V4(5-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 22); (D) Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23); (E) Ac-V4(2-Nal)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 7); y, (F) Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 19) a C3. Las líneas se obtuvieron ajustando los datos sin procesar corregidos a un modelo de “un conjunto de sitios” en Origin 7.0.

[0025] Figura 5. Gráfico con líneas que muestran la relación entre hidrofobicidad de los análogos indicada mediante log P y la constante inhibidora (A), la entropía indicada mediante
$-T\Delta S$ (B) y la constante de unión (C).

[0026] Figura 6. Actividad de un análogo sintético adicional de la compstatina. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23) (círculos) y Ac-V4(1-formil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 25) (cuadrados).

[0027] Figura 7. Actividad del análogo PEGilado de la compstatina. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23) (círculos) y Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (ID DE SECUENCIA Nº: 36) (cuadrados).

[0028] Figura 8. Actividad del análogo de la compstatina conjugada con proteína de unión albúmina. Gráfico con porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23) (círculos) y el péptido de fusión (Ac-ICV(1MeW)QDWGAHRCTRLIEDICLPRWGCLWEDD-NH_2) (ID DE SECUENCIA Nº: 39) (cuadrados).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0029] Se utilizan diferentes términos referentes a los métodos y otros aspectos de la presente invención a lo largo de la especificación y reivindicaciones. Se debe dar el significado habitual en la técnica a dichos términos a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos de forma específica deben interpretarse de manera que sean consecuentes con la definición que se proporciona en el presente documento.

Definiciones:

[0030] Las abreviaturas siguientes pueden utilizarse en la especificación y ejemplos: Ac, grupo acetilo; NH_2, amida; MALDI, ionización por desorción láser asistida por matriz; TOF, tiempo de vuelo; ITC, calorimetría de titulación isotérmica; CLAP, cromatografía de líquidos a alta presión; NA, no activo; dT, D-treonina; 2-Nal, 2-naftilalanina; 1-Nal, 1-naftilalanina; 2-Igl, 2-indanilglicina; Dht, dihidrotriptófano; Bpa, 4-benzoil-L-fenilalanina; 5f-/-W, 5-fluoro-/-triptófano; 6f-/-W, 6-fluoro-/-triptófano; 5-OH-W, 5-hidroxitriptófano; 5-metoxi-W, 5-metoxitriptófano; 5-metil-W, 5-metiltriptófano; 1-metil-W, 1-metiltriptófano; las abreviaturas de aminoácidos utilizan la nomenclatura estándar de una o tres letras, por ejemplo, Trp ó W para triptófano.

[0031] El término “aproximadamente”, tal y como se utiliza aquí cuando se hace referencia a un valor mensurable como es una cantidad, una duración temporal y cosas así, pretende englobar variaciones de ± 20% ó ± 10%, en algunas realizaciones ± 5%, en algunas realizaciones ± 1%, y en algunas realizaciones ± 0,1% con respecto al valor especificado, según dichas variaciones sean apropiadas para realizar y usar los compuestos y composiciones reveladas.

[0032] Los términos “farmacéuticamente activo” y “biológicamente activo” hacen referencia a la capacidad de los compuestos de la invención para unirse a C3 o a fragmentos de la misma e inhibir la activación del complemento. Esta actividad biológica puede medirse mediante uno o más de los diversos ensayos reconocidos en la técnica, tal y como se describe en mayor detalle en el presente documento.

[0033] Tal y como se utiliza en el presente documento, “alquilo” hace referencia a un hidrocarburo cíclico, ramificado o lineal saturado sustituido de forma opcional que posee de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Los grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclooctilo, adamantilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término “alquilo inferior” hace referencia a un hidrocarburo cíclico, ramificado o lineal saturado sustituido de forma opcional que posee de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo). Los grupos alquilo inferior incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo y neopentilo.

[0034] Tal y como se utiliza en el presente documento, “halo” hace referencia a F, Cl, Br ó I.

[0035] Tal y como se utiliza en el presente documento, “alcanoilo”, que puede utilizarse de manera intercambiable con “acilo”, hace referencia a un residuo acílico alifático ramificado o lineal sustituido de forma opcional que posee de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Los grupos alcanoilo incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, isopentanoilo, 2-metil-butirilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, y parecidos. El término “alcanoilo inferior” hace referencia a un residuo acílico alifático ramificado o lineal sustituido de forma opcional que posee de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo). Los grupos alcanoilo inferior incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, n-propionilo, isopropionilo, butirilo, iso-butirilo, pentanoilo, iso-pentanoilo, y parecidos.

[0036] Tal y como se utiliza en el presente documento, “arilo” hace referencia a un sistema de anillo aromático bicíclico o monocíclico sustituido de forma opcional que posee de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Entre los ejemplos no restrictivos se incluyen, por ejemplo, el fenilo y el naftilo.

[0037] Tal y como se utiliza en el presente documento, “aralquilo” hace referencia a radicales alquilo portadores de un sustituyente arilo y tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos aralquilo pueden ser sustituidos de forma opcional. Entre los ejemplos no restrictivos se incluyen, por ejemplo, el bencilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo, y difeniletilo.

[0038] Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos “alcoxi” y “alcoxilo” hacen referencia a un grupo-O-alquilo sustituido de forma opcional en el que el alquilo es como se ha definido anteriormente. Entre los grupos alcoxilo y alcoxi de ejemplo se incluyen el metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, y heptoxi, entre otros.

[0039] Tal y como se utiliza en el presente documento, “carboxi” hace referencia a un grupo –C(=O)OH.

[0040] Tal y como se utiliza en el presente documento, “alcoxicarbonilo” hace referencia a un grupo -C(=O)O alquilo, donde el alquilo es como se ha definido anteriormente.

[0041] Tal y como se utiliza en el presente documento, “aroílo” hace referencia a un grupo –C(=O) arilo, en el que el arilo es como se ha definido anteriormente. Entre los grupos aroílo de ejemplo se incluyen el benzoílo y el naftoílo.

[0042] Típicamente, partes de moléculas químicas sustituidas incluyen uno o más sustituyentes que sustituyen al hidrógeno en ubicaciones seleccionadas de una molécula. Entre los sustituyentes de ejemplo se incluyen, por ejemplo, halo, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, sulfhidrilo, hidróxilo (-OH), alcóxilo, ciano (-CN), carboxilo (-COOH), acilo (alcanoilo: -C(=O)R); -C(=O)O-alquilo, aminocarbonilo (-C(=O)NH_2), aminocarbonilo N-sustituido (-C(=O)NHR”), CF_3, CF_2CF_3, y similares. En relación con los sustituyentes anteriormente mencionados, cada parte de molécula R” puede ser, por separado, cualquiera de entre H, alquilo, cicloalquilo, arilo, ó aralquilo, por ejemplo.

[0043] Tal y como se utiliza en el presente documento, “L-aminoácido” hace referencia a cualesquiera alfa-aminoácidos levógiros presentes de forma natural que normalmente están en las proteínas o los ésteres de alquilo de dichos alfa-aminoácidos. El término "D-aminoácido" hace referencia a alfa-aminoácidos dextrógiros. Salvo que se especifique lo contrario, todos los aminoácidos a los que se hace referencia en el presente documento son L-aminoácidos.

[0044] “Hidrófobo” o “no polar” se utilizan en el presente documento como sinónimos, y hacen referencia a cualquier interacción inter- o intramolecular no caracterizada por un dipolo.

[0045] Tal y como se utiliza en el presente documento, “carácter pi” hace referencia a la capacidad de la compstatina para participar en un enlace pi con C3. Los enlaces pi resultan de la superposición lateral de dos orbitales *p* paralelos.

[0046] Tal y como se utiliza en el presente documento, “potencial de enlace de hidrógeno” hace referencia a la capacidad de la compstatina para participar en una atracción electrostática con C3 implicando a partes de moléculas electronegativas en los análogos de triptófano o residuos de triptófano modificados en los átomos de hidrógeno y compstatina de C3. Un ejemplo no restrictivo de dicha parte de molécula electronegativa es un átomo de flúor.

[0047] “PEGilación” hace referencia a la reacción en la que al menos una parte de molécula de polietilenglicol (PEG), independientemente del tamaño, se une químicamente a una proteína o péptido para formar un conjugado péptido-PEG. “PEGilado” significa que al menos una parte de molécula de PEG, independientemente del tamaño, está unida químicamente a un péptido o proteína. El término PEG va generalmente acompañado por un sufijo numérico que indica el peso molecular medio aproximado de los polímeros de PEG; por ejemplo, PEG-8.000 hace referencia a un polietilenglicol que posee un peso molecular medio de aproximadamente 8.000.

[0048] Tal y como se utiliza en el presente documento, “sales farmacéuticamente aceptables” hace referencia a derivados de los compuestos revelados en los que el compuesto precursor es modificado fabricando sales base o ácidas del mismo. Entre los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero no se limitan a, sales ácidas orgánicas o minerales de residuos básicos tales como aminas; sales orgánicas o alcalinas de residuos acídicos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Por consiguiente, el término “sal de adición ácida” hace referencia al derivado de sal correspondiente de un compuesto precursor que ha sido elaborado mediante la adición de un ácido. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales convencionales o las sales cuaternarias de amonio del compuesto precursor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos. Por ejemplo, dichas sales convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos tales como los clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos, sulfámicos, fosfóricos, nítricos y similares; y las sales elaboradas a partir de ácidos orgánicos tales como los acéticos, propiónicos, succínicos, glicólicos, esteáricos, lácticos, málicos, tartáricos, cítricos, ascórbicos, pamoicos, maleicos, hidroximaleicos, fenilacéticos, glutámicos, benzoicos, salicílicos, sulfanílicos, 2-acetoxibenzoicos, fumáricos, toluensulfónicos, metanosulfónicos, etanodisulfónicos, oxálicos, isetiónicos, y similares. Ciertos compuestos básicos o acídicos de la presente invención pueden existir como zwitteriones. Todas las formas de los compuestos, incluyendo el ácido libre, la base libre, y los zwitteriones, se considera que están dentro del alcance de la presente invención.

Descripción:

[0049] De conformidad con la presente invención, se ha empleado la información sobre las características biológicas y fisicoquímicas de la compstatina para diseñar análogos de la compstatina con una actividad considerablemente

mejorada en comparación con el péptido precursor de la compstatina. En algunas realizaciones, los análogos poseen una actividad al menos 50 veces mayor que la de la compstatina. En otras realizaciones, los

[0050] Se ha demostrado que los análogos de la compstatina sintetizados de conformidad con otros enfoques poseen una actividad un tanto mejorada en comparación con el péptido precursor, esto es, hasta aproximadamente 99 veces más (Mallik, B. *et al,* 2005, *supra*; WO2004/026328). Los análogos elaborados de conformidad con la presente invención poseen una actividad incluso mayor que el péptido precursor o los análogos del mismo elaborados hasta la fecha, tal y como se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* como se muestra en las figuras y los Ejemplos del presente documento.

[0051] La Tabla 1B muestra la secuencia de aminoácidos y las actividades inhibidoras del complemento de la compstatina y análogos seleccionados con una actividad considerablemente mejorada. Se hace referencia a los análogos seleccionados mediante modificaciones específicas de las posiciones designadas (1-13) en comparación con el péptido precursor, la compstatina (ID DE SECUENCIA Nº: 1) y con los péptidos de las SECUENCIAS Nº: 2-14, que se muestran en la Tabla 1A y que se han descrito en WO2004/026328. Los péptidos de ID DE SECUENCIA Nº: 16-24 son representativos de modificaciones realizadas de conformidad con la presente invención, dando por resultado análogos de la compstatina considerablemente más potentes. Tal y como se describe en mayor detalle a continuación, se entenderá que ciertas modificaciones realizadas al triptófano en la posición 4 como se expone en la ID DE SECUENCIA Nº: 2-13 pueden combinarse con una sustitución del análogo del triptófano en la posición 7, para formar unos análogos de la compstatina aún más potentes.

TABLA 1.

