

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 182**

51 Int. Cl.:

C07K 14/08 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2011 PCT/US2011/044791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011 E 11810386 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2606058**

54 Título: **Compuestos peptídicos para regular el sistema del complemento**

30 Prioridad:

21.07.2010 US 366204 P

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

24.07.2017

73 Titular/es:

**EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL (100.0%)
Office Of Technology Transfer 721 Fairfax
Avenue Suite 506
Norfolk, VA 23507, US**

72 Inventor/es:

**CUNNION, KENJI y
KRISHNA, NEEL, K.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 626 182 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

Compuestos peptídicos para regular el sistema del complemento

Campo

5 La invención se refiere en general al campo de la intervención terapéutica en la enfermedad inflamatoria y autoinmune. Más específicamente, la invención se refiere a compuestos péptidos que pueden regular la activación del complemento y se pueden utilizar terapéuticamente en la prevención y tratamiento de enfermedades mediadas por el complemento, tales como enfermedades inflamatorias, autoinmunes y patógenas.

Antecedentes

10 El sistema del complemento, un componente esencial del sistema inmune innato, desempeña un papel crítico como mecanismo de defensa contra patógenos invasores, estimula respuestas inmunes adaptativas y ayuda a eliminar complejos inmunes y células apoptóticas. Tres vías diferentes comprenden el sistema del complemento: la vía clásica, la vía de la lectina y la vía alternativa. C1q y la lectina de unión a manosa (MBL) son las moléculas de reconocimiento estructuralmente relacionadas de las vías clásicas y de la lectina, respectivamente. Mientras que la IgM o la IgG agrupada sirven como ligandos principales para C1q, MBL reconoce polisacáridos tales como manano.

15 La unión del ligando por C1q y MBL da como resultado la activación secuencial de C4 y C2 para formar la vía clásica y de la lectina C3-convertasa. Por el contrario, la activación de la vía alternativa no requiere una molécula de reconocimiento, pero puede amplificar la activación de C3 iniciada por las vías clásica o de la lectina. La activación de cualquiera de estas tres vías da como resultado la formación de mediadores inflamatorios (C3 y C5a) y el complejo de ataque de membrana (MAC), que causa la lisis celular.

20 Aunque el sistema del complemento juega un papel crítico en muchas funciones inmunitarias protectoras, la activación del complemento es un mediador significativo del daño del tejido en una amplia gama de procesos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. (Ricklin and Lambris, 2007).

25 Existe una necesidad de reguladores del complemento. Mientras que el sistema del complemento es una defensa vital del huésped contra organismos patógenos, su activación no controlada puede causar daños devastadores en las células huésped. En la actualidad, a pesar de la morbilidad y mortalidad conocidas asociadas con la desregulación del complemento en muchos procesos de la enfermedad, incluyendo enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, miastenia Gravis y esclerosis múltiple, sólo recientemente se han aprobado dos terapias anticomplemento para uso en seres humanos: inhibidor de C1 humano, purificado para uso en pacientes que sufren de angioedema hereditario (HAE) y Eculizumab/Solaris, un anticuerpo monoclonal humanizado de acción prolongada contra C5 utilizado en el tratamiento de la hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH). Tanto la PNH como el HAE son enfermedades huérfanas que muy pocas personas padecen; actualmente no se han aprobado reguladores del complemento para los procesos de enfermedad más comunes en los que la activación desregulada del complemento desempeña un papel fundamental.

35 Los *Astroviridae* constituyen una familia de virus icosaédricos desnudos con un genoma de ARN monocatenario, mensajero. Estos virus son una causa importante de gastroenteritis en los seres humanos, así como otras enfermedades en otras especies animales. Se estima que causan un estimado del 2-17% de las enfermedades diarreicas de los niños en todo el mundo.

