

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 775**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2008 E 08725157 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2148691**

54 Título: **Análogos de compstatina para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias del sistema respiratorio**

30 Prioridad:

05.02.2007 US 899474 P

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

15.09.2015

73 Titular/es:

**APELLIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6400 Westwind Way, Suite A
Crestwood, KY 40014, US**

72 Inventor/es:

**FRANCOIS, CEDRIC;
DESCHATELETS, PASCAL y
OLSON, PAUL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 545 775 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de compstatina para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias del sistema respiratorio

Antecedentes de la invención

5 El sistema del complemento comprende más de 30 proteínas solubles y unidas a células, y desempeña un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, particularmente en la respuesta del organismo a las infecciones. En ausencia de un evento desencadenante, muchas proteínas del complemento existen principalmente en una forma proenzimática inactiva. Después de la activación, frecuentemente por escisión proteolítica, éstas participan en una cascada enzimática que conduce a varios eventos aguas abajo, tales como lisis de células, bacterias y virus, opsonización y activación de respuestas inmunitarias, tales como inflamación y secreción de citoquinas.

10 La activación del complemento se produce mediante tres vías principales, conocidas como las vías clásica, alternativa y de las lectinas (*Kuby Immunology*, 2000). La vía clásica se desencadena normalmente por unión de un complejo de antígeno y anticuerpo IgM o IgG a C1 (aunque ciertos otros activadores también pueden iniciar la vía). El C1 activado escinde C4 y C2 para producir C4a y C4b, además de C2a y C2b. C4b y C2a se combinan para formar C3 convertasa, la cual escinde C3 para formar C3a y C3b. La unión de C3b a C3 convertasa produce C5 convertasa, la cual escinde C5 en C5a y C5b. C3a, C4a y C5a son anafilotoxinas y median múltiples reacciones en la respuesta inflamatoria aguda. C3a y C5a también son factores quimiotácticos que atraen células del sistema inmunitario, tales como los neutrófilos.

20 La vía alternativa se inicia por superficies microbianas y diversos polisacáridos complejos. En esta vía, C3b, resultante de la escisión de C3, la cual ocurre espontáneamente a un bajo nivel, se une a las dianas, por ejemplo, sobre superficies celulares, y forma un complejo con el factor B, el cual es luego escindido por el factor D, dando como resultado una C3 convertasa. La escisión de C3 y la unión de otra molécula de C3b a la C3 convertasa dan lugar a una C5 convertasa.

25 Las C5 convertasas producidas en ambas vías escinden C5 para producir C5a y C5b. Luego, C5b se une a C6, C7 y C8 para formar C5b-8, el cual cataliza la polimerización de C9 para formar el complejo C5b-9 de ataque a la membrana (MAC). El MAC se inserta dentro de las membranas celulares diana y produce la lisis celular. Pequeñas cantidades de MAC sobre la membrana de las células pueden tener una variedad de consecuencias además de la muerte celular.

30 Una tercera vía del complemento, la vía del complemento de las lectinas se inicia por unión de lectina de unión a manosa (MBL)¹ y serina-proteasa asociada a MBL (MASP) a carbohidratos. En la vía de las lectinas humanas, MASP-1 y MASP-2 están implicadas en la proteólisis de C4, C2 y C3, lo que conduce a una C3 convertasa descrita anteriormente.

35 La actividad del complemento está regulada por miembros de la familia de "los reguladores de activación del complemento" endógenos (RCA), también denominadas "proteínas de control del complemento" (CCP), que incluyen el receptor del complemento tipo 1 (CR1); el receptor C3b:C4b, el receptor del complemento tipo 2 (CR2), la proteína cofactor de membrana (MCP; CD46), el factor de aceleración de la degradación (DAF), el factor H del complemento (fH), la proteína y relacionada con el receptor del complemento (CRRY) y la proteína de unión a C4b (C4bp). Las CCP están caracterizadas por múltiples (normalmente 4-56) restos homólogos conocidos como repeticiones de consenso cortas (SCR, por sus siglas en inglés), módulos de proteína de control del complemento (CCP) o dominios SUSHI (Reid, KBM and Day, AJ, *Immunol Today*, 10:177-80, 1989). Las proteínas de control del complemento regulan negativamente el sistema del complemento, por ejemplo, acelerando la degradación normal de las convertasas y/o funcionando como cofactores para el factor I para escindir enzimáticamente C3b y/o C4b en fragmentos más pequeños.

45 Si bien la activación del complemento desempeña papeles importantes en los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, el sistema del complemento es reconocido cada vez más como implicado en el daño a tejidos durante una variedad de enfermedades isquémicas, inflamatorias y autoinmunitarias (Makrides, SC, *Pharm Rev.*, 50(1): 59-87, 1998; Lischewski, MK and Atkinson, JP, en *The Human Complement System in Health and Disease*, Volanakis, JE and Frank, MM, eds., Dekker, New York, pp. 149-66, 1998). Se ha propuesto la inhibición del complemento como una estrategia terapéutica para muchas de dichas enfermedades. Desafortunadamente, varios inhibidores del complemento han sido menos satisfactorios en la clínica que lo que se había esperado. No obstante, la inhibición del complemento continúa siendo una opción atractiva. Por lo tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de nuevas composiciones y métodos para aprovechar productivamente la inhibición del complemento como una modalidad terapéutica para una variedad de trastornos mediados por complemento.

Sumario de la invención

¹ Todas las abreviaturas empleadas en esta memoria son las correspondientes a las expresiones en inglés por ser de amplio uso internacional, con excepción de las ampliamente acreditadas en español como EPOC= enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SNC = Sistema nervioso central; CI = concentración inhibidora ; RMN = resonancia magnética nuclear...

- 5 La presente invención se refiere a las necesidades anteriores, entre otras. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un análogo de compstatina que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia central de X'aa—Gln—Asp—Xaa—Gly (SEQ ID NO:3), donde X'aa y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp, para uso en el tratamiento de un estado inflamatorio del sistema respiratorio, en donde el análogo de compstatina es para administrar directamente al tracto respiratorio.
- Las características preferidas de la invención se establecen en las reivindicaciones dependientes de la presente memoria.
- 10 Se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno mediado por el complemento, que comprende la etapa de: administrar un inhibidor del complemento directamente a un lugar extravascular que es un sitio de activación local del complemento en dicho trastorno. El inhibidor del complemento puede inhibir una actividad enzimática o la activación de una proteína soluble del complemento, tal como C3, factor B o factor D. El inhibidor del complemento puede ser un análogo de compstatina. El inhibidor del complemento puede administrarse en una formulación o dispositivo de liberación prolongada. La formulación de liberación prolongada puede comprender una pluralidad de micropartículas o nanopartículas. La formulación de liberación prolongada puede comprender un gel. 15 La formulación de liberación prolongada puede comprender un gel que se forma en el organismo después de la administración de un líquido que contiene el inhibidor del complemento.
- También se describe en la presente memoria una composición de liberación prolongada que comprende un inhibidor del complemento y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: agentes anti-inflamatorios esteroideos o no esteroideos, agentes anestésicos locales, leucotrienos o antagonistas del receptor de leucotrienos, citoquinas o 20 antagonistas del receptor de citoquinas, inhibidores de metaloproteasas de la matriz, inhibidores de fosfodiesterasas, antihistaminas, antiangiogénicos y agentes anti-infecciosos.
- También se describe en la presente memoria un método para tratar un estado inflamatorio del sistema respiratorio, que comprende administrar un inhibidor del complemento directamente al tracto respiratorio, donde dicho inhibidor del complemento se administra en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la activación de un componente del complemento producido localmente, o en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la activación local del complemento. El estado inflamatorio del sistema respiratorio se puede seleccionar del grupo que consiste en: asma, EPOC, rinitis alérgica e inflamación asociada a una infección. 25
- También se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno mediado por el complemento, que comprende administrar una formulación de liberación prolongada que comprende una cantidad eficaz de un análogo de compstatina a un lugar extravascular donde ocurre la activación del complemento, en el que dicho lugar no es un ojo. 30
- También se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno mediado por el complemento, que comprende administrar una formulación de liberación prolongada, que comprende una cantidad eficaz de un análogo de compstatina a un lugar extravascular donde ocurre la activación del complemento, en el que dicho lugar no es un ojo. 35
- En los métodos anteriormente mencionados, la administración local del inhibidor del complemento puede no inhibir sustancialmente la actividad sistémica del complemento.
- También se describe en la presente memoria una formulación o dispositivo de liberación prolongada, que comprende un material biodegradable que libera fármacos, un inhibidor del complemento y un resto detectable. El resto detectable puede ser fluorescente o un potenciador de contraste de ultrasonido o resonancia magnética. Además, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto, que comprende: (a) administrar al sujeto la primera cantidad de una primera formulación o dispositivo biodegradable de liberación prolongada, que comprende un resto detectable y un agente terapéutico, tal como un inhibidor del complemento, y (b) detectar el resto detectable 40 utilizando un método de detección no invasivo. La presencia y/o la cantidad del resto detectado puede servir como una indicación de la cantidad de la formulación o dispositivo de liberación prolongada que permanece intacta o que se ha degradado y/o sirve como una indicación de la cantidad del agente terapéutico que permanece en la formulación o dispositivo de liberación prolongada; y el método comprende, opcionalmente, (c) administrar al sujeto una segunda cantidad de una segunda formulación o dispositivo de liberación prolongada, en base a los resultados de la etapa (b). Las etapas (b) y (c) se pueden repetir una o más veces. 45
- También se describen en la presente memoria formulaciones y dispositivos de liberación prolongada, en el que la mejora comprende el uso de un inhibidor del complemento como agente activo. El inhibidor del complemento puede ser un análogo de compstatina. 50
- También se describe en la presente memoria un método para administrar un inhibidor del complemento a un sujeto, comprendiendo el método administrar una formulación de liberación prolongada, que comprende el inhibidor del complemento, a un lugar extravascular dentro de, o sobre, el cuerpo del sujeto. 55
- También se describen métodos para ensayar las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, *in vitro* o en un modelo animal.

También se describen métodos para preparar las composiciones descritas en la presente memoria.

A menos que se indique de otro modo, la invención hace uso de métodos estándares de biología molecular, química, cultivo celular, mantenimiento animal, exámenes médicos y veterinarios, y administración de agentes terapéuticos a sujetos, etc., y utiliza el significado de los términos aceptados en el estado de la técnica.

5 En la presente memoria se hace referencia a las siguientes publicaciones:

Current Protocols in Molecular Biology, *Current Protocols in Immunology*, *Current Protocols in Protein Science* y *Current Protocols in Cell Biology*, todos de John Wiley & Sons, N.Y., edición de julio de 2002; Sambrook, Russell, and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Kuby *Immunology*, 4th ed., Goldsby, R.A., Kindt, T.J., and Osborne, B. (eds.), W.H. Freeman; 2000, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Ed., McGraw Hill, 2001, Katzung, B. (ed.) *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill/Appleton & Lange; 9th edition (diciembre de 2003); Goldman & Ausiello, *Cecil Textbook of Medicine*, 22nd ed., W.B. Saunders, 2003. Se apreciará que el estado de la técnica puede haber progresado más allá de lo representado en ciertas referencias citadas en la presente memoria. En el caso de conflicto o inconsistencia entre cualquiera de las referencias y la presente descripción, prevalecerá esta descripción, a menos que se modifique mediante enmienda, entendiéndose que la determinación de si existe o no un conflicto o una inconsistencia dependerá del criterio de los inventores, y que puede determinarse en cualquier momento. En la presente memoria se utilizan las abreviaturas aceptadas en el estado de la técnica para los aminoácidos, a menos que se indique de otro modo.

Definiciones

20 Los términos "inhibidor de angiogénesis" y "agente antiangiogénico" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a agentes que son capaces de inhibir o reducir uno o más procesos asociados con la formación, crecimiento y/o desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, incluyendo, aunque sin limitación, proliferación de células endoteliales, migración de células endoteliales y formación de tubos capilares. Además, dichos agentes pueden inhibir la exudación de fluidos desde los vasos sanguíneos.

25 El término "antagonista" se refiere a un compuesto que inhibe (por ejemplo, antagoniza, reduce, disminuye, bloquea o revierte) el efecto de una proteína dada. Un antagonista es capaz de actuar de una manera en relación con la actividad de una proteína particular, de modo que la actividad biológica de la proteína sea disminuida o bloqueada de una manera que es antagonística (por ejemplo, en contra de, opuesto a, contrario a) a una o más acciones naturales de la proteína. Los antagonistas pueden incluir, aunque sin limitación, un anticuerpo o uno de sus fragmento de unión a antígenos, una proteína, un péptido, un ácido nucleico (tales como agentes de RNAi, ribozimas y antisentido), o una molécula pequeña.

35 El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus derivados que contiene un dominio de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, por ejemplo, humano, de roedor, de conejo, de cabra, de pollo, etc. El anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, o sus subclases, tales como IgG1, IgG2, etc. En diversas realizaciones de la invención, el anticuerpo es un fragmento, tal como Fab', F(ab')₂, scFv (variable monocatenaria) o cualquier fragmento que retiene un sitio de unión a antígeno, o un fragmento scFv producido recombinantemente, incluyendo fragmentos producidos recombinantemente. Véase, por ejemplo, Allen, T., *Nature Reviews Cancer*, Vol. 2, 750-765, 2002, y las referencias citadas en dicho texto. El anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o "humanizado" en el cual, por ejemplo, un dominio variable de origen murino está fusionado a un dominio constante de origen humano, reteniendo así la especificidad del anticuerpo murino. El dominio de origen humano no necesita originarse directamente a partir de un ser humano en el sentido de que sea primero sintetizado en un ser humano. En cambio, los dominios "humanos" pueden ser generados en roedores, cuyo genoma incorpora genes de inmunoglobulinas humanas. Véase, por ejemplo, Vaughan, et al., (1998), *Nature Biotechnology*, 16: 535-539. El anticuerpo puede estar parcial o completamente humanizado. Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, aunque para los fines de la presente invención, generalmente se prefieren los anticuerpos monoclonales. Se conocen en el estado de la técnica métodos para producir anticuerpos que específicamente se unen a virtualmente cualquier molécula de interés. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o policlonales se pueden purificar a partir de sangre o fluido ascítico de un animal que produzca el anticuerpo (por ejemplo, después de exposición natural, o de inmunización con la molécula o uno de sus fragmentos antigénicos), y se pueden producir utilizando técnicas recombinantes en cultivo celular u organismos transgénicos, o se pueden preparar al menos en parte por síntesis química.

50 Los términos "aproximadamente" o "alrededor de" en referencia a una cantidad, incluyen generalmente los números que caen dentro de un intervalo del 5% en ambas direcciones del número (mayor o menor que el número) a menos que se indique de otro modo o que sea de otro modo evidente del contexto (excepto cuando dicho número pudiera inaceptablemente exceder el 100% de un valor posible).

"Biocompatible" se utiliza de acuerdo con su uso en la técnica y se refiere a un material que es sustancialmente no tóxico para las células *in vitro*, por ejemplo, en ciertas realizaciones, si su adición a células en cultivo en cantidades

que se aproximan a las contempladas para uso *in vivo*, da como resultado menos o igual al 20% de muerte celular. Un material se considera biocompatible con respecto a un receptor si es sustancialmente no tóxico para las células y los tejidos del receptor en las cantidades y lugares utilizados, y si no induce ni causa un efecto perjudicial o inadecuado significativo en el cuerpo del receptor, por ejemplo, una reacción inmunológica o inflamatoria, formación de tejido cicatrizal inaceptable, etc.

"Biodegradable" significa que un material es capaz de ser degradado física y/o químicamente dentro de las células o dentro de un lugar extracelular, tal como un compartimento en el cuerpo de un sujeto, por ejemplo, por hidrólisis bajo condiciones fisiológicas, por procesos biológicos naturales, tales como la acción de enzimas presentes dentro de las células o dentro del cuerpo, etc., para formar especies químicas más pequeñas que pueden ser metabolizadas y, opcionalmente, reutilizadas y/o excretadas o desechadas de otra forma. Los materiales que se erosionan, se disgregan o se deterioran en fragmentos más pequeños, por ejemplo, moléculas solubles o complejos supramoleculares, bajo condiciones fisiológicas, están incluidos dentro del alcance de materiales "biodegradables". Preferiblemente, un material biodegradable es biocompatible.

Una "macromolécula biológica" es una molécula grande compuesta de subunidades más pequeñas de un tipo que se encuentra en los sistemas biológicos. Los ejemplos de macromoléculas biológicas incluyen polipéptidos, ácidos nucleicos y polisacáridos. Normalmente, una macromolécula biológica contiene al menos 3 subunidades (por ejemplo, aminoácidos, nucleósidos, monosacáridos, etc.). La macromolécula biológica puede ser, aunque no necesariamente, un polipéptido, un ácido nucleico o un polisacárido natural. La macromolécula biológica puede estar modificada, por ejemplo, puede estar conjugada a una molécula no biológica, tal como un polímero sintético, etc.

Un "componente del complemento" o "proteína del complemento" es una molécula que está implicada en la activación del sistema del complemento o participa en una o más actividades mediadas por el complemento. Los componentes de la vía clásica del complemento incluyen, por ejemplo, C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y el complejo C5b-9, también denominado el complejo de ataque a la membrana (MAC) y fragmentos activos o productos de escisión enzimática de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, etc.). Los componentes de la vía alternativa incluyen, por ejemplo, los factores B, D, H e I, y properdina, siendo el factor H un regulador negativo de la vía. Los componentes de la vía de las lectinas incluyen, por ejemplo, MBL2, MASP-1 y MASP-2. Los componentes del complemento también incluyen receptores unidos a células para los componentes solubles del complemento. Dichos receptores incluyen, por ejemplo, receptor de C5a (C5aR), receptor de C3a (C3aR), receptor 1 del complemento (CR1), receptor 2 del complemento (CR2), receptor 3 del complemento (CR3), etc. Se apreciará que la expresión "componente del complemento" no pretende incluir las moléculas y estructuras moleculares que sirven como "desencadenantes" para la activación del complemento, por ejemplo, complejos antígeno-anticuerpo, estructuras extrañas que se encuentran en las superficies microbianas o artificiales, etc.

"Administración simultánea" como se utiliza en la presente memoria con respecto a dos o más agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, es la administración que se lleva a cabo utilizando dosis e intervalos de tiempo tales que los agentes administrados estén presentes juntos dentro del cuerpo, por ejemplo, en uno o más sitios de acción en el cuerpo, durante un intervalo de tiempo en cantidades no despreciables. El intervalo de tiempo puede ser de minutos (por ejemplo, al menos 1 minuto, 1-30 minutos, 30-60 minutos), horas (por ejemplo, al menos 1 hora, 1-2 horas, 2-6 horas, 6-12 horas, 12-24 horas), días (por ejemplo, al menos 1 día, 1-2 días, 2-4 días, 4-7 días, etc.), semanas (por ejemplo, al menos 1, 2 o 3 semanas, etc.). De esta manera, los agentes pueden administrarse juntos, aunque no necesariamente, como parte de una única composición. Además, los agentes pueden administrarse, aunque no es necesario, esencialmente de modo simultáneo (por ejemplo, con menos de 5 minutos, o con menos de 1 minuto de separación) o con un corto tiempo entre sí (por ejemplo, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 10 minutos, aproximadamente 5 minutos entre sí). De acuerdo con diversas realizaciones de la invención, los agentes administrados con dichos intervalos de tiempo se pueden considerar como administrados sustancialmente al mismo tiempo. En ciertas realizaciones de la invención, los agentes administrados simultáneamente están presentes en concentraciones eficaces dentro del cuerpo (por ejemplo, en la sangre y/o en el sitio de activación local del complemento) durante el intervalo de tiempo. Cuando se administran simultáneamente, la concentración eficaz de cada uno de los agentes necesaria para inducir una respuesta biológica particular puede ser menor que la concentración eficaz de cada agente cuando se administran solos, permitiendo así una reducción en la dosis de uno o más de los agentes en relación con la dosis que se necesitaría si el agente se administrara como un único agente. Los efectos de agentes múltiples pueden ser, aunque no necesariamente, aditivos o sinérgicos. Los agentes se pueden administrar múltiples veces. La concentración no despreciable de un agente puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de la concentración que sería necesaria para inducir una respuesta biológica particular, por ejemplo, una respuesta biológica deseada.

Una "cantidad eficaz" de un agente activo, tal como un inhibidor del complemento, se refiere a la cantidad del agente activo suficiente para inducir una respuesta biológica deseada (o, equivalentemente, para inhibir una respuesta biológica no deseada). Como podrán apreciar los expertos en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que es eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente que se ha de suministrar, el tejido diana, etc. Los expertos en la técnica comprenderán además que una "cantidad eficaz" se puede administrar en una única dosis, o se puede lograr por administración de múltiples dosis. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para aliviar al menos un síntoma de un trastorno. Dependiendo del

trastorno en particular, el síntoma puede ser, por ejemplo, dolor, inflamación, limitación del movimiento, tos, falta de aire, hiperproliferación, comezón, etc. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para frenar el progreso de un trastorno crónico y progresivo, por ejemplo, para aumentar el tiempo antes de que se manifiesten uno o más síntomas o signos del trastorno, o para aumentar el tiempo antes de que el individuo que sufre el trastorno alcance cierto nivel de discapacidad. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para permitir una recuperación más rápida o mayor, a partir de un daño, que se produciría en ausencia del agente.

"Sólidos de colágeno fibrilar" significa el contenido sólido de colágeno seco del colágeno fibrilar. El colágeno fibrilar es un material de colágeno insoluble donde las moléculas de colágeno interactúan para formar microfibrillas que se añaden entre sí por asociación lado a lado y extremo a extremo, para formar fibrillas de colágeno estabilizadas.

"Proteína de fusión" se utiliza en la presente memoria como en la técnica, para referirse a un polipéptido que contiene dos o más polipéptidos diferentes o sus porciones unidos para formar una única cadena polipeptídica. Un polinucleótido recombinante que codifica una proteína de fusión se puede crear eliminando el codón de parada del polinucleótido que codifica el primer polipéptido y añadiendo un polinucleótido que codifica el segundo polipéptido, en marco, de modo que el polinucleótido recombinante resultante codifique un único polipéptido que comprenda los dos polipéptidos.

"Identidad" se refiere al grado en el que la secuencia de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos es la misma. El porcentaje de identidad entre una secuencia de interés y una segunda secuencia en una ventana de evaluación, por ejemplo, en la longitud de la secuencia de interés, se puede computar alineando las secuencias, determinando el número de residuos (nucleótidos o aminoácidos) dentro de la ventana de evaluación que están opuestos a un residuo idéntico, permitiendo la introducción de huecos para maximizar la identidad, dividiendo por el número total de residuos de la secuencia de interés o de la segunda secuencia (la que sea mayor) que caen dentro de la ventana y multiplicando por 100. Por hueco se entiende una porción de una secuencia que no está ocupada por un residuo. Por ejemplo, la secuencia A K L --- S I G (SEQ ID NO: 1) contiene un hueco de tres residuos. Cuando se computa el número de residuos idénticos necesarios para alcanzar un porcentaje de identidad particular, las fracciones deben redondearse al número entero más cercano. El porcentaje de identidad se puede calcular con el uso de una variedad de programas de ordenador conocidos en la técnica. Por ejemplo, los programas de ordenador tales como BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, etc., generan alineamientos y proporcionan porcentajes de identidad entre una secuencia de interés y secuencias en cualquiera de una variedad de bases de datos públicas. El algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:22264-2268, 1990) modificado como en Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, 1993 está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990). Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (Altschul, et al. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos. Se puede utilizar una matriz PAM250 o BLOSUM62. Véase, para estos programas, la página web que tiene la URL www.ncbi.nlm.nih.gov. En una realización específica, el porcentaje de identidad de una secuencia de interés y una segunda secuencia se calcula utilizando BLAST2 con los parámetros por defecto.

El término "aislado" significa: 1) separado de al menos algunos de los componentes con los cuales está normalmente asociado en la naturaleza; 2) preparado o purificado mediante un proceso que implica la mano del hombre; y/o 3) que no aparece en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula que es retirada de una célula que la produce, está "aislada". Una molécula químicamente sintetizada está "aislada".

El término "unido", cuando se utiliza con respecto a dos o más restos, significa que los restos están físicamente asociados o conectados uno con otro, formando una estructura molecular que es suficientemente estable como para que los restos permanezcan asociados bajo las condiciones en las cuales se forma el enlace y, preferiblemente, bajo las condiciones en las cuales se utiliza la nueva estructura molecular, por ejemplo, condiciones fisiológicas. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, la unión es una unión covalente. En otras realizaciones, la unión es no covalente. Los restos pueden estar unidos ya sea directa o indirectamente. Cuando dos restos están unidos directamente, están ya sea enlazados covalentemente uno con otro o están suficientemente próximos como para que las fuerzas intermoleculares entre los dos restos mantengan su asociación. Cuando dos restos están unidos indirectamente, están unidos ya sea covalentemente o no covalentemente a un tercer resto, que mantiene la asociación entre los dos restos. En general, cuando se refiere a que dos restos están unidos por un "enlazador" o "resto enlazador" o "porción enlazadora", la unión entre los dos restos unidos es indirecta y normalmente cada uno de los restos unidos está covalentemente enlazado al enlazador. El enlazador puede ser cualquier resto adecuado que reacciona con los dos restos que han de ser unidos en un período de tiempo razonable, bajo condiciones consistentes con la estabilidad de los restos (los cuales pueden protegerse como sea apropiado, dependiendo de las condiciones), y en cantidad suficiente para producir un rendimiento razonable.

Los "liposomas" son partículas esféricas microscópicas artificiales formadas por una bicapa lipídica (o multicapas) que encierran un compartimento acuoso. Los liposomas pueden utilizarse para suministrar ciertas composiciones de la invención.

"Administración local" o "suministro local", en referencia al suministro de una composición o agente, se refiere al

suministro que no se basa en el transporte de la composición o agente hacia su tejido o sitio diana pretendido mediante el sistema vascular. La composición o agente puede suministrarse directamente a su tejido o sitio diana pretendido, o a su proximidad, por ejemplo, muy próxima al tejido o sitio diana pretendido. Por ejemplo, la composición puede suministrarse por inyección o implantación de la composición o agente o por inyección o implantación de un dispositivo que contiene la composición o agente. Después de la administración local en la proximidad de un tejido o sitio diana, la composición o agente, o uno o más de sus componentes, se puede difundir hacia el tejido o sitio diana pretendido. Se comprenderá que una vez que haya sido suministrada localmente una fracción de un agente terapéutico (normalmente solo una fracción minoritaria de la dosis administrada) puede entrar en el sistema vascular y ser transportado a otro lugar, incluyendo el retorno a su tejido o sitio diana pretendido.

La "activación local del complemento" se refiere a la activación del complemento que ocurre fuera del sistema vascular.

Un "marcador", para los fines de la descripción de la invención, se puede referir a cualquier resto (por ejemplo, proteína, péptido, mRNA u otras especies de RNA, DNA, lípido, carbohidrato) que caracteriza, indica o identifica un estado fisiológico o de enfermedad particular (por ejemplo, apoptótico, canceroso, normal) o caracteriza, indica o identifica uno o más tipos de célula, tipos de tejido u origen embrionario. La presencia o ausencia de cierto(s) marcador(es), o la cantidad de cierto(s) marcador(es), puede indicar un estado particular fisiológico o de enfermedad de un paciente, órgano, tejido o célula. Un marcador celular es un marcador que se encuentra en o sobre una célula. Un marcador celular puede, aunque no necesariamente, ser específico del tipo celular. Por ejemplo, un marcador específico del tipo celular es generalmente una proteína, un péptido, un mRNA, un lípido o un carbohidrato, que está presente a un nivel superior sobre o en un tipo celular particular o tipos celulares de interés, que en o sobre muchos otros tipos celulares. En algunos ejemplos, un marcador específico del tipo celular está presente a niveles detectable solamente sobre o en un tipo celular particular de interés. Sin embargo, se apreciará que los marcadores útiles no necesitan ser absolutamente específicos para el tipo celular de interés. En general, un marcador específico del tipo celular para un tipo celular particular se expresa a niveles al menos 3 veces mayores en ese tipo celular que en una población de células de referencia que puede consistir, por ejemplo, en una mezcla que contiene células de una pluralidad (por ejemplo, 5-10 o más) de diferentes tejidos u órganos en cantidades aproximadamente iguales. El marcador específico del tipo celular puede estar presente a niveles al menos 4-5 veces, entre 5-10 veces o más de 10 veces mayores que su expresión media en una población de referencia. Preferiblemente, la detección o medición de un marcador específico del tipo celular hace posible distinguir el tipo o tipos celulares de interés, de células de muchos, de una mayoría o de todos los otros tipos. En general, la presencia y/o abundancia de la mayoría de los marcadores se puede determinar utilizando técnicas estándares, tales como transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, secuenciación, métodos inmunológicos, tales como inmunotransferencia, inmunodetección o detección por fluorescencia después de tinción con anticuerpos marcados fluorescentemente, micromatrices de oligonucleótidos o cDNA o matrices de membranas, análisis de micromatrices de proteína, espectrometría de masa, etc.

"Pluralidad" significa más de uno.

"Polipéptido", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polímero de aminoácidos que opcionalmente incluye uno o más análogos de aminoácidos. Una proteína es una molécula compuesta por uno o más polipéptidos. Un péptido es un polipéptido relativamente corto, normalmente de una longitud entre aproximadamente 2 y 60 aminoácidos, por ejemplo, de una longitud entre 8 y 40 aminoácidos. Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" pueden utilizarse indistintamente. Los polipéptidos utilizados en la presente memoria pueden contener aminoácidos, tales como los que se encuentran naturalmente en las proteínas, aminoácidos que no se encuentran naturalmente en las proteínas y/o análogos de aminoácidos que no son aminoácidos. Como se utiliza en la presente memoria, un "análogo" de un aminoácido puede ser un aminoácido diferente que se parece estructuralmente al aminoácido o un compuesto distinto de un aminoácido que se parece estructuralmente al aminoácido. Se conoce un gran número de análogos reconocidos en la técnica de los 20 aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas (los aminoácidos "estándares"). Uno o más de los aminoácidos se pueden modificar en un polipéptido, por ejemplo, por la adición de una entidad química, tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso, un enlazador para conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. Ciertos análogos adecuados no limitantes y las modificaciones se describen en WO2004026328. El polipéptido puede estar acetilado, por ejemplo, en el extremo N y/o amidado, por ejemplo, en el extremo C.

Las modificaciones naturales u otras químicas, tales como las descritas anteriormente, pueden ocurrir en cualquier lugar en un polipéptido, incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos pueden estar conjugados, encapsulados o empotrados en un polímero o una matriz polimérica, un dendrímero, una nanopartícula, una micropartícula, un liposoma o similares.

Los polipéptidos pueden, por ejemplo, ser purificados a partir de fuentes naturales, se pueden producir *in vitro* o *in vivo* en sistemas de expresión adecuados utilizando tecnología de DNA recombinante en sistemas de expresión adecuados (por ejemplo, por células hospedantes recombinantes o en animales o plantas transgénicos), se pueden sintetizar por medios químicos, tales como síntesis de péptidos en fase sólida convencional y/o métodos que implican la ligación química de péptidos sintetizados (véase, por ejemplo, Kent, S., *J Pept Sci.*, 9(9):574-93, 2003) o

cualquier combinación de los anteriores. Estos métodos son bien conocidos, y un experto en la técnica será capaz de seleccionar e implementar un método apropiado para sintetizar los péptidos y los polipéptidos descritos en la presente memoria. Un polipéptido puede comprender uno o más sitios de ligación química como se describe, por ejemplo, en la Publicación de patente de EE.UU. N° 20040115774. En ciertas realizaciones, un polipéptido de la invención se modifica con un polímero utilizando uno o más de los métodos descritos o referenciados en la misma.

La expresión "secuencia polipeptídica" o "secuencia de aminoácidos" como se utiliza en la presente memoria puede referirse al material polipeptídico en sí mismo y no estar restringida a la información de la secuencia (es decir, la sucesión de letras o de códigos de tres letras elegida entre las letras y códigos utilizados como abreviaturas para los nombres de los aminoácidos) que caracteriza bioquímicamente a un polipéptido. Una secuencia polipeptídica presentada en la presente memoria se expresa en la dirección extremo N a extremo C a menos que se indique de otro modo.

"Suministro pulmonar", como se utiliza en la presente memoria, se refiere al suministro al tracto respiratorio. El "tracto respiratorio" abarca las vías aéreas superiores, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguido de las vías aéreas inferiores, que incluyen la tráquea seguida por las bifurcaciones en los bronquios y bronquiólos (por ejemplo, terminales y respiratorias). Los bronquiólos terminales se dividen en bronquiólos respiratorios que luego conducen a los alvéolos.

"Purificada", como se utiliza en la presente memoria, significa que una entidad o sustancia está separada de una o más de otras entidades o sustancias con las cuales se encontraba previamente antes de ser purificada. Una entidad o sustancia puede estar parcialmente purificada, sustancialmente purificada o ser pura. Una sustancia o entidad, tal como un ácido nucleico o polipéptido, se considera pura cuando está separada sustancialmente de todos los otros compuestos o entidades, diferentes de un disolvente y cualesquiera iones contenidos en el disolvente, es decir, constituye al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más que el 99% del peso seco de la composición. Un compuesto o entidad parcial o sustancialmente purificado, tal como un ácido nucleico o polipéptido, puede estar separado de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80% en peso del material con el cual se encuentra naturalmente, por ejemplo, material celular, tal como proteínas celulares y/o ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico o polipéptido purificado constituye al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o incluso más, en peso seco, del ácido nucleico o polipéptido total, respectivamente, en una composición. Los métodos para evaluar la pureza son conocidos en la técnica e incluyen métodos cromatográficos, métodos inmunológicos, métodos electroforéticos, etc. Cualquiera de los polinucleótidos o los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden ser purificados.

"Grupos funcionales reactivos" como se utiliza en la presente memoria se refiere a grupos que incluyen, aunque sin limitación, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfoxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, isonitrilos de ácido sulfénico, amidinas, imidas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos tihidroxámicos, alenos, orto-ésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, pseudoureas, semicarbazidas, carbodiimidas, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azoicos, compuestos azoxi y compuestos nitrosos. Los grupos funcionales reactivos también incluyen los frecuentemente utilizados para preparar bioconjugados, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias, sulfhidrilos y similares (véase, por ejemplo, Hermanson, G., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996). Los métodos para preparar cada uno de estos grupos funcionales son bien conocidos en la técnica y su aplicación o modificación para un fin en particular está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sandler and Karo, eds. *ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS*, Academic Press, San Diego, 1989).