Péptido	**Secuencia**	**ID DE SECUENCIA Nº:**	**Actividad sobre la compstatina**
A. Compstatina y análogos anteriormente descritos			
Compstatina	*H*-ICWQDWGHHRCT-*CONH2*	1	*
Ac-compstatina	*Ac*-ICVVQDWGHHRCT-*CONH2*	2	3 veces más
Ac-V4Y/H9A	*Ac*-ICV**Y**QDWG**A**HRCT-*CONH2*	3	19 veces más
Ac-V4W/H9A-OH	*Ac*-ICV**W**QDWG**A**HRCT-*COOH*	4	25 veces más
Ac-V4W/H9A	*Ac*-ICV**W**3DWG**A**HRCT-*CONH2*	5	55 veces más
Ac-V4W/H9A/T13dT-OH	*Ac*-ICV**W**QDWG**A**HRC**dT**-*COON*	6	55 veces más
Ac-V4(2-Nal)/H9A	*Ac*-ICV**(2-Nal)**QDWG**A**HRCT-*CONH2*	7	99 veces más
Ac V4(2-Nal)/H9A-OH	*Ac*-ICV**(2-Nal)**QDWG**A**HRCT-*COOH*	8	39 veces más
Ac V4(1-Nal)/H9A-OH	*Ac*-ICV**(1-Nal)**QDWG**A**HRCT-*COOH*	9	30 veces más
Ac-V4Igl/H9A	*Ac*-ICV**(2-Igl)**QDWG**A**-HRCT-*CONH$_2$*	10	39 veces más
Ac-V4Igl/H9A-OH	*Ac*-ICV**(2-Igl)**QDWGAHRCT-*COOH*	11	37 veces más
Ac-V4Dht/H9A-OH	*Ac*-ICV**Dht**QDWG**A**HRCT-*COOH*	12	5 veces más
Ac-V4(Bpa)/H9A-OH	*Ac*-ICV**(Bpa)**QDWG**A**HRCT-*COOH*	13	49 veces más
+G/V4W/H9A +AN -OH	*H*-**G**ICV**W**QDWG**A**HRCT**AN**-*COOH*	14	38 veces más
B. Análogos ejemplo descritos en el presente documento			
+G/V4W/H9A +N -OH	*H*-**G**ICV**W**QDWG**A**HRCT**N**-*COOH*	15	45 veces más
+G/V4(5f-/-W)/W7(5f-I-W),/H9A+N -OH	*H*-GICV**(5f-/-W)**QD**(5f-/-W)**GAHRCT**N**-*COOH*	16	112 veces más
+G/V4(6f-/-W)/W7(6f-I-W)/H9A+N -OH	*H*-GICV**(6f-/-W)**QD**(6f-/-W)**GAHRCT**N**-*COOH*	17	126 veces más
Ac-V4(5f-I-W)/H9A	*Ac*-ICV**(5f-/-W)**QDWG**A**HRCT-*CONH$_2$*	18	31 veces más
Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A	*Ac*-ICVWQD**(5f-/-W)**G**A**HRCT-*CONH2*	19	121 veces más
Ac-V4(5f-/-W)/W7(5f-/-W)/H9A	*Ac*-ICV(**5f-/-W)**QD**(5f-/-W)**GAHRCT-*CONH$_2$*	20	161 veces más
Ac-V4(5-metoxi-W)/H9A	*Ac*-ICV**(5-metoxi-W)**QDWG**A**HRCT-*CONH2*	21	76 veces más
Ac-V4(5-metil-W)/H9A	*Ac*-ICV**(5-metil-W)**QDWG**A**HRCT-CONH$_2$	22	67 veces más
Ac-V4(1-metil-W)/H9A	*Ac*-ICV**(1-metil-W)**QDWG**A**HRCT-*CONH$_2$*	23	264 veces más
Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-I-W)/H9A	*Ac*-ICV**(1-metil-W)**QD**(5f-/-W)**GAHRCT-*CONH2*	24	264 veces más
Ac-V4(1-formil-W)/H9A	*Ac*-ICV**(1-formil-W)**QDWG**A**HRCT-*CONH$_2$*	25	264 veces más

Las abreviaturas utilizadas en esta tabla son las siguientes:
dT = D-treonina
2-Nal = 2-naftilalanina
1-Nal = 1-naftilalanina
2-Igl = 2-indanilglicina
Dht = dihidrotriptófano
Bpa = 4-benzoil-L-fenilalanina
5f-/-W = 5-fluoro-/-triptófano
6f-/-W = 6-fluoro-/-triptófano
5-OH-W = 5-hidroxitriptófano
5-metoxi-W = 5-metoxitriptófano
5-metil-W = 5-metiltriptófano
1-metil-W = 1-metiltriptófano
1-formil-W = 1-formiltriptófano

[0052] Modificaciones en el extremo N terminal. La acetilación del extremo N terminal normalmente incrementa la actividad inhibidora del complemento de la compstatina y sus análogos, como puede verse específicamente comparando la ID DE SECUENCIA Nº: 1 con la ID DE SECUENCIA Nº: 2. De acuerdo con esto, la adición de un grupo acilo en el extremo amino terminal del péptido, incluyendo pero sin limitarse a la N-acetilación, es una realización preferente de la invención, de particular utilidad cuando los péptidos se elaboran de forma sintética. Sin embargo, a veces es ventajoso elaborar los péptidos mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico de codificación peptídica en un sistema de expresión procariótica o eucariótica, o mediante traducción y transcripción *in vitro*. Para estas realizaciones, puede utilizarse el extremo N terminal presente de forma natural. Un ejemplo de un análogo de la compstatina adecuado para la expresión *in vitro* o *in vivo* viene representado por la ID DE SECUENCIA Nº: 15-17, en la que el grupo acetilo es sustituido por una glicina no modificada en el extremo N terminal. Las ID DE SECUENCIA Nº: 15-17, que además comprenden modificaciones dentro de los péptidos y en los extremos C terminales como se dice a continuación, son aproximadamente entre 45 y 125 veces más activas que la compstatina en el ensayo de inhibición del complemento que se describe en el presente documento.

[0053] Modificación dentro del péptido. Utilizando métodos computacionales que clasifican las secuencias de baja energía, se ha determinado previamente que Tyr y Val eran los candidatos más probables en la posición 4 para proporcionar estabilidad y actividad del péptido (Klepeis JL *et al.*, 2003). Se reveló en WO2004/026328 que Trp en la posición 4, en especial combinado con Ala en la posición 9, produce una actividad muchas veces mayor que la del péptido precursor (por ejemplo, compárense las actividades de las ID DE SECUENCIA Nº: 4, 5 y 6 con las de las ID DE SECUENCIA Nº: 2 y 3). WO2004/026326 también reveló que se descubrió que todos los péptidos que comprendían los análogos de triptófano 2-naftilalanina (ID DE SECUENCIA Nº: 7, 8), 1-naftilalanina (ID DE SECUENCIA Nº: 9), 2-indanilglicina (ID DE SECUENCIA Nº: 10, 11) o dihidrotriptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 12) en la posición 4, poseían una actividad inhibidora del complemento incrementada, que era entre 5 veces y 99 veces mayor que la compstatina. Además, un péptido que comprendía el análogo de fenilalanina, 4-benzoil-L-alanina, en la posición 4 (ID DE SECUENCIA Nº: 13) poseía una actividad 49 veces mayor que la de la compstatina.

[0054] De conformidad con la presente invención, los péptidos que comprenden 5-fluoro-/-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 19) ó 5-metoxi-, 5-metil- ó 1-metil-triptófano, ó 1-formil-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 21, 22, 23 y 25, respectivamente) en la posición 4 poseen una actividad 31-264 veces mayor que la de la compstatina. La incorporación de 1-metil- ó 1-formil-triptófano incrementó sobre todo la actividad y la afinidad de unión en comparación con otros análogos. Se cree que un enlace de hidrógeno con mediación de un 'N' de indol no es necesario en la posición 4 para la unión y actividad de la compstatina. La ausencia de este enlace de hidrógeno o la reducción del carácter polar al sustituir el hidrógeno por metilo o alcanoilo inferior en el nitrógeno del indol en la posición 4 aumenta la unión y actividad de la compstatina. Sin pretender estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción concretos, se cree que una interacción o efecto hidrófobos en la posición 4 fortalece la interacción de la compstatina con C3. De acuerdo con esto, en la presente invención se contemplan las modificaciones del Trp en la posición 4 (*p. ej.*, alterar la estructura de la cadena lateral según métodos bien conocidos en la técnica), o sustituciones de análogos de Trp que mantienen o aumentan la anteriormente mencionada interacción hidrófoba para producir análogos de la compstatina con una actividad incluso mayor. Dichos análogos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, los análogos ejemplificados en el presente documento, así como derivados de los mismos no sustituidos o sustituidos de forma alternativa. Pueden encontrarse ejemplos de análogos adecuados consultando las siguientes publicaciones y muchas otras: Beene, et al. (2002) Biochemistry 41: 10262-10269 (que describe, entre otros, análogos de Trp halogenados individualmente o multitudinariamente); Babitzky y Yanofsky (1995) J. Biol. Chem. 270: 12452-12456 (que describen, entre otros, Trp metilado y halogenado y otros análogos de Trp y de indol); y las patentes estadounidenses 6.214.790, 6.169.057, 5.776.970, 4.870.097, 4.576.750 y 4.299.838. Los análogos de Trp pueden introducirse en el péptido compstatina mediante expresión *in vitro* ó *in vivo*, o mediante síntesis peptídica, tal y como se conoce en la técnica y se describe con mayor detalle en los ejemplos.

[0055] En ciertas realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina es sustituido por un análogo que comprende un metil-sustituyente, en particular, N(α)metiltriptófano y 5-metiltriptófano. En otras realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina es sustituido por un análogo que comprende un sustituyente alcanoilo inferior (por ejemplo, C_1-C_5) tal y como ha sido definido anteriormente. Además de los análogos ejemplificados, estos incluyen, pero no se limitan a ello, 1-acetil-L-triptófano.

[0056] Experimentos termodinámicos mostraron que la incorporación de 5-fluoro-/-triptófano en la posición 7 de la compstatina incrementaba la entalpia de la interacción entre la compstatina y C3, refiriéndose a la compstatina de tipo salvaje, mientras que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 4 de la compstatina disminuía la entalpia de esta interacción. Sin pretender estar vinculados a ningún mecanismo concreto, los resultados anteriores indican que la sustitución de hidrógenos del indol por un átomo de flúor en un residuo de Trp en la posición 7 de la compstatina puede fortalecer el potencial de enlace de hidrógeno del anillo de indol, crear un nuevo potencial de enlace de hidrógeno, o mediar en una interacción con C3 a través de una molécula de agua en la interfaz de unión. (Katragadda M *et al.*, 2004). Por lo tanto, se contemplan en la presente invención las modificaciones de Trp en la posición 7 (por ejemplo, alterar la estructura de la cadena lateral de conformidad con métodos bien conocidos en la técnica), o las sustituciones de análogos de Trp que mantienen o aumentan el anteriormente mencionado potencial de enlace de hidrógeno, o median en una interacción con C3 a través de una molécula de agua en la interfaz de unión, para producir análogos con una actividad incluso mayor. En ciertas realizaciones, los análogos de Trp cuyos anillos de indol poseen modificaciones que dan por resultado un potencial incrementado de enlace de hidrógeno o que median en una interacción con C3 a través de una molécula de agua en la interfaz de unión pueden introducirse en la posición 7 del péptido compstatina mediante expresión *in vitro* o *in vivo*, o mediante síntesis peptídica. Se descubrió que un péptido que comprendía el análogo de triptófano 5-fluoro-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 19) en la posición 7 poseía una actividad 121 veces mayor en comparación con la de la compstatina.

[0057] En otra realización, se incorporan análogos de Trp tanto en la posición 4 como en la 7 de la molécula de compstatina, e His en la posición 9 de la compstatina es sustituido de forma opcional por Ala. Experimentos termodinámicos mostraron que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en las posiciones 4 y 7 de la compstatina incrementaba la entalpia de la interacción entre la compstatina y C3, refiriéndose a la compstatina de tipo salvaje. En consecuencia, se contemplan en la presente invención las modificaciones de Trp en las posiciones 4 y 7 (por ejemplo, alterar la estructura de la cadena lateral de conformidad con métodos bien conocidos en la técnica), o las sustituciones de análogos de Trp que mantienen o aumentan la anteriormente mencionada interacción hidrófoba con C3 a través de la posición 4 y mantienen o aumentan el anteriormente mencionado potencial del enlace de hidrógeno con C3 a través de la posición 7, o la interacción con C3 a través de una molécula de agua en la interfaz de unión a través de la posición 7, para producir análogos de la compstatina con una actividad incluso mayor. Dicho Trp modificado o análogos de Trp pueden introducirse en el péptido compstatina en las posiciones 4 y 7 mediante expresión *in vitro* o *in vivo*, o mediante síntesis peptídica. Se descubrió que los péptidos que comprendían los análogos de triptófano 5-fluoro-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 16) y que comprendían los análogos de triptófano 6-fluoro-triptófano (ID DE SECUENCIA Nº: 17) en las posiciones 4 y 7 poseían una actividad significativamente mayor que la compstatina, una actividad de 112 a 264 veces mayor. Además, se descubrió que los péptidos que comprendían el análogo de triptófano 1-metil-triptófano en la posición 4 y 5-fluoro-triptófano en la posición 7 (ID DE SECUENCIA Nº: 24) poseían una actividad 264 veces mayor en comparación con la compstatina.

[0058] Modificaciones en el extremo carboxi terminal. Los péptidos producidos mediante métodos sintéticos normalmente se modifican en el extremo carboxi terminal para comprender una amida en vez de un ácido; esta modificación frecuente se puede ver en la Tabla 1 en la compstatina (ID DE SECUENCIA Nº: 1) y en varios análogos. De hecho, en algunos casos, se ha determinado que los péptidos que contienen amida terminal poseen mayor actividad que los péptidos que contienen ácido terminal (compárese, por ejemplo, las ID DE SECUENCIA Nº: 5 y 7 con las ID DE SECUENCIA Nº: 4 y 8, respectivamente). En consecuencia, una realización preferente de la invención utiliza la modificación amida C-terminal. Sin embargo, algunas circunstancias favorecen el uso de un ácido en el extremo C-terminal. Dichas circunstancias incluyen, pero no se limitan a ello, consideraciones de solubilidad y la expresión de los péptidos *in vitro* o *in vivo* a partir de moléculas de ácido nucleico de codificación peptídica.