40 La proteína de recubrimiento de astrovirus ("CP") tiene fuertes efectos sobre el sistema del complemento, lo que sugiere que la porción "activa" de la proteína puede tener utilidad clínica para disminuir el daño del tejido de las enfermedades mediadas por el complemento. La proteína de recubrimiento de tipo salvaje ("WP CP") purificada a partir de astrovirus humano tipo 1 (HAstV-1) se puede unir a C1q y MBL, y regula tanto las activaciones clásicas como las de la lectina (Hair et al., 2010. Molec. Immunol. 47, 792-798). Esta propiedad es análoga a las propiedades descritas para el péptido-1 de neutrófilo humano (HNP-1) (van den Berg et al., 1998. Blood. 92, 3898-3903; Groeneveld et al., 2007. Molec. Immunol. 44, 3608-3614). La proteína de recubrimiento de HAstV-1 es una molécula de 787 aminoácidos que se ha expresado a partir de una construcción de baculovirus recombinante y después se purificó (Bonaparte et al., J. Virol. 82, 817-827).

45 El documento de Gronemus J.Q. Et al (2010) Molec. Immunol. 48, 305-313 describe una potente inhibición de la vía clásica de complemento por un nuevo péptido de unión a C1q derivado de la proteína de cubierta de astrovirus humano.

50 Son de interés el desarrollo de compuestos péptidos para inhibir las vías clásicas, lectinas y alternativas del sistema del complemento, ya que se ha demostrado que cada una de estas tres vías contribuye a numerosos procesos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. El bloqueo específico de las vías clásicas y de la lectina es de particular interés, ya que ambas vías han estado implicadas en la lesión inducida por isquemia-reperfusión en muchos modelos animales. (Castellano et al., 2010; Lee et al., 2010; Tjernberg, et al., 2008; Zhang et al. 2006). Los seres humanos con deficiencias en la vía alternativa sufren graves infecciones bacterianas; de este modo, una vía alternativa funcional es esencial para la vigilancia inmunológica contra patógenos invasores.

55

Sería deseable desarrollar compuestos péptidos que puedan regular la activación del complemento y se pueden utilizar terapéuticamente para prevenir y tratar enfermedades mediadas por el complemento, tales como enfermedades inflamatorias, autoinmunes y patogénicas.

Resumen

- 5 La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.
- La invención proporciona un péptido sintético que comprende la secuencia de aminoácidos de SeqIdNo.9
- La presente descripción proporciona compuestos péptidos que regulan las vías clásicas y de la lectina del sistema del complemento y métodos de utilización de estos compuestos.
- 10 Específicamente, los compuestos péptidos de esta descripción pueden unir, regular e inactivar C1 y MBL y, por lo tanto, pueden inhibir eficazmente la activación de vía clásica y de la lectina en su punto más temprano, mientras dejando intacta la vía alternativa. Estos compuestos péptidos son de valor terapéutico para regular selectivamente e inhibir la activación de C1 y MBL sin afectar la vía alternativa y se pueden utilizar para tratar enfermedades mediadas por la activación desregulada de las vías clásicas y de la lectina. En otros aspectos, los compuestos péptidos regulan la activación de la vía clásica, pero no la activación de la vía de la lectina.
- 15 La divulgación se basa en la identificación de un péptido aislado, purificado de 30 aminoácidos derivados de la proteína de recubrimiento de astrovirus humano, denominado CP1, y que tiene la SEQ ID NO: 1 que es capaz de regular la activación de la vía clásica y de la lectina por unión a C1q y MBL.
- En otros aspectos, la invención se dirige a compuestos péptidos que son miméticos de péptidos, análogos de péptidos y/o derivados sintéticos de CP1 que tienen, por ejemplo, deleciones y sustituciones de péptidos internos, deleciones y sustituciones en el extremo N y extremo C, y que son capaces de regular la activación de la vía clásica y de la lectina por unión a C1q y MBL.
- 20 Una realización adicional de la invención es un péptido sintético de esta invención, en el que el péptido se modifica por acetilación del residuo terminal N.
- 25 Otra realización de la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Otra realización de la invención proporciona además dicha composición farmacéutica para uso en la regulación del sistema del complemento en un sujeto.
- 30 Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con daño del tejido mediado por el complemento mediante la administración de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, en la que la enfermedad asociada con el daño del tejido mediado por el complemento se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia Gravis, anemia hemolítica autoinmune, glomerulonefritis membranoproliferativa, enfermedad del suero, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (ASDS), lesión por isquemia-reperusión, accidente cerebrovascular, infarto del miocardio, lesión por alo o xenotrasplante, rechazo hiperagudo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), enfermedad de Alzheimer, lesiones por quemaduras, daño por hemodiálisis, daño por bypass cardiopulmonar, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y angioedema hereditario.
- 35 Otra realización de la invención es una composición farmacéutica de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con daño del tejido mediado por el complemento, en la que la composición es para administración con al menos un otro ingrediente activo eficaz para tratar la enfermedad, en la que el al menos un otro ingrediente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio no esteroideo, un corticosteroide, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un inhibidor de C1 y eculizumab.
- 40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en el arte. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.
- 45 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones.
- 50