La expresión "interferencia por RNA" o "RNAi" se utiliza en la presente memoria como se entiende en la técnica, por ejemplo, se refiere a cualquier método por el cual la expresión de un gen o un producto génico se disminuye por introducción dentro de una célula u organismo diana de un RNA bicatenario (dsRNA), denominado "agente de RNAi" que corresponde en secuencia al gen de interés, particularmente RNA de doble cadena que contienen una cadena que es complementaria al RNA mensajero del gen de interés. Se apreciará que el agente de RNAi puede comprender una o más porciones de una sola cadena, no necesita ser 100% complementaria al mRNA diana, y puede comprender desoxirribonucleótidos, nucleótidos no naturales o modificados, y estructuras de la cadena principal modificadas. Los RNA cortos de interferencia (siRNA) son agentes de RNAi que normalmente comprenden dos cadenas separadas de RNA hibridadas para formar una estructura dúplex de una longitud de 17-29 nucleótidos (nt) (normalmente, de una longitud de alrededor de 19 nt), opcionalmente con extremos 3' salientes de 1-5 nt, normalmente 2 nt. Los RNA cortos de horquilla son normalmente una sola cadena de RNA que contiene regiones auto-complementarias que se hibridan para formar un dúplex de una longitud de 17-29 nt, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 19 nt, conectadas por un bucle monocatenario normalmente de una longitud de 4-15 nt, por ejemplo, de una longitud de 6-9 nt. "Introducir" puede comprender la administración exógena de un dsRNA, por ejemplo, siRNA, o puede comprender hacer que la célula exprese ya sea transitoria o establemente un RNA que se procesa intracelularmente para dar una especie de RNA de interferencia, tal como un shRNA. Por ejemplo, se puede introducir un vector que comprende un casete de expresión que codifica un RNA corto de horquilla (shRNA) dentro de las

células. Opcionalmente, el vector se mantiene establemente en las células. Son útiles los vectores virales y los plásmidos. Opcionalmente, el casete de expresión se integra dentro del genoma celular. El diseño y la síntesis de agentes de RNAi eficaces para inhibir la expresión de la mayoría de los genes son directos. Los candidatos pueden analizarse fácilmente para identificar un agente con la eficiencia de silenciamiento deseada.

5 "Administración secuencial" de dos o más agentes se refiere a la administración de dos o más agentes a un sujeto, de modo que los agentes no estén presentes juntos en el cuerpo del sujeto, o en un sitio relevante de actividad en el cuerpo, a concentraciones mayores que las no despreciables. La administración de los agentes puede alternarse, aunque no es necesario. Cada agente puede administrarse múltiples veces.

10 "Unión específica" se refiere generalmente a una asociación física entre un polipéptido diana (o, más generalmente, una molécula diana) y una molécula de unión, tal como un anticuerpo o un ligando. La asociación es normalmente dependiente de la presencia de una característica estructural particular de la diana, tal como un determinante anti-
 15 génico, un epítipo, una cavidad o hendidura de unión, reconocida por la molécula de unión. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo A, la presencia de un polipéptido que contiene el epítipo A o la presencia de A libre no marcado en una reacción que contiene tanto A libre marcado como la molécula de unión que se une al mismo, reducirá la cantidad de A marcado que se une a la molécula de unión. Ha de entenderse que la especificidad no necesita ser absoluta sino que generalmente se refiere al contexto en el que ocurre la unión. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que numerosos anticuerpos reaccionan cruzadamente con otros epítopos, además de los presentes en la molécula diana. Dicha reactividad cruzada puede ser aceptable dependiendo de la aplicación para la cual se utilizará el anticuerpo. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar anticuerpos o ligandos que tengan un
 20 grado suficiente de especificidad para comportarse apropiadamente en cualquier aplicación dada (por ejemplo, para detección de una molécula diana, para fines terapéuticos, etc.). También se comprenderá que la especificidad puede evaluarse en el contexto de factores adicionales, tales como la afinidad de la molécula de unión por la diana frente a la afinidad de la molécula de unión por otras dianas, por ejemplo, competidores. Si una molécula de unión exhibe una elevada afinidad por una molécula diana que se desea detectar y baja afinidad por moléculas no dianas, el anticuerpo probablemente será un reactivo aceptable. Una vez que la especificidad de una molécula de unión se establece en uno o más contextos, se puede emplear en otros contextos, preferiblemente similares, sin re-evaluar necesariamente su especificidad. La unión de dos o más moléculas se puede considerar específica si la afinidad (medida como la constante de disociación en equilibrio, Kd) es 10^{-3} M o menor, preferiblemente 10^{-4} M o menor, más preferiblemente 10^{-5} M o menor, por ejemplo, 10^{-6} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, o 10^{-9} M o menor bajo las
 25 condiciones ensayadas, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas.

"Identidad de secuencia significativa" aplicada a una secuencia de aminoácidos significa que la secuencia es al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% idéntica a una secuencia de referencia. En realizaciones específicas para una secuencia de aminoácidos significa que la secuencia es al menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de referencia. En realizaciones específicas al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los aminoácidos no idénticos está reemplazado conservativamente con relación a la secuencia de referencia. Los reemplazos conservadores se pueden definir de acuerdo con Stryer, L., *Biochemistry*, 3rd ed., 1988, de acuerdo con el cual los aminoácidos en los siguientes grupos poseen características similares con respecto a propiedades de cadenas laterales, tales como carga, hidrofobicidad, aromaticidad, etc. (1) Cadenas laterales alifáticas: G, A, V, L, I; (2) Cadenas laterales aromáticas: F, Y, W;
 35 (3) Cadenas laterales que contienen azufre: C, M; (4) Cadenas laterales con hidroxilo alifático: S, T; (5) Cadenas laterales básicas: K, R, H; (6) Aminoácidos ácidos: D, E, N, Q; (7) Cadenas laterales alifáticas cíclicas: P, que puede considerarse como dentro del grupo (1). En otra clasificación aceptada, las sustituciones conservadoras ocurren dentro de los siguientes grupos: (1) No polares: A, L, I, V, G, P, F, W, M; (2) Polares: S, T, C, Y, N, Q; (3) Básicos: K, R, H; (4) Ácidos: D, E. Los aminoácidos con una pequeña cadena lateral (G, A, S, T, M) también forman un grupo a partir del cual se pueden realizar sustituciones conservadoras. Se pueden utilizar otros métodos de clasificación conocidos en la técnica. Además, los análogos de aminoácidos y los aminoácidos no naturales pueden clasificarse de acuerdo con estos esquemas.

50 "Sujeto", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un individuo al cual se suministra un agente, por ejemplo, para fines experimentales, diagnósticos y/o terapéuticos. Los sujetos preferidos son mamíferos, particularmente mamíferos domésticos (por ejemplo, perros, gatos, etc.), primates no humanos o seres humanos.

55 "Complejo supramolecular" se refiere a un ensamblaje que comprende al menos dos entidades que están físicamente asociadas una con la otra, en el cual una o más entidades no están unidas covalentemente a otra entidad pero que en cambio están asociadas con esa entidad por uno o más mecanismos de interacciones no covalentes, tales como interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, π -apilamiento, enlaces dativos, etc. Por ejemplo, una o más entidades pueden estar atrapadas, empotradas, encerradas o encapsuladas dentro de otra entidad, o enmarañada con otra entidad, o disuelta en otra entidad, o impregnada con otra entidad, o adsorbida en otra entidad, o unida a otra entidad, de modo que se mantenga una asociación física entre las entidades. Las entidades pueden ser naturales o sintéticas. Pueden ser, por ejemplo, polipéptidos, polímeros no polipeptídicos, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas pequeñas, carbohidratos, etc. Una o más de las entidades puede ser un armazón polimérico rígido o flexible, una estructura tridimensional, tal como una micropartícula, nanopartícula, liposoma, noisoma, dendrímero, etc. El complejo supramolecular puede contener cualquier número o combinación de moléculas y/u
 60

otras entidades.

Formulación de "liberación prolongada", también denominada "liberación extendida" o "liberación controlada", se utiliza en la presente memoria en un sentido amplio, para abarcar una formulación de un agente biológicamente activo, por ejemplo, un agente terapéutico, que produce la liberación o suministro del agente durante un período de tiempo prolongado o extendido, o al menos durante un período que es más largo que si el agente fuera puesto a disposición *in vivo* en su estado natural o no formulado. Opcionalmente, la liberación o suministro del agente ocurre ya sea continua o intermitente, de modo que proporcione una cantidad eficaz del agente al sujeto, por ejemplo, para proporcionar una concentración eficaz en un lugar extravascular en el cuerpo, durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, al menos 4, 8, 12 o 18 horas, al menos 1, 2, 4 o 6 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 o 24 meses, o más. La formulación puede comprender un agente activo y una o más sustancias adicionales, en donde el agente activo y el otro u otros componentes están formulados de modo que la composición proporcione una liberación prolongada del agente activo. En algunas realizaciones, una formulación de liberación prolongada comprende una forma física del agente activo, tal como una forma cristalina, confórmero, agregado, gel, o forma precipitada, etc., con lo cual la liberación o suministro del agente ocurre durante un período de tiempo más largo que si el agente fuera puesto a disposición *in vivo* en una forma alternativa, por ejemplo, en un estado amorfo, como un polvo, etc. En algunas realizaciones, la velocidad de liberación varía dependiendo de la concentración a la cual se administra el agente activo o dependiendo de la cantidad administrada. Por ejemplo, administrar una cantidad o concentración más alta puede causar la formación de un precipitado que se disuelve a lo largo del tiempo, proporcionando así una liberación prolongada.

"Dispositivo de liberación prolongada" se utiliza en la presente memoria como en la técnica, para referirse a un dispositivo capaz de contener y liberar un agente activo, o una composición que comprende un agente activo, de modo que proporcione una liberación prolongada del agente activo. La expresión "dispositivo para liberación prolongada" abarca artículos sólidos de fabricación que consisten, o comprenden, una formulación de liberación prolongada, dispositivos eléctricos y/o mecánicos, tales como bombas, etc. El dispositivo puede ser implantable en un lugar extravascular en el cuerpo. Un dispositivo puede liberar el agente utilizando medios que se basan en una fuente de energía, por ejemplo, una batería o fuente externa de energía, o sin el uso de una fuente de energía. Un experto en la técnica apreciará que el "dispositivo de liberación prolongada" no se refiere a medios para proporcionar el suministro prolongado del agente desde un suministro del agente ubicado fuera del cuerpo, tal como por inyección o infusión prolongada.

"Sistémico", como se utiliza en la presente memoria en referencia a componentes del complemento, se refiere a proteínas del complemento que son sintetizadas por hepatocitos del hígado y entran al torrente sanguíneo, o son sintetizadas por macrófagos o monocitos circulantes y secretadas en el torrente sanguíneo.

"Activación sistémica del complemento" es la activación del complemento que ocurre en la sangre, el plasma o el suero y/o implica la activación de proteínas sistémicas del complemento en muchos lugares a través del cuerpo, afectando muchos tejidos, sistemas u órganos del cuerpo.

"Administración sistémica" y expresiones similares se utilizan en la presente memoria de acuerdo con su uso en la técnica para referirse a la administración de un agente tal que el agente llegue a estar ampliamente distribuido en el cuerpo en cantidades significativas y tenga un efecto biológico, por ejemplo, su efecto deseado, en la sangre y/o alcance su sitio de acción deseado vía el sistema vascular. Las vías sistémicas de administración típicas incluyen la administración por: (i) introducción del agente directamente en el sistema vascular o (ii) administración oral, pulmonar o intramuscular, donde el agente es absorbido, entra en el sistema vascular y es llevado a uno o más sitios de acción deseados vía la sangre.

"Agente terapéutico" se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier agente farmacológicamente activo útil para tratar un trastorno. La expresión incluye cualquier sal, profármaco, sal de un profármaco y los derivados de un agente farmacéuticamente aceptables que son conocidos en la técnica o que se producen fácilmente utilizando métodos estándares conocidos en la técnica. "Profármaco" se refiere a un precursor de un agente, en el que el profármaco no es en sí mismo farmacológicamente activo (o tiene una actividad menor o diferente que la actividad deseada del fármaco) pero se convierte, después de su administración (por ejemplo, por metabolismo) en el fármaco farmacéuticamente activo. Un agente terapéutico puede ser, sin limitación, una molécula pequeña o una macromolécula biológica, tal como un polipéptido, anticuerpo o ácido nucleico, tal como un aptámero, agente de RNAi, tal como un RNA pequeño de interferencia (siRNA), etc. A veces, en la presente memoria, se refiere a un agente terapéutico como un "agente activo" o "fármaco".

"Tratar", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a proporcionar tratamiento, es decir, proporcionar cualquier tipo de atención médica o quirúrgica a un sujeto. El tratamiento se puede proporcionar para revertir, aliviar, inhibir el progreso, evitar o reducir la probabilidad de una enfermedad, trastorno o estado, o para revertir, aliviar, inhibir o evitar el progreso, evitar o reducir la probabilidad de uno o más síntomas o manifestaciones de una enfermedad, trastorno o estado. "Evitar" se refiere a hacer que no ocurran una enfermedad, trastorno, estado o síntoma o su manifestación durante al menos un período de tiempo en al menos algunos individuos. Tratar puede incluir administrar un agente al sujeto después del desarrollo de uno o más síntomas o manifestaciones indicativos de un estado mediado por el complemento, por ejemplo, para revertir, aliviar, reducir la gravedad y/o inhibir o evitar el progreso del

estado y/o para revertir, aliviar, reducir la gravedad y/o inhibir uno o más síntomas o manifestaciones del estado. Una composición de esta invención se puede administrar a un sujeto que ha desarrollado un trastorno mediado por el complemento, o que tiene mayor riesgo de desarrollar dicho trastorno en relación con un miembro de la población general. Una composición de esta invención se puede administrar profilácticamente, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación del estado. Normalmente en este caso, el sujeto estará en riesgo de desarrollar el estado.

Una "variante" de un polipéptido o polinucleótido particular tiene una o más alteraciones (por ejemplo, adiciones, sustituciones y/o deleciones, que se pueden denominar colectivamente "mutaciones") con respecto al polipéptido o ácido nucleico, que se puede denominar "polipéptido o polinucleótido original". Así, una variante puede ser más corta o más larga que el polipéptido o polinucleótido del cual es una variante. El término "variante" abarca a "fragmentos". Un "fragmento" es una porción continua de un polipéptido que es más corta que el polipéptido original. En ciertas realizaciones de la invención, una variante de polipéptido tiene una identidad de secuencias significativa con el polipéptido original a lo largo de una porción continua de la variante que comprende al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o más, de la longitud de la variante o de la longitud del polipéptido (la que sea más corta). En ciertas realizaciones de la invención, una variante de polipéptido tiene una identidad de secuencias sustancial con el polipéptido original a lo largo de una porción continua de la variante que comprende al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o más, de la longitud de la variante o de la longitud del polipéptido (la que sea más corta). En una realización no limitante, una variante tiene al menos 80% de identidad con la secuencia original a lo largo de una porción continua de la variante que comprende entre 90% y 100% de la variante, por ejemplo, por encima de 100% de la longitud de la variante o la longitud del polipéptido (la que sea más corta). En otra realización no limitante, una variante tiene al menos 80% de identidad con la secuencia original a lo largo de una porción continua de la variante que comprende entre 90% y 100% de la variante, por ejemplo, por encima de 100% de la longitud de la variante o la longitud del polipéptido (la que sea más corta). En realizaciones específicas la secuencia de un polipéptido variante tiene N diferencias de aminoácidos con respecto a una secuencia original, donde N es cualquier número entero entre 1 y 10. En otras realizaciones específicas la secuencia de un polipéptido variante tiene N diferencias de aminoácidos con respecto a una secuencia original, donde N es cualquier número entero entre 1 y 20. Una "diferencia" de aminoácidos se refiere a una sustitución, inserción o deleción de un aminoácido.

En ciertas realizaciones de la invención, un fragmento o variante posee suficiente similitud estructural con el polipéptido original de modo que cuando su estructura tridimensional (ya sea la estructura real o la predicha) se superpone con la estructura del polipéptido original, el volumen de solapamiento es al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% del volumen total de la estructura del polipéptido original. Una estructura tridimensional parcial o completa del fragmento o variante se puede determinar cristalizando la proteína, lo que puede hacerse utilizando métodos estándares. Alternativamente, se puede generar una estructura de la solución de RMN, utilizando también métodos estándares. Se puede utilizar un programa de modelado, tal como MODELER (Sali, A. and Blundell, TL, *J. Mol. Biol.*, 234, 779-815, 1993), o cualquier otro programa de modelado, para generar una estructura predicha. Si está disponible una estructura o una estructura predicha de un polipéptido relacionado, el modelo se puede basar en esa estructura. Se puede utilizar el conjunto de programas PROSPECT-PSPP (Guo, JT, et al., *Nucleic Acids Res.* 32 (Web Server issue):W522-5, July 1, 2004).

Preferiblemente, una, más de una, o todas las funciones o actividades biológicas de una variante o fragmento, son sustancialmente similares a las de la función o actividad biológica correspondiente de la molécula original. En ciertas realizaciones, la actividad de una variante o fragmento puede ser al menos 20%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de la actividad de la molécula original, hasta aproximadamente 100%, aproximadamente 125% o aproximadamente 150% de la actividad de la molécula original. En ciertas realizaciones, una actividad de una variante o fragmento es tal que la cantidad o concentración de la variante necesaria para producir un efecto está dentro de 0,5 a 5 veces la cantidad o concentración de la molécula original necesaria para producir ese efecto.

Como se utiliza en la presente memoria, "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado, lineal, ramificado o cíclico, que tiene desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 22 átomos de carbono (y todas sus combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono), siendo preferidos los de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 12, o aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7, átomos de carbono en ciertas realizaciones de la invención. Los grupos alquilo incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, 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.

Como se utiliza en la presente memoria, "halo" se refiere a F, Cl, Br o I.

Como se utiliza en la presente memoria, "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos mono- o bi-cíclicos opcionalmente sustituidos, que tiene desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 14 átomos de carbono (y todas sus combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono), siendo preferido los de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10 carbonos. Ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, fenilo y naftilo.

- Como se utiliza en la presente memoria, "aralquilo" se refiere a radicales alquilo que llevan un sustituyente arilo y que tienen desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 22 átomos de carbono (y todas sus combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono), siendo preferidos en ciertas realizaciones, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos aralquilo pueden estar sustituidos opcionalmente. Ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, bencilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo.
- Como se utiliza en la presente memoria, los términos "alcoxi" y "alcoxilo" se refieren a un grupo alquil-O sustituido opcionalmente, en donde alquilo es como se definió anteriormente. Grupos alcoxi y alcoxilo ilustrativos incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi y heptoxi.
- Como se utiliza en la presente memoria, "carboxi" se refiere a un grupo $-C(=O)OH$.
- Como se utiliza en la presente memoria, "alcoxycarbonilo" se refiere a un grupo $-C(=O)O$ -alquilo, donde alquilo es como se definió anteriormente.
- Como se utiliza en la presente memoria, "aróilo" se refiere a un grupo $-C(=O)$ -arilo, donde arilo es como se definió anteriormente. Grupos aróilo ilustrativos incluyen benzoílo y naftóilo.
- Normalmente, los restos químicos sustituidos incluyen uno o más sustituyentes que reemplazan al hidrógeno. Sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, halo, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, sulfhidrilo, hidroxilo ($-OH$), alcoxilo, ciano ($-CN$), carboxilo ($-COOH$), $-C(=O)O$ -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 resto R" puede ser, por ejemplo, independientemente, cualquiera de H, alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo.
- Como se utiliza en la presente memoria, "L-aminoácido" se refiere a cualquiera de los alfa-aminoácidos levorrotatorios naturales normalmente presentes en las proteínas o los ésteres de alquilo de los alfa-aminoácidos. La expresión "D-aminoácido" se refiere a los alfa-aminoácidos dextrorrotatorios. A menos que se especifique de otro modo, todos los aminoácidos citados en la presente memoria son L-aminoácidos.
- Como se utiliza en la presente memoria, un "aminoácido aromático" es un aminoácido que comprende al menos un anillo aromático, por ejemplo, comprende un grupo arilo.
- Como se utiliza en la presente memoria, un "análogo de aminoácido aromático" es un análogo de aminoácido que comprende al menos un anillo aromático, por ejemplo, comprende un grupo arilo.

Descripción detallada de ciertas realizaciones de la invención

Inhibición de la activación local del complemento

- La presente invención se refiere a métodos mejorados para el uso de ciertos inhibidores del complemento para tratar un estado inflamatorio del sistema respiratorio. "Inhibidor del complemento" se utiliza en la presente memoria como en la técnica, para referirse a un compuesto que inhibe la expresión de una o más actividades biológicas de un componente del complemento. Tal como se conoce en la técnica, las proteínas solubles del sistema complemento se sintetizan principalmente por los hepatocitos del hígado y están presentes en grandes cantidades en la sangre, constituyendo colectivamente alrededor del 5% de la globulina sérica total. La invención abarca el reconocimiento de que la inhibición del complemento sistémico, que se ha analizado o sugerido como una estrategia terapéutica en varios trastornos mediados por el complemento, presenta ciertos inconvenientes que limitan su utilidad en un escenario clínico, en al menos algunos de estos trastornos. De hecho, el fracaso al traducir las estrategias de inhibición del complemento sistémico en el uso eficaz en la clínica en ciertos trastornos crónicos, ha sido una fuente de frustración y decepción para la investigación biomédica y las comunidades médicas.
- La presente invención se basa en parte en el reconocimiento por los inventores de que: (i) las proteínas solubles del complemento se producen localmente en una variedad de trastornos; (ii) la mayoría o todas las proteínas del complemento sistémico no se extravasan inmediatamente y participan en la activación del complemento fuera de la vasculatura a menos que haya habido daño a la vasculatura, y (iii) la activación de proteínas del complemento localmente producidas, incluyendo las proteínas solubles del complemento producidas localmente, desempeña un papel significativo en la patología y en los síntomas de la enfermedad, excediendo frecuentemente el papel desempeñado por la activación del complemento sistémico. Sin vincularse a ninguna teoría, los inventores proponen que los intentos de inhibir la activación del complemento sistémicamente, por ejemplo, por administración intravascular de un inhibidor del complemento, presenta los siguientes inconvenientes: (i) La presencia de grandes cantidades de proteínas solubles del complemento en la sangre hace difícil alcanzar una concentración eficaz en suero de los inhibidores del complemento que actúan sobre esas proteínas, especialmente de cara a su continua síntesis por el hígado, a menos que el inhibidor del complemento se administre por suministro intravascular continuo o repetido frecuentemente. Dichas vías son con frecuencia sencillamente no prácticas para muchos estados crónicos en los que la activación del complemento desempeña un papel, especialmente si se maneja primeramente en una situación de paciente ambulatorio. (ii) Ciertos inhibidores del complemento, si bien son eficaces *in vitro*, son rápidamente eliminados del sistema vascular cuando se administran sistémicamente. (iii) La activación local del complemento que implica

proteínas solubles del complemento producidas localmente tiene lugar frecuentemente en compartimentos corporales que no son accesibles a los agentes terapéuticos grandes, tales como anticuerpos y polipéptidos, a menos que el estado sea tan grave que se vea afectada la integridad de las paredes de los vasos y/u otras barreras. Por lo tanto, incluso si el complemento sistémico se inhibe eficazmente, dicha inhibición puede no ser suficiente para aliviar la patología o síntomas de la enfermedad. Como resultado, la mejora en el trastorno puede paradójicamente conducir a una eficacia reducida de los inhibidores del complemento administrados sistémicamente. Basado en parte en el reconocimiento de las razones anteriormente mencionadas para el éxito limitado del que goza la inhibición del complemento hasta la fecha en ciertas condiciones, la presente invención proporciona composiciones para el uso que proporcionan eficazmente el potencial de inhibición del complemento como una estrategia para tratar un estado inflamatorio del sistema respiratorio, particularmente, las condiciones que persisten intermitente o continuamente durante meses o años.

Si bien se ha observado en diversos trastornos, tales como artritis, la producción local de proteínas del complemento y se ha explorado la administración esporádica o local de una única dosis de ciertos agentes inhibidores del complemento (Williams, AS et al., *Br. J. Rheumatol.*, 35:719-724; Linton, S and Morgan, BP, *Mol. Immunol.*, 36:905-914, 1999; Neumann, E., et al., *Arthritis & Rheumatism*, 46(4):934-945, 2002), se cree que la presente descripción es la primera en enfocar directamente, y de acuerdo con un reconocimiento apropiado, el importante papel desempeñado por la activación local del complemento, las proteínas solubles del complemento producidas localmente y/o los receptores de la superficie celular en los estados inflamatorios del sistema respiratorio y sobre el potencial terapéutico para la inhibición local prolongada del complemento y la inhibición de estos componentes producidos localmente para tratar estos estados y al mismo tiempo proporcionar una amplia variedad de composiciones para el uso en el tratamiento de estos estados.

Los inventores proponen que la inhibición local de la activación del complemento en o dentro de un lugar extravascular durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, aproximadamente 1-4 semanas, 1-3 meses, 3-6 meses, 6-12 meses, 12-24 meses) ofrecerá oportunidades para aliviar e incluso inhibir el progreso y/o la recurrencia de síntomas en enfermedades inflamatorias crónicas. Naturalmente la invención no está limitada a enfermedades crónicas y puede encontrar uso en una variedad de situaciones agudas, tales como infecciones en las cuales la activación excesiva del complemento tiene consecuencias patogénicas. En algunas realizaciones de la invención, un inhibidor del complemento se suministra de una manera prolongada, de modo que la activación del complemento se inhiba continuamente durante un período de tiempo prolongado en o dentro de un lugar extravascular. Así, en ciertas realizaciones, la administración local proporciona inhibición local prolongada de la activación del complemento. Por ejemplo, la activación local del complemento puede ser inhibida durante un período entre 1 semana y 1 año, por una sola administración de una formulación de liberación prolongada de la invención. En ciertas realizaciones, la activación local del complemento es inhibida en al menos 25%, 50%, 75%, 90%, 95% o más durante un período entre 2 semanas y 3 meses por una sola administración de una formulación de liberación prolongada de la invención. En ciertas realizaciones, la activación local del complemento es inhibida en al menos 25%, 50%, 75%, 90%, 95% o más durante un período entre 3 y 6 meses por una sola administración de una formulación de liberación prolongada de la invención. En ciertas realizaciones, la activación local del complemento se inhibe en al menos 25%, 50%, 75%, 90%, 95% o más durante un período entre 6 y 12 meses por una sola administración de una formulación de liberación prolongada de la invención. Se pueden llevar a cabo múltiples administraciones. Se pueden realizar administraciones individuales en un programa regular o a medida que los síntomas aumentan o reaparecen. En ciertas realizaciones, la administración se realiza por término medio una vez cada 4 semanas durante al menos un año. En ciertas realizaciones la administración se realiza por término medio una vez cada 3 meses durante al menos un año. Por ejemplo, se puede seleccionar una dosis apropiada de un análogo de compstatina para alcanzar una concentración media o de estado estacionario en el lugar extravascular al menos suficiente para unirse hasta el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más del C3 presente.

En ciertas realizaciones de la invención, una composición se administra múltiples veces, por ejemplo, al menos dos veces, separadas por un período de tiempo, donde dicho período es más largo que el tiempo en el cual el inhibidor del complemento está presente a una concentración de al menos la mitad de su concentración máxima en dicho lugar extravascular. En ciertas realizaciones de la invención, una composición se administra múltiples veces, por ejemplo, al menos dos veces, separadas por un período de tiempo, donde dicho período es más largo que la semivida del inhibidor del complemento en dicho lugar extravascular, o más largo que la semivida del inhibidor del complemento *in vitro* en un fluido del tipo presente en dicho lugar extravascular. El modelo de administración se puede continuar tanto tiempo como sea necesario para alcanzar un efecto beneficioso. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, aproximadamente igual a la semivida, aproximadamente 2, 5, 10 o 20 veces la semivida, etc. Los modelos de administración anteriormente mencionados pueden continuarse tanto tiempo como sea necesario para alcanzar un efecto beneficioso.

Ciertas composiciones de la invención están basadas en parte en la percepción de los inventores de que puede no ser necesario, ni incluso deseable, inhibir completamente la activación del complemento en un lugar extravascular afectado por un trastorno mediado por el complemento. En ciertas realizaciones de la invención, el nivel de activación del complemento en un lugar extravascular de interés se reduce a un nivel dentro de un factor de aproximadamente 2 veces el nivel medio presente en ese lugar en individuos que no sufren, ni están en mayor riesgo, de desarrollar el trastorno, a lo largo de cualquiera de los períodos de tiempo anteriormente mencionados. En ciertas realiza-

ciones el nivel de activación del complemento en un lugar extravascular de interés se reduce a un nivel no más del 10% mayor, no más del 25% mayor o no más del 50% mayor que el nivel medio presente en ese lugar en individuos que no sufren, ni están en mayor riesgo, de desarrollar el trastorno, a lo largo de cualquiera de los períodos de tiempo anteriormente mencionados.

5 Ciertos métodos descritos en la presente memoria implican administrar un inhibidor del complemento directamente a un lugar extravascular que sea un sitio de activación local del complemento en un trastorno mediado por el complemento. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la formación local del MAC. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la activación local de C3, C5 o el factor B. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la activación local del complemento mediada por la vía clásica. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la activación local del complemento mediada por la vía alternativa. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la activación local del complemento mediada por la vía de las lectinas. En ciertas realizaciones, los métodos implican inhibir la activación local del complemento mediada por al menos dos vías, por ejemplo, las vías clásica y alternativa.

15 Las composiciones de la presente invención son prácticas en el tratamiento de trastornos del sistema respiratorio, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, tal como bronquitis crónica y enfisema), asma, rinitis alérgica, inflamación asociada a infección, síndrome de dificultad respiratoria adulta, sarcoide, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, bronquitis alérgica, infecciones, tales como infección por el virus de la gripe, infección por el virus sincitial respiratorio (RSV), infección por el virus de parainfluenza (PIV), infección por rinovirus (RV) e infección por adenovirus.

20 El análogo de compstatina para uso en la invención es para administrar directamente al tracto respiratorio. Se observa que el sistema respiratorio está considerado un "lugar extravascular" aun cuando contiene vasos sanguíneos, siempre que el inhibidor del complemento no sea suministrado directamente a un vaso. "En la vecindad de" se refiere normalmente a un lugar separado no más de 10 cm de al menos una porción del sitio de actividad deseado del inhibidor del complemento.

25 En ciertas realizaciones de la invención, un análogo de compstatina se formula utilizando métodos y sistemas de suministro convencionalmente utilizados en la técnica para administrar agentes terapéuticos a lugares extravasculares. En ciertas realizaciones de la invención, el método y el sistema de suministro son unos que se han utilizado previamente para suministrar un agente terapéutico distinto de un análogo de compstatina al tracto respiratorio. En ciertas realizaciones de la invención, el método y/o el sistema de suministro han sido conocidos o se han utilizado previamente en la técnica para la liberación prolongada de un agente terapéutico distinto de un análogo de compstatina. En ciertas realizaciones de la invención, el método y/o el sistema de suministro han sido conocidos o se han utilizado previamente en la técnica para la liberación prolongada de un agente terapéutico distinto de un análogo de compstatina al tracto respiratorio. En ciertas realizaciones de la invención, el método y/o el sistema de suministro han sido conocidos o se han utilizado previamente en la técnica para la liberación prolongada de un agente terapéutico a un lugar extravascular, y la presente invención contempla la liberación prolongada a un lugar extravascular diferente. Así, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a usos nuevos y no obvios para métodos y sistemas de suministro existentes y/o a nuevas formulaciones de liberación prolongada que comprenden ciertos análogos de compstatina y, opcionalmente, uno o más agente activos adicionales. En ciertas realizaciones, los métodos y sistemas de suministro están específicamente adaptados para el suministro de un inhibidor del complemento como se describe en otra parte en la presente memoria.

40 Se describen en la presente memoria métodos que implican inhibir la activación de al menos una proteína soluble del complemento producida localmente. La proteína puede ser, por ejemplo, C1, C3, C5, factor B o factor D. Los métodos pueden implicar inhibir la activación de al menos una proteína del receptor del complemento producida localmente. La proteína del receptor del complemento producida localmente puede ser un receptor para C3a o un receptor para C5a.

45 La proteína soluble del complemento producida localmente puede ser producida por sinoviocitos, fibroblastos, condrocitos, células alveolares tipo II, queratinocitos, neuronas, células gliales, macrófagos de tejido o monocitos. Estas células pueden ser residentes normalmente en un lugar o pueden ser reclutadas allí en sujetos que padecen el trastorno. La proteína o receptor soluble del complemento producido localmente puede ser producido por otras células del sistema inmunitario, tales como los linfocitos T activados.

50 En ciertas realizaciones de la presente invención, un estado inflamatorio del sistema respiratorio se trata sin inhibir significativamente la activación del complemento sistémico. En algunas realizaciones, "sin inhibir significativamente la activación del complemento sistémico" significa que la activación del complemento sistémico (por ejemplo, medido en la sangre) se inhibe al máximo en menos del 20% del valor medio, tal como se determina, por ejemplo, utilizando un ensayo aceptado en la técnica, tales como los descritos en la presente memoria, por ejemplo, un ensayo clínicamente aceptado para activación del complemento durante el transcurso de la terapia. En algunas realizaciones, la administración local de un inhibidor del complemento tiene un efecto esencialmente no detectable sobre la activación del complemento sistémico, tal como se determina, por ejemplo, utilizando un ensayo aceptado en la técnica, tales como los descritos en la presente memoria, por ejemplo, un ensayo clínicamente aceptado para la activación del complemento. En algunas realizaciones, la administración local de un inhibidor del complemento inhibe transitoria-

mente la activación del complemento sistémico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración local de un inhibidor del complemento reduce la activación del complemento sistémico en no más del 1%, 2%, 5%, 10% o 20% durante no más de 1, 2, 6, 12, 24 o 48 horas. En realizaciones ilustrativas, la administración local de un inhibidor del complemento reduce la activación del complemento sistémico en no más del 10% durante no más de 24 o 48 horas.

5 En realizaciones ilustrativas, la administración local de un inhibidor del complemento reduce la activación del complemento sistémico en no más del 20% durante no más de 24 o no más de 48 horas. En algunas realizaciones, la administración local de un inhibidor del complemento no da como resultado una alteración estadísticamente significativa en la incidencia y/o gravedad de un efecto adverso atribuible a la inhibición del complemento sistémico (por ejemplo, sensibilidad a una infección o gravedad de la infección).

10 En realizaciones ilustrativas, el análogo de compstatina se libera de una formulación o dispositivo de liberación prolongada en una cantidad suficiente para producir una reducción clínicamente significativa de la gravedad de al menos un síntoma del trastorno que se está tratando, durante un tiempo medio deseado, en el que dicha cantidad no es suficiente para inhibir significativamente la actividad del complemento sistémico de al menos una vía de activación del complemento durante al menos 50% de dicho tiempo. En algunas realizaciones, dicho tiempo es al menos 1
15 semana. En algunas realizaciones, dicho tiempo es al menos 2, 4, 6, o 8 semanas. En algunas realizaciones, dicha cantidad no es suficiente para inhibir significativamente la actividad del complemento sistémico de al menos una vía de activación del complemento durante al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de dicho tiempo. En algunas realizaciones, dicha cantidad no es suficiente para inhibir significativamente la actividad del complemento sistémico de al menos una vía de activación del complemento (por ejemplo, en diversas realizaciones la vía clásica, la alternativa, la de las lectinas, o cualquiera de sus combinaciones) durante todo o esencialmente todo (por ejemplo, al menos 99%)
20 dicho tiempo.

Se deberá tener presente que la invención no excluye la inhibición del complemento sistémico y, en algunas realizaciones, incluye específicamente la inhibición del complemento sistémico. Por ejemplo, en algunas realizaciones la activación del complemento sistémico se inhibe inicialmente en un plazo relativamente corto mientras la activación del complemento local se inhibe durante un periodo de tiempo más largo por administración local de un inhibidor del complemento una vez o repetidas veces. En realizaciones representativas un inhibidor del complemento se administra sistémicamente ya sea una vez o múltiples veces de modo que la activación del complemento sistémico sea inhibida en al menos 25%, 50%, 75%, 90%, 95% o más durante un periodo de hasta 24, 48 o 72 horas, o durante un periodo entre 72 horas y 1 semana, o durante un periodo entre 1- 4 semanas. Se administra localmente ya sea el mismo inhibidor del complemento o uno diferente a uno o más sitios extravasculares de activación del complemento local. La administración local puede tener lugar antes, durante y/o después del periodo de tiempo durante el cual ocurre la inhibición sistémica. Esquemas de tiempo adecuados para la inhibición del complemento local se describen anteriormente y en otras partes de la presente memoria.