[0059] El residuo carboxi terminal de la compstatina es la treonina. Se han descrito péptidos en los que la treonina C-terminal es sustituida por uno o más aminoácidos presentes de forma natural o análogos. Por ejemplo, el péptido que tiene la ID DE SECUENCIA Nº: 6 comprende D-treonina en vez de L-treonina, y además posee un grupo COOH en el extremo C-terminal. Este péptido muestra una actividad igual a la del péptido de ID DE SECUENCIA Nº: 5, que comprende L-treonina y $CONH_2$ en el extremo C-terminal. Más aún, Ile ha sido sustituido por Thr en la posición 13, para obtener un péptido con una actividad 21 veces mayor que la de la compstatina. Además, los péptidos de las ID DE SECUENCIA Nº: 14-17, que comprenden una extensión peptídica C-terminal de Asn, ó una extensión dipeptídica de Ala-Asn, junto con un COOH en el extremo C-terminal y un extremo N-terminal no acetilado, demuestra una actividad entre 38 y 126 veces mayor que la de la compstatina. También son adecuados para la producción mediante un sistema de expresión procariótica o eucariótica, tal y como se describe con mayor detalle a continuación.

[0060] Los análogos de la compstatina de la presente invención pueden elaborarse mediante varios métodos sintéticos de síntesis peptídica a través de la condensación de uno o más residuos de aminoácidos, de conformidad con los métodos convencionales de síntesis peptídica. Por ejemplo, los péptidos se sintetizan de conformidad con metodologías estándar de fase sólida, tales como las que pueden realizarse en un sintetizador peptídico Applied Biosystems Modelo 431A (Applied Biosystems, Foster City, California), de conformidad con las instrucciones del fabricante. Otros métodos de sintetizar péptidos o peptidomiméticos, bien mediante metodologías de fase sólida o en fase líquida, son bien conocidos para los expertos en la técnica. Durante el curso de la síntesis peptídica, pueden protegerse/desprotegerse los grupos carboxilo y amino de cadena ramificada según sea necesario utilizando grupos protectores bien conocidos. Un ejemplo de un método de síntesis peptídica adecuado se expone en el Ejemplo 3. La modificación utilizando grupos protectores alternativos para péptidos y derivados peptídicos será evidente para los expertos en la técnica.

[0061] De forma alternativa, ciertos péptidos de la invención pueden elaborarse mediante expresión en un sistema procariótico o eucariótico adecuado. Por ejemplo, una construcción de ADN puede insertarse en un vector plasmídico adaptado para la expresión en una célula bacteriana (tal como la *E. coli*) o una célula de la levadura (tal como la *Saccharomyces cerevisiae*), o en un vector baculovirus para la expresión en una célula de insecto o un vector viral para la expresión en una célula de mamífero. Dichos vectores comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula huésped, colocados de tal manera que permitan la expresión del ADN en la célula huésped. Dichos elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de inicio de transcripción y, de forma opcional, secuencias potenciadoras.

[0062] Los péptidos de las ID DE SECUENCIA Nº: 14-17, y otros diseñados de modo similar, son adecuados para la producción mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico *in vitro* o *in vivo*. Una construcción de ADN que codifica un concatémero de los péptidos, dependiendo el límite superior del concatémero en el sistema de expresión utilizado, puede introducirse en un sistema de expresión *in vivo*. Una vez que se ha producido el concatémero, se consigue la división entre el Asn C-terminal y la siguiente G N-terminal mediante la exposición del polipéptido a la hidracina.

[0063] Los péptidos producidos mediante expresión génica en un sistema procariótico o eucariótico recombinante se pueden purificar de conformidad con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos 1 y 2 exponen métodos adecuados para usar en la presente invención. En una realización, puede utilizarse un sistema de expresión/secreción disponible comercialmente, mediante el que se expresa el péptido recombinante y después se secreta de la célula huésped, para ser purificado fácilmente del medio que le rodea.

[0064] También puede utilizarse una combinación de expresión génica y métodos sintéticos para producir análogos de la compstatina. Por ejemplo, puede producirse un análogo mediante expresión génica y después someterlo a uno o más procesos sintéticos post-traslacionales, por ejemplo, para modificar el extremo N o C-terminal o para ciclizar la molécula.

[0065] La estructura de la compstatina es conocida en la técnica y las estructuras de los análogos anteriores se determinan mediante medios similares. Una vez que se ha establecido una conformación específica deseada de un péptido corto, hay métodos conocidos en la técnica para diseñar un péptido o peptidomimético que se adapte a dicha conformación. Véanse, por ejemplo, G.R. Marshall (1993), Tetrahedron, 49: 3547-3558; Hruby y Nikiforovich (1991), en Molecular Conformation and Biological Interactions, P. Balaram y S. Ramasehan, eds., Indian Acad. of Sci., Bangalore, pp. 429-455. De especial relevancia para la presente invención, el diseño de análogos peptídicos puede perfeccionarse aún más considerando la contribución de diversas cadenas laterales de residuos de aminoácidos, tal y como se había dicho anteriormente (esto es, para el efecto de los grupos funcionales o para consideraciones estéricas).

[0066] Los expertos en la técnica comprenderán que un mimético peptídico puede servir igual de bien que un péptido a efectos de proporcionar la conformación estructural específica y las funcionalidades de la cadena lateral necesarias para unirse a C3 y para inhibir la activación del complemento. En consecuencia, se contempla como dentro del alcance de la presente invención el producir compuestos inhibidores del complemento y de unión a C3 mediante el uso de o bien aminoácidos presentes de forma natural, derivados de aminoácidos, análogos o moléculas no aminoacídicas capaces de unirse para formar la conformación estructural apropiada. Un análogo no peptídico, o un análogo que comprende componentes peptídicos y no peptídicos, en ocasiones se denomina en el presente documento “peptidomimético” o “mimético isostérico”, para designar sustituciones o derivaciones de los péptidos de la invención, que poseen las mismas características conformacionales estructurales y/u otras funcionalidades, de modo que sea suficientemente similar a los péptidos de ejemplo para inhibir la activación del complemento.

[0067] El uso de peptidomiméticos para el desarrollo de análogos peptídicos de alta afinidad es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Zhao B *et al.,* 1995; Beeley, N. 1994; y, Hruby, VJ 1993). Suponiendo restricciones rotacionales similares a las de los residuos de aminoácidos dentro de un péptido, se pueden analizar los análogos que comprenden partes de moléculas no aminoacídicas y pueden verificarse sus motivos conformacionales, mediante, entre otras técnicas conocidas, el gráfico de Ramachandran (Hruby y Nikiforovich 1991).

[0068] Los análogos de la comsptatina de la presente invención pueden modificarse mediante la adición de componentes de polietilenglicol (PEG) al péptido. Tal y como se conoce bien en la técnica, la PEGilación puede incrementar la vida media de las proteínas y péptidos terapéuticos *in vivo.* En una realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000. En otra realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000. En otra realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000. En una realización ejemplo, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 5.000. El polietilenglicol puede ser una cadena ramificada o lineal, y preferentemente es una cadena lineal.

[0069] Los análogos de la compstatina de la presente invención pueden unirse de forma covalente a PEG mediante un grupo de enlace. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. (Revisados en Kozlowski A. *et al.* 2001; véase también, Harris JM y Zalipsky S, eds. Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series 680 (1997)). Entre los ejemplos no restrictivos de grupos de unión aceptables se incluyen un grupo éster, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo carboxilo, un grupo hidróxilo, un carbohidrato, un grupo succinimida (incluyendo, sin limitarse a ello, succinato de succinimidilo (SS), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinimida de succinimidilo (SSA) y N-hidroxisuccinimida (NHS)), un grupo epóxido, un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, pero sin limitarse a ello, carbonilimidazol (CDI)), un grupo nitrofenilo (incluyendo, pero sin limitarse a ello, nitrofenil carbonato (NPC) o triclorofenil carbonato (TPC)), un grupo trisilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina o una amina primaria. En ciertas realizaciones, el grupo de unión es un grupo succinimida. En una realización, el grupo de unión es NHS.

[0070] Los análogos de la comsptatina de la presente invención pueden acoplarse de forma alternativa directamente al PEG (esto es, sin grupo de unión) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo. En una realización, el PEG se acopla a un residuo de lisina añadido al extremo C-terminal de la compstatina.

[0071] La PEGilación es una manera de incrementar la retención *in vivo* de las proteínas y péptidos terapéuticos. La depuración *in vivo* de péptidos puede también reducirse uniendo los péptidos a ciertos otros péptidos. Por ejemplo, ciertos péptidos de unión a albúmina muestran una vida media inusualmente larga de 2,3 horas cuando son inyectados mediante bolo intravenoso a conejos (Dennis *et al.,* 2002). Un péptido de este tipo, fusionado con el factor antitisular Fab de D3H44, permitió que Fab se uniese a la albúmina a la vez que retenía la capacidad de Fab para unirse al factor tisular (Nguyen *et al.,* 2006). Esta interacción con la albúmina dio por resultado una depuración *in vivo* significativamente reducida y una vida media extendida en los ratones y conejos, en comparación con el Fab de D3H44 de tipo salvaje, comparable con lo observado para las moléculas de Fab PEGiladas, las inmunoadhesinas y fusiones de albúmina. Tal y como se describe en el Ejemplo 11 del presente documento, los inventores han sintetizado un análogo de la compstatina fusionado con un péptido de unión a albúmina y han demostrado que la proteína de fusión está activa a la hora de inhibir la activación del complemento.

[0072] La actividad de inhibición de la activación del complemento de los análogos de la compstatina, los peptidomiméticos y conjugados puede analizarse mediante una diversidad de ensayos conocidos en la técnica. En una realización preferente, se utiliza el ensayo descrito en el Ejemplo 4. Se expone un listado no exhaustivo de otros ensayos en la patente estadounidense 6.319.897, incluyendo, pero sin limitarse a ello, (1) la unión del péptido a C3 y a fragmentos de C3; (2) diferentes ensayos hemolíticos; (3) medición de la división de C3 mediada por la convertasa de C3; y (4) medición de la división del Factor B mediante el Factor D.

[0073] Los péptidos y peptidomiméticos descritos en el presente documento son de utilidad práctica para cualquier fin para el que se use la compstatina misma, tal y como se conoce en la técnica. Entre tales usos están incluidos, aunque no se limitan a ello: (1) inhibición de la activación del complemento en el suero, tejidos u órganos de un paciente (humano o animal), lo que puede facilitar el tratamiento de ciertas enfermedades o condiciones, incluyendo, pero sin limitarse a ello, la degeneración macular asociada a la edad, la artritis reumatoide, la lesión de la médula espinal, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Alzheimer; (2) inhibición de la activación del complemento que se produce durante el uso de implantes u órganos artificiales (por ejemplo, recubriendo o tratando de otro modo el implante u órgano artificial con un péptido de la invención); (3) inhibición de la activación del complemento que se produce durante la circulación extracorpórea de fluidos fisiológicos (sangre, orina) (por ejemplo, recubriendo los tubos a través de los que se hacen circular los fluidos con un péptido de la invención); y (4) en la criba de bibliotecas de moléculas pequeñas para identificar a otros inhibidores de la activación de la compstatina (por ejemplo, ensayos de alto rendimiento de fase líquida o sólida diseñados para medir la capacidad de un compuesto de prueba para competir con un análogo de la compstatina para unirse con C3 o un fragmento de C3).

[0074] Los ejemplos siguientes se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Tienen la intención de ilustrar, pero no restringir, la invención. Los materiales y métodos expuestos en los Ejemplos 1-5 fueron utilizados para generar los resultados descritos en los Ejemplos 6-11.

EJEMPLO 1
Expresión bacteriana de la compstatina

[0075] Se expresó un análogo de la compstatina con la secuencia siguiente, NH_2-GICVWQDWGAHRCTN-OH ("G(-1)/V4W/H9A/N14") (ID DE SECUENCIA Nº: 15) en fusión con un dominio de unión a quitina y la inteína DnaB (New England Biolabs, Beverly, MA). Guiado por la secuencia peptídica y el uso de codones para E. coli, se utilizó el siguiente código genético para generar un gen sintético para este péptido con la secuencia siguiente:

$^{5'}$ATTTGCGTTTGGCAGGATTGGGGTGCGCACCGTTGCACCAATTAA$^{3'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 29)

[0076] Para clonar el gen sintético en el vector pGEM-T, se diseñaron una región de flanqueo 5' que contenía un sitio *Sap*I y una región de flanqueo 3' que contenía un sitio *Pst*I. Para construir el gen sintético, se diseñaron los cuatro oligonucleótidos superpuestos que se muestran a continuación utilizando el software DnaWorks y se sintetizaron en Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA):

$^{5'}$GGTGGTGCTCTTCCAACGGTATTTGCGTTTGGCAGGA$^{3'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 30)
$^{5'}$TTGGGGTGCGCACCGTTGCACCAATTAACTGCAGG$^{3'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 31)
$^{3'}$CAACGTGGTTAATTGACGTCCGC$^{5'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 32)
$^{3'}$CATAAACGCAAACCGTCCTAACCCCACGCGTGG$^{5'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 33)

[0077] Los fragmentos de ADN superpuestos fueron ensamblados mediante PCR tal y como lo describe Stemmer *et al.,* 1995. El gen resultante fue amplificado utilizando los cebos siguientes:

$^{5'}$CGCCTGCAGTTAATTGGT$^{3'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 34)
$^{5'}$GGTGGTGCTCTTCCAACG$^{3'}$ (ID DE SECUENCIA Nº: 35)

[0078] Los fragmentos amplificados por PCR de la compstatina fueron entonces clonados en el vector pGEM-T, y el clon resultante fue digerido con *Pst*I y *Sap*I. El fragmento PstI-SapI que codificaba el análogo de la compstatina fue subclonado de forma adicional en el vector de expresión pTWIN1, que había sido predigerido con *Pst*I y *Sap*I; la secuencia del clon fue verificada secuenciando el ADN.