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 es un gráfico que representa CP de forma dependiente de la dosis compitiendo con la defensina 1 de neutrófilos humanos (HNP-1) para la unión a C1q. C1q se mezcló con cantidades crecientes de WT CP (círculos) o BSA (triángulos) y se adicionó a la placa ELISA recubierta con HNP-1. Después del lavado, el C1q unido se midió usando anticuerpo policlonal para C1q. Los datos son las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error indican SEM.
- La figura 2A muestra la alineación de WT CP con la molécula de 30 aminoácidos HNP-1 como se determina por el análisis de ClustalW. El símbolo "*" indica residuos idénticos, ":" indica residuos conservados, y "." indica residuos semiconservados entre las secuencias CP y HNP-1. La figura 2A también muestra los dos péptidos de 30 aminoácidos (CP1 (SEQ ID NO: 1) y CP2 (SEQ ID NO: 2)) que se sintetizaron basándose en esta alineación.
- La figura 2B es un gráfico que representa compuestos péptidos que compiten en función de la dosis con WT CP para la unión C1q. Se mezcló una cantidad constante de C1q con cantidades crecientes de WT CP y se adicionó a una placa ELISA revestida con CP1 (sin símbolo) o CP2 (cuadrados). Cuando BSA fue sustituido por WT CP (triángulos), no hubo competencia. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican SEM.
- Las figuras 3A-3D demuestran la unión de péptidos CP a C1q. Se recubrieron los péptidos CP1, CP2, HNP-1 (figura 3A), C04A, C27A (figura 3B), E23A, E25A (figura 3C) y Δ 8-22 (figura 3D) sobre la placa de ELISA y se incubaron con cantidades crecientes de C1q purificado. C1q se detectó con antisueros policlonales a C1q. Los datos representan lecturas por triplicado para cada derivado peptídico. Las barras de error indican SEM.
- Las figuras 4A-4D demuestran que CP1, pero no CP2, regula la activación de C1. El C1 humano parcialmente purificado se incubó solo, con IgG agregada (agg-IgG), o con agg-IgG y cantidades crecientes de péptidos CP1 (figura 4A) o CP2 (figura 4B) (1-4 μ l de un stock 250 mM), durante 90 minutos a 37°C. Las mezclas de reacción se cargaron entonces en un gel de SDS-PAGE al 8% y se sometieron a inmunotransferencia con antisuero policlonal a C1s.
- En las figuras 4A y 4B, las cadenas pesada y ligera de C1s, que indican la activación de C1s, y la proenzima C1s, se indican a la derecha de la imagen de gel, mientras que los marcadores de masa molecular (en kD) se indican a la izquierda de la imagen de gel. Las figuras 4C y 4D son gráficos que cuantifican el grado de activación de C1 correspondiente a CP1 (figura 4C) y CP2 (figura 4D), respectivamente, según se determina por imagen Odyssey. Los datos son la media de dos experimentos independientes. Las barras de error indican SEM.
- La figura 5 es un gráfico que representa la regulación del compuesto péptido de la actividad del complemento en un ensayo de activación de C4. Las placas de ELISA se recubrieron previamente con ovoalbúmina decorada con anticuerpos antiovalbúmina. El NHS se incubó solo o con BSA, control de dimetilsulfóxido (DMSO), WT CP (1.8 μ g) o compuestos péptidos (0.5 mM), durante 15 minutos y posteriormente se adicionó al objetivo de anticuerpo de ovoalbúmina. El anticuerpo policlonal C4 se utilizó para detectar la deposición de C4. La deposición de C4 se normalizó al 100% para NHS solo, y todos los valores se ajustaron para sustraer los valores de fondo de un control NHS inactivado por calor. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican SEM.
- Las figuras 6A y 6B son gráficos que representan la regulación del compuesto péptido de la actividad del complemento en un ensayo hemolítico. En la figura 6A, eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos se incubaron con NHS solo, o con compuestos péptidos (1.4 mM) o un control de DMSO. En la figura 6B, eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos se incubaron con NHS (barras blancas) o suero desprovisto del factor B (barras negras) solos, o con compuestos péptidos (0.77 mM) o un control de DMSO. La hemólisis se normalizó al 100% para el suero solo. La figura 6A representa los datos medios de tres experimentos independientes, y la figura 6B representa datos de un experimento. Las barras de error indican SEM.
- La figura 7 es un gráfico que representa la titulación del ensayo hemolítico del péptido Polar Assortant en suero desprovisto del Factor B. Los datos muestran el péptido Polar Assortant que regula la activación de la vía clásica de una manera dependiente de la dosis.
- Las figuras 8A y B son gráficos que representan el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF del estado oligomérico de E23A. La figura 8A representa el análisis de modo lineal de E23A, y la figura 8B representa el análisis del modo de reflexión de E23A. E23A tiene una masa teórica de 2934.37. En la figura 8A, la menor resolución y menor precisión de masa del modo lineal se muestra en el zoom del pico del péptido con la falta de picos de péptidos monoisotópicos. En la figura 8B, la alta resolución y precisión de masa del modo de reflexión se muestra en el zoom del pico del péptido. En ambas figuras 8A y 8B, no hay picos mayores con una relación de masa a carga (m/z) mayor que la masa teórica del péptido.
- La figura 9A representa los residuos de aminoácidos de E23A (residuos 2-29 de SEQ ID NO: 5) en comparación con los residuos de defensina 1 de planta de *Vigna radiata* (VrD1). E23A se cargó en el servidor CPHModels-3.0, que alineó los residuos 2-29 de E23A con los residuos 17-44 de la defensina de la planta VrD1. La alineación fue confirmada por el análisis de ClustalW.