35 Los inhibidores del complemento caen dentro de diversas clases de compuestos que incluyen péptidos, polipéptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros, agentes de RNAi tales como los RNA cortos de interferencia). Los inhibidores del complemento incluyen antagonistas de una o más proteínas en las vías clásica, alternativa y/o de las lectinas. El inhibidor del complemento puede inhibir una actividad enzimática de una proteína del complemento. La actividad enzimática puede ser una actividad proteolítica, tal como la capacidad de escindir otra proteína del complemento. El inhibidor del complemento puede inhibir la escisión de C3, C5 o el factor B.
40 B.

El agente puede tener un peso molecular de no más de 2, 5 o 10 kilodaltones para permitir una concentración molar elevada del agente en un volumen adecuado de una formulación de liberación prolongada.

45 El inhibidor del complemento se puede seleccionar para que sea estable en el lugar extravascular al cual se suministre. Un compuesto puede ser "estable" si tiene una semivida de al menos 12, 24, 48, 60, 72, 96 horas o uno que cae dentro de cualquiera de los sub-intervalos intermedios o que tiene un valor específico entre 12 y 96 horas. "Semivida" puede referirse a la semivida *in vitro*, que refleja la velocidad de degradación, o a la semivida *in vivo*, que refleja las velocidades tanto de degradación como de eliminación desde el lugar extravascular relevante. La estabilidad puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo biológico adecuado o medios de detección tales como un análisis por HPLC.

50 Un aspecto importante de la presente invención es el reconocimiento de que estrategias eficaces de inhibición local del complemento se benefician, y pueden en algunos casos incluso requerir, el uso de liberación prolongada para alcanzar los efectos terapéuticos suficientes para garantizar su adopción en la práctica clínica. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor del complemento se selecciona para que sea estable en una formulación o dispositivo de liberación prolongada, y bajo condiciones compatibles con la preparación de una formulación o dispositivo de liberación prolongada.
55

Se puede administrar localmente un inhibidor del complemento que se una, y directamente inhiba, a una proteína soluble del complemento producida localmente. Se puede administrar localmente un inhibidor del complemento que inhiba indirectamente una proteína soluble del complemento producida localmente, es decir, el inhibidor del complemento inhibe la proteína por un mecanismo distinto que el de unión a la misma. Por ejemplo, el inhibidor del complemento puede inhibir la actividad enzimática de un componente aguas arriba de la cascada del complemento, que
60

de otro modo activaría a la proteína soluble del complemento producida localmente.

Se pueden seleccionar cantidades adecuadas del inhibidor del complemento determinando el nivel de proteínas del complemento y/o la activación del complemento en un compartimento extravascular de interés, por ejemplo, una articulación sintomática en un sujeto con artritis, u otro lugar extravascular. La determinación se podría realizar sobre la base de mediciones hechas en múltiples sujetos o mediciones hechas en un sujeto individual que se ha de tratar. Por ejemplo, se obtiene una muestra del compartimento extravascular de interés de un sujeto que se ha de tratar, por ejemplo, una muestra de fluido de un espacio articular, y se determina la concentración de una o más proteínas del complemento o el grado de activación del complemento. Se podrían medir las proteínas intactas del complemento y/o sus fragmentos.

- Una dosificación apropiada de un inhibidor del complemento o una formulación o dispositivo de liberación prolongada que comprende un inhibidor del complemento se puede seleccionar en base al menos en parte, en esta información y, opcionalmente estimando una cantidad total de la proteína del complemento, utilizando el volumen aproximado del compartimento. Por ejemplo, la concentración de una proteína soluble del complemento producida localmente se puede determinar en una muestra de fluido obtenida de un lugar extravascular. Se selecciona una dosis apropiada de un inhibidor del complemento que se une a la proteína del complemento para alcanzar una concentración media o de estado estacionario del inhibidor en el compartimento al menos suficiente para unirse al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la proteína presente en exceso de la encontrada en el lugar extravascular en ausencia del trastorno. En ciertas realizaciones, la dosis se selecciona para alcanzar una concentración media o de estado estacionario en el compartimento al menos suficiente para unirse al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la proteína presente en el compartimento. En ciertas realizaciones, la dosis se selecciona para alcanzar una concentración media o de estado estacionario igual a 1, 2, 5, 10, 20, 50, o cualquier sub-intervalo intermedio entre 1 y 50, veces tan grande como la de la proteína del complemento. En ciertas realizaciones de la invención, una concentración media o de estado estacionario del inhibidor está presente durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, 1-4 semanas, 4-6 semanas, 1-3 meses, 3-6 meses, 6-12 meses, 12 - 24 meses. En ciertas realizaciones de la invención la dosis se ajusta para tener en cuenta el hecho de que antes de la administración del inhibidor del complemento, la proteína diana del complemento estaba siendo consumida, dando como resultado un nivel medido inferior al que habría una vez que se inhibiera la cascada del complemento. La formulación o dispositivo de liberación prolongada se puede seleccionar para proporcionar una velocidad de liberación apropiada para alcanzar la concentración media o de estado estacionario deseada.
- Se describe en la presente memoria una dosificación unitaria de las formulaciones o dispositivos de liberación prolongada descritos en la presente memoria, que comprende normalmente en un recipiente, una cantidad suficiente de la formulación o dispositivo para producir un efecto terapéutico deseado en un paciente, es decir, una cantidad suficiente para una única administración a un paciente que lo necesite. La dosificación unitaria puede ser estéril y liofilizada. La dosificación unitaria puede ser estéril y estar preparada como una solución aceptable para la administración a un paciente, por ejemplo, por inyección, perfusión o infiltración. La dosificación unitaria puede ser una suspensión o dispersión en un líquido adecuado para la administración a un paciente, por ejemplo, por inyección, infiltración, etc. La forma de dosificación unitaria puede ser una masa o un volumen seleccionado de nanopartículas o micropartículas que comprenden un inhibidor del complemento, opcionalmente en un vehículo líquido. La forma de dosificación unitaria puede ser un artículo de fabricación macroscópico adecuado para la inserción o implantación en un paciente y que contiene una cantidad seleccionada de un inhibidor del complemento.

Los siguientes apartados analizan ciertos inhibidores del complemento incluyendo los de uso en la presente invención.

Compuestos que inhiben la activación o actividad de C3

- En la invención, el inhibidor del complemento es un análogo de compstatina que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia central de X^{aa}—Gln—Asp—Xaa—Gly (SEQ ID NO:3) donde X^{aa} y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp.

- La compstatina es un péptido cíclico de 13 aminoácidos cuya secuencia procedía de la de un péptido más largo, identificado utilizando presentación de fagos, que se une al componente C3 del complemento e inhibe la activación del complemento. La compstatina inhibe la escisión de C3 a C3a y C3b por convertasa. Puesto que C3 es un componente central de las tres vías de la activación del complemento, la compstatina y sus análogos son capaces de inhibir la activación de la proteína convergente de las tres vías. Sin vincularse a ninguna teoría, la capacidad de la compstatina y sus análogos para inhibir la vía alternativa de activación del complemento, puede contribuir significativamente a la eficacia en ciertos trastornos descritos en la presente memoria.

- La invención abarca el reconocimiento de que la compstatina y sus análogos poseen ventajas únicas e inesperadas en comparación con otros inhibidores del complemento, particularmente para liberación prolongada, en una variedad de trastornos. El peso molecular relativamente bajo (~1,6 kD), la estabilidad y diversas otras propiedades de los análogos de compstatina facilitan su incorporación en formulaciones y dispositivos para suministro prolongado adecuados para proporcionar concentraciones terapéuticas a una variedad de tejidos extravasculares. Además, los análogos de compstatina son altamente específicos. La invención abarca el reconocimiento de que, debido a estas y

5 otras razones, se espera que los análogos de compstatina tengan cierto número de ventajas significativas para su uso en trastornos crónicos en los cuales los pacientes pueden estar normalmente expuestos a un agente terapéutico durante un período de tiempo prolongado y/o en los cuales puede ser necesario conservar las preparaciones terapéuticas durante amplios períodos de tiempo. En ciertas realizaciones, un análogo de compstatina se suministra de una manera prolongada durante un período de tiempo prolongado, tal como 1-2 semanas, 2-4 semanas, 4-6 semanas, 1-3 meses, 3-6 meses, 6-12 meses, 1-2 años, 2-5 años o 5-10 años.

10 Se describe un método para inhibir la activación del complemento en un lugar extravascular de un sujeto, que comprende administrar un análogo de compstatina al sujeto en una cantidad eficaz para inhibir detectablemente la activación del complemento en el lugar extravascular del sujeto durante un período de al menos 1-2 semanas, 2-4 semanas, 4-6 semanas, por ejemplo, 1-3 meses, 3-6 meses, 6-12 meses, 12-24 meses, 24-36 meses, etc. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina se administra por una o más inyecciones en un lugar extravascular. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina se administra por liberación desde una formulación de liberación prolongada, tal como microparticulas, nanoparticulas o un gel. El análogo de compstatina puede liberarse por difusión hacia afuera de la formulación, o puede liberarse a medida que se degrada la formulación. El tratamiento se puede repetir múltiples veces. En ciertas realizaciones, la administración se lleva a cabo a intervalos, por término medio, de cada 2 semanas, cada mes, cada 1-3 meses, cada 3-6 meses, cada 6-12 meses o cada 12-24 meses. En ciertas realizaciones, la formulación de liberación prolongada es biodegradable. En ciertas realizaciones, la concentración eficaz está entre 10% y 250% de la concentración media de C3 en un fluido en el lugar extravascular de los sujetos que padecen el trastorno.

20 La secuencia de aminoácidos de la compstatina se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897 (véase la SEQ ID NO:2 en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897). La secuencia, Ile— [Cys—Val—Val—Gln—Asp—Trp—Gly—His—His—Arg—Cys] —Thr (SEQ ID NO: 43), con el enlace disulfuro entre las dos cisteínas indicado por corchetes, es una región cíclica N-terminal de un péptido más largo (SEQ ID NO:2 en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897) que también presenta actividad inhibidora del complemento. Cierta número de fragmentos y variantes de este péptido inhiben el complemento, teniendo algunos de ellos una actividad inhibidora mayor que la de la propia compstatina, y son útiles en la presente invención. Véase, por ejemplo, las SEQ ID NO: 13, 15, 20, 21 y 22 en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897. Se comprenderá que el nombre "compstatina" no fue utilizado en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897 sino que se adoptó posteriormente en la bibliografía científica y de patentes (véase, por ejemplo, Morikis, et al., *Protein Sci.*, 7(3):619-27, 1998) para referirse a un péptido que tiene la misma secuencia que la SEQ ID NO: 2 descrita en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897, pero amidado en el extremo C como se muestra en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 8). El término "compstatina" se utiliza en la presente memoria de acuerdo con dicho uso (es decir, para referirse al péptido cíclico de la SEQ ID NO: 8). En ciertas realizaciones de la invención, se utiliza un péptido que tiene actividad inhibidora del complemento mayor que la de la compstatina, por ejemplo, una actividad al menos 5 veces mayor, una actividad al menos 10 veces mayor, etc.

35 Se ha sintetizado una variedad de análogos de compstatina que tienen mayor actividad inhibidora del complemento que la compstatina. Algunos de estos están descritos en WO2004/026328 (PCT/US2003/029653), Morikis, D., et al., *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt 1):28-32, 2004, Mallik, B., et al., *J. Med. Chem.*, 274-286, 2005 y/o en Katragadda, M., et al., *J. Med. Chem.*, 49:4616-4622, 2006. Los péptidos y peptidomiméticos inhibidores del complemento allí descritos pueden utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 4-13 que están descritas en WO2004/026328 se puede utilizar en la presente invención.

40 Los análogos de compstatina pueden estar acetilados o amidados, por ejemplo, en los extremos N y/o C. Por ejemplo, los análogos de compstatina pueden estar acetilados en el extremo N y amidados en el extremo C. De acuerdo con el uso en la técnica, "compstatina" como se utiliza en la presente memoria, y las actividades de análogos de la compstatina descritos en la presente memoria con relación a las de la compstatina, se refieren a la compstatina amidada en el extremo C (Mallik, 2005, *supra*).

También se utilizan en la presente invención los concatámeros o multímeros de compstatina o uno de sus análogos inhibidores del complemento (con la modificación apropiada de los extremos N y/o C).

Se usa en la invención un complejo supramolecular que comprende compstatina y/o uno o más de sus análogos inhibidores del complemento.

50 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "análogo de compstatina" incluye compstatina y cualquiera de sus análogos inhibidores del complemento. La expresión "análogo de la compstatina" abarca compstatina y otros compuestos indicados o identificados en base a la compstatina y cuya actividad inhibidora del complemento es al menos 50% tan grande como la de la compstatina medida, por ejemplo, utilizando cualquier ensayo de activación del complemento aceptado en la técnica, o ensayos sustancialmente similares o equivalentes. Ciertos análogos de compstatina y ensayos adecuados están descritos en la Patente de EE.UU. N° 6.319.897, WO2004/026328, Morikis, *supra*, Mallik, *supra* y/o Katragadda 2006, *supra*. El ensayo puede, por ejemplo, medir la lisis de eritrocitos mediada por la vía alternativa, o puede ser un ensayo ELISA (véanse los Ejemplos 5 y 6). WO2004/026328, Morikis, *supra*, Mallik, *supra*, Katragadda 2006, *supra*, entre otras referencias, describen análogos de compstatina que tienen una actividad mayor que la compstatina y métodos para determinar su capacidad para inhibir la activación del complemento.

La actividad de un análogo de compstatina se puede expresar en términos de su CI_{50} (la concentración del compuesto que inhibe la activación del complemento en 50%), por ejemplo, a una concentración particular en plasma, indicando una CI_{50} inferior una actividad superior, como se reconoce en la técnica. La actividad de un análogo de compstatina preferido para uso en la presente invención es al menos tan grande como la de la compstatina. Se conocen ciertas modificaciones para reducir o eliminar la actividad inhibitoria del complemento y se pueden excluir explícitamente de cualquier realización de la invención. Se apreciará que el valor preciso de CI_{50} medido para un análogo de compstatina dado variará con las condiciones experimentales. Son útiles los valores comparativos, en los que se determina la CI_{50} para múltiples compuestos bajo condiciones sustancialmente idénticas.

En una realización, la CI_{50} del análogo de compstatina no es mayor que la CI_{50} de la compstatina. En ciertas realizaciones de la invención, la actividad del análogo de compstatina está entre 2 y 99 veces la de la compstatina (es decir, el análogo tiene una CI_{50} que es menor que la CI_{50} de la compstatina en un factor entre 2 y 99). Por ejemplo, la actividad puede ser entre 10 y 50 veces tan grande como la de la compstatina, o entre 50 y 99 veces tan grande como la de la compstatina. En ciertas realizaciones de la invención, la actividad del análogo de compstatina es entre 99 y 264 veces la de la compstatina. Por ejemplo, la actividad puede ser 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 o 264 veces tan grande como la de la compstatina. En ciertas realizaciones la actividad es entre 264 y 300, 300 y 350, 350 y 400 o 400 y 500 veces tan grande como la de la compstatina. La invención además contempla análogos de compstatina que tienen actividades entre 500 y 1000 veces la de la compstatina.

La K_d de la unión de compstatina a C3 se ha medido como 1,3 μM utilizando calorimetría isoterma de titulación (Katragadda, et al., *J. Biol. Chem.*, 279(53), 54987-54995, 2004). (Se apreciará que en esta publicación y en ciertas otras publicaciones de la bibliografía científica, el término "compstatina" se utilizó para referirse a la compstatina y en general a diversos análogos, o para referirse a la compstatina acetilada en el extremo N. El valor de 1,3 μM se obtuvo para la versión acetilada de la SEQ ID NO: 8, es decir, la SEQ ID NO: 9). Se ha correlacionado la afinidad de unión de una variedad de análogos de compstatina a C3 con sus actividades, siendo una K_d inferior indicativa de una afinidad de unión superior, como se reconoce en la técnica. Se mostró una correlación lineal entre la afinidad de unión y la actividad para ciertos análogos ensayados (Katragadda, 2004, *supra*; Katragadda 2006, *supra*). En ciertas realizaciones de la invención el análogo de compstatina se une a C3 con una K_d entre 0,1 μM y 1,0 μM , entre 0,05 μM y 0,1 μM , entre 0,025 μM y 0,05 μM , entre 0,015 μM y 0,025 μM , entre 0,01 μM y 0,015 μM , o entre 0,001 μM y 0,01 μM . En ciertas realizaciones, la CI_{50} del análogo de compstatina está entre aproximadamente 0,2 μM y aproximadamente 0,5 μM . En ciertas realizaciones, la CI_{50} del análogo de compstatina está entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 0,2 μM . En ciertas realizaciones, la CI_{50} del análogo de compstatina está entre aproximadamente 0,05 μM y aproximadamente 0,1 μM . En ciertas realizaciones, la CI_{50} del análogo de compstatina está entre aproximadamente 0,001 μM y aproximadamente 0,05 μM .

Los compuestos "indicados o identificados en base a la compstatina" incluyen, aunque sin limitación, compuestos que comprenden una cadena de aminoácido cuya secuencia se obtiene por: (i) modificación de la secuencia de la compstatina (por ejemplo, reemplazando uno o más aminoácidos de la secuencia de la compstatina por un aminoácido diferente o análogo de aminoácido, insertando uno o más aminoácidos o análogos de aminoácido en la secuencia de la compstatina, o delecionando uno o más aminoácidos de la secuencia de la compstatina); (ii) selección a partir de una biblioteca de péptidos por presentación de fagos en la cual uno o más aminoácidos de la compstatina se aleatorizan y opcionalmente se modifican más de acuerdo con el método (i); o (iii) identificación por cribado de compuestos que compiten con la compstatina, o cualquiera de sus análogo, obtenidos por los métodos (i) o (ii) para unirse a C3 o a uno de sus fragmento. Muchos análogos útiles de compstatina comprenden un agrupamiento hidrófobo, un pliegue β y un puente disulfuro.

La secuencia del análogo de compstatina puede comprender, o consistir esencialmente en, una secuencia que se obtiene haciendo 1, 2, 3 o 4 sustituciones en la secuencia de la compstatina, es decir, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en la secuencia de la compstatina son reemplazados por un aminoácido estándar o por un aminoácido no estándar diferente. Se puede alterar el aminoácido en la posición 4 y/o 9. Solamente se pueden alterar los aminoácidos en las posiciones 4 y 9. El aminoácido en la posición 4 y/o 9 se puede alterar y, además, se pueden alterar hasta 2 aminoácidos situados en las posiciones seleccionadas de 1, 7, 10, 11 y 13. Se pueden alterar los aminoácidos en las posiciones 4, 7 y 9. Los aminoácidos en las posiciones 2, 12 o ambas se pueden alterar, siempre que la alteración conserve la capacidad del compuesto de ciclizarse. Dichas una o más alteraciones en las posiciones 2 y/o 12 pueden existir además de las alteraciones en la posición 1, 4, 7, 9, 10, 11 y/o 13. Opcionalmente, la secuencia de cualquiera de los análogos de compstatina que se obtiene reemplazando uno o más aminoácidos de la secuencia de la compstatina incluye además hasta 1, 2, 3 o más aminoácidos en el extremo C. El aminoácido adicional puede ser Gly. Opcionalmente, la secuencia de cualquiera de los análogos de compstatina que se obtiene reemplazando uno o más aminoácidos de la secuencia de la compstatina incluye además hasta 5, o hasta 10, aminoácidos adicionales en el extremo C. Se deberá entender que los análogos de compstatina pueden tener cualesquiera una o más de las características o cualidades de las diversas realizaciones descritas en la presente memoria, y las características o cualidades de cualquier realización pueden caracterizar adicionalmente cualquier otra realización descrita en la presente memoria, a menos que se establezca de otro modo, o que sea evidente a partir del contexto. La secuencia del análogo de compstatina puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia idéntica a la de la compstatina, excepto en las posiciones correspondientes a las posiciones 4 y 9 de la secuencia de la compstatina.

La compstatina y ciertos análogos de compstatina que tienen actividad algo mayor que la compstatina contienen solamente aminoácidos estándares (los "aminoácidos estándares" son glicina, leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, cisteína, metionina, arginina, lisina, prolina, serina, treonina e histidina). Ciertos análogos de compstatina que tienen actividad mejorada incorporan uno o más aminoácidos no estándares. Los aminoácidos no estándares útiles incluyen aminoácidos mono- o multi-halogenados (por ejemplo, fluorados), D-aminoácidos, homo-aminoácidos, N-alquil-aminoácidos, deshidroaminoácidos, aminoácidos aromáticos (distintos de fenilalanina, tirosina y triptófano), ácido orto-, meta- o para-aminobenzoico, fosfo-aminoácidos, aminoácidos metoxilados y aminoácidos α,α -disustituidos. Un análogo de compstatina se puede diseñar reemplazando uno o más L-aminoácidos en un análogo de compstatina descrito en otra parte en la presente memoria con el correspondiente D-aminoácido. Dichos compuestos se pueden utilizar en la invención. Aminoácidos no estándares útiles ilustrativos incluyen: 2-naftilalanina (2-Nal), 1-naftilalanina (1-Nal), ácido carboxílico de 2-indanilglicina (2Ig1), dihidrotriptófano (Dht), 4-benzoil-L-fenilalanina (Bpa), ácido 2- α -aminobutírico (2-Abu), ácido 3- α -aminobutírico (3-Abu), ácido 4- α -aminobutírico (4-Abu), ciclohexilalanina (Cha), homociclohexilalanina (hCha), 4-fluoro-L-triptófano (4fW), 5-fluoro-L-triptófano (5fW), 6-fluoro-L-triptófano (6fW), 4-hidroxi-L-triptófano (4OH-W), 5-hidroxi-L-triptófano (5OH-W), 6-hidroxi-L-triptófano (6OH-W), 1-metil-L-triptófano (1MeW), 4-metil-L-triptófano (4MeW), 5-metil-L-triptófano (5MeW), 7-aza-L-triptófano (7aW), α -metil-L-triptófano (α MeW), β -metil-L-triptófano (β MeW), N-metil-L-triptófano (NMeW), ornitina (orn), citrulina, norleucina, ácido γ -glutámico, etc.

En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina comprende uno o más análogos de Trp en la posición 4 y/o 7 con relación a la secuencia de la compstatina. Análogos de Trp ilustrativos se mencionan anteriormente. Véase también Beene, et. al., *Biochemistry* 41: 10262-10269, 2002 (que describe, *inter alia*, análogos de Trp mono- o multi-halogenados); Babitzke & Yanofsky, *J Biol. Chem.* 270: 12452-12456, 1995 (que describe, *inter alia*, Trp metilado y halogenado y otros análogos de Trp e indol); y las Patentes de EE.UU. 6.214.790, 6.169.057, 5.776.970, 4.870.097, 4.576.750 y 4.299.838. Otros análogos de Trp incluyen variantes que están sustituidas (por ejemplo, por un grupo metilo) en el carbono α o β y, opcionalmente, también en una o más posiciones del anillo de indol. Los aminoácidos que comprenden dos o más anillos aromáticos, incluyendo los sustituidos, no sustituidos o sus variantes alternativamente sustituidas, son de interés como análogos de Trp.

En ciertas realizaciones, el análogo de Trp tiene carácter hidrófobo aumentado con relación al Trp. Por ejemplo, el anillo de indol puede estar sustituido por uno o más grupos alquilo (por ejemplo, metilo). En ciertas realizaciones, el análogo de Trp participa en una interacción hidrófoba con C3. Dicho análogo de Trp puede estar localizado, por ejemplo, en la posición 4 con relación a la secuencia de la compstatina. En ciertas realizaciones, el análogo de Trp comprende un componente de anillo aromático bicíclico sustituido o no sustituido o dos o más componentes de anillo aromático monocíclico sustituido o no sustituido.

En ciertas realizaciones, el análogo de Trp tiene una mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con C3 con relación al Trp, pero no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. El análogo de Trp puede tener mayor polaridad con relación al Trp y/o una mayor capacidad para participar en una interacción electrostática con un dador de enlace de hidrógeno en C3. Ciertos análogos de Trp ilustrativos con un mayor carácter para la formación de enlaces de hidrógeno comprenden un sustituyente electronegativo en el anillo de indol. Dicho análogo de Trp puede estar localizado, por ejemplo, en la posición 7 con relación a la secuencia de la compstatina.

En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina comprende además uno o más análogos de Ala (por ejemplo, en la posición 9 con relación a la secuencia de la compstatina), por ejemplo, análogos de Ala que son idénticos a Ala excepto que incluyen uno o más grupos CH_2 en la cadena lateral. En ciertas realizaciones, el análogo de Ala es un aminoácido no ramificado con un único metilo, tal como 2-Abu.

Un análogo de compstatina es un compuesto que comprende un péptido que tiene una secuencia de $(\text{X}^{\text{aa}})_n\text{—Gln—Asp—Xaa—Gly—(X}^{\text{aa}})_m$, (SEQ ID NO: 2) donde cada uno de X^{aa} y cada uno de X^{aa} es un aminoácido o análogo de aminoácido independientemente seleccionado, donde Xaa es Trp o un análogo de Trp, y donde $n > 1$ y $m > 1$ y $n + m$ está entre 5 y 21. El péptido tiene una secuencia central de Gln—Asp—Xaa—Gly , en la que Xaa es Trp o un análogo de Trp, por ejemplo, un análogo de Trp que tiene mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con un dador de enlace de H, con relación a Trp, pero que en ciertas realizaciones no tiene mayor carácter hidrófobo con relación a Trp. Por ejemplo, el análogo puede ser uno en el cual el anillo de indol del Trp está sustituido con un resto electro-negativo, por ejemplo, un halógeno, tal como flúor. En una realización, Xaa es 5-fluorotriptófano. En ausencia de evidencia contraria, un experto en la técnica reconocerá que cualquier péptido no natural cuya secuencia comprenda esta secuencia central que inhibe la activación del complemento y/o se une a C3, habrá sido diseñado en base a la secuencia de la compstatina. Xaa puede ser un aminoácido o un análogo de aminoácido distinto de un análogo de Trp que permita que el péptido Gln—Asp—Xaa—Gly forme un pliegue β .

En la invención, el análogo de compstatina es un péptido cíclico que tiene una secuencia central de $\text{X}^{\text{aa}}\text{—Gln—Asp—Xaa—Gly}$ (SEQ ID NO: 3), en la que X^{aa} y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia central forma un pliegue β en el contexto del péptido. El pliegue β puede ser flexible, permitiendo al péptido adoptar dos o más conformaciones determinadas por ejemplo, utilizando resonancia magnética nuclear (RMN). En ciertas realizaciones, X^{aa} es un análogo de Trp que comprende un componente de anillo aromático bicíclico sustituido o no sustituido, o dos o más componentes de anillos aromáticos monocíclicos sustituidos o no sustituidos. En ciertas realizaciones de la invención, X^{aa} se selecciona del grupo que consiste en 2-

naftilalanina, 1-naftilalanina, ácido carboxílico de 2-indanilglicina, dihidrotriptófano y benzoilfenilalanina. En ciertas realizaciones de la invención, X'aa es un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. Por ejemplo, X'aa puede ser 1-metiltriptófano. En ciertas realizaciones de la invención, Xaa es un análogo de Trp que tiene mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con relación al Trp pero que, en ciertas realizaciones, no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de Trp que tiene mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con relación al Trp comprende una modificación en el anillo de indol del Trp, por ejemplo, en la posición 5, tal como una sustitución de un átomo de halógeno por un átomo de H en la posición 5. Por ejemplo, Xaa puede ser 5-fluorotriptófano.

En ciertas realizaciones de la invención, el péptido tiene una secuencia central de X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'aa (SEQ ID NO: 4), en la que X'aa y Xaa se seleccionan, cada una independientemente de Trp y análogos de Trp y X'aa se selecciona de His, Ala, análogos de Ala, Phe y Trp. En ciertas realizaciones de la invención, X'aa es un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp, tal como 1-metiltriptófano, u otro análogo de Trp que tiene un sustituyente alquilo en el anillo de indol (por ejemplo, en la posición 1, 4, 5 o 6). En ciertas realizaciones, X'aa es un análogo de Trp que comprende un componente de anillo aromático bicíclico sustituido o no sustituido, o dos o más componentes de anillos aromáticos monocíclicos sustituidos o no sustituidos. En ciertas realizaciones de la invención, X'aa se selecciona del grupo que consiste en 2-naftilalanina, 1-naftilalanina, ácido carboxílico de 2-indanilglicina, dihidrotriptófano y benzoilfenilalanina. En ciertas realizaciones de la invención, Xaa es un análogo de Trp que tiene mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con C3 con relación al Trp pero que, en ciertas realizaciones, no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de Trp que tiene mayor propensión a formar enlaces de hidrógeno con relación al Trp comprende una modificación en el anillo de indol del Trp, por ejemplo, en la posición 5, tal como una sustitución de un átomo de halógeno por un átomo de H en la posición 5. Por ejemplo, Xaa puede ser 5-fluorotriptófano. En ciertas realizaciones, X'aa es Ala o un análogo de Ala, tal como Abu, u otro aminoácido no ramificado con un único metilo. En ciertas realizaciones de la invención, el péptido tiene una secuencia central de X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'aa (SEQ ID NO: 4), en la que X'aa y Xaa se seleccionan independientemente cada uno de Trp, análogos de Trp y aminoácidos o análogos de aminoácido que comprenden al menos una cadena lateral aromática, y X'aa se selecciona de His, Ala, análogos de Ala, Phe, y Trp. En ciertas realizaciones, X'aa se selecciona de análogos de Trp, aminoácidos aromáticos y análogos de aminoácidos aromáticos.

En la invención el péptido es cíclico. El péptido puede estar ciclizado mediante un enlace entre dos aminoácidos cualesquiera, uno de los cuales es (X'aa)_n y el otro está localizado dentro de (X'aa)_m. En ciertas realizaciones, la porción cíclica del péptido tiene una longitud entre 9 y 15 aminoácidos, por ejemplo, una longitud de 10-12 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la porción cíclica del péptido tiene una longitud de 11 aminoácidos, con un enlace (por ejemplo, un enlace disulfuro) entre los aminoácidos en las posiciones 2 y 12. Por ejemplo, el péptido puede tener una longitud de 13 aminoácidos, con un enlace entre los aminoácidos en las posiciones 2 y 12 que da como resultado una porción cíclica con una longitud de 11 aminoácidos.

En ciertas realizaciones, el péptido comprende o consiste en la secuencia X'aa1-X'aa2-X'aa3-X'aa4-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'aa1-X'aa2-X'aa3-X'aa4-X'aa5 (SEQ ID NO: 5). En ciertas realizaciones, X'aa4 y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp, and X'aa1, X'aa2, X'aa3, X'aa1, X'aa2, X'aa3, X'aa4 y X'aa5 se seleccionan independientemente de aminoácidos y análogos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, X'aa4 y Xaa se seleccionan de aminoácidos aromáticos y análogos de aminoácidos aromáticos. Uno o más cualesquiera de X'aa1, X'aa2, X'aa3, X'aa1, X'aa2, X'aa3, X'aa4 y X'aa5 puede ser idéntico al aminoácido en la posición correspondiente en la compstatina. En una realización, X'aa1 es Ala o un aminoácido no ramificado con un único metilo. El péptido puede ciclizarse mediante un enlace covalente entre (i) X'aa1, X'aa2 o X'aa3; y (ii) X'aa2, X'aa3, X'aa4 o X'aa5. En una realización, el péptido se cicliza mediante un enlace covalente entre X'aa2 y X'aa4. En una realización, los aminoácidos unidos covalentemente son cada uno Cys y el enlace covalente es un enlace disulfuro (S-S). En otras realizaciones, el enlace covalente es un enlace C-C, C-O, C-S o C-N. En ciertas realizaciones de la invención, uno de los residuos unido covalentemente es un aminoácido o un análogo de aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende una amina primaria o secundaria, el otro residuo unido covalentemente es un aminoácido o un análogo de aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende un grupo ácido carboxílico, y el enlace covalente es un enlace amida. Los aminoácidos o análogos de aminoácido que tienen una cadena lateral que comprende una amina primaria o secundaria incluyen lisina y ácidos diaminocarboxílicos de estructura general NH₂(CH₂)_nCH(NH₂)COOH, tales como ácido 2,3-diaminopropiónico (dapa), ácido 2,4-diaminobutírico (daba) y ornitina (orn), en donde n = 1 (dapa), 2 (daba) y 3 (orn), respectivamente. Ejemplos de aminoácidos que tienen una cadena lateral que comprende un grupo ácido carboxílico incluyen aminoácidos dicarboxílicos tales como ácido glutámico y ácido aspártico. También se pueden utilizar análogos tales como ácido beta-hidroxi-L-glutámico.

En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que comprende un péptido que tiene una secuencia:

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4 (SEQ ID NO: 6); en la que:

Xaa1 es Ile, Val, Leu, B¹-Ile, B¹-Val, B¹-Leu o un dipéptido que comprende Gly-Ile o B¹-Gly-Ile y B¹ representa un primer resto bloqueante;

Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente a partir de Trp y análogos de Trp;

Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp, o un análogo de Trp;

5 Xaa4 es L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido seleccionado de Thr—Ala y Thr—Asn, o un tripéptido que comprende Thr—Ala—Asn, donde un —OH del extremo carboxi de cualquiera de L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, Ala o Asn está reemplazado opcionalmente por un segundo resto bloqueante B²; y

los dos residuos Cys están unidos por un enlace disulfuro.

En otras realizaciones, Xaa1 está ausente o es cualquier aminoácido o análogo de aminoácido y Xaa2, Xaa2*, Xaa3 y Xaa4 son como se han definido anteriormente. Si Xaa1 está ausente, el residuo Cys N-terminal puede tener un resto bloqueante B¹ unido al mismo.

10 En otra realización, Xaa4 es cualquier aminoácido o análogo de aminoácido y Xaa1, Xaa2, Xaa2* y Xaa3 son como se han definido anteriormente. En otra realización, Xaa4 es un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Thr—Ala y Thr—Asn, donde el —OH del extremo carboxi o Ala o Asn están reemplazados opcionalmente por un segundo resto bloqueante B².

En cualquiera de las realizaciones del análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 6, Xaa2 puede ser Trp.

15 En cualquiera de las realizaciones del análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 6, Xaa2 puede ser un análogo de Trp que comprende un componente de anillo aromático bicíclico sustituido o no sustituido, o dos o más componentes de anillos aromáticos monocíclicos sustituidos o no sustituidos. Por ejemplo, el análogo de Trp se puede seleccionar de 2-naftilalanina (2-Nal), 1-naftilalanina (1-Nal), ácido carboxílico de 2-indanilglicina (Ig1), dihidrotriptófano (Dht) y 4-benzoil-L-fenilalanina.

20 En cualquiera de las realizaciones del análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 6, Xaa2 puede ser un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. Por ejemplo, el análogo de Trp se puede seleccionar de 1-metiltriptófano, 4-metiltriptófano, 5-metiltriptófano y 6-metiltriptófano. En una realización, el análogo de Trp es 1-metiltriptófano. En una realización, Xaa2 es 1-metiltriptófano, Xaa2* es Trp, Xaa3 es Ala, y los otros aminoácidos son idénticos a los de la compstatina.