[0079] Para expresar el análogo de la compstatina, se cultivaron células ER2566 *E. coli* transformadas con el clon de compstatina en un medio SOB (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$) a 37º C. Cuando se alcanzó OD_{600} de 0,7, se indujo la expresión mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,3 mM, seguido por una incubación adicional a 37º C durante 4 horas. Se recogieron las células mediante centrifugación y se sometieron a lisis mediante sonicación en un tampón B1 (20 mM de tampón de fosfato, pH de 8,5, con 500 mM de NaCl y 1 mM de EDTA) suplementado con 0,2% de Tween-20. El extracto celular fue centrifugado, y la fracción soluble fue aplicada a una columna de unión a quitina (New England Biolabs, Beverly, MA) pre-equilibrada con un tampón B1. La columna se lavó con 100 ml de tampón B1, seguido por un lavado rápido con 3 volúmenes de columna del tampón B2 (50 mM de acetato de amonio, pH de 7,0). La columna fue incubada a temperatura ambiente durante 20 horas, y el péptido fue eluído con un tampón B2, liofilizado y purificado aún más en una columna C18 de CLAP. El péptido purificado fue identificado utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.

EJEMPLO 2

Expresión de análogos del triptófano de la compstatina en *E. coli*

[0080] Para expresar los análogos de la compstatina que contenían derivados del triptófano, el clon de la compstatina pTWIN1 fue transformado en el auxótrofo ER2566 Trp 82. La expresión se llevó a cabo en un medio mínimo M9 suplementado con 1 mM de L-triptófano tal y como se ha descrito anteriormente. Las células fueron cultivadas en OD_{600} de 0,8-1,0, después se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en un medio mínimo fresco que contenía 2 mM del/de los análogo(s) del triptófano deseado(s): 5-fluoro-triptófano, 6-fluoro-triptófano, 7-aza-triptófano o 5-hidroxi-triptófano. Los análogos de la compstatina expresados fueron purificados de forma adicional tal y como se describe en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

Síntesis peptídica

[0081] La síntesis y la purificación peptídicas se llevaron a cabo tal y como describen Sahu *et al.,* 1996; Sahu *et al.,* 2000; y Mallik *et al.,* 2005. En resumen, los péptidos fueron sintetizados en un sintetizador peptídico de Applied Biosystem (modelo 431A) utilizando grupos protectores de cadena lateral estándar y una resina de Fmoc amida. Los péptidos se separaron de la resina mediante incubación durante 3 horas a 22º C con una mezcla de solventes que contenía fenol al 5%, tioanisol al 5%, agua al 5%, etanoditiol al 2,5% y ácido trifluoroacético (TFA) al 82,5%. La

mezcla de la reacción se filtró a través de un embudo fritado, se precipitó con éter frío, se disolvió en acetonitrilo al 50% que contenía TFA al 0,1% y se liofilizó.

[0082] Los péptidos en bruto obtenidos tras la división se disolvieron en acetonitrilo al 10% que contenía TFA al 0,1% y se purificaron utilizando una columna C-18 de fase inversa (Waters, Milford, MA). Se consiguió la oxidación disulfúrica mediante un método de ciclización sobre resina utilizando el reactivo trifluoroacetato de talio (III). Este método elimina los pasos de oxidación en solución diluída y la posterior concentración que requiere mucho tiempo a través de los pasos de liofilización antes de la CLAP de fase inversa. Utilizando este método, no se produjo la formación de multímero y se obtuvo un nivel elevado (~ 90%) de material ciclizado, oxidado o completamente desprotegido. La identidad y la pureza de todos los péptidos fueron confirmadas mediante espectroscopia de masas por desorción láser y CLAP.

[0083] Para la síntesis de los análogos 5-fluoro-triptófano, 1-metil-triptófano y 5-metil-triptófano, se utilizaron derivados de Fmoc-*dl*. La separación de los péptidos enantioméricos se llevó a cabo tal y como lo describen Meyers *et al.,* 1978. La mezcla de *dl* de cada péptido fue separada en péptidos isoméricos *l* y *d* sobre una columna C18 de CLAP de fase inversa utilizando acetonitrilo al 10% en 0,01 M de acetato de amonio, pH de 4,1. La identidad isomérica de los péptidos eluídos fue determinada tratando los péptidos con proteasa V8, seguido de un análisis utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF (MicroMass TOFspec2E).

EJEMPLO 4

Ensayos de inhibición del complemento

[0084] La actividad inhibidora de la compstatina y sus análogos sobre el sistema del complemento fue determinada midiendo su efecto sobre la activación del sistema del complemento mediante inmunocomplejos. La inhibición de la activación del complemento fue evaluada midiendo la inhibición de la fijación de C3 a los complejos de ovoalbúmina-anti-ovoalbúmina en plasma humano normal. Los pocillos de microtitulación fueron recubiertos con 50 µl de ovoalbúmina (10 mg/ml) durante 2 horas a 25º C (durante la noche a 4º C). Los pocillos fueron saturados con 200 µl de BSA a 10 mg/ml durante 1 hora a 25º C y, después, se añadió un anticuerpo anti-ovoalbúmina de conejo para formar un inmunocomplejo mediante el que podía activarse el complemento. A cada pocillo se añadieron directamente treinta microlitros de péptidos a diferentes concentraciones, seguido de 30 µl de una dilución 1:80 de plasma humano. Tras 30 minutos de incubación, se detectó el C3b/iC3b unido utilizando un anticuerpo conjugado con HRP anti-C3 humano de cabra. Se desarrolló el color añadiendo sustrato de ABTS peroxidada y se midió la densidad óptica a 405 nm.

[0085] Los datos de absorbencia obtenidos a 405 nm fueron expresados en % de inhibición basada en la absorbencia correspondiente al 100% de la activación del complemento. El % de inhibición fue determinado contra la concentración peptídica, y el conjunto de datos resultante se ajustó a la función logística dosis-respuesta utilizando el software Origin 7.0. La concentración del péptido que provoca una inhibición del 50% de la deposición de C3b/iC3b se tomó como la IC_{50} y se utilizó para comparar las actividades de diferentes péptidos. Los valores de IC_{50} fueron obtenidos a partir de los parámetros fijados que habían conseguido el valor más bajo de chi-cuadrado.

EJEMPLO 5

Análisis de calorimetría de titulación isotérmica de la interacción de C3 con la compstatina y sus análogos

[0086] Se llevaron a cabo experimentos de calorimetría de titulación isotérmica utilizando el calorímetro Microcal VP-ITC (Microcal Inc, Northampton, MA). Se utilizaron concentraciones proteínicas de 3,5-5 µM y concentraciones peptídicas de 80-200 µM para estos experimentos. Todas las titulaciones se llevaron a cabo en PBS (10 mM de tampón de fosfato con 150 mM de NaCl, pH de 7,4). En cada experimento, la proteína objetivo, C3, se cargó en la célula, y se cargó un péptido en la jeringa. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25º C y para cada experimento, se hicieron inyecciones de 2 µl de péptidos en la célula que contenía la proteína. En cada experimento, se corrigieron las isotermas en bruto con respecto a los calores de la dilución sustrayendo las isotermas que representaban las inyecciones peptídicas en el tampón. Las isotermas resultantes se ajustaron a diferentes modelos dentro del software Origin 7.0, y el modelo que consiguió el valor más bajo de chi-cuadrado se consideró el adecuado para el conjunto de datos correspondiente. Los valores de la entropía y afinidad de unión fueron calculados contra los valores de log P.

EJEMPLO 6

Papel del triptófano en la interacción de C3-compstatina según lo establecido por los análogos de la compstatina con expresión bacteriana

[0087] Se incorporaron a la compstatina cuatro análogos del triptófano diferentes que difieren en la naturaleza química del anillo de indol utilizando un sistema de expresión de la proteína con mediación de la inteína. Después de la expresión, los péptidos fueron purificados en un único paso con un rendimiento final de 2 mg/L de cultivo. Los análogos del triptófano 5-fluoro-triptófano, 6-fluoro-triptófano, 7-aza-triptófano y 5-hidroxi-triptófano también fueron

expresados utilizando el auxótrofo ER2566/Trp 82 como lo indican los perfiles MALDI, y los péptidos resultantes fueron purificados para alcanzar la homogeneidad. La compstatina nativa y los análogos fueron ciclizados *in vivo* a través de un enlace disulfídico, tal y como queda evidenciado por su incapacidad para reaccionar con PHMB. Todos los péptidos fueron purificados de forma adicional sobre una columna C18 de CLAP de fase inversa .

[0088] La actividad del análogo de la compstatina expresado G(-1)N4W/H9A/N14 (ID DE SECUENCIA Nº: 15) mostró una IC_{50} de 1,2 µM, que es similar a la actividad observada para el análogo de Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5). Este resultado indica que la glicina ubicada en el extremo N-terminal del péptido expresado juega un papel similar al del grupo acetilo ubicado en el extremo N-terminal del análogo de Ac-V4W/H9A.

[0089] Todos los análogos expresados de la compstatina excepto el análogo 7-aza-triptófano se vio que estaban activos en las concentraciones analizadas. Sin embargo, el péptido mostraba diferentes niveles de actividad con respecto al análogo de Ac-V4W/H9A (Figura 1; Tabla 2). La compstatina que contenía 6-fluoro-triptófano y 5-fluoro-triptófano así como alanina en la posición 9 mostró una actividad 2,8 y 2,5 veces mayor, respectivamente, que la del análogo de Ac-V4W/H9A.

Tabla 2. Actividad de inhibición del complemento de los péptidos expresados

Péptido expresado	ID DE SECUENCIA Nº:	IC_{50} (µM)	Actividad relativa*
Ac-V4W/H9A[b]	5	1,2	45
G(-1)/V4W/H9A/N14	15	1,2	45
G(-1)/V4(5fW)/W7(5fW)/H9A/N14	16	0,48	112
G(-1)/V4(6fW)/W7(6fW)/H9A/N14	17	0,43	126
G(-1)/V4(5-*OH*[a]-W)/W7(5-*OH*-W)/H9A/N14	27	33	1,6
G(-1)/V4(7-aza-W)/W7(7-aza-W)/H9A/N14	28	122	0,44
*relativa a la actividad del péptido H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH_2 (compstatina, ID DE SECUENCIA Nº: 1) [c] representa el hidroxi [b] péptido sintético			

[0090] Sin estar restringido a ningún mecanismo en concreto, se cree que añadir un átomo de flúor incrementa la actividad del péptido aumentando la hidrofobicidad del anillo de indol. También se investigó la incorporación de los análogos del triptófano menos hidrófobos 5-hidroxi-triptófano y 7-aza-triptófano. En contraste con los resultados con los análogos 5-fluoro y 6-fluoro, los análogos de la compstatina que contenían 5-hidroxi-triptófano mostraron una pérdida 27,5 veces mayor en la actividad en comparación con el análogo de Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5), y el péptido que contenía 7-aza-triptófano no mostró ninguna actividad en las concentraciones analizadas. 7-aza-triptófano se parece al triptófano de la estructura molecular excepto en que posee un átomo de nitrógeno en la posición 7 del anillo de indol en vez de un átomo de carbono. La pérdida de actividad observada en la sustitución de 7-aza-triptófano muestra la importancia relativa de este átomo de carbono.

EJEMPLO 7

<u>Papel de los triptófanos individuales en la interacción de C3-compstatina</u>

[0091] Se utilizó la síntesis peptídica en fase sólida para generar análogos de la compstatina con 5-fluoro-triptófano incorporado de forma selectiva en la posición 4, la posición 7, o en ambas posiciones 4 y 7, con alanina en la posición 9. La síntesis se llevó a cabo utilizando Fmoc-5-fluoro-*dl*-triptófano. Esta reacción produjo una mezcla enantiomérica de los péptidos que portaban 5-fluoro-*d*-triptófano y 5-fluoro-*l*-triptófano. Se sintetizaron tres péptidos diferentes: dos péptidos con una única sustitución independientemente en la posición 4 ó 7 y un péptido con sustituciones en ambas posiciones 4 y 7. Mientras que una mezcla de análogos 5-fluoro-*l*-triptófano y 5-fluoro-*d*-triptófano podría producirse en el caso de la sustitución única, una mezcla de cuatro combinaciones enantioméricas era posible en el caso de la doble sustitución. Cada una de las mezclas peptídicas fue sometida además a CLAP de fase inversa para separar los enantiómeros peptídicos. La identificación de los enantiómeros se llevó a cabo digiriendo los péptidos con proteasa V8 y posteriormente analizando el producto digerido utilizando MALDI. La proteasa V8 se divide en el extremo C-terminal de los residuos de Asp solamente cuando le sigue un *l*-aminoácido. La identificación de los productos de la división en los espectros de masa indicó que el péptido *l*-enantiomérico se eluía primero seguido por la forma *d*, donde no se detectaba ningún fragmento de la división.