El símbolo "*" indica residuos idénticos, ":" indica residuos conservados, y "." indica residuos semiconservados. La figura 9B es una imagen que representa el modelo estructural de E23A. Las coordenadas PDB generadas por CPHModels-3.0 se subieron a FirstGlance en Jmol para visualizar el modelo estructural. La hélice alfa terminal N y las hebras beta se muestran como cintas, con puntas de flecha apuntando hacia los extremos carboxi. El espiral aleatorio se muestra como rastros del esqueleto suavizados. El enlace disulfuro putativo se muestra como un cilindro delgado.

Descripción detallada

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. La invención proporciona un péptido sintético que comprende la secuencia de aminoácidos de SeqIdNo.9. La presente divulgación proporciona compuestos péptidos que regulan las vías clásicas y de las lectinas del sistema del complemento, específicamente uniendo y/o inactivando C1 y MBL y regulando de este modo la activación de la vía clásica y de la lectina en su punto más temprano sin afectar la vía alternativa. Estos compuestos péptidos son de valor terapéutico para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por la activación desregulada de la vía clásica y de la lectina.

La divulgación se basa en la identificación de un péptido aislado, purificado de 30 aminoácidos derivado de la proteína de cubierta de astrovirus humano, denominado CP1, y que tiene una secuencia (SEQ ID NO: 1) que es capaz de regular la activación de la vía clásica y de la lectina por unión a C1q y MBL. En otros aspectos, los compuestos péptidos regulan la activación de la vía clásica, pero no la activación de la vía de la lectina.

Las modificaciones de la estructura de aminoácidos de CP1 han conducido al descubrimiento de compuestos péptidos adicionales que son capaces de regular la actividad de C1q.

El término "compuesto(s) péptido(s)", como se usa en este documento, se refiere a secuencias de aminoácidos, que pueden ser de origen natural, o miméticos peptídicos, análogos de péptidos y/o derivados sintéticos de aproximadamente 30 aminoácidos basados en SEQ ID NO: 1. Además, el compuesto péptido puede ser menor que aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, tales como entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 residuos de aminoácidos y tales como compuestos péptidos entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. Los péptidos de, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 aminoácidos son igualmente susceptibles de ser compuestos péptidos dentro del contexto de la presente invención.