25 En cualquiera de las realizaciones del análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 6, Xaa2* puede ser un análogo de Trp, tal como un análogo de Trp que tenga una mayor propensión a formar enlace de hidrógeno con C3 con relación al Trp que, en ciertas realizaciones, no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. En ciertas realizaciones el análogo de Trp comprende un sustituyente electronegativo en el anillo de indol. Por ejemplo, el análogo de Trp se puede seleccionar de 5-fluorotriptófano y 6-fluorotriptófano.

30 En ciertas realizaciones de la invención, Xaa2 es Trp y Xaa2* es un análogo de Trp que tiene una mayor propensión a formar enlace de hidrógeno con C3 con relación al Trp que, en ciertas realizaciones, no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. En ciertas realizaciones del análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 6, Xaa2 es un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp, tal como un análogo de Trp seleccionado de 1-metiltriptófano, 4-metiltriptófano, 5-metiltriptófano y 6-metiltriptófano, y Xaa2* es un análogo de Trp que tiene una mayor propensión a formar enlace de hidrógeno con C3 con relación al Trp que, en ciertas realizaciones, no tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp. Por ejemplo, en una realización Xaa2 es metiltriptófano y Xaa2* es 5-fluorotriptófano.

En ciertas de las realizaciones anteriormente mencionadas, Xaa3 es Ala. En ciertas de las realizaciones anteriormente mencionadas, Xaa3 es un aminoácido no ramificado con un único metilo, por ejemplo, Abu.

40 En ciertas realizaciones, la invención emplea un análogo de compstatina de SEQ ID NO: 6, como se ha descrito anteriormente, en la que Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente de Trp, análogos de Trp y otros aminoácidos o análogos de aminoácidos que comprenden al menos un anillo aromático, y Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp, un análogo de Trp, u otro aminoácido aromático o análogo de aminoácido aromático.

45 En ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante presente en los extremos N o C de cualquiera de los análogos de compstatina descritos en la presente memoria es cualquier resto que estabiliza un péptido frente a la degradación que de otro modo ocurriría en sangre o humor vítreo de mamífero (por ejemplo, ser humano o primate no humano). Por ejemplo, el resto bloqueante B¹ podría ser cualquier resto que altere la estructura del extremo N de un péptido de modo que inhiba la escisión de un enlace peptídico entre el aminoácido N-terminal del péptido y el aminoácido adyacente. El resto bloqueante B² podría ser cualquier resto que altere la estructura del extremo C de un péptido de modo que inhiba la escisión de un enlace peptídico entre el aminoácido C-terminal del péptido y el aminoácido adyacente. Se puede utilizar cualquier resto bloqueante adecuado conocido en la técnica. En ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante B¹ comprende un grupo acilo (es decir, la porción de un ácido carboxílico que permanece después de eliminar el grupo —OH). El grupo acilo comprende normalmente entre 1 y 12 carbonos, por ejemplo, entre 1 y 6 carbonos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante B¹ se selecciona del grupo que consiste en: formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, valerilo, isovalerilo, etc. En

una realización, el resto bloqueante B¹ es un grupo acetilo, es decir, Xaa1 es Ac—Ile, Ac—Val, Ac—Leu o Ac—Gly—Ile.

En ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante B² es una amina primaria o secundaria (-NH₂ o NHR¹, donde R es un resto orgánico, tal como un grupo alquilo).

- 5 En ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante B¹ es cualquier resto que neutralice o reduzca la carga negativa que de otro modo podría estar presente en el extremo N a pH fisiológico. En ciertas realizaciones de la invención, el resto bloqueante B² es cualquier resto que neutralice o reduzca la carga negativa que de otro modo podría estar presente en el extremo C a pH fisiológico.

- 10 En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina está acetilado o amidado en el extremo N y/o en el extremo C, respectivamente. Un análogo de compstatina puede estar acetilado en el extremo N, amidado en el extremo C y/o tanto acetilado en el extremo N como amidado en el extremo C. En ciertas realizaciones de la invención, un análogo de compstatina comprende un grupo alquilo o arilo en el extremo N en lugar de un grupo acetilo.

En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que comprende un péptido que tiene una secuencia:

- 15 Xaa1—Cys—Val—Xaa2—Gln—Asp—Xaa2*—Gly—Xaa3—His—Arg—Cys—Xaa4 (SEQ ID NO: 7); en la que:

Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac—Ile, Ac—Val, Ac—Leu o un dipéptido que comprende Gly—Ile o Ac—Gly—Ile;

Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente de Trp y análogos de Trp;

Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp, o un análogo de Trp;

- 20 Xaa4 es L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido seleccionado de Thr—Ala y Thr—Asn, o un tripéptido que comprende Thr—Ala—Asn, donde un -OH carboxi-terminal de cualquiera de L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, Ala o Asn está reemplazado opcionalmente por -NH₂; y

los dos residuos Cys están unidos por un enlace disulfuro.

- 25 Xaa1, Xaa2, Xaa2*, Xaa3 y Xaa4 son como se han descrito anteriormente para las diversas realizaciones de la SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, Xaa2* es Trp. En ciertas realizaciones, Xaa2 es un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación al Trp, por ejemplo, 1-metilriptófano. En ciertas realizaciones, Xaa3 es Ala. En ciertas realizaciones, Xaa3 es un aminoácido no ramificado con un único metilo.

En ciertas realizaciones de la invención, Xaa1 es Ile y Xaa4 es L—Thr.

En ciertas realizaciones de la invención, Xaa1 es Ile, Xaa2* es Trp y Xaa4 es L—Thr.

- 30 En ciertas realizaciones, la invención utiliza un análogo de compstatina de SEQ ID NO: 7, como se ha descrito anteriormente, donde Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente de Trp, análogos de Trp, otros aminoácidos o análogos de aminoácidos aromáticos, y Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp, un análogo de Trp, u otro aminoácido aromático o análogo de aminoácido aromático.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los análogos de compstatina descritos en la presente memoria, Xaa3 es un análogo de His.

- 35 La Tabla 1 proporciona una lista no limitativa de análogos de compstatina útiles en la presente invención. Los análogos se representan en forma abreviada en la columna de la izquierda, indicando modificaciones específicas en las posiciones señaladas (1-13) en comparación con el péptido precursor, compstatina. A menos que se indique de otro modo, los péptidos están amidados en el extremo C. El texto en **negrita** se utiliza para indicar ciertas modificaciones. La actividad con relación a la compstatina se basa en datos publicados y ensayos descritos (WO2004/026326, Mallik, 2005; Katragadda, 2006). Cuando se consultaron múltiples publicaciones que describían una actividad, se utilizó el valor más recientemente publicado, y se reconocerá que los valores pueden ajustarse en el caso de que existan diferencias entre los ensayos. También se apreciará que los péptidos recogidos en la Tabla 1 están ciclizados, por ejemplo, por un enlace disulfuro entre los dos residuos Cys, cuando se utilizan en la invención. Se pueden utilizar otros métodos para ciclizar los péptidos.

45

Tabla 1

Péptidos	Secuencia	SEQ ID NO:	Actividad con relación a la compstatina
Compstatina	H-ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	8	*
Ac-compstatina	Ac-ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	9	3 veces más
Ac-V4Y/H9A	Ac-ICVYQDWGAHRCT-CONH ₂	10	14 veces más
Ac-V4W/H9A -OH	Ac-ICVWQDWGAHRCT-COOH	11	27 veces más
Ac-V4W/H9A	Ac-ICVWQDWGAHRCT-CONH ₂	12	45 veces más
Ac-V4W/H9A/T13dT-OH	Ac-ICVWQDWGAHRCTdT-COOH	13	55 veces más
Ac-V4(2-Nal)/H9A	Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-CONH ₂	14	99 veces más
Ac-V4(2-Nal)/H9A-OH	Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-COOH	15	38 veces más
Ac-V4(1-Nal)/H9A-OH	Ac-ICV(1-Nal)QDWGAHRCT-COOH	16	30 veces más
Ac-V42Igl/H9A	Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-CONH ₂	17	39 veces más
Ac-V42Igl/H9A-OH	Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-COOH	18	37 veces más
Ac-V4Dht/H9A-OH	Ac-ICVDhtQDWGAHRCT-COOH	19	5 veces más
Ac-V4(Bpa)/H9A-OH	Ac-ICV(Bpa)QDWGAHRCT-COOH	20	49 veces más
Ac-V4(Bpa)/H9A	Ac-ICV(Bpa)QDWGAHRCT-CONH ₂	21	86 veces más
Ac-V4(Bta)/H9A-OH	Ac-ICV(Bta)QDWGAHRCT-COOH	22	65 veces más
Ac-V4(Bta)/H9A	Ac-ICV(Bta)QDWGAHRCT-CONH ₂	23	64 veces más
Ac-V4W/H9(2-Abu)	Ac-ICVWQDWG(2-Abu)HRCT-CONH ₂	24	64 veces más
+G/V4W/H9A+AN-OH	H-GICVWQDWGAHRCTAN-COOH	25	38 veces más
Ac-V4(5fW)/H9A	Ac-ICV(5fW)QDWGAHRCT-CONH ₂	26	31 veces más
Ac-V4(5-MeW)/H9A	Ac-ICV(5-metil-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	27	67 veces más
Ac-V4(1-MeW)/H9A	Ac-ICV(1-metil-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	28	264 veces más
Ac-V4W/W7(5fW)/H9A	Ac-ICVWQD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	29	121 veces más
Ac-V4(5fW)/W7(5fW)/H9A	Ac-ICV(5fW)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	30	NA
Ac-V4(5-MeW)/W7(5fW)/H9A	Ac-ICV(5-metil-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	31	NA
Ac-V4(1-MeW)/W7(5fW)/H9A	Ac-ICV(1-metil-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	32	264x más

NA = no disponible

- 5 En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia seleccionada de las secuencias 9-32. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 y 32. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 30 y 31. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia de SEQ ID NO: 28. En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de compstatina tiene una secuencia de SEQ ID NO: 32.
- 10 En otras realizaciones, se utilizan los análogos de compstatina que tienen secuencias como las mostradas en la Tabla 1, pero donde el grupo Ac está reemplazado por un resto bloqueante alternativo B¹, como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, se utilizan análogos de compstatina que tienen secuencias como las mostradas en la Tabla 1, pero donde el grupo -NH₂ está reemplazado por un resto bloqueante alternativo B², como se ha descrito anteriormente.
- 15 En una realización, el análogo de compstatina se une a sustancialmente la misma región de la cadena β de C3 humano como lo hace la compstatina. En una realización, el análogo de compstatina es un compuesto que se une a un fragmento de la porción C-terminal de la cadena β de C3 humano que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa al cual se une la compstatina (Soulika, A.M., et al., *Mol. Immunol.*, 35:160, 1998; Soulika, A.M., et al., *Mol. Immunol.* 43(12):2023-9, 2006). En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que se une al sitio de unión de compstatina como se determina en una estructura compstatina-C3, por ejemplo, una estructura cristalina o estructura tridimensional obtenida por RMN. En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que podría sustituir a la compstatina en una estructura compstatina-C3 y que formaría sustancialmente los mismos contactos intermoleculares con C3 que la compstatina. En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que se une al sitio de unión de un péptido que tiene una secuencia como se muestra en la
- 20 Tabla 1, por ejemplo, SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 o 32 en una estructura péptido-C3, por ejemplo, una estructura cristalina. En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que se une al sitio de unión de un péptido que tiene SEQ ID NO: 30 o 31 en una estructura péptido-C3, por ejemplo, una estructura cristalina. En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que podría sustituir al péptido de SEQ ID NO: 9-32, por ejemplo, SEQ ID NO: 14, 21, 28 o 32 en una estructura péptido-C3 y que formaría sustancialmente los mismos
- 25

contactos intermoleculares con C3 que el péptido. En ciertas realizaciones, el análogo de compstatina es un compuesto que podría sustituir el péptido de SEQ ID NO: 30 o 31 en una estructura péptido-C3 y que formaría sustancialmente los mismos contactos intermoleculares con C3 que el péptido.

Un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente si un análogo de compstatina se une a un fragmento de la porción C-terminal de la cadena β de C3 utilizando métodos experimentales habituales. Por ejemplo, un experto en la técnica podría sintetizar una versión fotorreticulable del análogo de compstatina incluyendo un aminoácido fotorreticulable, tal como *p*-benzoil-L-fenilalanina (Bpa) en el compuesto, por ejemplo, en el extremo C de la secuencia (Soulika, A.M., et al, *supra*). Opcionalmente, se podrían incluir aminoácidos adicionales, por ejemplo, una etiqueta de epítipo, tal como una etiqueta FLAG o una etiqueta HA, para facilitar la detección del compuesto, por ejemplo, transferencia de Western. El análogo de compstatina se incuba con el fragmento y se inicia la reticulación. La localización conjunta del análogo de compstatina y del fragmento de C3 indica la unión. También se puede utilizar resonancia de plasmones superficiales para determinar si un análogo de compstatina se une al sitio de unión de la compstatina a C3 o a uno de sus fragmentos. Un experto en la técnica podría utilizar programas de ordenador de modelado molecular para predecir si un compuesto formaría sustancialmente los mismos contactos intermoleculares con C3 que como lo haría la compstatina o un péptido que tenga la secuencia de cualquiera de los péptidos de la Tabla 1, por ejemplo, SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 o 32, o en otras realizaciones SEQ ID NO: 30 o 31.

Los análogos de compstatina se pueden preparar por diversos métodos de síntesis de péptidos, conocidos en la técnica, mediante condensación de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de acuerdo con métodos convencionales de síntesis de péptidos, mediante expresión *in vitro* o en células vivas a partir de secuencias de ácidos nucleicos apropiadas que los codifican utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar utilizando metodologías estándares en fase sólida, tales como las descritas en Malik, *supra*, Katragadda, *supra* y/o WO2004026328. Los restos potencialmente reactivos, tales como grupos amino y carboxilo, grupos funcionales reactivos, etc., se pueden proteger y posteriormente desproteger utilizando diversos grupos protectores y metodologías conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd ed. Greene, T. W. and Wuts, P. G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999. Los péptidos se pueden purificar utilizando métodos estándares, tales como HPLC en fase inversa. La separación de péptidos diastereoisómeros, si se desea, se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos, tales como HPLC en fase inversa. Las preparaciones se pueden liofilizar, si se desea, y posteriormente disolver en un disolvente adecuado, por ejemplo, agua. El pH de la solución resultante se puede ajustar, por ejemplo, al pH fisiológico, utilizando una base, tal como NaOH. Las preparaciones de péptidos se pueden caracterizar por espectrometría de masas, si se desea, por ejemplo, para confirmar la masa y/o la formación de enlaces disulfuro. Véase, por ejemplo, Mallik, 2005 y Katragadda, 2006.

La estructura de la compstatina es conocida en la técnica y también son conocidas las estructuras obtenidas por RMN de cierto número de análogos de compstatina que tienen actividad más alta que la compstatina (Malik, *supra*). La información estructural se puede utilizar para diseñar compuestos miméticos de compstatina. Un compuesto mimético de compstatina puede ser cualquier compuesto que compita con la compstatina o con cualquier análogo de compstatina (por ejemplo, un análogo de compstatina cuya secuencia se muestra en la Tabla 1) por unirse a C3 o uno de sus fragmentos (tal como un fragmento de 40 kD de la cadena β a la cual se une la compstatina) y que tenga una actividad igual o superior a la de la compstatina. El compuesto mimético de compstatina puede ser un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña. El compuesto mimético de compstatina puede ser un compuesto que se une al sitio de unión de la compstatina como se determina en una estructura compstatina-C3, por ejemplo, una estructura cristalina o una estructura tridimensional obtenida por RMN. El compuesto mimético de compstatina puede ser un compuesto que podría sustituir a la compstatina en una estructura compstatina-C3 y que formaría sustancialmente los mismos contactos intermoleculares con C3 que la compstatina. El compuesto mimético de compstatina puede ser un compuesto que se une al sitio de unión de un péptido que tenga una secuencia que se muestra en la Tabla 1, por ejemplo, SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 o 32, o SEQ ID NO: 30 o 31, en una estructura péptido-C3. El compuesto mimético de compstatina puede ser un compuesto que podría sustituir a un péptido que tiene una secuencia que se muestra en la Tabla 1, por ejemplo, SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 o 32, o SEQ ID NO: 30 o 31, en una estructura péptido-C3 y que formaría sustancialmente los mismos contactos intermoleculares con C3 que el péptido. El compuesto mimético de compstatina puede tener una cadena principal no peptídica pero tener cadenas laterales dispuestas en una secuencia diseñada en base a la secuencia de la compstatina.

Un experto en la técnica apreciará que una vez que se ha logrado una conformación deseada particular de un péptido corto, se conocen bien los métodos para diseñar un péptido o un péptidomimético que se ajusta a dicha conformación. Véanse, por ejemplo, G.R. Marshall (1993), *Tetrahedron*, 49: 3547-3558; Hruby and Nikiforovich (1991), en *Molecular Conformation and Biological Interactions*, P. Balaram & S. Ramasehan, eds., *Indian Acad. of Sci.*, Bangalore, pp. 429-455; Eguchi M, Kahn M., *Mini Rev. Med. Chem.*, 2(5):447-62, 2002. De particular relevancia para la presente invención, el diseño de análogos de péptido se puede refinar más considerando la contribución de diversas cadenas laterales de residuos de aminoácido, por ejemplo, para el efecto de grupos funcionales o para consideraciones estéricas como se describen en la técnica para la compstatina y sus análogos, entre otros.

Los expertos en la técnica apreciarán que un péptidomimético puede servir igualmente como un péptido para los fines de proporcionar la conformación de la cadena principal específica y las funcionalidades de las cadenas laterales requeridas para unirse a C3 e inhibir la activación del complemento.

- De acuerdo con ello, los compuestos inhibidores del complemento, que se unen a C3, se pueden producir y utilizar a través del uso de aminoácidos naturales, derivados de aminoácidos, análogos o moléculas no aminoacídicas capaces de unirse para formar la conformación de la cadena principal apropiada. En la presente memoria un análogo no peptídico o a un análogo que comprende componentes peptídicos y no peptídicos, se denomina algunas veces "peptidomimético" o "compuesto mimético isostérico", para indicar sustituciones o derivaciones de un péptido que posee casi las mismas características conformacionales y/u otras funcionalidades de la cadena principal, de modo que sea suficientemente similar a los péptidos ilustrados, para inhibir la activación del complemento. Más generalmente, un compuesto mimético de compstatina es cualquier compuesto que posicionaría farmacóforos similarmente a su posicionamiento en la compstatina, incluso si difiere la cadena principal.
- El uso de peptidomiméticos para el desarrollo de análogos peptídicos de alta afinidad es bien conocido en la técnica. Suponiendo restricciones rotacionales similares a las de los residuos de aminoácidos dentro de un péptido, los análogos que comprenden restos no aminoacídicos se pueden analizar, y sus restos conformacionales se pueden verificar, por medio del gráfico de Ramachandran (Hruby & Nikiforovich, 1991), entre otras técnicas conocidas. Los métodos de cribado virtual se pueden utilizar para identificar compuesto miméticos de compstatina que se unen a C3. Dichos métodos pueden comprender el uso de algoritmos adecuados para acoplar por ordenador, puntuar y clasificar opcionalmente una pluralidad de estructuras candidatas. Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de programas de ordenador disponibles para realizar el método de cribado virtual. Programas ilustrativos útiles para acoplamiento molecular flexible incluyen DOCK 4.0, FlexX 1.8, AutoDock 3.0, GOLD 1.2, ICM 2.8, y sus versiones más recientes.
- Un experto en la técnica será capaz de establecer fácilmente ensayos de cribado adecuados para identificar compuesto miméticos de compstatina adicionales y para seleccionar los que tengan actividades inhibitoras deseadas. Por ejemplo, la compstatina o uno de sus análogos se podría marcar (por ejemplo, con un marcador radiactivo o fluorescente) y poner en contacto con C3 en presencia de diferentes concentraciones de un compuesto de ensayo. Se evalúa la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir la unión del análogo de compstatina a C3. Un compuesto de ensayo que disminuye significativamente la unión del análogo de compstatina a C3 es un compuesto mimético de compstatina candidato. Por ejemplo, un compuesto de ensayo que disminuya la concentración en estado estacionario de un complejo análogo de compstatina-C3, o que disminuya la velocidad de formación de un complejo análogo de compstatina-C3 en al menos 25%, o en al menos 50%, es un compuesto mimético de compstatina candidato. Un experto en la técnica reconocerá que se puede utilizar cierto número de variaciones de este ensayo de cribado. Los compuestos que han de ser cribados incluyen productos naturales, colecciones de aptámeros, colecciones de presentación de fagos, quimiotecas sintetizadas utilizando química combinatoria, etc. Una quimioteca combinatoria se puede sintetizar en base a la secuencia central descrita anteriormente y la quimioteca se puede cribar para identificar compuesto miméticos de compstatina. Cualquiera de estos métodos se podría también utilizar para identificar nuevos análogos de compstatina que tengan actividad inhibitora mayor que los análogos de compstatina ensayados hasta ahora.
- La terapia de combinación utilizando dos o más inhibidores del complemento está dentro del alcance de la invención. Los dos o más inhibidores del complemento se pueden proporcionar en la misma composición. En una realización, al menos dos de los inhibidores del complemento son péptidos, teniendo cada uno una longitud entre 5 y 50 aminoácidos.
- Los inhibidores del complemento, opcionalmente unidos a un resto de unión, se pueden modificar por adición de una molécula, tal como polietilenglicol (PEG) o moléculas similares, para estabilizar el compuesto, reducir su inmunogenicidad, aumentar su tiempo de vida en el organismo, aumentar o disminuir su solubilidad y/o aumentar su resistencia a la degradación. Los métodos para pegilación se conocen bien en la técnica (Veronese, F.M. & Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 453-456, 2002; Davis, F.F., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 457-458, 2002; Wang, Y.S. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 547-570, 2002). Una amplia variedad de polímeros, tales como los PEG y los PEG modificados, incluyendo los PEG derivatizados a los cuales se les han unido convenientemente polipéptidos, se describen en *Nektar Advanced Pegylation*, 2005-2006 Product Catalog, Nektar Therapeutics, San Carlos, CA, que también proporciona detalles de procedimientos de conjugación apropiados.
- En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento es un compuesto multivalente que comprende una pluralidad de restos de inhibidores del complemento unidos covalente o no covalentemente a una cadena principal o armazón polimérico. Los restos de inhibidores del complemento pueden ser los mismos o diferentes. Un inhibidor del complemento puede comprender o estar modificado para comprender un grupo funcional reactivo o estar unido a un enlazador que comprende un grupo funcional reactivo. El grupo funcional reactivo facilita la unión del inhibidor del complemento a la cadena principal polimérica. El inhibidor del complemento puede ser cualquiera de los inhibidores del complemento descritos en la presente memoria. Se apreciará que después de la unión a la cadena principal polimérica, la estructura del resto del inhibidor del complemento diferirá ligeramente de la de los inhibidores del complemento descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un inhibidor del complemento que comprende un grupo amina (NH_2), representado como $\text{NH}_2\text{-R}^1$, puede reaccionar con un resto que comprende un ácido carboxílico (COOH), representado como $\text{R}^2\text{-(C=O)OH}$ para formar un conjugado que tiene la fórmula $\text{R}^2\text{-(C=O)-NH-R}^1$, en la cual uno de los hidrógenos presentes en el inhibidor del complemento ya no está presente y se ha formado un nuevo enlace covalente (C-N). Así, la expresión "resto del inhibidor del complemento" incluye moléculas que tienen la for-

mula precisa de un inhibidor del complemento como se describe en la presente memoria, así como también estructuras moleculares en las cuales un grupo funcional de un inhibidor del complemento ha reaccionado con un segundo grupo funcional, que normalmente conlleva la pérdida de al menos un átomo o grupo de átomos que estaba presente en la molécula del inhibidor del complemento antes de la reacción y la formación de un nuevo enlace covalente. El nuevo enlace covalente se forma entre un átomo que estaba previamente unido a uno de los átomos que se pierde del inhibidor del complemento y un átomo al cual se une el inhibidor del complemento.

Los restos de inhibidores del complemento pueden ser idénticos o diferentes. En ciertas realizaciones de la invención, el compuesto multivalente comprende múltiples casos, o copias, de un único resto de inhibidor del complemento. En otras realizaciones de la invención, el compuesto multivalente comprende uno o más casos de cada uno de los dos o más restos no idénticos de inhibidores del complemento, por ejemplo, 3, 4, 5, o más restos diferentes de inhibidores del complemento. En ciertas realizaciones de la invención, el número de restos de inhibidores del complemento ("n") está entre 2 y 6. En otras realizaciones de la invención, n está entre 7 y 20. En otras realizaciones de la invención, n está entre 20 y 100. En otras realizaciones, n está entre 100 y 1000. En otras realizaciones de la invención, n está entre 1000 y 10.000. En otras realizaciones, n está entre 10.000 y 50.000. En otras realizaciones, n está entre 50.000 y 100.000. En otras realizaciones, n está entre 100.000 y 1.000.000.

Los restos de inhibidores del complemento pueden estar unidos directamente al armazón polimérico o pueden estar unidos por un resto enlazador que conecta el resto del inhibidor del complemento con el armazón polimérico. El resto enlazador puede estar unido a un único resto del inhibidor del complemento y al armazón polimérico. Alternativamente, un resto enlazador puede tener múltiples restos de inhibidores del complemento unidos al mismo, de modo que el resto enlazador une múltiples restos de análogo de compstatina al armazón polimérico.

En una realización, el inhibidor del complemento comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende una amina primaria o secundaria, por ejemplo, un residuo de Lys. Por ejemplo, un residuo de Lys, o una secuencia que comprende un residuo de Lys, está añadido al extremo C del inhibidor del complemento. En una realización, el residuo de Lys está separado de la porción cíclica del inhibidor del complemento por medio de un espaciador rígido o flexible. El espaciador puede, por ejemplo, ser una cadena de alquilo saturada o no saturada, sustituida o no sustituida. La longitud de la cadena de alquilo puede ser, por ejemplo, entre 2 y 20 átomos de carbono. En otras realizaciones, el espaciador es un péptido. El espaciador peptídico puede tener, por ejemplo, una longitud entre 1 y 20 aminoácidos, por ejemplo, una longitud entre 4 y 20 aminoácidos. Espaciadores adecuados comprenden o consisten en múltiples residuos de Gly, residuos de Ser, o ambos.

Se puede utilizar cualquiera de una variedad de cadenas principales o armazones poliméricos. Por ejemplo, la cadena principal o armazón polimérico puede ser una poliamida, polisacárido, polianhídrido, poliacrilamida, polimetacrilato, polipéptido, poli(óxido de etileno) o dendrímero. Métodos adecuados y cadenas principales poliméricas se describen, por ejemplo, en WO98/46270 (PCT/US98/07171) o WO98/47002 (PCT/US98/06963). En una realización, la cadena principal o armazón polimérico comprende múltiples grupos funcionales reactivos, tales como grupos ácido carboxílico, anhídrido o succinimida. La cadena principal o armazón polimérico se hace reaccionar con los inhibidores del complemento. En una realización, el inhibidor del complemento comprende cualquiera de varios grupos funcionales reactivos diferentes, tales como grupos ácido carboxílico, anhídrido o succinimida, los cuales se hacen reaccionar con grupos apropiados de la cadena principal polimérica. Alternativamente, las unidades monoméricas que podrían unirse entre sí para formar una cadena principal o armazón polimérico, se hacen reaccionar primero con los inhibidores del complemento y se polimerizan los monómeros resultantes. En otra realización, las cadenas cortas se prepolimerizan, funcionalizan y luego una mezcla de cadenas cortas de diferente composición se ensamblan en polímeros más grandes.

Inhibidores del complemento dirigidos

En ciertas realizaciones de la invención el inhibidor del complemento se dirige hacia un componente presente en un lugar extravascular de un sujeto con riesgo o que padece un trastorno mediado por el complemento. De acuerdo con estas realizaciones, se administra localmente al sujeto una composición que comprende: (i) un inhibidor del complemento; y (ii) un resto de unión que se une a un componente presente en un lugar extravascular de un sujeto con riesgo o que padece un trastorno mediado por el complemento, en el que dicho lugar extravascular no es el ojo, y dicho trastorno no es un trastorno ocular. En ciertas realizaciones, el resto de unión y el inhibidor del complemento están enlazados. El enlace puede ser covalente o no covalente y puede ser directo o indirecto en diversas realizaciones de la invención. El resto de unión puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o ligando, como se analiza a continuación. En general, el componente puede ser cualquier molécula presente sobre o en la superficie de una célula o entidad molecular no celular. Por "sobre o en la superficie de una célula o entidad molecular no celular" se entiende que el componente es accesible a las moléculas presentes en el ambiente extracelular de modo que puede ser reconocido y unido por el resto. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, el componente es un marcador celular. El marcador celular puede ser cualquier marcador que se exprese sobre o en la superficie de una célula presente en un lugar extracelular de interés. En ciertas realizaciones de la invención, el marcador celular es un marcador específico de tipo celular.

El componente puede ser enteramente extracelular. El componente puede estar insertado dentro de la membrana celular. En ciertas realizaciones de la invención, el componente puede estar parcial o enteramente dentro de la

membrana, en cuyo caso la entidad puede penetrar parcialmente la membrana para ganar acceso. En general, el componente no está situado en el citoplasma de una célula. Siempre y cuando esté expuesta o sea accesible una porción suficiente del componente de modo que pueda ser reconocido y unido, se dirá que está presente sobre o en la superficie. Si la diana es una entidad molecular distinta de una célula, el componente puede ser cualquier entidad química presente sobre o en la superficie de la molécula que sea reconocible por un anticuerpo o ligando. Una gran cantidad de componentes moleculares se han identificado en depósitos en sitios de inflamación. Dichos componentes son entidades moleculares no celulares adecuadas a las cuales se puede dirigir el inhibidor del complemento. Normalmente el resto de unión reconocerá una sub-porción del componente que tiene características estructurales tridimensionales particulares. Dicha porción se denominará un "epítipo", aunque se entiende que el resto de unión puede no ser un anticuerpo. El epítipo puede ser uno que está expuesto o presente solamente o mayormente en el estado morbo.

En ciertas realizaciones de la invención, el resto de unión está enlazado al inhibidor del complemento. En otras realizaciones, el resto de unión comprende una porción que se une a otra molécula a la cual está unido el inhibidor del complemento. Restos de unión adecuados incluyen anticuerpos y ligandos que se unen específicamente a un marcador celular o entidad molecular no celular, tal como las mencionadas anteriormente. El enlace entre el resto de unión y el inhibidor del complemento puede ser covalente o no covalente y puede ser directo o indirecto en diversas realizaciones de la invención. "Indirecto" en este contexto significa que el resto de unión y el inhibidor del complemento están ambos enlazados a un tercer resto. En diversas realizaciones de la invención, un resto de unión apropiado es cualquier molécula que se une específicamente a una molécula diana (por ejemplo, polipéptido o una de sus porciones, tal como un resto de carbohidrato), a través de un mecanismo distinto de la interacción antígeno-anticuerpo. Dicho resto de unión se denomina "ligando". Por ejemplo, en diversas realizaciones de la invención el ligando es un polipéptido, péptido, ácido nucleico (por ejemplo, DNA o RNA), carbohidrato, lípido o fosfolípido, o molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto orgánico, ya sea natural o artificialmente creado que tiene peso molecular relativamente bajo y que no es una proteína, polipéptido, ácido nucleico o lípido, normalmente con un peso molecular menor de aproximadamente 1500 g/mol y que normalmente tiene enlaces carbono-carbono múltiples).

Los ligandos pueden ser naturales o sintetizados, incluyendo moléculas cuya estructura ha sido inventada por el hombre. Ejemplos de ligandos incluyen, aunque sin limitación, hormonas, factores de crecimiento o neurotransmisores que se unen a receptores particulares. También se apreciará que, se pueden utilizar también los fragmentos o variantes de ligandos polipeptídicos que difieren en secuencia de sus correspondientes naturales pero que retienen la capacidad de unirse a una célula de interés. Los ligandos peptídicos se pueden identificar utilizando presentación de fagos (Arap W, et al., *Nature Medicine* 8(2):121-7, 2002; Zurita AJ, et al., *J Control Release*, 91(1-2):183-6, 2003; Pasqualini, R. & Ruoslahti, E., *Nature* 380, 364-366, 1996; Pasqualini, R., et al., *Trends Mol. Med.* 8, 563-571, 2002). En ciertas realizaciones de la invención, el ligando es un aptámero que se une a un marcador específico de tipo celular. En general, un aptámero es un oligonucleótido (por ejemplo, DNA o RNA) que se une a una proteína particular. Los aptámeros proceden normalmente de un proceso de evolución *in vitro* denominado SELEX. Se conocen en la técnica métodos para obtener aptámeros específicos para una proteína de interés. Véase, por ejemplo, Brody EN, Gold L., *J Biotechnol.*, 74(1):5-13, 2000. Las moléculas pequeñas también se pueden utilizar como ligandos. Se conocen en la técnica métodos para identificar dichos ligandos. Por ejemplo, el cribado *in vitro* de quimiotecas de moléculas pequeñas, incluyendo quimiotecas combinatorias y el cribado por ordenador, por ejemplo, para identificar compuestos orgánicos pequeños que se unen a superficies cóncavas (cavidades) de proteínas, puede identificar ligandos de pequeño tamaño molecular para numerosas proteínas de interés (Huang, Z., *Pharm. & Ther.* 86: 201-215, 2000).

En ciertas realizaciones de la invención, los restos de unión no son proteínas ni moléculas que se utilizan normalmente como vehículos y están conjugadas a antígenos con el fin de generar anticuerpos. Ejemplos son proteínas o moléculas portadoras, tales como albúmina de suero bovino, hemocianina de lapa californiana, gamma-globulina bovina y toxina diftérica. En ciertas realizaciones de la invención, el resto de unión a células no es una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina.

Se conocen en la técnica métodos para unir covalente o no covalentemente un inhibidor del complemento a un resto de unión. Véase, por ejemplo, US20050113297. Métodos generales para conjugación y reticulación se describen en "Cross-Linking", Pierce Chemical Technical Library, disponible en la página web que tiene la URL www.piercenet.com y originalmente publicado en el Pierce Catalog 1994-95 y en las referencias allí citadas, en Wong SS, *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991; y en G. T. Hermanson, *supra*. Véase también, Allen, T.M., *Nature Reviews Cancer*, 2, 750-763, 2002. Por ejemplo, de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, un reactivo de reticulación bifuncional se utiliza para acoplar un inhibidor del complemento a un anticuerpo o ligando. En general, los reactivos de reticulación bifuncionales contienen dos grupos reactivos, proporcionando así un medio para unir covalentemente dos grupos diana. Los grupos reactivos en un reactivo de reticulación química pertenecen normalmente a diversas clases, que incluyen ésteres de succinimidilo, maleimidias, disulfuros de piridilo y yodoacetamidas. También se pueden utilizar agentes quelantes bifuncionales.