[0092] Todos los péptidos, que contenían o bien 5-fluoro-*l*-triptófano o 5-fluoro-*d*-triptófano o ambos, fueron analizados para ver su actividad inhibidora del complemento. El péptido sintético sustituido por 5-fluoro-*l*-triptófano en ambas posiciones mostró una actividad 2,5 veces mayor que la de Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad inhibidora del complemento de los análogos sintéticos de la compstatina que contienen 5-fluoro-1-triptófano

Péptido	ID DE SECUENCIA Nº:	IC_{50} (µM)	Actividad relativa*
Ac-V4W/H9A	5	1,20	45
Ac-V4(5f-/-W)/H9A	18	1,74	31
Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A	19	0,446	121
Ac-V4(5f-/-W)/W7(5f-/-W)/H9A	20	0,482	112
*relativa a la actividad del péptido H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH_2 (compstatina, ID DE SECUENCIA Nº: 1)			

[0093] Los ensayos de inhibición del complemento (Figura 2; Tabla 3) indicaron que (a) la sustitución de 5-fluoro-/-triptófano solo en la posición 4 hizo que el péptido fuera al menos 1,5 veces menos activo que Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5). La sustitución de 5-fluoro-/-triptófano solo en la posición 7 incrementó la actividad 2,7 veces en comparación con Ac-V4W/H9A. La sustitución de 5-fluoro-/-triptófano a la vez en las posiciones 4 y 7 también produjo un incremento en la actividad de 2,5 veces con referencia a Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5). La sustitución de 5-fluoro-d-triptófano en la posición 4 ó 7, o en ambas, hizo que el péptido estuviera inactivo.

EJEMPLO 8

Base termodinámica para el reconocimiento de la compstatina por parte de C3 con mediación del triptófano

[0094] Se utilizó calorimetría de titulación isotérmica para examinar la unión de los péptidos a C3 e investigar la base termodinámica de sus actividades. Los datos calorimétricos obtenidos para la interacción de todos los péptidos con C3 se ajustan al modelo de un "conjunto de sitios" con una estequiometría de cerca de 1. Se cree que la unión de estos péptidos a C3 se produce en una proporción de 1:1. Los parámetros termodinámicos resultantes de estos ajustes se muestran en la Tabla 4. Como resulta evidente a partir de los valores K_d, el péptido con una única sustitución de 5-fluoro-/-triptófano en la posición 7 y una doble sustitución en las posiciones 4 y 7 mostró una unión más estrecha que los análogos de Ac-V4W/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 5) y Ac-V4(5f-/-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 18). Este resultado está conforme con las actividades relativas observadas en el ensayo de inhibición del complemento (Tabla 3), indicando que existe una correlación unión-actividad.

[0095] Todos los péptidos se unieron a C3 con una entalpia negativa y una entropía positiva. Dicha unión es una característica de la interacción de la compstatina con C3. Entre todos los péptidos examinados, el análogo de Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A con sustitución en la posición 7 (ID DE SECUENCIA Nº: 19) mostró una entalpia de unión mayor (ΔH = -21,83, $\Delta\Delta H$ = -3,69) que la de su homólogo de tipo salvaje. El análogo de Ac-V4(5f-/-W)/H9A con sustitución en la posición 4 (ID DE SECUENCIA Nº: 18) se unió a C3 con una entalpia de -16,69 kcal/mol, 1,45 kcal/mol menos que la mostrada por su homólogo de tipo salvaje

[0096] La incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 4 llevó a una pérdida en la entalpia de 1,45 kcal/mol con respecto a la del triptófano en esa posición (Tabla 4). Dado que la única diferencia entre el triptófano y el 5-fluoro-triptófano es el átomo de flúor en C5 del indol, esta pérdida en la entalpia puede atribuirse a la sustitución del hidrógeno por flúor.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos para la interacción de los análogos sintéticos de la compstatina que contienen 5-fluoro-1-triptófano y C3

Péptido	ID DE SECUENCIA Nº:	K_d (µM)	(kcal/mol)					
			ΔH	$\Delta\Delta H$	$-T\Delta S$	$-T\Delta\Delta S$	ΔG	$\Delta\Delta G$
Ac-V4W/H9A	5	0,14	-18,14	0	8,79	0	-9,4	0
Ac-V4(5f-/-W)/H9A	18	0,15	-16,69	1,45	7,39	-1,4	-9,4	0
Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A	19	0,035	-21,83	-3,69	11,56	2,77	-10,25	-1
Ac-V4(5f-/-W)/W7(5f-/-W)/H9A	20	0,017	-17,33	0,81	6,73	-2,06	-10,6	-1,2

[0097] La incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 7 incrementó la entalpia en 3,69 kcal/mol con respecto al tipo salvaje (Tabla 4). Sin limitarse a ningún mecanismo en concreto, se cree que el triptófano en la posición 7

está participando en una interacción entalpicamente favorable como por ejemplo un enlace de hidrógeno. Sustituir uno de los hidrógenos del indol por un átomo de flúor podría fortalecer el carácter de enlace de hidrógeno del indol NH debido al descenso en pK_a. De forma alternativa, el flúor forma un enlace de hidrógeno como resultado de su carácter de donante de electrones, tal y como se ha demostrado en la estructura de la tetradeca(3-fluorotirosil)glutatión transferasa.

[0098] Otra explicación del incremento observado en la entalpia es que una molécula de agua está haciendo puente en la interacción entre el átomo de flúor y un aceptor de hidrógeno en C3, en cuyo caso, deben formarse dos enlaces de hidrógeno (equivalentes a una energía de aproximadamente 4 kcal/mol). El respaldo a esta teoría proviene de la disminución en la entropía observada para la interacción del análogo de Ac-V4W/W7(5fW)/H9A con sustitución en la posición 7 (ID DE SECUENCIA Nº: 19) con respecto al análogo de tipo salvaje (Tabla 4), una disminución que podría producirse por la unión de una molécula de agua adicional en la interfaz. En otros sistemas se han observado interacciones con mediación de agua entre átomos de flúor y otros aceptores del enlace de hidrógeno.

[0099] La unión del análogo con doble sustitución a C3 produjo un cambio en la entalpia de -19,85 kcal/mol, un cambio en la entropía de -9,35 kcal/mol y un cambio en la energía libre de -10,5 kcal/mol. Se cree que la incorporación de 5-fluoro-triptófano simultáneamente en ambas posiciones abroga los efectos de las sustituciones únicas.

EJEMPLO 9

<u>Análogos adicionales de la compstatina</u>

[0100] Incorporación de análogos del triptófano en la posición 4. Se ha mostrado en los Ejemplos 5 y 6 que la sustitución de valina por triptófano en la posición 4 de la compstatina incrementaba su actividad 45 veces. Para investigar aún más el carácter de la interacción con mediación del residuo en la posición 4 durante el curso de la unión de la compstatina a C3, se sustituyó el triptófano en la posición 4 por análogos del triptófano y 2-naftilalanina.

[0101] Se utilizaron ensayos basados en ELISA para analizar la actividad de todos los análogos peptídicos que portaban análogos del triptófano en la posición 4 y alanina en la posición 9. Mientras que la sustitución por 1-metil-triptófano (Ac-V4(1-metil-W)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 23) y 2-naftilalanina (Ac-V4(2Nal)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 7) incrementó la actividad sobre la compstatina 264 y 99 veces, respectivamente, la sustitución por 5-fluoro-triptófano (Ac-V4(5f-/-W)/W7/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 18) y 5-metil-triptófano (Ac-V4(5-metil-W)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 22) dio por resultado una actividad menor; 31 y 67 veces mayor que la actividad mostrada por el péptido de tipo salvaje (Tabla 5). La Figura 3 muestra las curvas inhibitorias que representan la actividad y la Tabla 5 muestra los valores de IC_{50} calculados a partir de las curvas y las actividades relativas de los péptidos en comparación con la actividad de la compstatina original. La Figura 5 muestra las constantes inhibitorias (IC_{50}) trazadas contra los valores del log P de los análogos del triptófano y 2-naftilalanina.

Tabla 5. Actividad inhibidora del complemento de los análogos de la compstatina

Péptido	ID DE SECUENCIA Nº:	IC_{50} (µM)	Actividad relativa*
Ac-V4W/H9A	5	1,20	45
Ac-V4(5f-/-W)/7W/H9A	18	1,74	31
Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A	19	0,446	121
Ac-V4(5f-/-W)/W7(5f-/-W)/H9A	20	0,482	112
Ac-V4W/7(5-metoxi W)/H9A	29	0,46	0,5
AC-V4(5-metoxi W)/7W/H9A	21	0,71	76
AC-V4(5-metil W)/7W/H9A	22	0,81	67
AC-V4(1-metil W)/7W/H9A	23	0,205	264
AC-V4(2-Nal)/W7/H9A	7	0,545	99
AC-V4(1-metil W)/W7(5f-/-W)/H9A	24	0,205	264
* Relativa a la actividad de H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH_2 (compstatina, ID DE SECUENCIA Nº: 1).			

[0102] También se investigó la unión de péptidos de la compstatina utilizando calorimetría de titulación isotérmica. Los datos calorimétricos obtenidos para la interacción de todos los péptidos con C3 se ajustan al modelo de “un

conjunto de sitios" con una estequiometría de cerca de 1 (Figura 4). Este resultado sugiere que la unión de estos péptidos a C3 se produce en una proporción de 1:1. Los parámetros termodinámicos resultado de estos ajustes se muestran en la Tabla 6. Como resulta evidente a partir de los valores Kd, Ac-V4(1-metil-W)/H9A mostró una afinidad de unión más elevada (K_d = 0,015 µM) en comparación con todos los demás péptidos que poseían una única sustitución en la posición 4. La determinación de estos valores contra los valores del log P de los análogos indica que existe una correlación entre la afinidad de unión y el carácter hidrófobo de los análogos del triptófano y 2-naftilalanina. De conformidad con la correlación, la afinidad de unión aumenta con un incremento en la hidrofobicidad del análogo incorporado en la posición 4. Esta observación concuerda con la correlación que se muestra entre log P y las constantes inhibitorias.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos para la interacción de los análogos sintéticos de la compstatina que contienen 5-fluoro-1-triptófano y C3

péptido	**ID DE SECUENCIA Nº:**	**K_d (µM)**	**(kcal/mol)**					
			ΔH	**ΔΔH**	**-TΔS**	**-TΔΔS**	**ΔG**	**ΔΔG**
Tipo salvaje	1	0,14	-18,14	0	8,79	0	-9,4	0
Ac-V4(5f-/-W)/H9A	18	0,15	-16,69	1,45	7,39	-1,4	-9,4	0
Ac-V4(5-metil-W)/H9A	22	0,12	-17,75	0,34	8,2	-0,54	-9,55	-0,15
AC-V4(1-metil-W)/H9A	23	0,015	-17,59	0,81	6,94	-1,85	-10,65	-1,1
AC-V4(2-Nal)/H9A	7	0,11	-14,27	3,87	4,8	-3,99	-9,5	-0,1
AC-V4W/W7(5f-I-W)/H9A	19	0,035	-21,83	-3,69	11,56	2,77	-10,25	-0,8
AC-V4(1-metil-W)/W7(5f-I-W)/H9A	24	0,017	-17,33	0,81	6,73	-2,06	-10,6	-1,2

[0103] Todos los péptidos se unieron a C3 con una entalpia negativa y una entropía positiva, lo que sugiere que la unión está impulsada por la entalpia. Dicha unión es una característica de la interacción de la compstatina con C3. Sin embargo, la unión de estos péptidos está caracterizada por un cambio en la entalpia menor que la del tipo salvaje, y el cambio en la entropía varió hacia un lado favorable. La Figura 5B muestra un gráfico de log P versus -TΔS, que indica que con un incremento en la hidrofobicidad de los análogos incorporados en la posición 4, se favorece más la entropía provocando por tanto un impacto positivo en el cambio de la energía libre.

[0104] Incorporación de análogos del triptófano en la posición 7. Se proponía en el Ejemplo 7 que el triptófano en la posición 7 produce un enlace de hidrógeno con un residuo en C3. Para examinar más aún esta posibilidad, el triptófano en la posición 7 fue sustituido por análogos de triptófano similares a las sustituciones de la posición 4 para dilucidar el carácter de la interacción realizada por el triptófano en esta posición. La sustitución por 5-fluoro-triptófano (Ac-V4W/W7(5f-/-W)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 19) produjo un péptido 121 veces más activo. (Figura 3, Tabla 5). Las sustituciones del triptófano 7 por el análogo 5-metil trp ó 1-metil trp hicieron que la compstatina estuviera inactiva (no se muestran los datos). Por consiguiente, no se observó ninguna correlación entre la actividad y la hidrofobicidad de los análogos del triptófano.