Producción de inhibidores del complemento

En general, los inhibidores del complemento se fabrican utilizando métodos estándares conocidos en la técnica y

adecuados para los compuestos de esa clase. Los péptidos tales como los análogos de compstatina y otros péptidos analizados en la presente memoria, se pueden fabricar utilizando técnicas estándares de síntesis de péptidos en fase sólida. Los polipéptidos se pueden, por ejemplo, purificar a partir de fuentes naturales, se pueden producir *in vitro* o *in vivo* en sistemas de expresión adecuados utilizando tecnología de DNA recombinante en sistemas de expresión adecuados (por ejemplo, mediante células hospedantes recombinantes o en animales o plantas transgénicos), se pueden sintetizar por medios químicos, tales como síntesis convencional de péptidos en fase sólida y/o métodos que impliquen ligamiento químico de péptidos sintetizados. Los polipéptidos recombinantes se pueden producir utilizando técnicas estándares de ácido nucleico recombinante como se describe, por ejemplo, en US20060142191 y PCT/US2005/36547 (WO2006042252) y sistemas de expresión. Véase, por ejemplo, Hardin, C., et al., (Eds.), "*Cloning, Gene Expression and Protein Purification: Experimental Procedures and Process Rationale*", Oxford University Press, Oxford, 2001, para información adicional referida a la producción de polipéptidos recombinantes y purificación de polipéptidos. La actividad de ciertos polipéptidos es al menos en parte dependiente de su estado de glicosilación. Puede ser deseable producir dichos polipéptidos en sistemas que proporcionan glicosilación similar o sustancialmente idéntica a la que se encuentra en mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Se pueden utilizar por ejemplo, los sistemas de expresión de mamíferos o los sistemas de expresión modificados para eucariotas inferiores (por ejemplo, sistemas de expresión para hongos), que proporcionan la glicosilación similar a la de mamífero. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de EE.UU. N° 20060177898 y 20070184063. Los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, se pueden cosechar de hibridomas o se pueden producir utilizando métodos recombinantes como se conoce en la técnica. Las modificaciones químicas, tales como pegilación, se pueden llevar a cabo utilizando métodos estándares.

En lugar de administrar un polipéptido que inhibe el complemento, se pueden administrar células recombinantes que producen y secretan el polipéptido (por ejemplo, un análogo de compstatina). Dichas células se pueden generar similarmente a las células hospedantes recombinantes útiles para la expresión de proteínas (es decir, por introducción de un ácido nucleico, tal como un vector de expresión que codifica el polipéptido en la célula). Normalmente se genera una línea celular estable. Las células pueden ser, por ejemplo, células madre o células precursoras o maduras de un tipo encontrado en el lugar extravascular, por ejemplo, fibroblastos, queratinocitos. Se puede utilizar cualquier otro tipo celular. Se pueden utilizar células autólogas. Las células se pueden introducir en cualquier lugar extravascular contemplado en la presente memoria. Pueden estar encapsuladas en un material o estructura adecuados, que proporcionan suficiente contacto con fluidos corporales para la supervivencia de las células y la liberación del inhibidor del complemento en su sitio de actividad deseado.

Composiciones, formulaciones de liberación prolongada y vías de administración

La invención proporciona composiciones adecuadas para la administración al tracto respiratorio. En ciertas realizaciones, las composiciones son formulaciones de liberación prolongada. Ciertas composiciones de la invención comprenden un inhibidor del complemento y un polímero biocompatible. En algunas realizaciones, el polímero biocompatible es biodegradable. La composición puede estar en forma de un artículo sólido o semi-sólido. En algunas realizaciones, la composición está en forma de un gel, o un líquido que forma un gel por exposición a un ambiente fisiológico. Las composiciones pueden estar formuladas para suministro local en cápsulas, partículas, microcápsulas, micropartículas, nanocápsulas, nanopartículas, bombas osmóticas, dispositivos osmóticos, liposomas, lipoesferas, niosomas, etc.

La formulación de liberación prolongada puede comprender un inhibidor del complemento y un componente, elemento o estructura adicional, que contribuye a las propiedades de liberación prolongada de la formulación. En la presente memoria un "componente regulador del suministro de fármaco" o "material de liberación prolongada" es el componente, elemento o estructura adicional, que es eficaz para proporcionar liberación prolongada. Opcionalmente, el elemento regulador del suministro de fármaco está diseñado para proporcionar control sobre la cinética de liberación. Se apreciará que la naturaleza física de la formulación, por ejemplo, la forma, el área superficial total, la relación de área superficial a volumen, etc., de cualquiera de los constituyentes sólidos o semi-sólidos, puede contribuir a sus propiedades de liberación prolongada. Como otro ejemplo, la compresión fuerte de partículas que contienen un agente terapéutico puede producir una liberación que tenga lugar durante un período de tiempo más largo que si las partículas no estuvieran comprimidas.

En ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor del complemento se selecciona para que tenga propiedades deseables para la preparación de una formulación de liberación prolongada. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona para que sea soluble en un medio acuoso, por ejemplo, agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS), a concentraciones de hasta, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500, dentro de un intervalo de pH seleccionado. En otras realizaciones de la invención, el inhibidor del complemento se selecciona para que sea al menos en parte, insoluble (por ejemplo, para que forme un agregado o precipitado) a concentraciones por encima de, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg/mL en un medio acuoso, tal como agua o PBS, dentro de un intervalo de pH seleccionado. En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona para que sea soluble en un disolvente orgánico, tal como etanol, dimetilsulfóxido o dimetilformamida, a concentraciones de hasta, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg/mL dentro de un intervalo de pH seleccionado. En otras realizaciones de la invención, el inhibidor del complemento se selecciona para que sea, al menos

en parte, insoluble bajo dichas condiciones. El intervalo de pH seleccionado puede estar entre 2,0 y 11,0, o cualquier intervalo o valor intermedio (por ejemplo, 3,0-10,0, 4,0-9,0, 5,0-8,0).

El componente regulador del suministro del fármaco puede comprender, o consistir en, una matriz polimérica que esté físicamente asociada con el agente terapéutico. Por ejemplo, el agente puede estar atrapado, empotrado o encapsulado por la matriz polimérica. Una formulación de liberación prolongada puede ser un implante individual, una pluralidad de partículas (nanopartículas, micropartículas) o liposomas, un material semi-sólido o viscoso, etc. En general, se pueden utilizar las composiciones que tienen concentraciones entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 100% de agente(s) activo(s) en peso. El (o los) agente(s) activo(s) puede(n) constituir desde aproximadamente el 1% al 90% en peso de la formulación de liberación prolongada. Frecuentemente, el (o los) agente(s) activo(s) constituye(n) desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 80% en peso de la formulación de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el (o los) agente(s) terapéutico(s) comprende(n) aproximadamente el 30%-50% en peso de la formulación de liberación prolongada. Una formulación de liberación prolongada puede liberar el agente por difusión o como resultado de descomposición o erosión de al menos una porción de la composición. La formulación puede comprender una matriz que sea permeable o semi-permeable al agente.

Se conocen en la técnica varios vehículos poliméricos para suministro, para proporcionar liberación prolongada y se pueden utilizar para administrar un inhibidor del complemento. Se pueden utilizar diversos polímeros, por ejemplo, polímeros biocompatibles, que pueden ser biodegradables. Los polímeros pueden ser homopolímeros, copolímeros (incluyendo copolímeros de bloques), lineales, de cadena ramificada o reticulados. En diversas realizaciones de la invención se pueden utilizar polímeros naturales o sintéticos. Polímeros útiles incluyen, aunque sin limitación, ácido poliláctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), poli-lactida-co-glicolida (PLGA), poli(fosfazina), poli(éster fosfato), policaprolactonas, polianhídridos, copolímero de etileno y acetato de vinilo, poliortoésteres, poliéteres y poli(beta-aminoésteres). En ciertas realizaciones, la formulación comprende ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y se puede preparar como ha sido descrito en Lewis, "Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glicolide Polymer," en *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Chasin & R. Langer, Ed. (Marcel Dekker, New York), 1990. Véase también, Jones, D., *Pharmaceutical Applications of Polymers for Drug Delivery*, ISBN 1-85957-479-3, ChemTec Publishing, 2004. Se pueden utilizar las formulaciones descritas en cualquiera de estas referencias. En ciertas realizaciones, los materiales para liberación prolongada son copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, en donde la relación en peso de ácido láctico a ácido glicólico no es mayor que 4:1 (es decir, 80% o menos de ácido láctico a 20% o más de ácido glicólico en peso). Ciertos copolímeros útiles tienen una composición porcentual molar de aproximadamente 50% de lactida y 50% de glicolia. Otras relaciones incluyen 65:35, 75:25 y 85:15. Ciertos polianhídridos farmacéuticamente aceptables, útiles en la presente invención tienen un enlace anhídrido lábil al agua. La velocidad de liberación del fármaco puede ser controlada por el polímero de polianhídrido particular utilizado, y su peso molecular. El polímero de polianhídrido puede ser ramificado o lineal. Otros polímeros útiles en diversas realizaciones de la invención incluyen poliamidas, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poli(alcoholes vinílicos), poli(éteres vinílicos), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y sus copolímeros, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinilpirrolidona, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-cocaprolactona). También son útiles péptidos, polipéptidos, proteínas, tales como colágeno o albúmina, polisacáridos, tales como sacarosa, quitosano, dextrano, alginato, ácido hialurónico (o derivados de cualquiera de estos) y dendrímeros (por ejemplo, dendrímeros PAMAM). Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los liposomas u otras partículas que contienen lípidos se pueden utilizar para administrar localmente un agente terapéutico. Otros polímeros ilustrativos incluyen derivados de celulosa, tales como, alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, carboxiletilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, policarbamatos o poliureas, poli(acetato de vinilo) reticulado y similares, copolímeros etileno-éster vinílico que tienen un contenido de éster de 4 a 80%, tales como copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA), copolímero de etileno-hexanoato de vinilo, copolímero de etileno-propionato de vinilo, copolímero de etileno-butirato de vinilo, copolímero de etileno-pentanoato de vinilo, copolímero de etileno-trimetilacetato de vinilo, copolímero de etileno-acetato de vinildietilo, copolímero de etileno-butanoato de vinil-3-metilo, copolímero de etileno-butanoato de vinil-3,3-dimetilo y copolímero de etileno-benzoato de vinilo, o sus mezclas. Se pueden utilizar derivados químicos de los polímeros anteriormente mencionados, por ejemplo, por sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones hechas habitualmente por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones de la invención, se utilizan materiales que no activan el complemento detectablemente cuando se evalúan en un ensayo adecuado. En algunas realizaciones de la invención, los materiales se seleccionan de modo que no activan el complemento en más del 10% por encima de los niveles de la línea base, cuando están presentes en cantidades a las cuales serían administrados a un lugar extravascular para tratar un trastorno mediado por el complemento.

En ciertas realizaciones, un material biodegradable para liberación prolongada se degrada *in vivo* durante un período

de menos de aproximadamente dos años, degradándose en algunas realizaciones al menos 50% del material de liberación prolongada en aproximadamente un año, y en algunas realizaciones seis meses o menos. En algunas realizaciones, el material de liberación prolongada se degradará significativamente en uno a tres meses, degradándose al menos 50% del material en residuos no tóxicos que son eliminados por el cuerpo, y siendo el 100% del fármaco liberado en un período de tiempo de aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente dos meses. En algunas realizaciones, el material de liberación prolongada se degrada por hidrólisis. En algunas realizaciones, la degradación ocurre por erosión superficial, más que por erosión total. El perfil de liberación farmacocinética de las formulaciones puede ser de primer orden, orden cero, bi- o multi-fásico, para proporcionar el efecto deseado durante del período de tiempo deseado.

Un método para preparar una formulación de liberación prolongada implica combinar o mezclar el agente terapéutico con un componente polimérico para formar una mezcla. La mezcla puede luego se extruida, comprimida, moldeada, etc., para formar una única composición. Opcionalmente, se pueden utilizar calor y/o presión. La composición única puede luego ser procesada para formar implantes, o partículas, individuales adecuados para la administración a un lugar extravascular. Se conocen en la técnica otros métodos para incorporar agentes terapéuticamente activos en matrices poliméricas. A la matriz polimérica se le pueden dar formas diversas, tales como varillas, discos, obleas, etc., que pueden tener un intervalo de diferentes dimensiones (por ejemplo, longitud, anchura, etc.) y volúmenes. Formas ilustrativas incluyen esférica, cilíndrica, helicoidal, con forma de espiral o hélice, con forma de tornillo, cúbica, cónica, elipsoidal, biconvexa, hemiesférica o casi-hemiesférica, etc. El implante puede conformarse apropiadamente para entrar en un lugar extravascular de interés, tal como un espacio articular. En realizaciones particulares, el implante tiene una longitud u otra dimensión más larga, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 20 cm, o entre aproximadamente 1 cm y aproximadamente 10 cm. En ciertas realizaciones, el implante es al menos algo flexible, lo que puede facilitar el ajuste del implante en su sitio de administración. El peso total del implante puede ser aproximadamente 250 µg-100 g, por ejemplo, aproximadamente 10 mg - 10 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 100 mg y 1 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 1 g y 10 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 10 g y 50 g.

En ciertas realizaciones de la invención, un implante está dimensionado y conformado de modo que se ajuste dentro del eje hueco de una aguja para inyección, por ejemplo, una aguja de calibre 22, 25, 27, 30, 33 o 35 (o aguja de cualquier calibre en el intervalo entre 22 y 35).

Las dimensiones ilustrativas y no limitativas para un implante cilíndrico pueden ser aproximadamente 0,5 a 8 milímetros de longitud y aproximadamente 0,1 a 2 milímetros de diámetro, por ejemplo, aproximadamente 0,75 mm hasta aproximadamente 1,5 mm de diámetro. Los implantes que tienen otras formas, por ejemplo, otras estructuras tipo varilla con secciones transversales que son rectangulares o cuadradas, pueden tener una sección transversal en la cual los dos puntos más distantes entre sí estén separados por como máximo 0,1 mm a 1 mm. En realizaciones particulares, el implante puede tener una longitud u otra dimensión más larga entre aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 2 mm, o entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 1 mm para la administración con una aguja. Alternativamente, la longitud u otra dimensión más larga es mayor que 1 mm, o mayor que 2 mm, tal como 3 mm o hasta 10 mm. En ciertas realizaciones de la invención, los implantes también pueden ser al menos algo flexibles, lo que puede facilitar el ajuste del implante en su sitio de administración. El peso total del implante puede ser aproximadamente 250-5000 microgramos, por ejemplo, aproximadamente 500-1000 microgramos. Por ejemplo, un implante puede tener aproximadamente 500 microgramos o aproximadamente 1000 microgramos. También se pueden formar implantes más grandes y adicionalmente se procesan antes de su administración. Además, pueden ser deseables implantes mayores cuando se deban proporcionar en el implante cantidades relativamente mayores de un agente terapéutico.

En una realización la formulación de liberación prolongada es un implante biocompatible que comprende una capa externa polimérica sustancialmente impermeable que cubre un núcleo que comprende el fármaco que se ha de suministrar, donde dicha capa externa tiene uno o más orificios, por los que se entiende una o más aberturas en la capa externa, a través de los cuales, cuando el dispositivo está en uso, pueden entrar fluidos corporales al dispositivo y el fármaco contenido en el dispositivo (por ejemplo, disuelto, encapsulado o atrapado dentro del dispositivo) puede migrar hacia afuera del dispositivo. En ciertas realizaciones, los orificios tienen en total un área superficial de menos del 10 por ciento del área superficial total del dispositivo. En ciertas realizaciones de la invención, el implante comprende una capa de recubrimiento exterior que es permeable al agente terapéutico, permitiendo su lenta difusión hacia afuera del implante. La composición, estructura y/o espesor de la capa de recubrimiento se pueden seleccionar para proporcionar una permeabilidad y una velocidad de difusión particulares.

Un agente terapéutico puede estar contenido en un implante en forma de un polvo seco, partículas, gránulos o un sólido comprimido. El fármaco también puede estar presente como una solución, o puede estar dispersado en una matriz polimérica. Los implantes pueden tener el agente o agentes activos, homogéneamente distribuidos a través de la matriz polimérica, por ejemplo, pueden ser monolíticos. En otras realizaciones, el (o los) agente(s) activo(s) está(n) heterogéneamente distribuidos en la matriz polimérica. Por ejemplo, regiones discretas del implante pueden contener partículas sólidas de un agente activo, o un reservorio de agente activo puede estar encapsulado por la matriz polimérica. El (o los) agente(s) terapéutico(s) puede(n) estar distribuidos con un patrón no homogéneo en la matriz. Por ejemplo, un implante puede incluir una porción que tiene una concentración mayor del agente terapéutico

con relación a una segunda porción del implante. Otra realización son las estructuras en multi-capas, teniendo las capas diferentes composiciones y pueden tener diferentes características físicas, tales como densidad o porosidad. Por ejemplo, las capas pueden contener diferentes agentes terapéuticos o sus combinaciones. En otra realización, las capas que son relativamente resistentes a la degradación están interdispersadas con capas que se degradan más rápidamente.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento está encapsulado dentro de una matriz sólida formada por un primer material biocompatible en fase sólida. El inhibidor del complemento contenido dentro de la matriz sólida puede ser un sólido, un líquido, puede estar en una suspensión, en una emulsión o en una solución, en las diversas realizaciones.

Los materiales poliméricos biodegradables que forman la matriz pueden estar sometidos a inestabilidad enzimática o hidrolítica. Los polímeros solubles en agua pueden estar reticulados con enlaces cruzados hidrolíticos o inestables biodegradables, para proporcionar polímeros insolubles en agua, útiles. El grado de estabilidad puede variar ampliamente dependiendo, por ejemplo, de la elección del monómero, de si se emplea un homopolímero o copolímero o una mezcla, y de si el polímero incluye grupos ácidos terminales. La biodegradación del polímero y por lo tanto el perfil de liberación extendida de la formulación de liberación prolongada, también puede estar influenciado por el peso molecular medio relativo de los materiales poliméricos empleados. Se pueden incluir en las formulaciones diferentes pesos moleculares de los mismos o diferentes materiales poliméricos para modular el perfil de liberación. Por ejemplo, el peso molecular medio del polímero puede estar en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 kD, por ejemplo, desde aproximadamente 10 hasta 100 kD, o desde aproximadamente 15 hasta 50 kD.

En ciertas realizaciones, el implante es un artículo de fabricación recubierto con una capa de liberación, por ejemplo, que comprende un polímero y un inhibidor del complemento. Así, la invención proporciona un implante que comprende: (a) un artículo de fabricación implantable; (b) una capa de liberación dispuesta sobre al menos una porción del implante; y (c) un inhibidor del complemento. La capa de liberación comprende un polímero, que en ciertas realizaciones comprende estireno o un copolímero de estireno y, opcionalmente, al menos un polímero adicional. El artículo podría estar destinado para el suministro del inhibidor del complemento pero también puede tener una o más funciones adicionales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el artículo es una prótesis tal como una articulación artificial o un artefacto ortopédico o una pieza metálica tal como un tornillo, varilla, etc. Métodos ilustrativos para producir un artículo recubierto con una capa de liberación, se proporcionan en la Patente de EE.UU. N° 7.105.175 y se adaptarán para artículos adecuados para la administración extravascular. En ciertas realizaciones, el implante se administra en asociación con un procedimiento operatorio o quirúrgico en una articulación o hueso. En una realización, dicho procedimiento comprende cirugía artroscópica. En ciertas realizaciones, el procedimiento es una técnica estándar de cirugía seleccionada del grupo que consiste en: raspaje de cartílago, condroplastia de abrasión, reparación por láser, desbridamiento, condroplastia, microfractura con o sin penetración en el hueso subcondral, mosaico-plastia, aloinjerto de células de cartílago, autoinjertos de células madre, injertos de cartílago costal, estimulación química, estimulación eléctrica, autoinjertos pericondrales. En algunas realizaciones, el método produce una elevada concentración local del agente en relación con su concentración en la sangre. Otros métodos para modificar un dispositivo ortopédico para liberar localmente un inhibidor del complemento también están dentro del alcance de la invención.

La invención abarca administrar las composiciones a los sitios de herida o cirugía. Las composiciones se pueden administrar para inhibir la inflamación post-quirúrgica.

En la presente memoria se describe una composición que comprende una población de partículas que comprenden un inhibidor del complemento, donde la composición es adecuada para la administración a un lugar extravascular y la composición es capaz de liberar el inhibidor del complemento en una cantidad eficaz para tratar un trastorno mediado por el complemento, que afecta al sistema respiratorio, al sistema nervioso, al sistema musculoesquelético y al sistema integumentario, cuando se administra una cantidad adecuada de la composición al lugar extravascular. Las nanopartículas o micropartículas se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, secado por pulverización, separación de fases, emulsión simple y doble, evaporación de disolvente, extracción con disolvente y coacervación simple y compleja. Las composiciones poliméricas en partículas también se pueden preparar utilizando granulación, extrusión y/o esferonización. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20040092470. Una composición puede contener nanopartículas o micropartículas que tengan diferentes composiciones y/o propiedades. Las condiciones utilizadas en la preparación de las partículas se pueden alterar para obtener partículas de un tamaño o propiedad deseados (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliicidad, morfología externa, densidad, dureza, "pegajosidad", forma, etc.). El método utilizado para preparar la partícula y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) puede también depender del agente terapéutico y/o de la composición de la matriz polimérica. Generalmente, se desea evitar extremos de temperatura o pH que podrían producir una degradación significativa del inhibidor del complemento. Se apreciará que el grado de degradación puede ser función tanto de las condiciones particulares como del tiempo durante el cual el inhibidor del complemento está expuesto a las condiciones, así como también de la estructura y las propiedades del agente propiamente dicho. Por ejemplo, un péptido estable, tal como un análogo de compstatina, puede tener ventajas significativas. Las composiciones se pueden analizar para determinar si el método seleccionado es apro-

piado en términos de retención de suficiente eficacia. En ciertas realizaciones, un método seleccionado de formulación da como resultado una composición en la cual, después de la formulación, el compuesto retiene al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, 50% o más, del nivel de actividad del compuesto de entrada.

5 El método para preparar la partícula y las condiciones utilizadas (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) también pueden depender de los agentes activos particulares y de otros componentes incluidos en la composición. Si las partículas preparadas por cualquiera de los métodos anteriores tienen un intervalo de tamaño fuera del intervalo deseado, las partículas pueden ser dimensionadas, por ejemplo, utilizando un tamiz, por molienda, etc. Se pueden emplear combinaciones de métodos.

10 Micropartículas y nanopartículas útiles en la invención pueden tener un intervalo de dimensiones. Generalmente, una micropartícula tendrá un diámetro de 500 micrómetros o menos, por ejemplo, entre 1 y 500 micrómetros, entre 50 y 500 micrómetros, entre 100 y 250 micrómetros, entre 20 y 50 micrómetros, entre 1 y 20 micrómetros, entre 1 y 10 micrómetros, etc., y una nanopartícula tendrá un diámetro menor que 1 micrómetro, por ejemplo, entre 10 nm y 100 nm, entre 100 nm y 250 nm, entre 100 nm y 500 nm, entre 250 nm y 500 nm, entre 250 nm y 750 nm, entre 500 nm y 750 micrómetros. En algunas realizaciones, las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo de 5 - 750 micrómetros. En algunas realizaciones, las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo desde 10 hasta 500 micrómetros. En algunas realizaciones, las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo desde 20 hasta 200 micrómetros. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro en el intervalo de 5 - 750 nanómetros. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro en el intervalo desde 10 hasta 500 nanómetros. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro en el intervalo desde 20 hasta 200 nanómetros. En algunas realizaciones, el tamaño se selecciona para minimizar o evitar el transporte a través de paredes de capilares, minimizando así la entrada dentro del sistema vascular.

25 En algunas realizaciones, las micropartículas o nanopartículas se forman a partir de un polímero seleccionado del grupo que consiste en hialuronano, quitosano, colágeno, gelatina, alginato, ácido poliláctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) y PLGA o combinaciones de los anteriores. Las partículas pueden ser de tamaño o forma sustancialmente uniforme (por ejemplo, diámetro) o pueden ser heterogéneas en tamaño y/o forma. Pueden ser sustancialmente esféricas o pueden tener otras formas, en cuyo caso la dimensión relevante será la dimensión lineal mayor entre dos puntos sobre la superficie de la partícula, en lugar del diámetro. La población de partículas puede consistir entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100% de partículas que caen dentro de los intervalos de tamaño anteriormente mencionados, por ejemplo, aproximadamente 40%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etc.

30 En otra realización, se preparan las microcápsulas biocompatibles y biodegradables de liberación prolongada, que opcionalmente no tienen, o tienen una mínima, liberación por estallido, que pueden ser programadas para liberar su núcleo activo con duraciones variables en el intervalo de 1-100 días en un ambiente fisiológico acuoso. Las microcápsulas están constituidas por un núcleo de polipéptido inhibidor del complemento u otro inhibidor del complemento encapsulado en una matriz de copolímero de poli(láctida/glicolida) que tiene una composición molar de lactida/glicolida desde 90/10 hasta 40/60, que puede contener un excipiente farmacéuticamente aceptable, como una mezcla de grupo carboxilo terminal libre no protegido y formas protegidas en los extremos en el intervalo de relaciones de 100/0 a 1/99. Las microcápsulas se pueden preparar como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.902.743.

40 Se describe en la presente memoria una población de partículas que comprende dos o más poblaciones (subpoblaciones), donde las subpoblaciones son distinguibles una de la otra, por una o más características, tales como tamaño, composición, etc. Cada población comprende un inhibidor del complemento, que puede ser el mismo o diferente. Se contempla cualquier combinación de dos o más inhibidores del complemento diferentes. Una primera población puede comprender partículas que liberan el agente a lo largo de un primer intervalo de tiempo y/o con un primer perfil de liberación a lo largo del tiempo, y una segunda población puede comprender partículas que liberan el agente a lo largo de un segundo intervalo de tiempo y/o con un segundo perfil de liberación a lo largo del tiempo. La formulación combinada libera el agente a lo largo de un tercer intervalo de tiempo con un tercer perfil de liberación a lo largo del tiempo. El tercer intervalo de tiempo puede ser más largo que los intervalos de tiempo primero o segundo. Las poblaciones primera y segunda pueden comprender partículas hechas de materiales que se degradan o erosionan a diferentes velocidades. Las partículas de las diferentes poblaciones pueden tener capas externas o recubrimientos de diferentes espesores. Al menos una población puede no contener un inhibidor del complemento. Al menos una población puede no contener un agente terapéutico.

55 Se describe en la presente memoria una formulación de liberación prolongada que comprende microvehículos que contienen un primer material biocompatible de fase sólida y un inhibidor del complemento, donde dichos microportadores mantienen la liberación *in vivo* del agente biológicamente activo. La composición también contiene partículas de un segundo material biocompatible en fase sólida, donde el segundo material en fase sólida mantiene además la liberación *in vivo* del agente biológicamente activo. Opcionalmente, dicha liberación se produce en un lugar extravascular. La formulación puede comprender: (a) partículas microportadoras de aproximadamente un milímetro o menos que contienen una cantidad eficaz de un inhibidor del complemento encapsulado dentro de un primer polímero que es biocompatible y está seleccionado del grupo que consiste en poli(láctida)s, poli(glicolida)s, poli(láctida-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), polioortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, poliete-

résteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilenalquilato)s, copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, sus mezclas y copolímeros, donde los microportadores mantienen la liberación *in vivo* del inhibidor del complemento, y (b) micropartículas de aproximadamente un milímetro o menos de un segundo polímero que es biocompatible y biodegradable, donde dichas micropartículas están sustancialmente libres del agente biológicamente activo, y que están separadas, pero mezclados, con las partículas microportadoras de (a) y están presentes en una cantidad suficiente para alargar el periodo de liberación del inhibidor del complemento desde las partículas microportadoras de (a). El primer polímero y el segundo polímero pueden ser el mismo o ser diferentes. El segundo polímero se puede seleccionar del grupo que consiste en poli(lactida)s, poli(glicolida)s, poli(lactida-co-glicolida)s, poli(ácido láctico)s, poli(ácido glicólico)s, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)s, policaprolactona, policarbonatos, poliesteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, polieterésteres, poli(dioxanona)s, poli(alquilenalquilato)s, copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, sus mezclas y copolímeros. Métodos adecuados para preparar las composiciones se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.916.597.

Las composiciones que comprenden partículas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un líquido tal como agua estéril, solución salina, etc. Las composiciones en forma de partículas pueden ser inyectables. En ciertas realizaciones de la invención, la formulación de liberación prolongada comprende liposomas. Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.522.811 y en otras referencias citadas en la presente memoria. Se han descrito liposomas, incluyendo los liposomas dirigidos (por ejemplo, los liposomas dirigidos a anticuerpo), liposomas pegilados y liposomas polimerizados (Hansen CB, et al., *Biochim Biophys Acta*. 1239(2):133-44, 1995; Torchilin VP, et al., *Biochim Biophys Acta*, 1511(2):397-411, 2001; Ishida T, et al., *FEBS Lett*. 460(1):129-33, 1999). En ciertas realizaciones, la formulación de liberación prolongada no comprende liposomas o, si los liposomas están presentes, menos del 1%, 5%, 10% o 20% del inhibidor del complemento, en peso, está contenido en los liposomas.

En ciertas realizaciones, la formulación de liberación prolongada comprende una ciclodextrina. La ciclodextrina se puede proporcionar en una cantidad desde aproximadamente 0,5% (p/p) hasta aproximadamente 25% (p/p) de la formulación. En ciertos implantes, la ciclodextrina se proporciona en una cantidad desde aproximadamente 5% (p/p) hasta aproximadamente 15% (p/p) de la formulación. La ciclodextrina puede ser α -, β - o γ -ciclodextrina, o sus mezclas. Los derivados de ciclodextrina también son útiles. La ciclodextrina, o su derivado, puede estar presente en una cantidad eficaz para mejorar la solubilidad del agente terapéutico en un fluido o una fase gel o matriz en la cual se debe disolver.

En ciertas realizaciones de la invención, una formulación de liberación prolongada comprende un agente terapéutico y un material formador de gel, también denominado un "precursor" de gel. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una solución que contiene un material formador de gel y un agente terapéutico, se prepara combinando el material formador de gel y el agente terapéutico en solución, utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo, añadiendo el agente terapéutico a una solución que contiene el material formador de gel soluble, o añadiendo tanto el agente terapéutico como el material formador de gel en forma seca o líquida a un disolvente adecuado. La composición se suministra localmente a un lugar extravascular apropiada en el cuerpo de un sujeto. La solución forma rápidamente un gel en, o cerca de, el sitio de administración. El agente terapéutico es atrapado dentro del gel. El agente terapéutico se difunde hacia afuera del gel o se libera a medida que el gel se degrada con el tiempo, proporcionando así un suministro continuo del agente a los tejidos y estructuras que están en contacto físico directo con el gel, o que están ubicados en las cercanías. En ciertas realizaciones, la solución se administra en, o cerca de, una articulación. En otras realizaciones, la solución se administra intratecalmente. Se puede lograr el suministro por inyección (por ejemplo, utilizando una aguja de calibre 25, 27 o 30, o similar), por catéter, etc.

La formación del gel puede ocurrir a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, la formación del gel puede ser desencadenada por sustancias tales como iones presentes en los fluidos fisiológicos, con los cuales entra en contacto el precursor del gel, después de su administración. En algunas realizaciones, un agente iniciador, tal como un ion, sal, agente reticulante o iniciador de polimerización, se añade a la solución poco antes de la administración. La solución se administra después de un tiempo adecuado, normalmente antes de que haya ocurrido una significativa formación de gel. El tiempo exacto dependerá de, por ejemplo, el precursor de gel particular, el agente iniciador y sus concentraciones utilizadas. En ciertas realizaciones, la formación del gel ocurre al menos en parte como resultado de un cambio en el pH o de un cambio en la temperatura. Por ejemplo, la formación del gel puede ocurrir como resultado de un aumento o disminución en el pH y/o en la temperatura de la solución tras la administración a un lugar extravascular de un sujeto mamífero que tiene una temperatura corporal de aproximadamente 37°C. En otras realizaciones, la formación del gel ocurre como resultado de la difusión de una sustancia, tal como un disolvente orgánico (por ejemplo, etanol, metanol, etilenglicol o N-metilpirrolidona), fuera de la solución a los tejidos circundantes, después de la administración.

Alternativamente, se puede preparar un implante de gel preconformado, por ejemplo, introduciendo la solución en un molde o cavidad de la forma deseada y dejando que ocurra la formación de gel. En ciertas realizaciones de la invención, la formación de gel ocurre en presencia de una concentración adecuada de un ion, sal, agente reticulante o iniciador de la polimerización, que se puede añadir a la solución antes o después de la introducción de la solución

en el molde o cavidad. El molde o cavidad puede ser, por ejemplo, cualquier estructura que contenga un espacio hueco o una depresión cóncava dentro de la cual se puede introducir una solución. En otra realización, se forma una película o membrana a partir de la solución formadora de gel, que contiene un agente terapéutico.

5 En una realización, se utiliza colágeno soluble como material formador de gel. El colágeno es inicialmente soluble, por ejemplo, en un medio acuoso y forma una solución que tiene una baja viscosidad, pero es capaz de una rápida formación de un gel en condiciones apropiadas, por ejemplo, condiciones que se encuentran tras la administración a un sujeto mamífero. Una variedad de diferentes preparaciones de colágeno se pueden utilizar en la presente invención, siempre que el colágeno sea inicialmente soluble y capaz de formar rápidamente un gel en condiciones apropiadas. Preparaciones de colágeno adecuadas y métodos para su fabricación, se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N° 5.492.135; 5.861.486; 6.197.934; 6.204.365; y la solicitud de patente WO 00/47130, pero la invención no está limitada a dichas preparaciones o métodos. Estos colágenos se preparan en forma soluble y rápidamente forman un gel por exposición a fluidos fisiológicos, u otros fluidos que tienen la concentración de iones adecuada. La inyección o introducción de otro modo de la solución de colágeno en un lugar extravascular produce la formación del gel, inducida presumiblemente por el contacto con los fluidos fisiológicos. No obstante, se hace notar que la invención no está limitada, en modo alguno, por el mecanismo por el cual ocurre la formación del gel. Además, como se indicó anteriormente, el gel se puede formar *in vitro* y luego ser implantado en un lugar apropiado.

20 Un método adecuado para preparar una solución de colágeno soluble implica extraer colágeno de una fuente natural, solubilizar el colágeno con ácido y dializar el colágeno solubilizado frente a una solución que contiene un agente quelante, por ejemplo, un agente quelante de metales, tal como dihidrato de la sal disódica del ácido etilendiamintetraacético (EDTA), mientras que se eleva el pH. También se pueden llevar a cabo una o más etapas de diálisis frente a una solución, tal como agua desionizada, que carezca del agente quelante. A diferencia de las soluciones estándares de colágeno, que experimentan fibrillogénesis espontánea a pH neutro y a temperatura ambiente, las soluciones de colágeno para uso en la presente invención permanecen en solución durante la conservación durante amplios períodos de tiempo y experimentan rápidamente la formación de gel cuando se exponen a fluidos fisiológicos. El agente quelante puede alterar la concentración de uno o más cationes y así evitar la fibrillogénesis que de otro modo ocurriría a medida que se eleva el pH. El agente quelante puede tener otros efectos deseables sobre la solución de colágeno y, en ciertas realizaciones de la invención, la solución de colágeno comprende un agente quelante, por ejemplo, EDTA. El agente quelante puede permanecer en la solución de colágeno después de la diálisis, o puede añadirse a la solución de colágeno. La concentración del agente quelante puede estar en el intervalo de, por ejemplo, entre aproximadamente 0,02M y aproximadamente 0,05M, por ejemplo, entre aproximadamente 0,025M y aproximadamente 0,035M. También se pueden utilizar otros agentes quelantes incluyendo, aunque sin limitación, los descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.861.486.

35 En ciertas realizaciones, la solución de colágeno tiene una concentración de colágeno soluble en el intervalo entre 1 mg/mL y 100 mg/mL, por ejemplo, entre 10 mg/mL y 70 mg/mL, entre 20 mg/mL y 50 mg/mL, por ejemplo, 30 mg/mL, etc. En ciertas realizaciones de la invención, el pH de la solución de colágeno está entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5, por ejemplo, 7,0.

40 En ciertas realizaciones de la invención, la composición de colágeno comprende además un componente fibrilar que comprende sólidos de colágeno fibrilar. Por ejemplo, ciertas composiciones de colágeno contienen entre 0,5 mg/mL y 30 mg/mL de sólidos de colágeno fibrilar, o entre 1 mg/mL y 20 mg/mL de sólidos de colágeno fibrilar, por ejemplo, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL, 10 mg/mL, etc. En términos de porcentaje de sólidos de colágeno fibrilar sobre una base peso/volumen, ciertas composiciones de colágeno contienen entre 0,05 y 3% de sólidos de colágeno fibrilar o entre 0,1 y 2% de sólidos de colágeno fibrilar, por ejemplo, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,8%, 1%, 1,2%, etc. Cualquier componente fibrilar adecuado se puede utilizar en las composiciones de colágeno de la invención. Los sólidos de colágeno fibrilar se pueden preparar utilizando una variedad de métodos. Por ejemplo, el colágeno fibrilar puede ser colágeno reconstituido preparado a partir de fuentes animales, tales como cuero bovino (*Frontiers in Matrix Biology*, Vol. 10, pp. 1-58, en *Methods of Connective Tissue Research*, Eds. Robert, Moczar, and Moczar, S. Karger, Basilea, 1985). El colágeno fibrilar se puede preparar a partir de fuentes humanas o animales como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 4.969.912 y 5.322.802. Los sólidos de colágeno fibrilar se ponen en suspensión en solución a una concentración que normalmente está en el intervalo de aproximadamente 10-100 mg/mL. La suspensión de colágeno que contiene sólidos de colágeno fibrilar se combina con, por ejemplo, se añade a, una composición de colágeno soluble, antes o después de la adición del agente terapéutico a una solución que comprende colágeno soluble.

55 En algunas realizaciones de la invención, la preparación de colágeno soluble comprende un agente reticulante químico. El agente puede reticular moléculas y/o fibrillas de colágeno entre sí y/o puede reticular un agente terapéutico, tal como compstatina o uno de sus análogos, a una molécula o fibrilla de colágeno. Los agentes reticulantes típicos reticulan grupos amina del colágeno entre sí, o a grupos amina, carboxilo, fenol, sulfonilo o carbohidrato, de agentes terapéuticos. Agentes reticulantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, los descritos en WO 00/47130. La reticulación puede estabilizar el gel de colágeno (por ejemplo, disminuir su velocidad de descomposición) y/o disminuir la velocidad de liberación del agente terapéutico desde el gel.

60 La presencia de sólidos de colágeno fibrilar puede tener cualquiera de una variedad de efectos ventajosos. Por ejemplo, los sólidos de colágeno fibrilar pueden aumentar la estabilidad *in vivo* del gel de colágeno, por ejemplo,

pueden disminuir la velocidad de descomposición del gel. Los sólidos de colágeno fibrilar pueden aumentar la estabilidad de un agente terapéutico contenido en el gel y/o disminuir o modular la velocidad a la cual el agente es liberado desde el gel por difusión y/o descomposición del gel.

5 Cualquiera de los tipos de colágeno I - XXVIII, o sus mezclas, se pueden utilizar en diversas realizaciones de la presente invención. El colágeno se puede purificar a partir de fuentes naturales (por ejemplo, tejido humano o tejido animal, tal como de bovino, conejo, etc.) como se describe en las patentes y publicaciones anteriormente referenciadas. Alternativamente, el colágeno se puede fabricar utilizando técnicas de DNA recombinante, en cuyo caso la secuencia puede ser de origen humano o animal. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.593.854 y 5.667.839. Los métodos para la producción de proteínas, por ejemplo, un polipéptido de interés tal como
10 una cadena de colágeno, utilizando tecnología de DNA recombinante son bien conocidos en la técnica. El término "colágeno" incluye fragmentos de colágeno. En ciertas realizaciones, el colágeno soluble comprende, o consiste en, un fragmento de colágeno o combinación de fragmentos. En ciertas realizaciones, se utiliza una cadena polipeptídica completa de colágeno. Diversos colágenos modificados o derivatizados también son útiles en diversas realizaciones de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.201.764. El colágeno puede estar acilado con uno o más agentes acilantes, tales como anhídrido glutárico, anhídrido succínico y anhídrido maleico, y al menos otro agente acilante, seleccionado del grupo que consiste en anhídrido metacrílico, cloruro de beta-estireno-sulfonilo, copolímero de etileno y anhídrido maleico, copolímero de estireno y anhídrido maleico o ácido poli(vinil)sulfónico.

Otros materiales de colágeno útiles en la invención se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.412.076, que describe un colágeno modificado reticulable que es soluble en agua y/o en disolventes orgánicos polares apróticos y que comprende grupos tiol libres o no sustituidos, llevados por residuos de cisteína, estando al menos algunos de dichos residuos fijados al colágeno mediante compuestos espaciadores. En ciertas realizaciones, los compuestos espaciadores son unidades hidrocarbonadas carboxiladas. Otros materiales de colágeno adicionales de uso en la invención se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.916.909, que describe péptidos de colágeno que están modificados por injerto de funciones tiol libres o sustituidas, llevadas por radicales de mercaptoamina. En ciertas realizaciones, los residuos de mercaptoamina son idénticos o diferentes entre sí, y están injertados exclusivamente en los ácidos aspárticos y en los ácidos glutámicos de la cadena colagénica mediante enlaces amida y, opcionalmente, dicho péptido colagénico es soluble en medios acuosos y/o en disolventes polares.

Otros materiales formadores de gel, prácticos en la invención incluyen, aunque sin limitación, ácido hialurónico y sus formas modificadas, polisacáridos tales como alginato y sus formas modificadas, carbómeros, péptidos autoensamblables, etc. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.129.761 para una descripción adicional del alginato y sus formas modificadas, ácido hialurónico y sus formas modificadas, y ejemplos adicionales de materiales solubles formadores de gel, que son útiles en diversas realizaciones de la presente invención. Como se describe en dicha patente, otros precursores poliméricos de hidrogel incluyen copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol, tales como Poloxámeros, por ejemplo, Pluronic™ o Tetronics™ los cuales se reticulan por enlaces de hidrógeno y/o por un cambio en la temperatura, como se conoce en la técnica. Otros materiales que pueden utilizarse incluyen proteínas, tales como fibrina o gelatina. También se pueden utilizar mezclas de polímeros. Por ejemplo, se puede utilizar una mezcla de poli(óxido de etileno) y poli(ácido acrílico), que gelifica por enlaces de hidrógeno, cuando se mezcla. La composición puede comprender un agente reticulante, un agente polimerizante, tal como un iniciador de la polimerización, etc.

40 Normalmente, un material formador de gel útil en la invención es capaz de disolverse al menos parcialmente, o en ciertas realizaciones de la invención, de disolverse sustancial o completamente, por ejemplo, en un medio acuoso. Por ejemplo, se puede disolver al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o más, en peso, del material formador de gel presente en una composición formadora de gel. En ciertas realizaciones, se disuelve esencialmente el 100% del material. Se apreciará que el medio acuoso puede contener uno o más líquidos además de agua, por ejemplo, diversos alcoholes. En general, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o aproximadamente el 100% del líquido presente en el medio es agua.

También son útiles los precursores de hidrogel reticulables covalentemente. Por ejemplo, una poliamina soluble en agua, tal como quitosano, puede ser reticulada con un diisocianato soluble en agua, tal como diisocianato de polietilenglicol. Los isotiocianatos reaccionarán con las aminas para formar un gel químicamente reticulado. También pueden utilizarse las reacciones de aldehído con aminas, por ejemplo, con dialdehído de polietilenglicol. También puede utilizarse un polímero hidroxilado soluble en agua.

En ciertas realizaciones de la invención, un agente terapéutico está unido covalente o no covalentemente a un componente regulador del suministro de fármaco, tal como un polímero, por un resto enlazador. El resto enlazador puede ser escindido para liberar el agente terapéutico desde el componente regulador del suministro de fármaco para proporcionar liberación prolongada. Por ejemplo, el resto enlazador puede ser un péptido que contiene un sitio que es escindido por una enzima endógena, tal como una proteasa, o el resto enlazador puede contener un enlace lábil o hidrolizable.

Alternativamente, se pueden utilizar los polímeros que incluyen sustituyentes que se reticulan por una reacción por radicales al contacto con un iniciador de radicales. Por ejemplo, se pueden utilizar polímeros que incluyen grupos etilénicamente insaturados que pueden ser reticulados fotoquímicamente, como se describe en WO 93/17669.

En esta realización, se proporcionan macrómeros solubles en agua que incluyen al menos una región soluble en agua, una región biodegradable y al menos dos regiones polimerizables por radicales libres. Los macrómeros se polimerizan por exposición de las regiones polimerizables a radicales libres generados, por ejemplo, por productos químicos fotosensibles y/o luz. Ejemplos de estos macrómeros son acrilatos de PEG-oligolactilo, donde los grupos acrilato se polimerizan utilizando sistemas iniciadores por radicales, tales como un colorante de eosina, o mediante breve exposición a luz ultravioleta o visible. Además, se pueden utilizar los polímeros solubles en agua que incluyen grupos cinamoilo que pueden ser reticulados fotoquímicamente, como se describe en Matsuda et al., *ASAID Trans.*, 38:154-157 (1992). En ciertas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones tamponadas de sal o soluciones de alcohol acuosas.

Los métodos para la síntesis de los otros polímeros descritos anteriormente son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, E. Goethals, editor (Pergamon Press, Elmsford, N.Y. 1980). Muchos polímeros, tales como poli(ácido acrílico), están disponibles comercialmente. Los polímeros naturales y los sintéticos se pueden modificar utilizando reacciones químicas disponibles en la técnica y descritas, por ejemplo, en March, "*Advanced Organic Chemistry*", 4th Edition, 1992, Wiley-Interscience Publication, New York.

Los polímeros solubles en agua con grupos laterales cargados pueden ser reticulados haciendo reaccionar el polímero con una solución acuosa que contenga iones de la carga opuesta, cationes si el polímero tiene grupos laterales ácidos, o aniones si el polímero tiene grupos laterales básicos. Ejemplos de cationes para la reticulación de los polímeros con grupos laterales ácidos, para formar un hidrogel, son cationes monovalentes tales como sodio y cationes multivalentes, tales como cobre, calcio, aluminio, magnesio, estroncio, bario y estaño, y cationes orgánicos di-, tri- o tetra-funcionales, tales como sales de alquilamonio. Las soluciones acuosas de las sales de estos cationes se añaden a los polímeros para formar hidrogeles y membranas suaves, altamente hinchados. Cuanto mayor sea la concentración de catión, o mayor la valencia, mayor será el grado de reticulación del polímero. Además, los polímeros se pueden reticular enzimáticamente, por ejemplo, fibrina con trombina. En algunas realizaciones, se utiliza un péptido auto-ensamblable, tal como los descritos en la Patente de EE.UU. N° 6.800.481. Estos péptidos se auto-ensamblan para formar una estructura de hidrogel por contacto con cationes monovalentes, por ejemplo, tales como los presentes en el fluido extracelular.

En realizaciones de la invención en las que se forma el gel por reticulación de cadenas poliméricas entre sí, la composición puede incluir un agente reticulante apropiado, que se selecciona de acuerdo con el polímero particular. Alternativamente, el agente reticulante se puede administrar después de la administración de la composición que contiene el material formador del gel, en sustancialmente el mismo lugar. Cualquiera de estos geles se puede formar *in vitro*, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para geles que comprenden colágeno soluble, y se implanta en un lugar extravascular apropiado.

La composición puede contener células que produzcan y secreten un inhibidor del complemento en lugar de, o además de, la molécula en sí misma. En estas realizaciones, el gel puede ser resistente a la degradación, de modo que atrape a las células en el mismo durante un período de tiempo prolongado.

En ciertas realizaciones, las composiciones forman un gel 5 minutos después de su administración. En ciertas realizaciones, las preparaciones forman un gel 90 segundos, 2 minutos o 3 minutos después de su administración. En ciertas realizaciones, se forma un gel entre 5-90 segundos después de su administración. En otras realizaciones, se forma un gel entre 3-5 minutos después de su administración.

El volumen total de la solución administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 50 μ L – 100 mL. En ciertas realizaciones, la cantidad es 50 μ L - 100 μ L, 100 μ L - 1 mL, 1 mL – 5 mL, 5 mL – 10 mL, 10 mL – 50 mL o 50 mL – 100 mL. En algunas realizaciones, el peso del gel formado está entre 250 μ g – 100 g, por ejemplo, aproximadamente 10 mg – 10 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 100 mg y 1 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 1 g y 10 g. En algunas realizaciones, el peso está entre 10 g y 50 g.

Se describe en la presente memoria una composición que comprende: (i) una población de partículas que comprenden un inhibidor del complemento; y (ii) una matriz biocompatible continua o precursor para la misma. La matriz puede ser una matriz polimérica de gel, sólida o semi-sólida, etc. El precursor es un material utilizado para formar la masa de la matriz. Las partículas pueden ser nanopartículas, micropartículas, partículas a base de lípido (por ejemplo, liposomas), niosomas, etc. Las partículas pueden ser uniformes o no uniformes en términos de su composición material y/o su tamaño. La población puede comprender múltiples subpoblaciones, cada una de las cuales tiene una o más características uniformes, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, la matriz es un gel, tal como los descritos anteriormente.

Las preparaciones de liberación prolongada pueden tener cinéticas de liberación deseables. En una realización, menos del 50% del total del inhibidor del complemento se libera en las primeras 48 horas después de su administración. En una realización, menos del 25% del total del inhibidor del complemento se libera en las primeras 48 horas después de su administración. En una realización, menos del 50% del total del inhibidor del complemento se libera en la primera semana después de su administración. En una realización, menos del 25% del total del inhibidor del complemento se libera en la primera semana después de su administración. En ciertas realizaciones, hay un perfil

de liberación bifásico donde una primera fracción de la dosis administrada (por ejemplo, hasta 50%) se libera rápidamente (por ejemplo, en las 12, 24 o 48 horas) y una segunda fracción de la dosis administrada se libera a una velocidad diferente, por ejemplo, menos de 0,1 vez la velocidad a la cual se libera la segunda fracción. En algunas realizaciones, hay una primera fase (por ejemplo, 12, 24 o 48 horas) en la cual se libera una primera fracción de la dosis total, y una segunda fase en la cual el tiempo requerido para liberar una cantidad igual a la dosis liberada durante la primera fase es al menos o aproximadamente 5, 10, 20, 50 o 100 veces tan largo como en la primera fase. En algunas realizaciones, la segunda fase es de, o al menos, 2-4 semanas, de, o al menos, 1-3 meses, de, o al menos, 3-6 meses, o de, o al menos, 6-12 meses. En algunas realizaciones, el perfil de liberación es trifásico. En una realización, se administra un bolo junto con, o en hasta 2 horas antes, o después de su administración, de una preparación de liberación prolongada.

La presente invención contempla el uso de una variedad de formulaciones de liberación prolongada y métodos para su fabricación, conocidos en la técnica. Estas formulaciones y métodos comprenden, o se aplican a, un inhibidor del complemento con modificaciones apropiadas, como sea necesario. Se describe en la presente memoria una composición que comprende un inhibidor del complemento complejo o mezclado con una sustancia que tiene una carga opuesta al inhibidor del complemento. La sustancia puede ser un lípido, un polisacárido o un polímero que tiene una pluralidad de restos ácidos (por ejemplo, restos carboxílicos o restos ácido fosfónico) o restos básicos (por ejemplo, restos amina). La sustancia puede ser un metal alcalino, un metal alcalinotérreo o un metal polivalente.

La composición se puede utilizar en la preparación de una formulación o dispositivo de liberación prolongada. La sustancia puede reducir la degradación y/o facilitar la liberación prolongada. La invención proporciona una composición que comprende un inhibidor del complemento y un disolvente orgánico. Disolventes orgánicos como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier disolvente líquido a base de carbono. Disolventes orgánicos ilustrativos incluyen cloruro de metileno, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, dimetilformamida y etanol. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es un alcohol, por ejemplo, que tiene 1 a 10 átomos de carbono, tal como metanol, etanol, iso-propanol, n-propanol o t-butanol, así como también glicerol, propilenglicol, etilenglicol, hexilenglicol, polipropilenglicol y polietilenglicol, y más preferiblemente etanol o iso-propanol. Otros disolventes orgánicos son compuestos heterocíclicos sustituidos, ésteres de ácido carbónico y alcoholes alquílicos, ésteres alquílicos de ácidos monocarboxílicos, ésteres alquílicos de ácidos dicarboxílicos, ésteres alquílicos de ácidos tricarboxílicos, alquil-cetonas, alcoholes, dialquilamidas, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilsulfona, tetrahidrofurano, lactonas, alquilamidas cíclicas, amidas aromáticas, sus mezclas y combinaciones. En algunas realizaciones, los alcoholes son disolventes que, cuando se añaden a una solución acuosa, aumentan la hidrofobicidad de la solución disminuyendo la polaridad de la solución.

En otro aspecto, esta formulación de liberación prolongada comprende un conjugado iónico que contiene un polímero biodegradable que contiene un grupo carboxilo libre, tal como un poliéster hecho de monómeros tales como ácido láctico, ácido ϵ -caprónico, ácido glicólico, carbonato de trimetileno o p-dioxanona; o uno de sus copolímeros y un inhibidor del complemento que contiene un grupo amino libre (por ejemplo, un fármaco peptídico tal como un análogo de compstatina) que están unidos iónicamente entre sí. El fármaco puede tener, por ejemplo, 1-10 grupos amino libres. La formulación de liberación prolongada puede estar en forma de nanopartículas o micropartículas, o en forma de un artículo conformado. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.911.218, en donde se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.

En una realización, la formulación de liberación prolongada es una composición de hidrogel que contiene: (a) un material polimérico y (b) una cantidad eficaz de un inhibidor del complemento. Los materiales poliméricos utilizados en la composición de hidrogel tienen propiedades de gelificación inversa y existen como una solución líquida, acuosa, a temperaturas por debajo de las temperaturas fisiológicas (por ejemplo, por debajo de la temperatura corporal de un paciente) pero forman hidrogeles bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, a temperaturas en, o cercanas a, la temperatura corporal de un paciente). Las composiciones se pueden administrar por tanto a un paciente por inyección mientras están en estado líquido. Tras su administración, las composiciones de hidrogel forman luego hidrogeles con el inhibidor del complemento embebido en ellas. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.541.020, en donde se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.

En una realización, la formulación de liberación prolongada comprende microcápsulas que proporcionan la liberación prolongada de péptidos solubles en agua, con períodos de liberación ajustables entre 1 y 18 semanas. Las paredes de la microcápsulas están hechas de un polímero biodegradable. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.534.094, en donde se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento. Uno de dichos procesos se basa en la formación de una emulsión compleja intermedia del tipo agua/aceite/agua. Evaporando el disolvente en la emulsión a presión reducida, las microcápsulas se consolidan, reteniendo los péptidos activos en la matriz polimérica. El proceso produce la emulsión compleja en una operación continua, en dos mezcladores. En el primer mezclador, se forma una emulsión agua/aceite, y se utiliza para formar la emulsión compleja en el segundo mezclador.

Se describen en la presente memoria microcápsulas de liberación prolongada de inhibidor del complemento y un polímero biodegradable. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se

describen en la Patente de EE.UU. N° 6.419.961, en donde se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento. Uno de dichos métodos comprende obtener microcápsulas que contienen una sustancia bioactiva que está encapsulada con un polímero biodegradable y secar térmicamente las microcápsulas obtenidas a una temperatura no inferior a la temperatura de transición vítrea del polímero biodegradable durante aproximadamente 24 hasta
5 aproximadamente 120 horas, para producir las microcápsulas de liberación prolongada que comprenden, con relación al peso de la microcápsula de liberación prolongada, no menos del 60% (p/p) del polímero biodegradable. En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento se libera a esencialmente o aproximadamente velocidad constante durante un período de tiempo muy largo, desde justo después de su administración, con una liberación inicial drásticamente suprimida del inhibidor del complemento en exceso justo después de la administración, y con un mínimo de disolvente orgánico residual.
10

Se describe en la presente memoria una composición que comprende un inhibidor del complemento contenido dentro de micropartículas poliméricas, donde una mezcla del inhibidor del complemento y el polímero está dispersa dentro de una fase continua, y la dispersión resultante se liofiliza directamente para eliminar el agua y los disolventes orgánicos y formar dichas micropartículas. La fase continua puede ser acuosa u orgánica. En ciertas realizaciones, el inhibidor de la mezcla complemento-polímero se obtiene dispersando una solución acuosa del inhibidor del complemento en una segunda fase, no acuosa, que contiene el polímero, antes de la adición a la fase continua. En ciertas realizaciones, la mezcla ingrediente activo-polímero se obtiene disolviendo ambos componentes en un disolvente no acuoso antes de la adición a la fase continua. En ciertas realizaciones, el ingrediente activo está presente como una dispersión de partículas sólidas en una solución no acuosa del polímero, la cual se añade luego a la fase continua. En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento se omite de la mezcla, produciendo así micropartículas poliméricas vacías, y el inhibidor del complemento se carga sobre dichas micropartículas poliméricas vacías poniendo en suspensión dichas micropartículas poliméricas vacías en la solución del ingrediente activo. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.020.004, en donde se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento. Se apreciará que el método de carga de partícula se puede aplicar a una amplia variedad de composiciones de partículas.
15
20
25

También se describe un sistema de suministro de liberación prolongada para suministrar un inhibidor del complemento. El sistema incluye un reservorio que comprende el inhibidor del complemento y un canal capilar en comunicación con el reservorio y el exterior del sistema para suministrar el inhibidor del complemento desde el sistema. El canal capilar tiene un área de sección transversal y una longitud seleccionadas para suministrar el inhibidor del complemento a una velocidad predeterminada. El sistema puede incluir además una superficie externa que sea impermeable y no porosa durante el suministro del inhibidor del complemento. El inhibidor del complemento puede ser formulado en una matriz de azúcar vítrea. En una realización, la totalidad de un reservorio que aloja el inhibidor del complemento es impermeable y no poroso para los fluidos externos a dicho reservorio durante el suministro del inhibidor del complemento. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.261.583. Se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.
30
35

Se describe una composición de implante para suministro prolongado de un agente biológicamente activo. La composición de implante incluye un inhibidor del complemento, un polímero termoplástico, un líquido orgánico y una pequeña cantidad de un medio acuoso. El polímero termoplástico es insoluble en agua de modo que la composición de implante tiene la forma de un sólido flexible, moldeable, sustancialmente homogéneo. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.261.583. Se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.
40

También se describe una composición fluyente para formar un implante sólido biodegradable *in situ* dentro de un cuerpo, que comprende: (a) un inhibidor del complemento; (b) un material no polimérico, insoluble en agua, que es biodegradable; (c) una cantidad menor de un polímero termoplástico, bioabsorbible y biodegradable; (d) un disolvente orgánico, biocompatible, que es miscible a dispersable en agua o fluidos corporales, y capaz de disiparse, difundirse o lixivarse desde la composición al fluido corporal tras su colocación dentro de un cuerpo, con lo cual el material no polimérico coagula o precipita para formar el implante. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.120.789. Se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.
45

Se describen sistemas sólidos de suministro de dosis para administración de un inhibidor del complemento. Los sistemas de suministro comprenden un vehículo vítreo cargado con el inhibidor del complemento y capaz de liberarlo *in situ* a diversas velocidades controladas. En una realización, el vehículo es un derivado de carbohidrato hidrófobo (HDC). Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación de liberación prolongada se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.586.006. Se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.
50

Se describe un implante preparado a partir de un precursor de implante que tiene una estructura de dos piezas hecha de una bolsa externa y un contenido líquido. El precursor de implante está compuesto de un polímero termoplástico coagulable en agua y biodegradable, y un disolvente orgánico miscible con el agua. Cuando se administra a un sitio de implante en un mamífero, el precursor de implante, que tiene un inhibidor del complemento incluido en el mismo, se solidifica *in situ* formando una matriz microporosa, sólida, por disipación del disolvente orgánico a los fluidos de tejido circundantes y coagulación del polímero. Métodos y materiales adecuados para preparar el precursor de implante y el implante se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.395.293. Se utiliza como agente activo un
55
60

inhibidor del complemento.

5 Se describe una composición polimérica de liberación prolongada que incluye un polímero o copolímero base, un disolvente orgánico, un aditivo polimérico para liberación controlada y un inhibidor del complemento. El aditivo polimérico para liberación controlada reduce la descarga inicial del inhibidor del complemento liberado desde la composición polimérica, a medida que solidifica formando el implante sólido. En ciertas realizaciones, el aditivo para liberación controlada es un copolímero de bloques de poli(lactida-co-glicolida)/polietilenglicol. En ciertas realizaciones, la composición polimérica es capaz de formar el implante por disipación o dispersión del disolvente orgánico en el cuerpo. En ciertas realizaciones, el copolímero de bloques de poli(lactida-co-glicolida)/polietilenglicol incluye desde 10 aproximadamente 50 % en moles hasta aproximadamente 90 % en moles de monómeros de lactida y aproximadamente 50 % en moles hasta aproximadamente 10 % en moles de monómeros de glicolida.

Métodos y materiales adecuados para preparar el precursor de implante y el implante se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.630.155. Se utiliza como agente activo un inhibidor del complemento.

15 Se describe una formulación de liberación prolongada que comprende un polímero bioerosionable y biocompatible, que tiene dispersada en ella una fase de matriz vítrea que comprende un inhibidor del complemento peptídico o polipeptídico y un termoprotector, teniendo dicha fase de matriz vítrea una temperatura de transición vítrea por encima del punto de fusión del polímero. En ciertas realizaciones, el termoprotector se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, lactosa, maltosa, celobiosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa y sacarosa. En ciertas realizaciones, el polímero bioerosionable y biocompatible es policaprolactona. Métodos y materiales adecuados para preparar la formulación se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.187.330.

20 Una variedad de formulaciones de liberación prolongada para suministrar un agente activo y métodos y materiales adecuados para su fabricación, se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.451.335 y 6.419.961.

Una formulación de liberación prolongada puede incluir un componente excipiente, tal como un agente de voluminosidad, agente tampón, estabilizante, conservante y similares. Agentes tampones solubles en agua incluyen carbonatos, fosfatos, bicarbonatos, citratos, boratos, acetatos, succinatos de metales alcalinos y alcalinotérreos y similares, 25 tales como fosfato, citrato, borato, acetato, bicarbonato, carbonato de sodio y similares. Estos agentes están opcionalmente presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la formulación entre aproximadamente 2 y aproximadamente 9, por ejemplo, aproximadamente 4 y aproximadamente 8. Conservantes solubles en agua adecuados incluyen bisulfito de sodio, bisulfato de sodio, tiosulfato de sodio, ascorbato, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, parabenos, metilparabeno, poli(alcohol vinílico), alcohol bencílico, feniletanol y similares, y sus mezclas. En ciertas realizaciones, el estabilizante es un poliol, cuyo término indica un hidrocarburo que incluye al menos dos hidroxilos unidos a átomos de carbono. Los polioles pueden incluir otros grupos funcionales. Los polioles en ciertas realizaciones tienen un peso molecular menor que aproximadamente 70.000 kD. Ejemplos de polioles útiles incluyen alcoholes azúcares, tales como manitol y trehalosa, y poliéteres tal como polietilenglicol. Véase la Patente de EE.UU. N° 5.589.167. "Poliéter" como se utiliza 35 en la presente memoria indica un hidrocarburo que contiene al menos tres enlaces éter. Los poliéteres pueden incluir otros grupos funcionales. Los poliéteres útiles para llevar a la práctica la invención, incluyen polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, un agente estabilizante es un agente que inhibe la agregación de un inhibidor del complemento. Los agentes tampones, conservantes, estabilizantes, etc., pueden estar presentes en cantidades desde 0,001 hasta aproximadamente 5% en peso, por ejemplo, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2% 40 en peso. Estos agentes también se pueden utilizar en composiciones líquidas que carezcan de los componentes reguladores de la liberación del fármaco. Una formulación de liberación prolongada puede contener una variedad de componentes adicionales que carezcan de actividad terapéutica y que puedan, o no, contribuir a las características de liberación prolongada de la formulación. Ejemplos incluyen agentes plastificantes, agentes solubilizantes, agentes que disminuyen la solubilidad y agentes dispersantes (véase la Patente de EE.UU. N° 6.331.313), siempre que dichos componentes sean compatibles con la administración en las condiciones utilizadas. 45

Un experto en la técnica apreciará que los materiales y métodos seleccionados para la preparación de una formulación de liberación prolongada, implante, etc., deben ser tales que retengan la actividad del compuesto. Por ejemplo, puede ser deseable evitar el calentamiento excesivo de ciertos agentes, tales como los polipéptidos, lo que podría conducir a la desnaturalización y pérdida de actividad.

50 En algunas realizaciones de la invención, la formulación de liberación prolongada comprende un agente de suministro que mejora el suministro del agente a un sitio de acción deseado, mejora la biodisponibilidad del agente o mejora de otro modo la actividad del agente. En ciertas realizaciones, el agente de suministro aumenta la permeabilidad del tejido. El agente de suministro puede aumentar la permeabilidad de la membrana mediante una vía paracelular, por ejemplo, mediante fuertes conexiones. Compuestos ilustrativos se describen en la Publicación de Patente de EE.UU. 55 N° 20040077540 e incluyen un péptido o análogo o mimético de péptido seleccionado o derivado de un dominio extracelular de una JAM de mamífero, proteína ocludina o claudina. Una composición que comprende un inhibidor del complemento y un potenciador de la permeabilidad del tejido se puede administrar nasalmente (por ejemplo, por pulverización nasal) para suministrar el inhibidor del complemento al sistema nervioso central.

Incluidos dentro del alcance de la expresión "formulación de liberación prolongada" están los dispositivos o "chips"

que incluyen uno o más reservorios que contienen el agente y que liberan el agente o una de sus porciones desde el uno o más reservorios en el área circundante (Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.797.898 y 6.976.982). La liberación puede ocurrir a través de una variedad de medios. Por ejemplo, los reservorios pueden tener una tapa biodegradable que sea impermeable al agente y que se degrade con el tiempo, de modo que el agente terapéutico se libere una vez que se degrada la tapa. Tapas de espesores diferentes harán que ocurra la liberación a diferentes tiempos. Se pueden utilizar medios mecánicos, eléctricos o de otro tipo, para liberar el agente desde un reservorio, utilizando opcionalmente medios de control externo para regular dicha liberación. La liberación puede ocurrir a tiempos predeterminados y/o en cantidades predeterminadas. El dispositivo puede ser programable.

Otros dispositivos de liberación prolongada útiles en la invención incluyen dispositivos tales como bombas que producen infusión de un material sustancialmente fluido en un lugar en el cuerpo, de una manera continua, sustancialmente continua o intermitente. El dispositivo puede estar programado para liberar cantidades predeterminadas del agente a intervalos de tiempo predeterminados. La Patente de EE.UU. N° 4.692.147, cedida a Medtronic, Inc., Minneapolis, Minn., describe una bomba adecuada. En ciertas realizaciones, se utiliza uno o más de los sistemas de infusión conocidos como Sistema de Infusión Synchromed® fabricado por Medtronic, Inc. de Minneapolis, Minn. (véase la página web que tiene la URL www.medtronic.com). No obstante, se apreciará que la bomba puede tener la forma de cualquier dispositivo utilizado para mover al fluido desde un reservorio. Se pueden utilizar medios mecánicos, a base de presión, osmóticos o electrocinéticos.

La invención proporciona composiciones que comprenden un inhibidor del complemento para administración por inhalación, por ejemplo, a través de la nariz o la boca y dentro del tracto respiratorio. En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento se administra en una cantidad eficaz para tratar un estado que afecta al sistema respiratorio, al tiempo que produce una mínima absorción en la sangre y así un mínimo suministro sistémico del inhibidor del complemento. En ciertas realizaciones de la invención, el grado de absorción en la sangre es tal que no se observa inhibición del complemento clínicamente significativa en un órgano o tejido fuera del sistema respiratorio, cuando el inhibidor del complemento se administra a una dosis que es eficaz en los pulmones.

La composición se puede suministrar en la forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dosificador presurizado que contiene un agente propulsor adecuado, por ejemplo, son prácticos los hidrofluoroalcanos (HFA): HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) o HFA 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) o combinaciones de los dos, o desde un nebulizador. Los dispositivos para suministro de formulaciones en aerosol, o no aerosol, útiles para suministrar inhibidores del complemento al tracto respiratorio incluyen, aunque sin limitación, inhaladores de dosis medidas presurizados (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI) y dispositivos de soluciones medidas (MSI) y nebulizadores. En ciertas realizaciones, el sistema de suministro es adecuado para suministrar la composición en las principales vías respiratorias (tráquea y bronquios) de un sujeto y/o más profundamente en los pulmones (bronquiolos y/o alveolos). En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden un inhibidor del complemento se suministran utilizando un pulverizador nasal.

En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento se suministra al tracto respiratorio, por ejemplo, a los bronquios y/o a los pulmones, como una composición que consiste esencialmente en el inhibidor del complemento en forma seca, por ejemplo, liofilizada, o en un medio acuoso que consiste esencialmente en agua, incluyendo, opcionalmente, también una sal (por ejemplo, NaCl, una sal fosfato), tampón y/o un alcohol. En otras realizaciones, la composición contiene uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las partículas contienen uno o más componentes además de un inhibidor del complemento.

Las formulaciones en aerosol para suministro al tracto respiratorio pueden comprender partículas líquidas o secas de diversas dimensiones y propiedades. En ciertas realizaciones de la invención, las partículas están en la forma de una composición seca adecuada para inhalación. En la presente memoria se denomina un polvo seco a una composición de partículas secas que contiene partículas más pequeñas que aproximadamente 1 mm de diámetro. Una composición "seca" tiene un contenido líquido relativamente bajo, de modo que las partículas son fácilmente dispersables, por ejemplo, en un dispositivo para inhalación de polvo seco, para formar un aerosol o una pulverización. Un "polvo" consiste, en gran medida o esencialmente en su totalidad, en partículas sólidas finamente dispersadas que son de fluidez relativamente libre y capaces de ser dispersadas fácilmente en un dispositivo para inhalación, y subsiguientemente ser inhaladas por un sujeto, preferiblemente de modo que una fracción significativa de las partículas pueda alcanzar una porción deseada del tracto respiratorio.

Las composiciones en polvo se pueden caracterizar en base a diversos parámetros, tales como la fracción de partículas finas (FPF), la dosis emitida, la densidad media de las partículas y el diámetro aerodinámico mediano másico (MMAD). Métodos adecuados se conocen en la técnica, algunos de los cuales se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.942.868 y 7.048.908 y en las Publicaciones de Patentes de EE.UU. N° 20020146373, 20030012742 y 20040092470. En ciertas realizaciones de la invención, se utilizan las partículas que tienen un diámetro aerodinámico medio básico entre 1 μm y 25 μm , por ejemplo, entre 1 μm y 10 μm . En ciertas realizaciones, se utilizan partículas porosas grandes que tienen diámetros geométrico medios en el intervalo entre 3 y 15 μm y una densidad del material asentado entre 0,04 y 0,6 g/cm^3 . Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.048.908; Edwards, D. et al., *Science* 276:1868-1871, 1997; y Vanbever, R., et al., *Pharmaceutical Res.* 16:1735-1742, 1999).