[0105] Las propiedades termodinámicas de los diferentes análogos de Trp 7 fueron investigadas paralelamente mediante calorimetría. (Tabla 6). Dado que no se detectó ninguna unión para los péptidos que contenían o bien 5-metil trp ó 1-metil trp en la posición 7, no existen los parámetros de unión. Solamente el péptido Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 19) se unió a C3. La afinidad de unión era de 0,035 µM, lo que es mayor que la observada para todos los péptidos que tienen un análogo de Trp en la posición 4, excepto el péptido Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23). En contraste con los péptidos que tienen un análogo de Trp en la posición 4, Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 19) se unió a C3 con un cambio en la entalpia de unión altamente favorable (ΔH = -21,83, ΔΔH = -3,69) y un cambio en la entropía desfavorable (-TΔS = 11,56, -TΔΔS = 2,77), lo que sugiere interacciones no covalentes favorables adicionales de carácter polar.

[0106] Los resultados muestran que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 7 da por resultado un incremento en la actividad de la compstatina, mientras que la incorporación de los análogos 5-metil-triptófano y 1-metil-triptófano hace que la compstatina esté inactiva. La pérdida de actividad de la compstatina con la incorporación de 1-metil-triptófano respalda la conclusión de que el enlace de hidrógeno con mediación de N-H de Trp 7 es importante para la interacción de la compstatina con C3. Además, la pérdida completa de actividad de la

compstatina con la incorporación de 5-metil-triptófano sugiere que no se tolera bien un aminoácido hidrófobo en la posición 7.

[0107] Incorporación de análogos del triptófano en las posiciones 4 y 7. Dado que la sustitución de triptófanos en la posición 4 por 1-metil-triptófano y en la posición 7 por 5-fluoro-triptófano producía análogos de la compstatina que mostraban un espectacular incremento en la actividad, se generó un análogo de la compstatina que contenía sustituciones en las posiciones 4 y 7. El péptido resultante (Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-I-W)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 24) generó una curva de inhibición similar a la de la sustitución única con 1-metil-triptófano (Ac-V4(1-metil-W)/H9A) (ID DE SECUENCIA Nº: 23), (Figura 3, Tabla 5). La afinidad de unión (K_d = 0,017) observada para este péptido en el calorímetro es también similar a la de Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23). Estas observaciones sugieren que 5-fluoro-triptófano no tiene ningún efecto en la posición 7 en presencia de 1-metil-triptófano en la posición 4 bajo estas condiciones experimentales.

[0108] Incorporación de otro análogo del triptófano en la posición 4. Para investigar más aún el carácter de la interacción con mediación del residuo en la posición 4 durante el curso de la unión de la compstatina con C3, el triptófano en la posición 4 fue sustituido por el análogo del triptófano 1-formil-triptófano.

[0109] La Figura 6 muestra una comparación del porcentaje de la inhibición del complemento versus la concentración peptídica para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23) (círculos) y Ac-V4(1-formil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 25). Como puede verse, el análogo de 1-formil-W era fundamentalmente idéntico al análogo de 1-metil-W en su actividad de inhibición del complemento.

EJEMPLO 10

PEGilación del análogo de la compstatina

[0110] Una vida media prolongada de la compstatina resulta ventajosa para su uso en tratamientos crónicos. Se ha conseguido extender la vida media de los péptidos terapéuticos analizados en diferentes ejemplos a través de la PEGilación (*véase* Veronese et al., 2001), ya que PEG posee la capacidad de demorar la eliminación de las biomoléculas de la circulación a través de una diversidad de mecanismos, incluyendo disminuir la depuración renal, la proteolisis y la inmunogenicidad. La PEGilación implica la unión covalente de polímeros de PEG a macromoléculas, preferentemente a la amina primaria de las lisinas.

[0111] Este ejemplo describe la elaboración de un análogo de la compstatina PEGilado, Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (ID DE SECUENCIA Nº: 36) y la evaluación del compuesto para ver su capacidad para inhibir la activación del complemento.

[0112] Se adquirió Fmoc-NH-NHS-5000 PEG en Nektar transforming therapeutics, 490 discovery Dr, Huntsville, AL 35806.

[0113] El compuesto Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (ID DE SECUENCIA Nº: 36) fue sintetizado químicamente mediante química peptídica Fmoc en fase sólida de conformidad con un protocolo estándar modificado. En resumen, se disolvió PEG en 3 ml de diclorometano, se añadió manualmente 1 ml de 2M DIEA, y se mezcló el PEG durante 5 minutos.

[0114] Después, se pasó el PEG a un recipiente y se dejó reposar durante toda la noche para que se uniera. El PEG fue entonces desprotegido con piperidina al 20% durante 20 minutos.

[0115] Después, la síntesis prosiguió de conformidad con el protocolo estándar, incorporando una lisina en el extremo C-terminal de la molécula con el propósito de unir el PEG a su cadena lateral.

[0116] Las divisiones finales de los péptidos se consiguieron con el reactivo D (TFA:H2O:TIS:Fenol, 87,5:5:2,5:5) (4 mL) a 25º C durante 90 minutos, para proporcionar el producto deseado. El péptido fue entonces purificado en una columna C18 de CLAP de fase inversa, fue liofilizado y caracterizado mediante MALDI-TOF.

[0117] El análogo PEGilado de la compstatina se analizó en busca de la actividad inhibidora del complemento utilizando el ensayo *in vitro* que se ha descrito en el Ejemplo 4. Tal y como se muestra en la Figura 7, el análogo PEGilado estaba activo a la hora de inhibir la activación del complemento, sin embargo, se necesitó siete veces más conjugado para conseguir la misma cantidad de inhibición que la del análogo no PEGilado, Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23).

EJEMPLO 11

Conjugado proteínico de unión a albúmina del análogo de la compstatina

[0118] Dennis *et al.* (2002) identificaron una serie de péptidos que poseían la secuencia central DICLPRWGCLW (ID DE SECUENCIA Nº: 37) que se unían de forma específica a la albúmina del suero procedente de múltiples especies con una elevada afinidad. Estos péptidos se unían a la albúmina con una estequiometría 1:1 en un sitio diferente de los sitios de unión de pequeñas moléculas conocidos. El péptido SA21 (AcRLIEDICLPRWGCLWEDDNH2; ID DE SECUENCIA Nº: 38) posee una vida media inusualmente larga de 2,3 horas cuando se inyecta mediante bolo intravenoso a conejos. Tal y como se menciona en la Descripción Detallada, una secuencia relacionada, fusionada con el factor antitisular Fab de D3H44 permitió que Fab se uniese a la albúmina con una afinidad similar a la de SA21 a la vez que retenía la capacidad de Fab para unirse al factor tisular 1 (Nguyen *et al.,* 2006). Esta interacción con la albúmina dio por resultado una depuración *in vivo* reducida de 25 a 58 veces en ratones y conejos, respectivamente, en comparación con el Fab de D3H44 de tipo salvaje. La vida media se extendió 37 veces hasta alcanzar las 32,4 horas en los conejos y 26 veces hasta alcanzar las 10,4 horas en los ratones, consiguiendo un 25-43% de la vida media de la albúmina en estos animales. Estas vidas medias exceden las de Fab 2 y son comparables a las observadas en las moléculas de Fab PEGiladas, las inmunoadhesinas y las fusiones de albúmina.

[0119] Este ejemplo describe la síntesis de un análogo de la compstatina fusionado con un péptido de unión a albúmina y su actividad en ensayos *in vitro* para la inhibición del complemento.

[0120] El compuesto 4(1MeW)-ABP fue sintetizado químicamente mediante química peptídica Fmoc en fase sólida de conformidad con los protocolos estándar. Los extremos N y C terminales del péptido fueron protegidos con grupos acetilo y amida. El péptido fue purificado además en una columna C18 de CLAP de fase inversa, fue liofilizado y caracterizado mediante espectrometría de masas MALDI.

[0121] Para la ciclización, el péptido-resina (carga de 0,10 mmol/g basada en un análisis de aminoácidos) fue hinchado en diclorometano (DCM) (2 mL) durante 5 minutos, filtrado y tratado con 94:1:5 de DCM/TFA/TIS (5 mL) a 25º C, 3 veces x 2 minutos cada uno, para desproteger de forma selectiva los grupos protectores S-Mmt, eliminando la presión del solvente N_2. Estos bis(tiol), bis(Acm)-péptido-resina intermedios fueron lavados con CH_2Cl_2, DMF y NMP (cada uno 5 veces x 2 minutos, 2 mL), hinchados adicionalmente en NMP (2 mL) durante 5 minutos y después tratados con Et_3N (2 eq.) en NMP a 25º C durante 4 horas. El péptido-resina fue después lavado con DMF y CH_2Cl_2 (cada uno 5 veces x 2 minutos, 2 mL). Después de las formaciones unidas a la resina del primer bucle, el péptido-resina fue lavado de nuevo con DMF (5 veces x 2 minutos, 2 mL) e hinchado en DMF (2 mL) durante 5 minutos, filtrado y tratado con T1 (tfa)3 (1,5 eq.) en DMF-anisol (4 mL) para ciclizar los segundos bucles disulfuro. Tras agitarlos suavemente a 25º C durante 4 horas, los reactivos de talio fueron extraídos con DMF (8 veces x 2 minutos, 2 mL) y los péptidos-resinas fueron lavados de forma adicional con CH_2Cl_2 (5 veces x 2 minutos, 2 mL). Las divisiones finales del péptido bicíclico se consiguieron con el Reactivo D (TFA:H_2O:TIS:Fenol, 87,5:5:2,5:5) (4 mL) a 25º C durante 90 minutos, para proporcionar el producto deseado. El péptido conjugado resultante (ID DE SECUENCIA Nº: 39) se muestra a continuación.

[0122] El péptido-compstatina de unión a albúmina fue analizado para observar la actividad inhibidora del complemento utilizando el ensayo *in vitro* que se ha descrito en el Ejemplo 4. Tal y como se muestra en la Figura 8, el conjugado estaba activo a la hora de inhibir la activación del complemento, sin embargo, se necesitó siete veces más conjugado para conseguir la misma cantidad de inhibición que el análogo no conjugado, Ac-V4(1-metil-W)/H9A (ID DE SECUENCIA Nº: 23).

Referencias:

[0123]

Babitzke P y Yanofsky C. (1995) Structural features of L-tryptophan required for activation of TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 270: 12452-6.

Beeley N. (1994) Peptidomimetics and small-molecule drug design: towards improved bioavailability and in vivo stability. Trends Biotechnol. 12: 213-6.

Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA y Dougherty DA. (2002) Cation-pi interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT3A) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binging properties of nicotine. Biochemistry. 41: 10262-9.
Dennis MS, Zhang M, Meng YG, Kadkhodayan M, Kirchhofer D, Combs D, Damico LA. (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. J Biol Chem. 277: 35035-43.

Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A y Lambris JD. (1999a) Prolongation of ex vivo-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. Transplant. Proc. 31: 934-5.

Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A y Lambris JD. (1999b) Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. Xenotransplantation. 6: 52-65.

Fiane AE, Videm V, Lambris JD, Geiran OR, Svennevig JL y Mollnes TE. (2000) Modulation of fluid-phase complement activation inhibits hyperacute rejection in a porcine-to-human xenograft model. Transplant. Proc. 32: 899-900.

Furlong ST, Dutta AS, Coath MM, Gormley JJ, Hubbs SJ, Lloyd D, Mauger RC, Strimpler AM, Sylvester MA, Scott CW y Edwards PD. (2000) C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. Immunopharmacology. 48: 199-212.

Hruby VJ. (1993) Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides. Biopolymers. 33: 1073-82.

Kalli KR, Hsu P, Fearon y DT. (1994) Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. Springer Semin. Immunopathol. 15: 417-31.

Katragadda M, Morikis D y Lambris JD. (2004) Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. J. Biol. Chem. 279: 54987-95.

Klepeis JL, Floudas CA, Morikis D, Tsokos CG, Argyropoulos E, Spruce L y Lambris JD. (2003) Integrated computational and experimental approach for lead optimization and design of compstatin variants with improved activity. J. Am. Chem. Soc. 125: 8422-3. Kozlowski A, Charles SA y Harris JM. (2001) Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. BioDrugs. 15: 419-29.

Mallik B, Katragadda M, Spruce LA, Carafides C, Tsokos CG, Morikis D y Lambris JD. (2005) Design and NMR Characterization of Active Analogs of Compstatin Containing Non-Natural Amino Acids. J. Med. Chem. 48: 274-286.

Morikis D, Assa-Munt N, Sahu A y Lambris JD. (1998) Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. Protein Sci. 7: 619-27.

Nguyen A, Reyes AE 2nd, Zhang M, McDonald P, Wong WL, Damico LA, Dennis MS. (2006) The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. Protein Eng Des Sel. 19: 291-7.

Nilsson B, Larsson R, Hong J, Elgue G, Ekdahl KN, Sahu A y Lambris JD. (1998) Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. Blood. 92: 1661-7.

Sahu A, Kay BK y Lambris JD. (1996) Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. J. Immunol. 157: 884-91.

Soulika AM, Khan MM, Hattori T, Bowen FW, Richardson BA, Hack CE, Sahu A, Edmunds LH Jr y Lambris JD. (2000) Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons. Clin. Immunol. 96: 212-21.