Los métodos para preparar partículas incluyendo polvos secos se describen anteriormente. Las partículas pueden

consistir esencialmente en uno o más inhibidores del complemento. En ciertas realizaciones, las partículas o la composición incluyen uno o más agentes adicionales, por ejemplo, agentes estabilizantes, agentes mejoradores del suministro, excipientes, etc. Se conocen en la técnica excipientes adecuados para el suministro pulmonar. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20040092470 para composiciones ilustrativas de polvo seco.

5 Estas partículas, si bien se describen como útiles para el suministro de oligonucleótidos, también podrían utilizarse para el suministro de otras moléculas. Las composiciones de partículas secas se pueden suministrar en forma seca o se pueden disolver en un disolvente adecuado y ser suministradas como aerosoles líquidos, o por cualquier otro medio de suministro adecuado. Las partículas líquidas también se pueden suministrar, por ejemplo, como formulaciones en aerosol. En general, los intervalos de tamaño para dichas partículas pueden ser similares a los descritos anteriormente para partículas secas. En ciertas realizaciones, las partículas líquidas tienen un tamaño entre aproximadamente 0,5-5 µm para suministro respiratorio, aunque también se podrían utilizar partículas más pequeñas o más grandes. Vehículos acuosos adecuados incluyen agua o solución salina, incluyendo opcionalmente un alcohol. En algunas realizaciones, la composición comprende un tensioactivo adecuado para introducción en el pulmón. Consideraciones adicionales para el suministro pulmonar se estudian en Bisgaard, H., et al., (eds.), *Drug Delivery to the Lung*, Vol. 26 en "*Lung Biology in Health and Disease*", Marcel Dekker, New York, 2002.

Si se desea, las proporciones adecuadas de agente terapéutico, polímero y/o cualquier otro modificador para una formulación de liberación prolongada, tal como una población de micropartículas o un implante, para proporcionar una velocidad deseada de liberación del agente terapéutico, se pueden determinar empíricamente formulando varias composiciones, por ejemplo, con proporciones variables de dichos ingredientes. Se puede utilizar un método para disolución o ensayo de liberación aprobado por la USP para medir la velocidad de liberación (USP 23; NF 18 (1995) pp. 1790-1798).

Como se ha indicado anteriormente, el inhibidor del complemento se puede disolver en un vehículo farmacéuticamente aceptable previo a su formulación con un componente regulador del suministro del fármaco. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el cual está formulado. Los portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones de esta invención incluyen, sin limitación, agua, solución salina fisiológica y similares. Como se indicó además anteriormente, se pueden utilizar las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, tales como las derivadas de ácidos y bases, inorgánicos y orgánicos, farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales de ácido adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio y potasio), metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amonio y sales N⁺(alquilo C₁₋₄)₄. Esta invención también concibe la cuaternización de cualesquiera grupos básicos que contienen nitrógeno, de los compuestos descritos en la presente memoria. Por dicha cuaternización se pueden obtener productos solubles en agua o aceite, o dispersables. Además, se apreciará que la invención abarca solvatos, hidratos, formas enantioméricas, confórmers, tautómeros, formas polimórficas, etc., de los agentes activos descritos en la presente memoria.

La cantidad y la concentración del (o de los) agente(s) terapéutico(s) en una composición puede variar, dependiendo de varios factores que incluyen, sin limitación, la identidad del agente(s) terapéutico(s), el estado que se ha de tratar y su gravedad, los componentes formadores de gel particulares y/o los agentes de reticulación química en la composición, la cantidad total de composición administrada (que en sí misma puede variar en base a diversas consideraciones, tales como la anatomía del paciente, etc.). Las dosis ilustrativas están entre aproximadamente 0,1 y 10.000 mg/dosis para cada lugar que se ha de tratar, por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 y 5000 mg/dosis, entre 1 y 1000 mg/dosis, etc. Las concentraciones ilustrativas de un agente terapéutico en una composición de la invención están entre aproximadamente 0,001 y 100 mg del agente terapéutico por mililitro de solución, por ejemplo, la concentración puede estar entre 0,01 y 50 mg/mL, entre 0,1 y 10 mg/mL, etc.

El intervalo de dosificación (es decir, el tiempo entre administraciones individuales de una composición de la invención) y la dosis del agente terapéutico suministrado con cada administración puede variar. En ciertas realizaciones, la composición se suministra a tiempos de más de 6 semanas de separación, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 meses de separación, o cualquier cantidad intermedia de semanas, por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16 semanas, etc. En otras realizaciones, la composición se suministra a incluso intervalos de tiempo mayores, por ejemplo, a tiempos de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de separación. En otras realizaciones, el intervalo de tiempo es 6 semanas o menos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas de separación. Por ejemplo, la composición se puede administrar por término medio cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 30 días, etc. Naturalmente, el intervalo de tiempo puede variar. Por ejemplo, los intervalos de tiempo entre las dosis pueden alternarse entre 6 semanas o menos y más de 6 semanas. En ciertas realizaciones, el intervalo de tiempo medio entre administraciones de una composición de la invención es al menos 6 semanas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 meses, o cualquier número intermedio de semanas, por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16 semanas, etc. En ciertas realizaciones de la invención, la composición se administra múltiples veces a intervalos de tiempo por término medio de al menos 6, 8, 10 o 12 semanas de separación, o por término medio 3, 4, 6, 8, 12,

15, 18 o 24 meses de separación, etc. La composición se puede administrar al menos 1, 2, 5, 10, 15, 20 o más veces. La composición se puede administrar indefinidamente a diversos intervalos a un sujeto que padece, o está bajo riesgo de, un trastorno mediado por el complemento.

Medición de la inhibición del complemento

5 Se puede utilizar cualquier método adecuado para evaluar la capacidad de un agente, o composición que contiene el agente, para inhibir la activación del complemento (o cualesquiera otras propiedades relevantes). Se pueden utilizar varios ensayos *in vitro*. Por ejemplo, la capacidad de un agente de inhibir la vía clásica o alternativa del complemento se puede evaluar midiendo la hemólisis de eritrocitos mediada por el complemento (por ejemplo, eritrocitos de conejo u oveja sensibilizados por anticuerpo o no sensibilizados), por el suero humano o un conjunto de componentes del complemento en presencia o ausencia del agente. Un agente inhibe el complemento si reduce la hemólisis en este ensayo de inhibición hasta un grado estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La capacidad de un agente de unirse a uno o más componentes del complemento, tales como C3, C5, factor B, factor D, se puede evaluar utilizando calorimetría isoterma de titulación u otros métodos adecuados para llevar a cabo en fase líquida. En otra realización, la capacidad de un agente de unirse a un componente del complemento se mide utilizando un ensayo ELISA. Por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con el agente. Un inhibidor del complemento puede ser funcionalizado para facilitar su unión a una placa. Por ejemplo, el agente se podría biotinar y se utiliza una placa recubierta con estreptavidina. El (o los) componente(s) del complemento se añade(n) a los pocillos. Después de un período de incubación, los pocillos se lavan, y los componentes del complemento unidos se detectan utilizando anticuerpos para el componente del complemento de interés. Otros métodos útiles incluyen resonancia de plasmones superficiales, diálisis de equilibrio, etc.

La capacidad de ciertos agentes, tal como una VCCP, para actuar como cofactor para la escisión mediada por el factor I de un componente del complemento, por ejemplo, C3, C3b, etc., y la velocidad de dicha escisión, se puede determinar incubando el agente con el componente del complemento y el factor I durante un período de tiempo. Después de la incubación, las muestras se someten a electroforesis para separar por tamaños los componentes y los productos de escisión. Los componentes del complemento y sus productos de escisión se pueden visualizar utilizando, por ejemplo, tinción con Coomassie, inmunotransferencia utilizando anticuerpos que reconocen el componente, etc. Se puede realizar una secuencia temporal. La capacidad de un agente de unirse a heparina se puede evaluar por ensayo ELISA o haciendo fluir el agente a través de una columna de heparina y recogiendo y analizando el material no unido para detectar la presencia del agente (donde una cantidad disminuida del agente indica que el agente se ha unido a la heparina en la columna). Los métodos para evaluar la capacidad de un agente para unirse a células, por ejemplo, células endoteliales, incluyen citometría de flujo. La inhibición por quimiotaxis por un agente o por consumo celular de un agente, se puede medir utilizando ensayos bien establecidos de quimiotaxis o captación. En cualquiera de los métodos anteriores, el agente se puede analizar en un intervalo de diluciones diferentes.

Se conocen en la técnica métodos para medir la activación sistémica o local del complemento que tiene lugar *in vitro* o *in vivo* y para determinar la capacidad de un inhibidor del complemento para inhibir dicha activación. Por ejemplo, la medición de los productos de la activación del complemento, tales como C3a, C5a, C3bBb, C5b-9, complejos covalentes entre la molécula de reconocimiento de la vía clásica (C1q) y la activada C4, etc., proporciona una indicación del grado de activación del complemento. Una disminución en la cantidad de dichos productos indica la inhibición de la activación del complemento. En algunas realizaciones, se mide una relación entre un producto de escisión activo y su forma inactiva desArg (por ejemplo, C3a/C3adesArg). Un experto en la técnica puede distinguir entre activación de la vía clásica, la alternativa y de las lectinas, por una selección apropiada del (o de los) producto(s) de la activación del complemento medido(s) y/o de los activadores apropiados del complemento, tales como zimosano, lipopolisacárido, complejos inmunitarios, etc. Otros métodos implican medición de hemólisis de glóbulos rojos mediada por el complemento, como resultado de la formación de un complejo terminal.

La activación del complemento *in vivo* y/o su inhibición por un inhibidor del complemento, se puede medir en una muestra biológica apropiada. Por ejemplo, la activación sistémica del complemento y/o su inhibición por un inhibidor del complemento, se puede medir en una muestra de sangre. La activación local y/o la inhibición en el tracto respiratorio se pueden medir en una muestra de esputo. La activación local y/o la inhibición en una articulación, se puede medir en una muestra de fluido sinovial. La activación local y/o la inhibición en el SNC, se puede medir en una muestra de CSF. Las mediciones en serie que comienzan antes de la administración de un inhibidor del complemento proporcionan una indicación del grado en el cual el inhibidor del complemento inhibe la activación del complemento y la secuencia temporal y la duración de la inhibición. Se apreciará que una disminución de los productos de la activación pueden solamente ponerse en evidencia una vez que se hayan degradado o eliminado los productos de la activación, presentes antes de la administración del inhibidor del complemento.

Los efectos *in vivo* de ciertos inhibidores del complemento sobre la activación sistémica o local del complemento en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que padece, o está bajo riesgo de, un trastorno mediado por el complemento) también se pueden evaluar utilizando ensayos *in vitro*, tales como los descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Las muestras biológicas apropiadas (por ejemplo, plasma, fluido sinovial, esputo) se obtienen del sujeto, por ejemplo, antes y después de la administración local de un inhibidor del complemento. El ensayo *in vitro* se lleva a cabo utilizando estas muestras como fuente de los componentes del complemento. Las mediciones en serie que comienzan antes de la administración de un inhibidor del complemento proporcionan una indicación del grado en el

que el inhibidor del complemento inhibe la activación del complemento y la secuencia temporal y la duración de la inhibición.

Los métodos anteriores se describen en varias referencias citadas en la presente memoria (Patentes de EE.UU. N° 5.157.110; 6.551.595; Patente de EE.UU. N° 6.319.897; WO2004/026328 (PCT/US2003/029653), USSN 10/937,912; Morikis, 2004; Mallik, 2005; Katragadda, M., 2006), Sahu, 1998; Smith, 2000; Rosengard, 2002, etc.). Cualquiera de estos métodos o sus variantes u otros conocidos en la técnica, se puede utilizar para evaluar el efecto de la administración sistémica y/o local de una composición que comprende un inhibidor del complemento de acuerdo con la presente invención. Los Ejemplos 5 y 6 proporcionan ensayos adecuados para medir la inhibición de las vías clásica y alternativa, respectivamente.

10 **Monitorización de la degradación de una formulación o dispositivo de liberación prolongada**

Ciertas formulaciones y dispositivos de liberación prolongada liberan un agente terapéutico a medida que el material se degrada en condiciones fisiológicas. La biodisponibilidad del agente y/o la cantidad o concentración del agente en un sitio de actividad deseado está normalmente controlada, al menos en parte, por la velocidad a la cual disminuyen la masa y/o el volumen del material. La invención proporciona métodos para monitorizar una formulación o dispositivo de liberación prolongada que comprende un agente terapéutico. Los métodos son útiles para monitorizar la degradación de una formulación o dispositivo de liberación prolongada biodegradable. Los métodos son útiles para monitorizar la biodisponibilidad del agente y/o la cantidad o concentración del agente en un sitio de actividad deseado. Se describe una formulación o dispositivo de liberación prolongada que comprende un resto detectable y un agente terapéutico, tal como un inhibidor del complemento, o cualquier otro agente terapéutico analizado en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, un "resto detectable" es un resto, por ejemplo, una molécula o complejo supramolecular, que puede estar incluido en una formulación de liberación prolongada y que puede ser detectado por un método o métodos particulares de interés. Normalmente, el método de detección es externo y no invasivo, es decir, el método no implica la penetración de la piel u otra superficie corporal o entrada hacia una cavidad corporal accesible externamente. En ciertas realizaciones, el resto detectable tiene la propiedad de hacerse detectable sin necesidad de administrar otro resto para hacerlo detectable. En ciertas realizaciones, el resto detectable puede ser detectado mientras está presente en la formulación o dispositivo de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el resto detectable puede ser detectado solamente cuando ya no está presente en la formulación o dispositivo de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el resto detectable no puede ser detectado después de que haya sido liberado desde la formulación o dispositivo de liberación prolongada, o ser detectable solamente durante un período de tiempo limitado (por ejemplo, hasta 1-2 semanas). Por ejemplo, el resto detectable se puede degradar o eliminar desde su sitio de liberación.

En ciertas realizaciones, la detección del resto detectable se puede utilizar para evaluar la masa o volumen de la formulación o dispositivo de liberación prolongada que permanece intacto un tiempo "X" después de la administración y/o para evaluar la masa o volumen de la formulación o dispositivo de liberación prolongada que se ha degradado en un tiempo "X" después de la administración. Si se determina que una masa o un volumen predeterminado de la formulación se ha degradado o se mantiene, el sujeto puede volver a ser tratado en un período de tiempo adecuado. Por ejemplo, el nuevo tratamiento se puede programar para llevarse a cabo 1, 2, 3 o 4 semanas después del tiempo en el que se determina o se espera que la formulación esté al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% degradada. La detección del resto detectable se puede utilizar alternativa o adicionalmente para evaluar la cantidad de agente terapéutico que permanece dentro de la formulación o dispositivo de liberación prolongada, es decir, que aún no se ha liberado.

En ciertas realizaciones, el resto detectable se selecciona para ser liberado desde la formulación o dispositivo de liberación prolongada, o para degradarse, a una velocidad que se correlaciona con la velocidad de liberación del agente terapéutico, por ejemplo, a aproximadamente la misma velocidad. La detección del resto detectable puede así utilizarse para determinar la cantidad del agente terapéutico que se ha liberado o equivalentemente, la cantidad que no se ha liberado.

Se describe en la presente memoria un método para tratar un sujeto, que comprende: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de una primera formulación o dispositivo de liberación prolongada biodegradable que comprende un resto detectable y un agente terapéutico; (b) detectar el resto detectable utilizando un método de detección no invasivo. En ciertas realizaciones, la presencia y/o cantidad del resto detectado sirve como indicación de la cantidad de la formulación o dispositivo de liberación prolongada que permanece intacta o que ha sido degradada, o sirve como indicación de la cantidad del agente terapéutico que permanece en la formulación o dispositivo de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el resto se detecta para facilitar la colocación apropiada de la formulación o dispositivo en un lugar extravascular en el cuerpo. El método puede además comprender (c) administrar al sujeto una segunda cantidad de una segunda formulación o dispositivo de liberación prolongada en base a los resultados de la etapa (b). Las cantidades primera y segunda pueden ser iguales o diferentes. Las formulaciones de liberación prolongada primera y segunda pueden ser iguales o diferentes. Si son diferentes, pueden diferir en la cantidad o identidad (i) del agente terapéutico; o (ii) de un componente regulador del suministro de fármaco, tal como una matriz de polímero. Las etapas (b) y (c) se pueden repetir múltiples veces. La etapa (b) podría comprender determinar que el resto es no detectable o está presente en una cantidad por debajo de un nivel predeterminado, donde la incapacidad para detectar el resto, o la detección por debajo de un nivel predeterminado indica que la formulación o

dispositivo de liberación prolongada permanece al menos parcialmente intacta o, en ciertas realizaciones, se ha degradado sustancialmente.

La formulación o dispositivo de liberación prolongada puede ser cualquier formulación o dispositivo de liberación prolongada descrita en la presente memoria o conocida en la técnica. Podría estar en forma de un gel, un artículo de fabricación microscópico o macroscópico, sólido o semi-sólido, una pluralidad de micropartículas o nanopartículas, etc. En una realización, el resto detectable está distribuido uniformemente en toda la formulación, por ejemplo, su concentración varía en no más de aproximadamente 20% en toda la formulación. La estructura podría ser, por ejemplo, un implante macroscópico, micropartículas o nanopartículas. En ciertas realizaciones, la forma y/o tamaño de la estructura se puede monitorizar detectando el resto. En ciertas realizaciones, a medida que la estructura se degrada, el resto se libera de modo que finalmente la señal total detectada desde la porción remanente de la estructura está por debajo de un umbral predeterminado, indicando que la formulación o dispositivo de liberación prolongada se ha degradado en gran medida. En ciertas realizaciones, el resto se libera de modo que finalmente la señal está por encima de un umbral predeterminado, indicando que la formulación o dispositivo de liberación prolongada se ha degradado en gran medida. En ciertas realizaciones, dicho método se utiliza para una formulación que se administra como un líquido y forma un gel después de su administración. El resto detectable se mezcla en solución con el material formador de gel y el agente terapéutico. Al menos una porción del resto detectable (por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más del resto detectable) está atrapado dentro del gel después de su administración.

En otras realizaciones, el resto detectable no está distribuido uniformemente en la formulación. Por ejemplo, el resto detectable puede estar concentrado en una región central de la formulación que se espera permanezca intacta cuando se haya degradado la mayor parte de la formulación. La detección del resto indica que la mayor parte de la formulación se ha degradado y liberado el agente terapéutico. El resto detectable podría volverse detectable a medida que disminuye el espesor de la capa externa y/o a medida que se libera el resto detectable.

Se podrían incorporar una variedad de restos detectables diferentes en una formulación o dispositivo de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el resto detectable es sustancialmente no tóxico cuando se administra en las cantidades y en los sitios concebidos para la administración de la formulación o dispositivo de liberación prolongada. En ciertas realizaciones, el resto detectable es una partícula. En ciertas realizaciones, el resto detectable no es una partícula. En ciertas realizaciones, el resto detectable es soluble en un medio acuoso o disolvente orgánico. El resto detectable puede ser o comprender una molécula fluorescente o luminiscente. La molécula puede ser una proteína o un colorante orgánico o inorgánico. En ciertas realizaciones, el resto detectable es un punto cuántico. En ciertas realizaciones de la invención, el resto detectable emite una señal detectable, por ejemplo, energía electromagnética tal como en forma de luz UV, visible o infrarroja. En ciertas realizaciones, el resto detectable absorbe detectablemente radiación electromagnética. En ciertas realizaciones, el resto detectable no es un agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el resto detectable no es un aminoácido, nucleótido ni ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el resto detectable es distinto del componente que libera fármaco de una formulación o dispositivo de liberación prolongada. Un aspecto de la presente invención es una composición que comprende un inhibidor del complemento (por ejemplo, un análogo de compstatina) y un resto detectable, por ejemplo, un resto detectable descrito en la presente memoria.

La fluorescencia es un fenómeno en el cual la absorción de la luz de una longitud de onda dada por una molécula fluorescente es seguida por la emisión de luz a longitudes de onda mayores. Véase, por ejemplo, Valeur, B., "*Molecular Fluorescence: Principles and Applications*", John Wiley and Sons (2002), "*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*" (Molecular Probes, 9th edition, 2002) y "*The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*", (Invitrogen Corp., 10th edition, disponible en la página web de Invitrogen y en Invitrogen Corp.). La quimioluminiscencia es la emisión de luz por una reacción química que ocurre a temperatura ambiente o cercana a la temperatura ambiente. La bioluminiscencia es un proceso luminiscente mediado por una enzima u otro sistema biológico. Véase, por ejemplo, McCapra and Beheshti en "*Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*", K. Van Dyke (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., pp. 9-42 (1985).

Las moléculas fluorescentes y luminiscentes incluyen una variedad de moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas diferentes comúnmente denominadas "colorantes" o "indicadores". Las moléculas fluorescentes y luminiscentes también incluyen una variedad de proteínas naturales y sus derivados, por ejemplo, variantes producidas por ingeniería genética. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), GFP mejorada, las proteínas fluorescentes roja, azul, amarilla, cian y azul zafiro (RFP, BFP, YFP, CYP y SFP), proteína fluorescente de arrecife de coral, etc. Las proteínas luminiscentes incluyen luciferasa, acurina y sus derivados. Numerosos colorantes y proteínas fluorescentes y luminiscentes se describen en los manuales de Molecular Probes e Invitrogen anteriormente mencionados. Moléculas ilustrativas incluyen fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, R-ficoeritrina, Cy-3, Cy-5, Cy-7, Rojo Texas, Rojo Phar, alofocianina (APC), fluoresceína-amina, eosina, dansilo, umbeliferona, 5-carboxifluoresceína (FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-rodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)-benzoico (DABCYL), ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS), ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina, isotiocianato de acridina, 3,5-disulfonato de r-amino-N-(3-vinilsulfonil)fenilnaftalimida (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, amarillo brillante,

cumarina, 7-amino-4-metilcumarina, 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151), cianosina, 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-dibromopirogalol-sulfonftaleína (rojo de bromopirogalol), 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, pentaacetato de dietilentriamina, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilben-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC), isotiocianato de eosina, eritrosina B, isotiocianato de eritrosina, etidio, 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), QFITC (XRITC), fluorescamina, IR144, IR1446, isotiocianato de verde malaquita, 4-metilumbeliferona, orto-cresolftaleína, nitrotirosina, pararosanilina, rojo de fenol, B-ficocitrina, o-ftaldialdehído, pireno, butirato de pireno, butirato de succinimidil-1-pireno, rojo reactivo 4 (Cibacron.RTM. Rojo Brillante 3B-A), cloruro de lisamina-rodamina B-sulfonilo, rodamina B, rodamina 123, rodamina X, sulforodamina B, sulforodamina 101, derivado de cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101, tetrametil-rodamina, riboflavina, ácido rosólico y derivados de quelatos de terbio.

Otros restos detectables incluyen moléculas para resonancia de espín electrónico (tales como por ejemplo radicales nitroxilo), moléculas que transducen o transfieren cargas eléctricas, etc.

Los puntos cuánticos (QD) son nanocristales con dimensiones físicas suficientemente pequeñas (por ejemplo, más pequeñas que el radio de Bohr del excitón) de modo que el efecto del confinamiento cuántico da origen a propiedades ópticas y electrónicas únicas, que no se observan ni en el material a granel, ni en átomos discretos, ni en nanopartículas mayores. Los QD de semiconductores están frecuentemente compuestos de átomos de los grupos II-VI o III-V de la tabla periódica, pero son posibles también otras composiciones. Los puntos cuánticos tienen generalmente un amplio espectro de absorción y un estrecho espectro de emisión. Variando su tamaño y composición, la longitud de onda de emisión se puede calibrar (es decir, ajustar de una manera predecible y controlable) desde el azul hasta el infrarrojo cercano. Los puntos cuánticos y los métodos para su síntesis y conjugación con biomoléculas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Michalet X, et al., *Science*, 307(5709):538-44, 2005; Smith, AM, *Ann Biomed Eng.*, 34(1):3-14, 2006). Los puntos cuánticos con una gran variedad de espectros de absorción y emisión están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Evident Technologies (Troy, N.Y.) o Quantum Dot Corp. (Hayward Calif.; actualmente propiedad de Invitrogen), etc. Los puntos cuánticos están descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nº 5.990.479; 6.207.392; 6.251.303; y 6.914.265, entre otras. En algunas realizaciones, los QD son solubles. En algunas realizaciones, los QD están recubiertos con un polímero u otro material, por ejemplo, uno o más polímeros hidrofílicos o anfipáticos, que aumentan la estabilidad de los QD, hacen a los QD solubles, y/o hacen a los QD biocompatibles. El polímero puede estabilizar a los QD en un ambiente fisiológico. En algunas realizaciones, los QD son estables mientras estén contenidos en la formulación de liberación prolongada, pero inestables cuando se liberan desde la formulación o dispositivo en el ambiente local dentro del cuerpo. En este caso, la detección de los QD implica que los QD aún están contenidos en la formulación o dispositivo de liberación prolongada y proporcionan una indicación del grado el cual la formulación o dispositivo permanece intacta. En algunas realizaciones, los QD están incorporados en partículas (por ejemplo, compuestas de una matriz polimérica biocompatible) las cuales están incorporadas en la formulación o dispositivo de liberación prolongada. Véase Vashist, et al., "*Review of Quantum Dot Technologies for Cancer Detection and Treatment*", *AZojono Journal of Nanotechnology Online*, publicado el 13 de Sept., 2006; DOI: 10.2240/azojono0113 y las referencias allí citadas para información adicional sobre los QD útiles.

También son útiles los restos detectables que aumentan la detectabilidad de la formulación o dispositivo de liberación prolongada por ultrasonido o resonancia magnética. Dichos restos se denominan en la técnica potenciadores o agentes de contraste. Son útiles los potenciadores de contraste de ultrasonido conocidos en la técnica. En una realización, el resto detectable comprende microburbujas rellenas con gas. También son útiles los potenciadores de contraste por resonancia magnética conocidos en la técnica. También son útiles los restos radiactivos o radiopacos, conocidos por los expertos en la técnica, como administración adecuada a sujetos mamíferos durante los períodos de tiempo contemplados en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el resto detectable no es percibido por el sujeto cuando se administra al ojo en cantidades suficientes para permitir su detección externa, de acuerdo con la invención. En este aspecto, pueden ser preferidos los restos que no emiten cantidades significativas de radiación electromagnética dentro de la porción visible del espectro electromagnético.

El método de detección se seleccionará como apropiado para detectar el resto detectable. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el método de detección detecta radiación electromagnética dentro de la porción de infrarrojo, infrarrojo cercano, visible o UV del espectro. Los sistemas de detección adecuados se conocen en la técnica y pueden emplear, por ejemplo, dispositivos acoplados a carga (CCD), sensores CMOS, LED, etc. Por ejemplo, un experto en la técnica podría emplear un sistema de detección conocido en la técnica para la formación de imágenes *in vivo* de los QD. En ciertas realizaciones, la detección emplea un sistema de tomografía de coherencia óptica (OCT). La invención proporciona un instrumento médico, por ejemplo, un oftalmoscopio, que comprende un sistema de detección capaz de detectar restos fluorescentes o luminiscentes en un lugar extravascular en el cuerpo. En ciertas realizaciones, el instrumento es un oftalmoscopio y el lugar extravascular es el ojo, o un compartimento del mismo, por ejemplo, la cámara vítrea. En una realización, la invención proporciona un oftalmoscopio que comprende un sistema de detección capaz de detectar los QD en el ojo, por ejemplo, dentro de la cámara vítrea. En ciertas realizaciones, el instrumento permite la visualización de la distribución del resto detectable dentro del lugar extravascular, por ejem-

5 plo, dentro del ojo. En ciertas realizaciones, el detector permite la cuantificación de la cantidad o distribución del resto detectable en el lugar extravascular. En ciertas realizaciones, el instrumento comprende una porción o sonda portátil, por ejemplo, de manejo manual, que comprende un detector, o comprende una fibra óptica que transmite una señal a un detector. En una realización, el instrumento comprende un sistema de formación de imágenes fluorescentes miniaturizado, tal como LumiSens 830 (Sensovation Corp., Pleasanton, CA 94588). Como se utiliza en la presente memoria, "portátil" significa en ciertas realizaciones que el instrumento o una de sus porciones, pesa aproximadamente 5 kg o menos, por ejemplo, aproximadamente 2 kg o menos, por ejemplo, aproximadamente 1 o 0,5 kg, o menos, y normalmente puede ser trasladado y/o un dispositivo de habitación en habitación por una persona adulta, de fuerza media, sin necesidad de estar sobre ruedas o en contacto con una superficie portadora de peso, tal como un piso.

10 Como se utiliza en la presente memoria, "de manejo manual" significa que el instrumento o una de sus porciones, se puede manipular fácilmente y colocar a mano para su uso por una persona adulta de fuerza media. En ciertas realizaciones, el instrumento comprende medios de aumento, por ejemplo, un microscopio u otro sistema de lentes y/o comprende una cámara. En ciertas realizaciones, el instrumento comprende un transductor de ultrasonidos. En ciertas realizaciones, el instrumento comprende o hace interfaz con un procesador de señales. En ciertas realizaciones, el instrumento hace interfaz con un ordenador y/o un dispositivo de presentación de imágenes de modo que, por ejemplo, el usuario pueda visualizar la formulación de liberación prolongada dentro del cuerpo, por ejemplo, dentro de la cámara vítrea.

Se describe en la presente memoria una formulación o dispositivo de liberación prolongada que comprende un resto detectable y un inhibidor del complemento, tal como un análogo de compstatina.

20 Terapias de combinación y composiciones

La presente invención contempla el uso de inhibidores del complemento que son ciertos análogos de compstatina junto con uno o más segundos agentes eficaces para el tratamiento de un trastorno analizado en la presente memoria. Los agentes se pueden administrar separadamente o juntos en la misma composición. Si se administran separadamente se pueden administrar simultánea o secuencialmente. En ciertas realizaciones, un inhibidor del complemento se administra localmente y un segundo agente se administra sistémicamente. En otras realizaciones, dos o más agentes se administran localmente. En ciertas realizaciones, dos o más agentes se administran como componentes de la misma formulación, por ejemplo, la misma formulación de liberación prolongada. La invención contempla la adición de un inhibidor del complemento a terapias existentes para diversos trastornos analizados en la presente memoria, para alcanzar una mejor eficacia global.

30 Los agentes pueden actuar sobre la(s) misma(s) diana(s) o vía(s) o sobre dianas o vías diferentes. El inhibidor del complemento y el segundo agente pueden actuar aditiva o sinérgicamente (donde la actividad combinada de los agentes es superior a la suma de sus actividades si fueran administrados individualmente). En algunas realizaciones, la presencia del inhibidor del complemento permite inesperadamente una reducción de la dosis del segundo agente requerida para producir un efecto deseado.

35 El (o los) segundo(s) agente(s) se selecciona(n) según sea apropiado para el trastorno que se ha de tratar. En algunas realizaciones, el agente ya es utilizado en la técnica para el tratamiento del trastorno. En otras realizaciones, el agente no es comúnmente utilizado en la técnica para el tratamiento del trastorno. Agentes adecuados incluyen agentes anti-inflamatorios, tales como corticosteroides, agentes anti-inflamatorios no esteroideos, leucotrienos o antagonistas del receptor de leucotrienos, citoquinas o antagonistas del receptor de citoquinas (por ejemplo, agentes anti-TNF α , tales como anticuerpos o receptores solubles de TNF α o sus fragmentos que se unen a TNF α), agentes anti-IgE (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a IgE o a un receptor de IgE), inhibidores de angiogénesis, agentes analgésicos y agentes anti-infecciosos. Los agentes anti-infecciosos incluyen agentes antivirales, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Agentes corticosteroides adecuados, útiles en las diversas realizaciones de la invención, incluyen dexametasona, cortisona, prednisona, hidrocortisona, dipropionato de beclometasona, betametasona, flunisolida, metilprednisona, parametasona, prednisolona, triamcinolona, alclometasona, amcinonida, clobetasol, fludrocortisona, diacetato de diflorasona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluorometolona, flurandrenolida, halcinonida, medrisona y mometasona, y sus mezclas y sales farmacéuticamente aceptables, y cualquier otro de sus derivados y análogos. Son útiles los antibióticos, tales como sulfisoxazol, penicilina G, ampicilina, cefalosporinas, quinolonas, ampicacina, gentamicina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, isoniazid, rifampina, y sus derivados, sales y mezclas; antifúngicos, tales como anfotericina B, nistatina, ketoconazol, itraconazol; y otros agentes anti-infecciosos o sus combinaciones conocidos en la técnica.

45 En ciertas realizaciones, el agente anti-inflamatorio es un agonista de un receptor de melanocortina. Ejemplos incluyen hormonas estimulantes de melanocitos (por ejemplo, α -MSH) y sus fragmentos, variantes o análogos, tales como el péptido central de melanocortina His-Phe-Arg-Trp, el agonista del receptor de melanocortina MTII ([Ac-Nle4, Asp5, d-Phe7, Lys10]ciclo-alfa-MSH-(4-10)amida). En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de un receptor tipo Toll (TLR). El TLR puede ser cualquiera de los TLR conocidos en mamíferos, por ejemplo, TLR1 - TLR13. En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de TLR4. En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de TLR2 o TLR5. En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de TLR9. En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de TLR3 o TLR7.

Se pueden seleccionar agentes adecuados como apropiados para el trastorno que se ha de tratar.

En ciertas realizaciones, el agente adicional es un agente anestésico local. Un "agente anestésico local" o "anestésico local" es un fármaco que proporciona adormecimiento local y/o analgesia. La expresión incluye también, aunque sin limitación, cualquier fármaco que, cuando se administra localmente, por ejemplo, tópicamente o por infiltración o inyección, proporciona una inhibición parcial o completa localizada de la percepción sensorial y/o de la función motora. Los agentes anestésicos locales incluyen bupivacaína, ropivacaína, dibucaína, procaína, cloroprocaína, prilocaína, mepivacaína, etidocaína, tetracaína, lidocaína y xilocaína, así como también sus derivados, análogos y mezclas activos como anestésicos. El anestésico local puede estar en forma de una sal, por ejemplo, hidrocloreto, bromuro, acetato, citrato, carbonato o sulfato. En una realización, el agente anestésico local está en forma de una base libre. En ciertas realizaciones, el agente anestésico local es un agente de larga duración capaz de aliviar eficazmente el dolor durante al menos tanto como la bupivacaína cuando se administra en una dosis aceptable. Las composiciones que comprenden un inhibidor del complemento y un agente anestésico local se pueden administrar localmente a una articulación o bolsa, por ejemplo, a un sujeto que padece artritis, espondilitis anquilosante, etc.

Se apreciará que una cantidad de los agentes mencionados en la presente memoria se encuentran naturalmente en sujetos mamíferos. En ciertas realizaciones, el agente administrado es de la misma especie que el sujeto al cual se administra. Por ejemplo, la IFG-1 o NGF humana se administra a un ser humano. En otras realizaciones, el agente es de una especie diferente.