Spruce L., E. Argyropoulos, D. Mastellos, G. Sfyroera y J.D. Lambris (2002) Chemical synthesis of small complement proteins and protein modules. International Immunopharmacology. 2: 1320-1321.

Veronese FM. (2001) Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. Biomaterials 22: 405-417.

Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A y Matis LA. (1996) Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8563-8. Zhao B, Helms LR, DesJarlais RL, Abdel-Meguid SS y Wetzel R. (1995) A paradigm for drug discovery using a conformation from the crystal structure of a presentation scaffold. Nat. Struct. Biol. 2: 1131-7.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que inhibe la activación del complemento, que comprende un péptido que posee una secuencia:

Xaa1 – Cys – Val – Xaa2 – Gln – Asp – Xaa3 – Gly – Xaa4 – His – Arg – Cys – Xaa5 (ID DE SECUENCIA Nº: 26);

en la que:

Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ó un dipéptido Gly-Ile;
Xaa2 es Trp ó un análogo de Trp, donde el análogo de Trp posee un carácter hidrófobo incrementado en comparación con Trp y se selecciona de entre un triptófano halogenado, 5-metoxitriptófano, 5-metiltriptófano y 1-metiltriptófano, con la condición de que, si Xaa3 es Trp, Xaa2 sea el análogo de Trp;
Xaa3 es Trp ó un análogo de Trp que posee un hidrógeno del indol sustituido por un átomo de flúor, incrementando así el potencial de enlace de hidrógeno del anillo de indol;
Xaa4 es His, Ala, Phe ó Trp;
Xaa5 es L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido Thr-Asn ó Thr-Ala, ó un tripéptido Thr-Ala-Asn, donde un –OH carboxi-terminal de cualquiera de entre L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ó Asn es sustituido de forma opcional por $–NH_2$; y

los dos residuos de Cys están unidos mediante un enlace disulfúrico.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el análogo de Trp de Xaa2 es 5-fluoro-/-triptófano ó 6-fluoro-/-triptófano.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el análogo de Trp de Xaa2 es 5-metoxitriptófano ó 5-metiltriptófano.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el análogo de Trp de Xaa2 es 1-metiltriptófano.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Xaa4 es Ala.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Xaa2 es 1-metil triptófano, Xaa3 opcionalmente es un análogo de Trp que posee un hidrógeno del indol sustituido por un átomo de flúor y Xaa4 es Ala.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que el análogo de Trp opcional de Xaa3 es 5-fluoro-1-triptófano.

8. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende cualquiera de las ID DE SECUENCIA Nº: 16-24.

9. Un compuesto que inhibe la activación del complemento, que comprende un péptido que posee una secuencia:

Xaa1 – Cys – Val – Xaa2 – Gln – Asp – Xaa3 – Gly – Xaa4 – His – Arg – Cys – Xaa5 (ID DE SECUENCIA Nº: 26);

en la que:

Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ó un dipéptido Gly-Ile;
Xaa2 es Trp ó un análogo de Trp, donde el análogo de Trp es un análogo que posee un sustituyente alcanoilo inferior en la posición 1 del triptófano y tiene un carácter hidrófobo incrementado en comparación con Trp, con la condición de que, si Xaa3 es Trp, Xaa2 sea el análogo de Trp;
Xaa3 es Trp ó un análogo de Trp que es un triptófano halogenado, que es una modificación química de su anillo de indol que incrementa el potencial de enlace de hidrógeno del anillo de indol;
Xaa4 es His, Ala, Phe ó Trp;
Xaa5 es L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido Thr-Asn ó Thr-Ala, ó un tripéptido Thr-Ala-Asn, donde un –OH carboxi-terminal de cualquiera de entre L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ó Asn es sustituido de forma opcional por $–NH_2$; y

los dos residuos de Cys están unidos mediante un enlace disulfúrico.

10. El compuesto de la reivindicación 10, en el que el análogo de Trp de Xaa2 es 1-formiltriptófano y Xaa4 opcionalmente es Ala.

11. El compuesto de la reivindicación 10, que comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 25.

12. El compuesto de las reivindicaciones 9, 10 ú 11, que además comprende un componente peptídico adicional que extiende la retención *in vivo* del compuesto; en el que opcionalmente el componente peptídico adicional es un péptido de unión a albúmina; opcionalmente comprendiendo la ID DE SECUENCIA Nº: 39

13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un péptido producido mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el péptido.

14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto es producido al menos en parte mediante síntesis peptídica.

15. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto está PEGilado; opcionalmente comprendiendo la ID DE SECUENCIA Nº: 36.

16. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que inhibe la activación del complemento con una actividad al menos 100 veces mayor que la de un péptido que comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 1 bajo condiciones de ensayo equivalentes.

17. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 23.

18. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende la ID DE SECUENCIA Nº: 24.

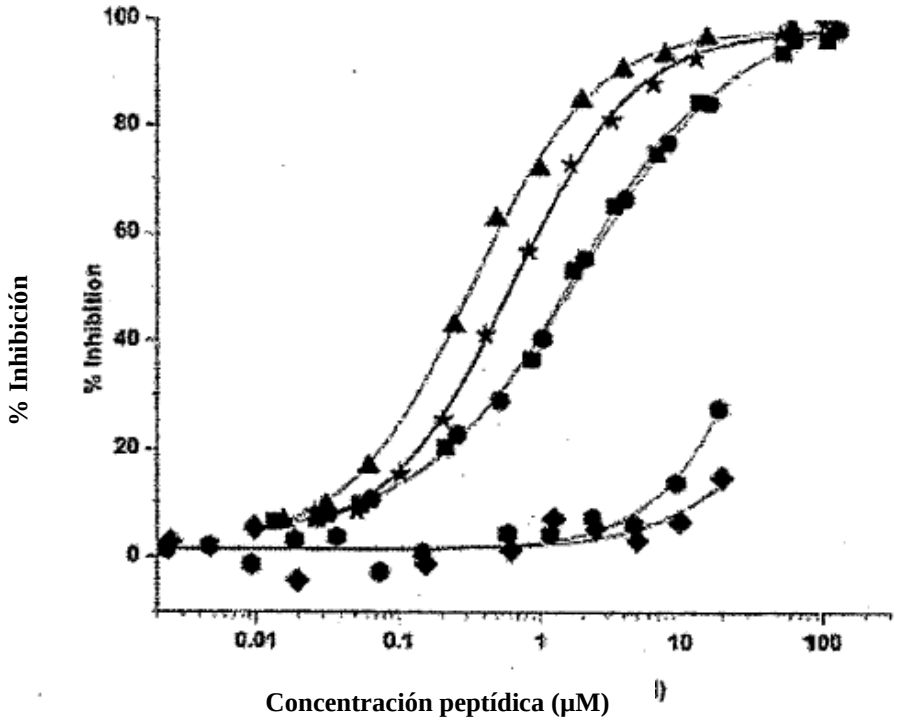
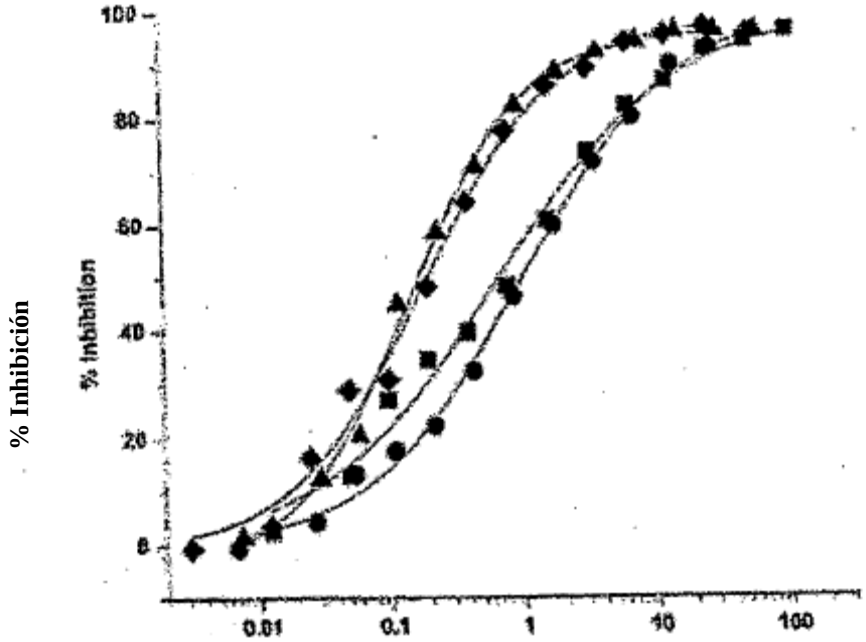

% Inhibición
% Inhibition
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentración peptídica (µM)

Fig. 1



Concentración peptídica (µM)

Fig. 2

Fig. 3a

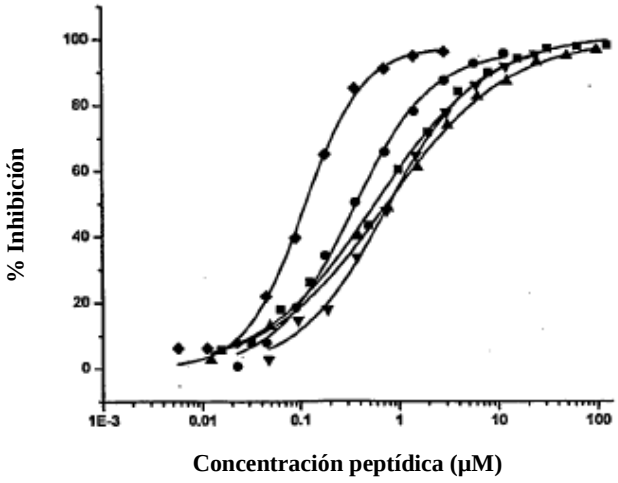


Fig. 3b

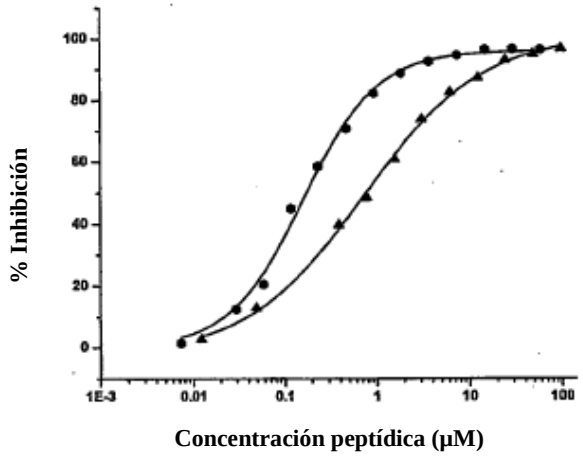
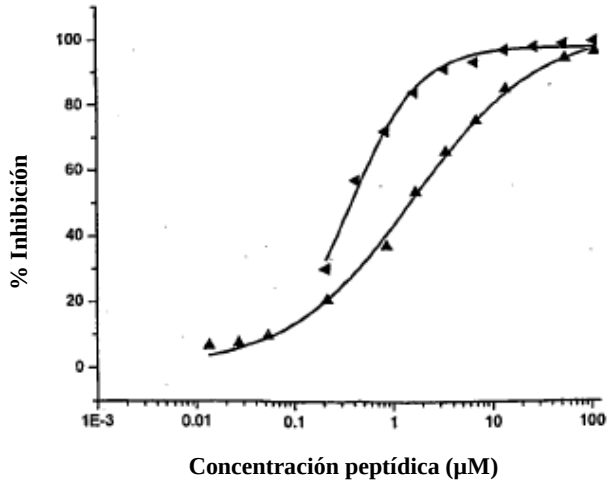


Fig. 3c



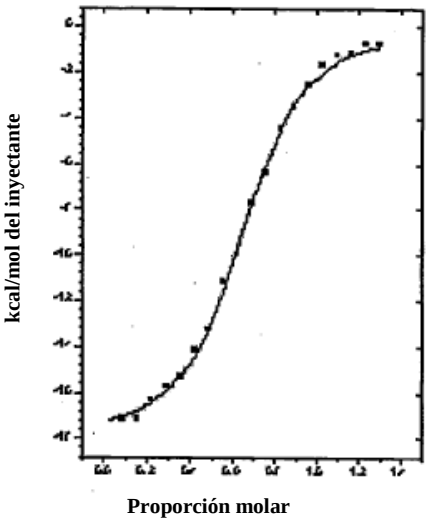


Fig. 4a

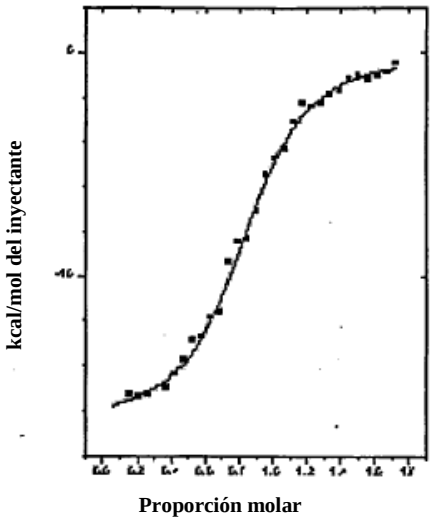
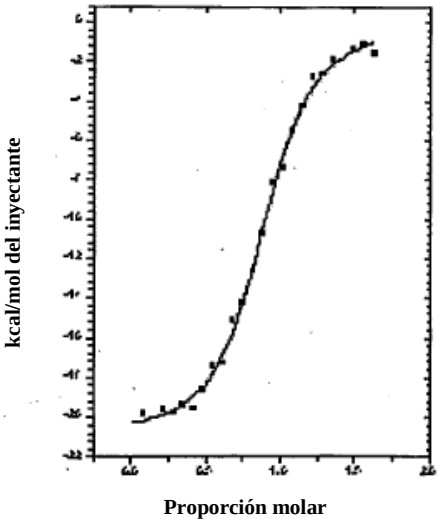


Fig. 4b

Fig. 4c



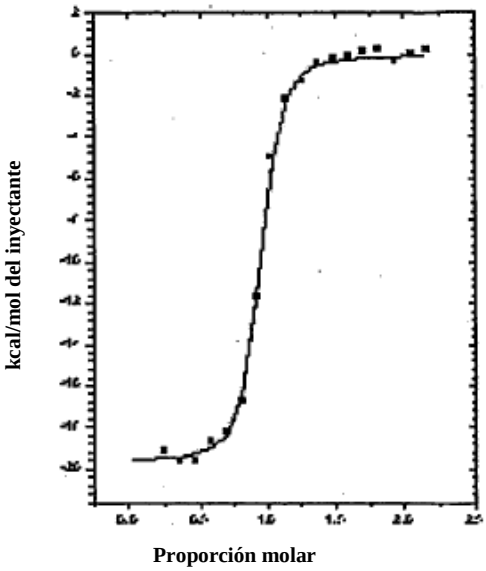


Fig. 4d

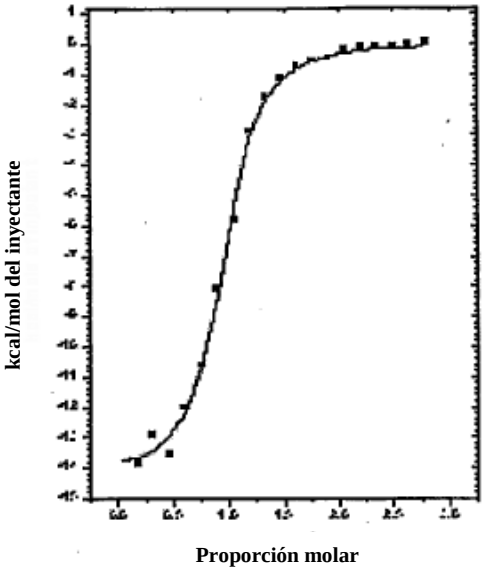


Fig. 4e

Fig. 4f

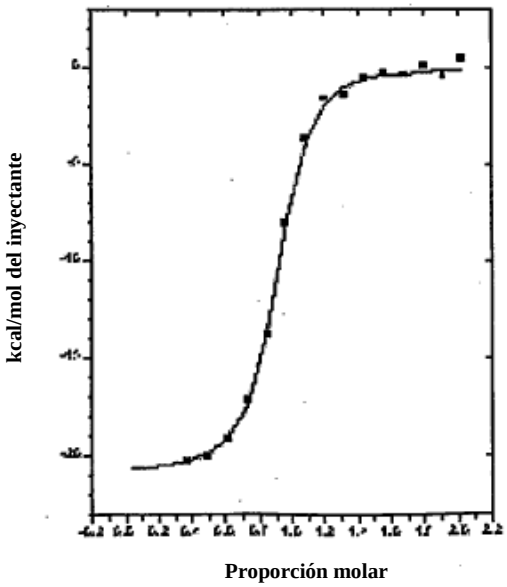


Fig. 5a

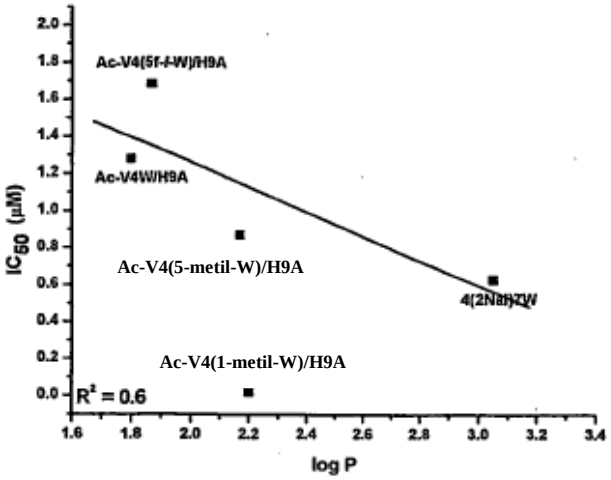


Fig. 5b

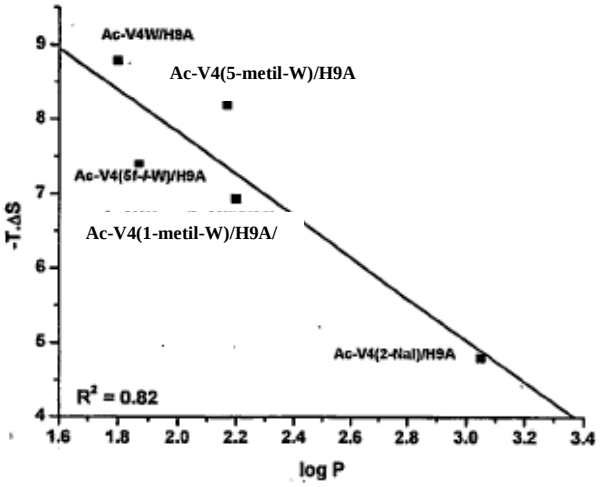
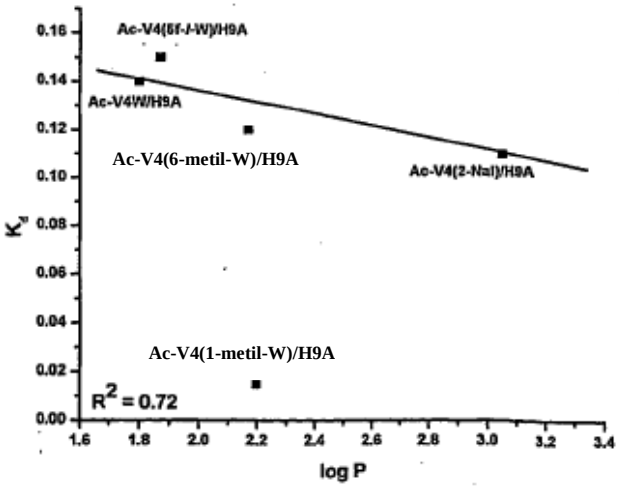


Fig. 5c



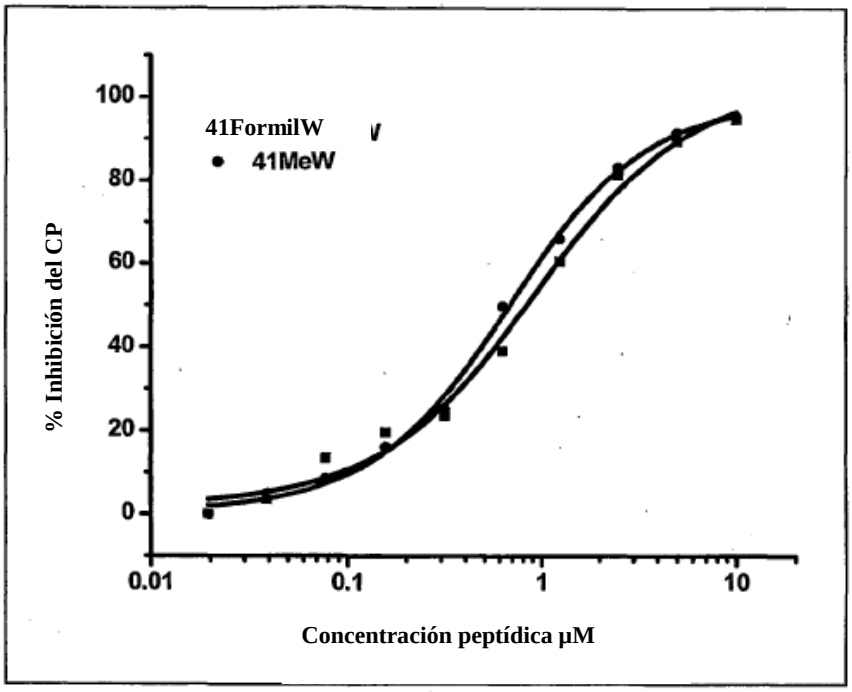

100
80
60
40
20
0
41FormilW
41MeW
% Inhibición del CP
0.01
0.1
1
10
Concentración peptídica µM

FIG. 6

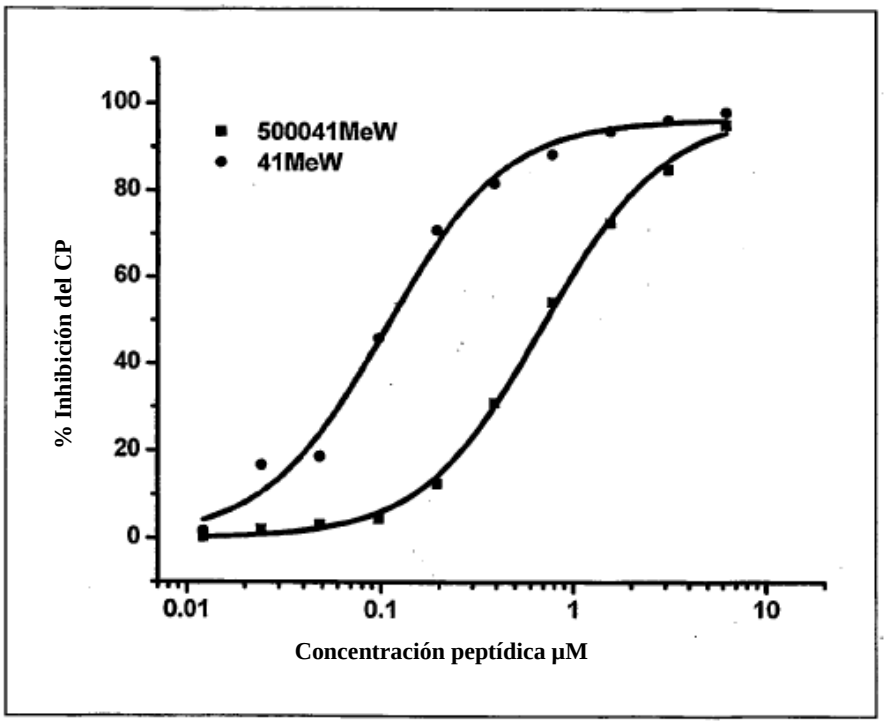

100
80
60
40
20
0
500041MeW
41MeW
% Inhibición del CP
0.01
0.1
1
10
Concentración peptídica µM

FIG. 7

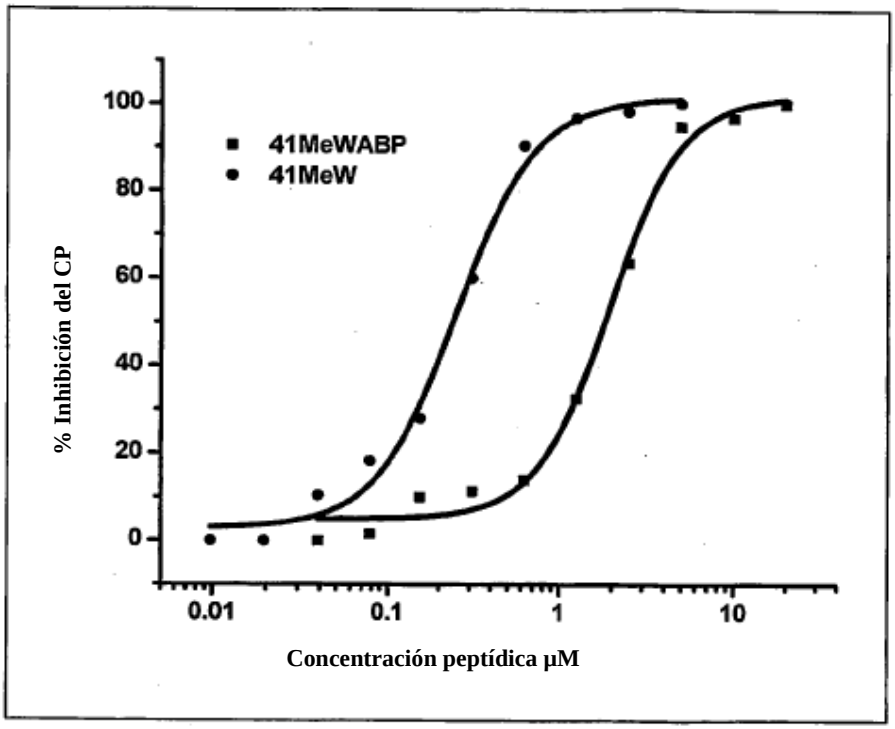

100
80
60
40
20
0
41MeWABP
41MeW
% Inhibición del CP
0.01
0.1
1
10
Concentración peptídica µM

FIG. 8