Análisis del potencial terapéutico en modelos animales y humanos

Se conocen en la técnica varios modelos animales diferentes con características patológicas que simulan una o más características de un trastorno mediado por el complemento. Una composición que contiene un inhibidor del complemento se puede administrar en diversas dosis a ratones, ratas, perros, primates, etc., que exhiben espontáneamente un trastorno o en los cuales se ha inducido experimentalmente un trastorno, sometiendo el animal a un protocolo adecuado. La capacidad del compuesto para prevenir o tratar uno o más signos o síntomas del trastorno se evalúa utilizando métodos y criterios estándares.

Se puede utilizarse cualquier modelo animal conocido en la técnica para evaluar la seguridad y/o eficacia de la administración local de un inhibidor del complemento. En ciertas realizaciones de la invención, el modelo animal es uno en el cual la activación local del complemento ocurre en un lugar extravascular manifestando síntoma(s) del trastorno. Un modelo animal adecuado puede replicar más fielmente el papel de la activación local del complemento en sujetos humanos que padecen el trastorno, que otros modelos animales conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, un modelo animal adecuado se genera administrando localmente una sustancia sensibilizante, irritante o inmunogénica a un lugar extravascular, tal como una articulación, el tracto respiratorio, la piel o el SNC. Véase, por ejemplo, Linton, *supra*. En ciertas realizaciones, un modelo animal adecuado se genera administrando localmente una primera sustancia sensibilizante, irritante o inmunogénica a un lugar extravascular, tal como una articulación, el tracto respiratorio, la piel o el SNC, y administrando sistémicamente una segunda sustancia sensibilizante, irritante o inmunogénica. Las sustancias pueden ser las mismas o diferentes y pueden administrarse en cualquier orden. Se describe un método para analizar un agente candidato para el tratamiento de un trastorno asociado a inflamación, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar un animal en el cual al menos una vía del complemento esté activada anormalmente en un lugar extravascular en el cual se manifiesta el trastorno; administrar el agente candidato al lugar extravascular de modo que el agente esté presente durante un período de tiempo prolongado en dicho lugar en una cantidad eficaz para inhibir la activación local del complemento; y determinar si el síntoma se alivia significativamente después de la administración del agente candidato, donde si el síntoma se alivia significativamente, el agente candidato se identifica como útil en el tratamiento del trastorno por administración local.

Se pueden analizar en seres humanos los compuestos que muestren resultados prometedores en estudios en animales, tales como seguridad aceptable y factibilidad de administrar una dosis que se espera que inhiba eficazmente el complemento en el lugar extravascular relevante en un sujeto humano, por ejemplo, utilizando protocolos estándares y puntos finales para ensayos clínicos para terapias, para el trastorno particular bajo estudio. Se apreciará que, en el caso de ciertos trastornos de interés en la presente memoria, no es necesario demostrar la eficacia en modelos animales para establecer que un compuesto descrito en la presente memoria sería considerado terapéuticamente útil por los expertos en la técnica, y/o para realizar ensayos clínicos en seres humanos, aunque dichos resultados pudieran reforzar la motivación para proceder con los ensayos clínicos.

Los métodos pueden incluir proporcionar un sujeto al cual se debe administrar una composición de la invención. El sujeto está normalmente bajo riesgo, o está padeciendo, un trastorno mediado por el complemento. En ciertas realizaciones, el sujeto está bajo riesgo de, o padece, al menos un trastorno mediado por el complemento distinto de un trastorno ocular caracterizado por degeneración macular, neovascularización coroidea, neovascularización retiniana o inflamación ocular. En ciertas realizaciones, el sujeto está bajo riesgo de, o padece, al menos un trastorno mediado por el complemento además de un trastorno ocular caracterizado por degeneración macular, neovascularización coroidea, neovascularización retiniana o inflamación ocular.

La composición se administra normalmente al sujeto con la intención de tratar o prevenir el desarrollo de dicho trastorno. Así, normalmente el sujeto habrá sido identificado que está bajo riesgo de, o padece, dicho estado. Se puede

utilizar cualquier ensayo y criterios adecuados para identificar un sujeto que está bajo riesgo de, o padece, un trastorno de interés en la presente memoria. Se conocen en la técnica métodos de diagnóstico de los trastornos de interés en la presente memoria y de evaluación de la respuesta a la terapia.

5 El método de tratamiento puede comprender determinar si el sujeto tiene un polimorfismo genético que aumenta el riesgo del trastorno. "Determinar" se utiliza aquí para referirse a establecer que el sujeto tiene un polimorfismo que aumenta el riesgo del trastorno llevando a cabo u ordenando un ensayo adecuado, o recibiendo los resultados de un ensayo realizado u ordenado por otro, en donde el ensayo establece si el sujeto tiene el polimorfismo. Se apreciará que un ensayo genético útil no precisa ser 100% exacto. El polimorfismo puede estar en el gen que codifica un componente del complemento.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo basado en ELISA para la activación de la vía clásica del complemento para evaluar la actividad inhibidora del complemento

15 Este ejemplo describe un protocolo para medir la activación de la vía del complemento y la capacidad de un agente de ensayo, por ejemplo, un inhibidor del complemento de interés, para inhibirla. El protocolo mide la deposición de C3b en un formato ELISA. La deposición de C3b aquí monitorizada es a través del complemento activado por la vía clásica. En resumen, placas de 96 pocillos se recubren con BSA. Luego se añaden plasma (o cualquier muestra biológica de interés), ovoalbúmina de pollo (OVA), anticuerpos policlonales anti-OVA y un inhibidor del complemento de interés, y se incuban, seguido por la adición de anticuerpo anti-C3 humano conjugado a HRP. Después de una incubación adicional, se añade el sustrato y se detecta una señal.

- 20 • Placa para ELISA de noventa y seis pocillos (ThermoElectron 9205)
- OVA de pollo (Sigma A5378)
- Anti-OVA de pollo policlonal (Abcam ab1221-100)
- BSA al 1% en PBS - Calbiochem N° 126626, dilución 1/30
- Tampón Veronal + MgCl₂ 0,5 mM + CaCl₂ 0,15 mM (VB⁺⁺)
- 25 • Plasma (recolectado con Lepirudin a una concentración final de 5 µg/mL)
- Ab policlonal anti-C3 humano conjugado a HRP (C3-HRP Ab, Cappel 55237)
- Tampón de lavado con Tween-20 (0,05% en PBS)
- TMB (Sustrato de peroxidasa) – mezcla 1:1 de BD 51-2607KC y 51-2606KC.
- H₂SO₄ 3M
- 30 • Lector de microplacas

Protocolo:

1. Añadir 50 µL/pocillo de OVA de pollo al 1% (en PBS)
2. Incubar durante la noche a 4°C
3. Separar por sacudidas y golpeteo de la placa; aspirar cualquier fluido remanente.
- 35 4. Bloquear añadiendo 200 µL de BSA/PBS al 1%
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
6. Separar por sacudidas y golpeteo de la placa; aspirar cualquier fluido remanente
7. Añadir 50 µL de dilución 1/4000 de anti-OVA de pollo policlonal en BSA/PBS al 1%
8. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- 40 9. Lavar dos veces con tampón de lavado
10. Añadir 50 µL de VB⁺⁺ a los pocillos N° 2 a 12
11. Añadir 100 µL de la dilución inicial de fármaco (2x en VB⁺⁺) al pocillo 1
12. Diluir en serie (1:2) el fármaco de los pocillos 1 a 10 como sigue:
 - a. Tomar 50 µL de solución del pocillo original
 - 45 b. Añadir esto al siguiente pocillo
 - c. Mezclar por pipeteo varias veces
 - d. Repetir hasta el pocillo N° 10
- Nota: del pocillo N° 10 retirar 50 µL y desecharlos.
13. Añadir 50 µL de dilución de plasma 2x a los pocillos 1 a 11 (q.v. 5.10 anterior)
- 50 14. Incubar durante 1 hora
15. Lavar dos veces con tampón de lavado
16. Añadir 50 µL de dilución 1/1000 de Ab C3-HRP en BSA/PBS al 1%
17. Incubar durante 1 hora
18. Añadir 100 µL de TMB a todos los pocillos
- 55 19. Incubar durante 5 min
20. Añadir 50 µL de H₂SO₄ 3M
21. Leer la placa a 405 nm

VB⁺⁺

Fórmula:

Barbital	5 mM
NaCl	72,5 mM
MgCl ₂	0,5 mM
5 CaCl ₂	0,15 mM
pH	7,3-7,4

Soluciones madre:**Tampón de veronal (5X)**

	Nº del producto	PM	Para 500 mL
Barbitona sódica 9 mM	Sigma B0500	206,17	927 mg
Ácido dietilbarbitúrico 15,5 mM	Sigma B0375	184,19	1,42 gramos

10

Mg-Cl₂ (200X)

	Nº de producto	PM	Para 50 mL
MgCl ₂ ·6H ₂ O 100 mM	Sigma M0250	203,30	1,00 gramo

CaCl₂ (500x)

	Nº de producto	PM	Para 50 mL
CaCl ₂ 75mM	Sigma C7902	147,01	551,28 mg

15

El ensayo anterior se lleva a cabo utilizando una variedad de diferentes análogos de compstatina. La inhibición porcentual se puede normalizar considerando el 100% de activación igual a la activación que ocurre en ausencia del compuesto, o igual a la activación que ocurre en presencia de una cantidad igual de una variante inactiva de compstatina.

Ejemplo 2: Ensayo basado en ELISA para la activación de la vía alternativa del complemento para evaluar la actividad inhibidora del complemento

20 Este ejemplo describe un protocolo para medir la activación de la vía del complemento y la capacidad de un agente de ensayo, por ejemplo, un inhibidor del complemento de interés, para inhibirla. El protocolo mide la deposición de C3b en un formato ELISA. La deposición de C3b aquí monitorizada es a través del complemento activado por la vía alternativa. En resumen, placas de 96 pocillos se recubren con LPS + BSA. Luego se añaden plasma (o cualquier muestra biológica de interés) y cualquier inhibidor del complemento de interés, y se incuban, seguido por la adición de anticuerpo anti-C3 humano conjugado a HRP. Después de una incubación adicional, se añade el sustrato y se detecta una señal.

25

Materiales:

- Placa para ELISA de noventa y seis pocillos (Corning 3590)
- LPS de *Salmonella typhosa* - Sigma L7136 (40 µg/mL en PBS)
- 30 • BSA al 1% en PBS - Calbiochem Nº 126626 dilución 1/30
- Tampón de veronal + MgCl₂ 10 mM + EGTA 10 mM (VB-Mg EGTA)
- Plasma (recogido con Lepirudin a una concentración final de 5 µg/mL)
- Ab policlonal anti-C3 humano conjugado a HRP (C3-HRP Ab, Cappel 55237)
- Tampón de lavado con Tween-20 (0,05% en PBS)
- 35 • TMB (sustrato para peroxidasa) – mezcla 1:1 de BD 51-2607KC y 51-2606KC.
- H₂SO₄ 3M
- Lector de micro-placas

Protocolo:

- 1 Añadir 50 µL/pocillo de LPS a 40 µg/mL (en PBS)
- 40 2 Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente
- 3 Separar por sacudidas y golpeteo de la placa; aspirar cualquier fluido remanente.
- 4 Bloquear añadiendo 200 µL de BSA/PBS al 1%
- 5 Incubar durante 1 h a temperatura ambiente
- 6 Separar por sacudidas y golpeteo de la placa; aspirar cualquier fluido remanente.
- 45 7 Añadir 50 µL de VB-Mg EGTA a los pocillos Nº 2 a 12
- 8 Añadir 100 µL de la dilución inicial de fármaco (2x en VB-Mg EGTA) al pocillo 1.
- 9 Diluir en serie (1:2) el fármaco de los pocillos 1 a 10 como sigue:
 - e. Tomar 50 µL de solución del pocillo original

- f. Añadir esto al siguiente pocillo
- g. Mezclar por pipeteo varias veces
- h. Repetir hasta el pocillo N° 10

Nota: del pocillo N° 10 retirar 50 µL y desecharlos.

- 5 10 Añadir 50 µL de la dilución de plasma 2x a los pocillos 1 a 11. Esto implica lo siguiente: (i) pipetear 50 µL de plasma en el pocillo N° 1; (ii) mezclar bien por pipeteo; (iii) desechar la punta de la pipeta y reemplazar por una nueva; (iii) pipetear 50 µL del contenido del pocillo N° 1 y añadir al pocillo N° 2. Repetir las etapas (i) a (iii) para los pocillos N° 2 a N° 11.
- 10 11 Incubar durante 1 hora
- 12 Lavar dos veces con tampón de lavado
- 13 Añadir 50 µL de dilución 1/1000 de Ab C3-HRP en BSA/PBS al 1%
- 14 Incubar durante 1 hora
- 15 Añadir 100 µL de TMB a todos los pocillos
- 16 Incubar durante 30 minutos
- 17 Añadir 50 µL de H₂SO₄ 3M
- 18 Leer las placas a 405 nm

Los ensayos anteriores se pueden llevar a cabo utilizando una variedad de diferentes inhibidores del complemento y/o muestras de plasma (o muestras de cualquier fluido corporal de interés). La inhibición porcentual se puede normalizar considerando el 100% de activación igual a la activación que ocurre en ausencia del compuesto, o igual a la activación que ocurre en presencia de una cantidad igual de una variante inactiva de un compuesto.

Ejemplo 3: Análisis de datos

El siguiente procedimiento se puede utilizar para calcular valores de CI₅₀ para un inhibidor del complemento y una muestra biológica de interés. Los datos se analizan utilizando el programa informático GraphPad Prism v4.03. Los conjuntos de datos de cada experimento se normalizan a la activación porcentual en comparación con el control de 100% de activación correspondiente al pocillo al que no se añade compuesto. Luego, todos los conjuntos de datos individuales se agrupan en una única tabla. Los valores de concentración de fármaco (valores X) se transforman en sus logaritmos y la activación porcentual (Pa) (valores Y) se transforman en inhibición porcentual (Pi) utilizando la siguiente fórmula $Pi=100-Pa$ ($Yi=100-Ya$). La inhibición porcentual se representa gráficamente frente a la concentración de fármaco y el conjunto de datos resultantes se ajusta a una función sigmoidea de dosis-respuesta $[Y=\text{valor inferior} + (\text{valor superior}-\text{valor inferior})/(1+10^{-(\text{LogCE}_{50}-X)})]$. Los valores de la CI₅₀ se obtienen a partir de los parámetros del ajuste.

Ejemplo 4: Selección del inhibidor del complemento

Los métodos descritos en los Ejemplos 1-3 se utilizan para medir la activación del complemento en diversas muestras biológicas, tales como plasma, fluido sinovial, CSF, etc., y para evaluar la capacidad de un panel de inhibidores del complemento para inhibir la activación del complemento en dichas muestras. Las muestras se obtienen a partir de individuos normales y de los que padecen un trastorno mediado por el complemento, tal como artritis. Por ejemplo, se utiliza la artrocentesis para recoger fluido sinovial, o se utiliza biopsia para recoger tejido de la membrana sinovial. Los datos se utilizan para seleccionar un inhibidor del complemento y una dosis para la administración local a individuos que padecen el trastorno. Por ejemplo, el inhibidor del complemento y la dosis se pueden seleccionar de modo que reduzcan la actividad media del complemento en muestras biológicas obtenidas de individuos que padecen el trastorno, hasta la actividad media del complemento, que se encuentra en muestras biológicas comparables obtenidas de individuos que no padecen el trastorno.

Ejemplo de referencia 1: Desarrollo de una formulación de micropartículas de liberación prolongada

El método del Ejemplo 4 se utiliza para seleccionar un inhibidor del complemento para utilizar en individuos que padecen artritis reumatoide. Se prepara un panel de formulaciones de micropartículas de liberación prolongada que contienen el inhibidor del complemento, utilizando una variedad de materiales diferentes (PLGA, polianhídridos, poliortoésteres). Las partículas tienen una variedad de diámetros y densidades medias. Las formulaciones de liberación prolongada se ensayan *in vitro* (por ejemplo, en solución salina fisiológica) para identificar las que liberan suficiente inhibidor del complemento para conseguir una concentración deseada en un volumen deseado durante al menos dos semanas.

Las formulaciones seleccionadas se ensayan *in vivo* en modelos de artritis reumatoide en conejo y rata con artritis inducida por antígeno (AIA). Las formulaciones se administran a una o más cavidades articulares afectadas por inyección intraarticular. Se obtienen tejido y fluido sinovial 28 días después de la administración y se evalúan utilizando diversas técnicas, incluyendo inmunohistoquímica, análisis cuantitativo por imágenes e inmunoensayo. Se evalúan diversos parámetros incluyendo síntesis de citoquinas inflamatorias, infiltrado celular inflamatorio y apariencia y se comparan con los controles apropiados. También se evalúan parámetros clínicos incluyendo inflamación y alteración en la marcha. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración y luego a intervalos semanales durante 6 semanas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad sistémica del complemento.

Ejemplo de referencia 2: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

Se produce SPICE recombinante y se purifica a partir de un sistema de expresión en *Pichia pastoris* tal como se describe en (Sahu, A, et al., J. Immunol., 160, 5596-5604, 1998). Se prepara una solución que comprende un material formador de gel y SPICE y se inyecta en una articulación de un modelo animal para artritis en el cual ocurre síntesis local y/o activación local del complemento. Se forma un gel en el espacio articular. El SPICE se libera a lo largo de un tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta dos veces los niveles normales, o en un factor de al menos 2, durante un período de tiempo medio deseado. Se monitorizan los síntomas y presentación de efectos secundarios potenciales. Una reducción en la gravedad media de uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante todo el estudio y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente la actividad sistémica del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 3: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

Se repite el Ejemplo de referencia 2 utilizando el análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 14 en lugar de SPICE. El análogo de compstatina se sintetiza químicamente utilizando métodos estándares y se añade a la solución que contiene el material formador de gel. El animal es un primate no humano. El análogo de compstatina se libera con el tiempo en cantidades suficientes para proporcionar una concentración que reduce la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial, hasta dos veces los niveles normales, o en un factor de al menos 2, durante un período de tiempo medio deseado. Se monitorizan los síntomas. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante todo el estudio y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 4: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

Se prepara una solución que comprende un material formador de gel y el análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 28 (sintetizado químicamente utilizando métodos estándares) y se inyecta en una articulación de un modelo animal para artritis en la que ocurre síntesis local y/o activación local del complemento. El animal es un primate no humano. El análogo de compstatina se libera a lo largo de un tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta dos veces los niveles normales, o en un factor de al menos 2, durante un período de tiempo deseado. Se monitorizan los síntomas. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante 6 semanas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 5: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

Se prepara una solución que comprende un material formador de gel y el análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 29 (sintetizado químicamente utilizando métodos estándares) y se inyecta en una articulación de un modelo animal de artritis en la que ocurre síntesis local y/o activación local del complemento. El animal es un primate no humano. El análogo de compstatina se libera durante un tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta dos veces los niveles normales, durante un período de tiempo deseado. Se monitorizan los síntomas y efectos secundarios potenciales. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante 8 semanas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 6: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

Se prepara una solución que comprende un material formador de gel y el análogo de compstatina de la SEQ ID NO: 32 (sintetizado químicamente utilizando métodos estándares) y se inyecta en una articulación de un modelo animal de artritis en la que ocurre síntesis local y/o activación local del complemento. El animal es un primate no humano. El análogo de compstatina se libera durante un tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta niveles normales durante al menos un mes. Se monitorizan los síntomas y efectos secundarios potenciales. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante 8 sema-

nas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 7: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

- 5 Se repite el Ejemplo de referencia 1 utilizando SPICE producido recombinantemente como inhibidor del complemento. SPICE se libera durante un período de tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta niveles normales durante al menos un mes. Se monitorizan los síntomas y efectos secundarios potenciales. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante 6 semanas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

Ejemplo de referencia 8: Tratamiento de artritis en un modelo animal por administración local de una formulación de liberación prolongada de un inhibidor del complemento

- 15 Se repite el Ejemplo de referencia 1 utilizando un análogo de compstatina altamente potente como inhibidor del complemento. El animal es un primate no humano. El análogo de compstatina se libera durante un período de tiempo prolongado en cantidades suficientes para proporcionar una concentración suficiente para reducir la activación del complemento en el fluido sinovial y/o en la membrana sinovial hasta niveles normales durante al menos un mes. Se monitorizan los síntomas y efectos secundarios potenciales. Una reducción en uno o más síntomas es indicativa de eficacia. Las muestras de sangre se obtienen antes de la administración, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, y luego a intervalos semanales durante 6 semanas y se evalúan para determinar si el tratamiento afecta detectablemente a la actividad del complemento y, si es así, en qué grado.

- 25 Los expertos en la técnica podrán reconocer, o serán capaces de determinar, utilizando sólo experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. El alcance de la presente invención no pretende estar limitado a la descripción anterior, sino como se establece en las reivindicaciones anexas. Se apreciará que la invención no es de ningún modo dependiente de resultados particulares conseguidos en cualquiera de los ejemplos específicos o con cualquier realización específica. En las reivindicaciones, artículos tales como "un", "uno", "una" y "el/la" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto. Las reivindicaciones o las descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o de otro modo son relevantes para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es relevante de otro modo para un producto o proceso dado. Por ejemplo, y sin limitación, se entiende que cuando las reivindicaciones o la descripción indican que un residuo en una posición particular se puede seleccionar de un grupo particular de aminoácidos o análogos de aminoácido, la invención incluye realizaciones individuales en las cuales el residuo en esa posición es cualquiera de los aminoácidos o análogos de los aminoácido enumerados. La invención también incluye realizaciones en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo, están presentes, se emplean, o de otro modo son relevantes para un producto o proceso dado. Además, se deberá entender que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que uno o más de las limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones, están introducidos en otra reivindicación. En particular, cualquier reivindicación que sea dependiente de otra reivindicación se puede modificar para incluir uno o más elementos o limitaciones que se encuentran en cualquier otra reivindicación que sea dependiente de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones describen una composición, se ha de entender que los métodos para administrar la composición están de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, y se incluyen los métodos para utilizar la composición para cualquiera de los fines descritos en la presente memoria, y se incluyen los métodos para preparar la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos de preparación descritos en la presente memoria, a menos que se indique de otro modo, o a menos que fuera evidente para un experto en la técnica que surgiera una contradicción o inconsistencia.

- 50 Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo Markush, se deberá entender que cada subgrupo de los elementos también está descrito, y cualquier o cualesquiera elementos puede eliminarse del grupo. Para los fines de concisión solamente algunas de estas realizaciones se han enumerado específicamente *in haec verba* en la presente memoria, pero la invención incluye todas las realizaciones. También se deberá entender que en general, cuando se cita que la invención, o aspectos de la invención, comprende elementos, características, etc., particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en dichos elementos, características, etc.

- 60 La inclusión de una etapa de "proporcionar" en ciertos métodos descritos en la presente memoria, pretende indicar que la composición se administra para tratar un trastorno indicado en el método. Así, el sujeto tendrá o estará bajo riesgo de tener el trastorno y la composición se administra para tratar el trastorno, normalmente por la recomendación sensata de un médico o cirujano, que puede o no ser el mismo individuo o administrador de la composición. En

dichos métodos se incluyen los métodos en los que una etapa de proporcionar no está explícitamente incluida y las realizaciones en las que se incluye una etapa de proporcionar. También se incluyen los métodos en los que se incluye una etapa de identificar el sujeto que está en riesgo, o padece, un trastorno mediado por el complemento.

5 Cuando se dan intervalos, la invención incluye realizaciones en las cuales los puntos extremos están incluidos, realizaciones en las cuales ambos extremos están excluidos y realizaciones en las cuales un extremo está incluido y el otro está excluido. Se deberá asumir que ambos extremos están incluidos a menos que se indique de otro modo. Además, se deberá comprender que a menos que se indique de otro modo, o que sea evidente de otro modo a partir del contexto, y del entendimiento de un experto en la técnica, los valores que están expresados como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, hasta el décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Un período de tiempo de 1 mes se entiende que significa 30 días. Un período de tiempo de 10 1 año se entiende que significa 365 días. Para cualquier realización de la invención en la cual un valor numérico esté precedido por "alrededor de" o "aproximadamente", la invención incluye una realización en la cual el valor exacto está indicado. Para cualquier realización de la invención en la cual un valor numérico no esté precedido por "alrededor de" o "aproximadamente", la invención incluye una realización en la cual el valor está precedido por "alrededor de" o "aproximadamente". 15

Se deberá comprender que cualquier realización, característica o aspecto de la presente invención se puede excluir explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Por ejemplo, cualquier composición, compuesto o clase de compuestos, lugar extravascular, vía o método de administración, dosis, formulación, dispositivo, o trastorno mediado por el complemento particular, puede ser excluido de una cualquiera o más de las reivindicaciones. 20

Reivindicaciones

1. Un análogo de compstatina que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia central de X'aa—Gln—Asp—Xaa—Gly (SEQ ID NO:3), donde X'aa y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp, para el uso en el tratamiento de un estado inflamatorio del sistema respiratorio, en el que el análogo de compstatina es para administración directamente al tracto respiratorio.
2. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1, en donde el estado inflamatorio del sistema respiratorio se selecciona del grupo que consiste en asma, EPOC, rinitis alérgica o inflamación asociada a infección.
3. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho análogo de compstatina se administra por inhalación.
4. El análogo de compstatina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho análogo de compstatina no tiene esencialmente ningún efecto sobre la activación sistémica del complemento cuando se administra al tracto respiratorio.
5. El análogo de compstatina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el análogo de compstatina tiene la secuencia SEQ ID NO:28.
6. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, administrado como componente de una formulación o dispositivo de liberación prolongada, componente de un polvo seco inhalable, componente de un aerosol líquido inhalable o componente de una pulverización nasal.
7. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1, en donde el análogo de compstatina se selecciona de lo siguiente:
 - i) un compuesto que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia central de X'aa—Gln—Asp—Xaa—Gly—X"aa (SEQ ID NO: 4), donde X'aa y Xaa se selecciona cada uno independientemente de Trp y análogos de Trp y X"aa se selecciona de His, Ala, aminoácidos no ramificados con un único metilo, Phe, Trp y análogos de Trp,
 - ii) el compuesto de i), en donde el péptido tiene una secuencia de X'aa1—X'aa2—X'aa3—X'aa—Gln—Asp—Xaa—Gly—X"aa—X"aa2—X"aa3—X"aa4—X"aa5 (SEQ ID NO: 5), donde X'aa1, X'aa2, X'aa3, X"aa2, X"aa3, X"aa4, y X"aa5 son idénticos a los aminoácidos en las posiciones correspondientes en la compstatina,
 - iii) un compuesto que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia de X'aa1—X'aa2—X'aa3—X'aa4—Gln—Asp—Xaa—Gly—X"aa1—X"aa2—X"aa3—X"aa4—X"aa5 (SEQ ID NO: 5), donde X'aa4 y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp, en donde X'aa1, X'aa2, X'aa3, X"aa1, X"aa2, X"aa3, X"aa4 y X"aa5 se seleccionan independientemente de aminoácidos y análogos de aminoácidos, y el péptido está ciclizado mediante un enlace entre X'aa2 y X"aa4, en donde X'aa1, X'aa2, X'aa3, X"aa2, X"aa3, X"aa4 y X"aa5 son opcionalmente idénticos a los aminoácidos en las posiciones correspondientes en la compstatina y X'aa1 es opcionalmente Ala o un aminoácido no ramificado con un único metilo,
 - iv) un compuesto que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia: Xaa1—Cys—Val—Xaa2—Gln—Asp—Xaa2*—Gly—Xaa3—His—Arg—Cys—Xaa4 (SEQ ID NO: 6); en donde:

Xaa1 es Ile, Val, Leu, B¹—Ile, B¹—Val, B¹—Leu o un dipéptido que comprende Gly—Ile o B¹—Gly—Ile, y B¹ representa un primer resto bloqueante;

Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente de Trp y análogos de Trp;

Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp o un análogo de Trp;

Xaa4 es L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido seleccionado de Thr—Ala y Thr—Asn, o un tripéptido que comprende Thr—Ala—Asn, en donde un —OH del extremo carboxi de cualquiera de L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, Ala o Asn está opcionalmente reemplazado por un segundo resto bloqueante B²; y

los dos residuos de Cys están unidos por un enlace disulfuro,
 - v) un compuesto que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia:

Xaa1—Cys—Val—Xaa2—Gln—Asp—Xaa2*—Gly—Xaa3—His—Arg—Cys—Xaa4 (SEQ ID NO: 6); en donde Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac—Ile, Ac—Val, Ac—Leu o un dipéptido que comprende Gly—Ile o Ac—Ile;

Xaa2 y Xaa2* se seleccionan independientemente de Trp y análogos de Trp;

Xaa3 es His, Ala o un análogo de Ala, Phe, Trp o un análogo de Trp;

Xaa4 es L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, un dipéptido seleccionado de Thr—Ala y Thr—Asn, o un tripéptido que comprende Thr—Ala—Asn, en donde un —OH del extremo carboxi de cualquiera de L—Thr, D—Thr, Ile, Val, Gly, Ala o Asn está opcionalmente reemplazado por —NH₂,

5

vi) el compuesto de v) en donde:

Xaa2 es un análogo de Trp que tiene mayor carácter hidrófobo con relación a Trp o es un análogo de Trp que comprende un componente de anillo aromático bicíclico sustituido o no sustituido o dos o más componentes de anillo aromático monocíclico sustituido o no sustituido;

10

Xaa2 es Trp y Xaa2* es un análogo de Trp;

Xaa2 es un análogo de Trp y Xaa2* es Trp;

Xaa2 es un análogo de Trp y Xaa2* es un análogo de Trp; o

Xaa2* es un análogo de Trp que tiene un sustituyente electronegativo en el anillo de indol y que no tiene mayor carácter hidrófobo con relación a Trp,

15

vii) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 9 - 32,

viii) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 14, 21, 28, 29 y 32,

ix) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 30 y 31,

x) un compuesto que comprende un péptido cíclico que tiene una secuencia de X'aa1—X'aa2—X'aa3—X'aa4—Gln—Asp—Xaa—Gly—X"aa1—X"aa2—X"aa3—X"aa4—X"aa5 (SEQ ID NO: 5), donde X'aa4 y Xaa se seleccionan de Trp y análogos de Trp, en donde X'aa1, X'aa2, X'aa3, X"aa1, X"aa2, X"aa3, X"aa4 y X"aa5 se seleccionan independientemente de aminoácidos y análogos de aminoácidos, X'aa2 y X"aa4 no son Cys, y el péptido está ciclizado mediante un enlace entre X'aa2 y X"aa4,

20

xi) el compuesto de x), en donde X'aa1, X'aa3, X"aa2, X"aa3 y X"aa5 son idénticos a los aminoácidos en las posiciones correspondientes en la compstatina y X"aa1 es Ala o un aminoácido no ramificado con un único metilo, y

25

xii) el compuesto de x) en el que uno de X'aa2 y X"aa4 es un aminoácido o un análogo de aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende una amina primaria o secundaria, el otro de X'aa2 y X"aa4 es un aminoácido o un análogo de aminoácido que tiene una cadena lateral que comprende un grupo ácido carboxílico, y el enlace es un enlace amida, o

30

xiii) el análogo de compstatina de cualquiera de i) - xii), en donde el análogo de compstatina está acetilado en el extremo N, amidado en el extremo C, o tanto acetilado en el extremo N como amidado en el extremo C.

8. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1, administrado como un componente de una formulación o dispositivo de liberación prolongada, en donde dicha formulación o dispositivo de liberación prolongada:

35

i) comprende una pluralidad de micropartículas o nanopartículas; o

ii) comprende un polímero biodegradable y biocompatible.

9. El análogo de compstatina para el uso de la reivindicación 1, en el que el análogo de compstatina se administra como componente de un polvo seco inhalable o como componente de un aerosol líquido inhalable.

40

Articulación sinovial

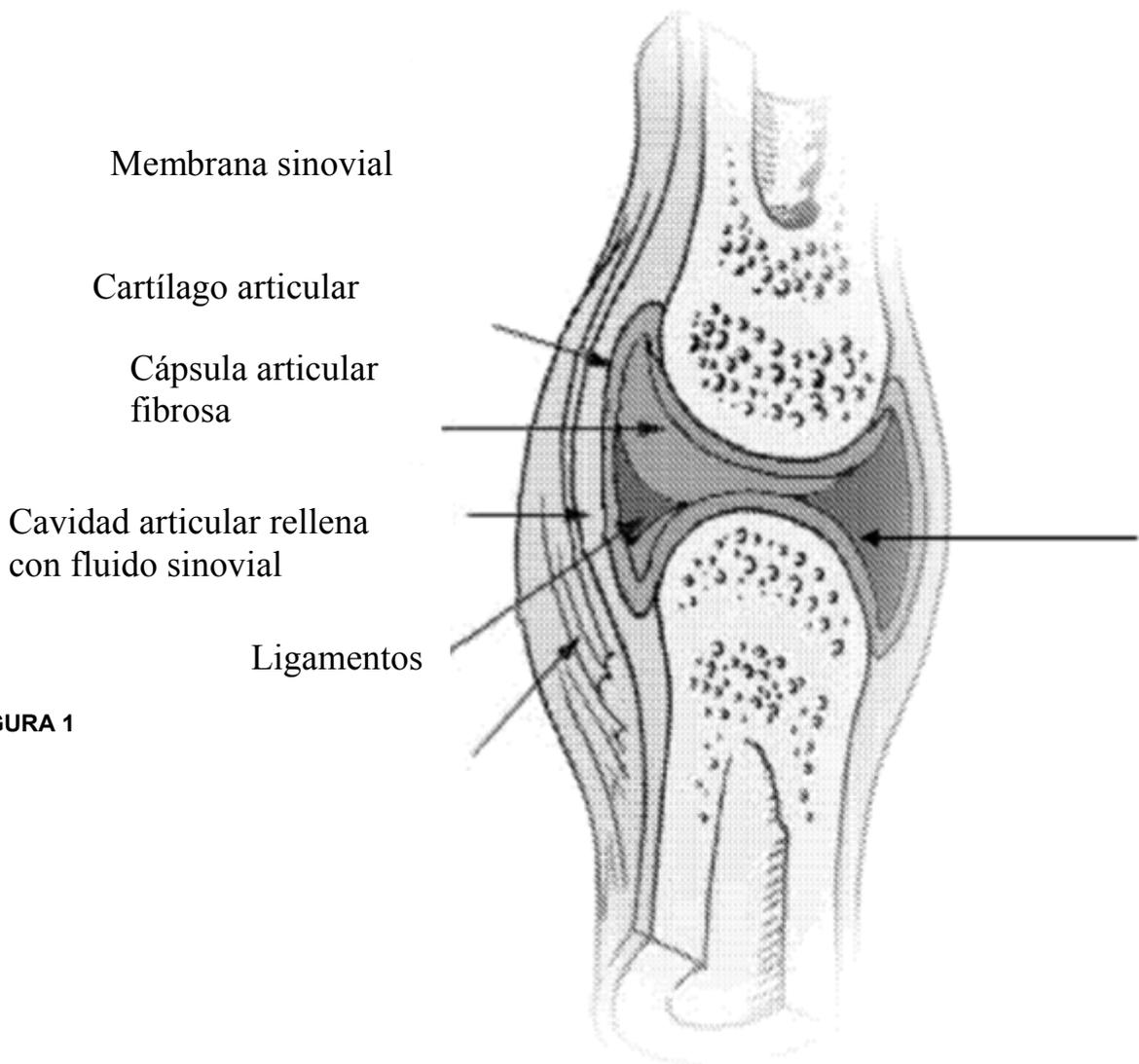


FIGURA 1