Los compuestos péptidos descritos están generalmente constreñidos (esto es, tienen algún elemento de estructura como, por ejemplo, la presencia de aminoácidos que inician una lámina de giro β o una lámina plegada β , o, por ejemplo, son ciclados por la presencia de residuos Cys unidos a disulfuro) o secuencias de aminoácidos sin restricciones (esto es, lineales) de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos o menos de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos.

Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia de péptidos se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillo aromático incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina y lisina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa.

Un cambio conservador generalmente conduce a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Por ejemplo, el péptido de la presente divulgación comprende una o más de las siguientes sustituciones conservadoras de aminoácidos: sustitución de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, con otro aminoácido alifático; sustitución de una serina por una treonina; sustitución de una treonina por una serina; sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico y ácido glutámico, con otro residuo ácido; sustitución de un residuo que lleva un grupo amida, tal como asparagina y glutamina, con otro residuo que lleva un grupo amida; intercambio de un residuo básico, tal como lisina y arginina, con otro residuo básico; y sustitución de un residuo aromático, tal como fenilalanina y tirosina, con otro residuo aromático.

Las sustituciones de aminoácidos particularmente preferidas incluyen:

- a) Ala para Glu o viceversa, de manera que se puede reducir una carga negativa;
- b) Lys para Arg o viceversa, de manera que se puede mantener una carga positiva;
- c) Ala para Arg o viceversa, de manera que se puede reducir una carga positiva;
- d) Glu para Asp o viceversa, de manera que se puede mantener una carga negativa;

- e) Ser para Thr o viceversa, de manera que se puede mantener un OH libre;
 - f) Gln para Asn o viceversa, de manera que se puede mantener un NH₂ libre;
 - g) Ile para Leu o para Val o viceversa, como aminoácidos hidrófobos casi equivalentes;
 - h) Phe para Tyr o viceversa, como aminoácidos aromáticos casi equivalentes; y
- 5 i) Ala para Cys o viceversa, de manera que se afecta el enlace disulfuro.

En un aspecto, la divulgación describe un péptido aislado purificado derivado de una proteína de recubrimiento de astrovirus humano, comprendiendo el péptido la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10 En otro aspecto, la divulgación describe un péptido sintético, aislado, purificado, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, con una o más sustituciones, modificaciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, en la que el péptido regula la activación del complemento.

En otro aspecto, la divulgación describe un péptido sintético, aislado, purificado, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, con una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las que el péptido regula la activación del complemento.

15 Los compuestos péptidos pueden tener deleciones y sustituciones de péptidos internos, así como deleciones y sustituciones en el extremo N y el extremo C en base a SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, el péptido tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 o más sustituciones, modificaciones, inserciones o deleciones de aminoácidos.

20 En algunos aspectos, la secuencia de péptidos tiene al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% identidad de la secuencia con SEQ ID NO:1.

Péptidos y derivados de la proteína del recubrimiento de astrovirus

25 Se sintetizaron dos péptidos de 30 residuos que abarcaban la región de homología entre HNP-1 y el WT CP, CP1 y CP2 (figura 2A). El CP1 demostró una regulación consistente de la activación de la vía clásica, mientras que el CP2 no reguló la activación de la vía clásica. CP1 retiene homología limitada con HNP-1 en sus terminales N y C (cuatro residuos cada uno); sin embargo, no existe homología interna a estos residuos flanqueantes, como se muestra en la figura 2A. Aunque no está vinculado por ninguna teoría, WT CP puede regular la actividad de C1 y MBL uniendo las regiones similares a colágeno de ambas moléculas y disociando sus serina proteasas asociadas, C1s-C1r-C1r-C1s y MASP2, de C1q y MBL, respectivamente (Hair et al., 2010. Molec. Immunol. 47, 792-798).

30

Los compuestos péptidos en esta divulgación se sintetizaron a través de deleciones de péptidos y sustituciones de CP1, el péptido de 30 aminoácidos de HAsV CP descrito anteriormente. Se han sintetizado compuestos péptidos adicionales basándose en modificaciones de CP1, como se muestra en la siguiente tabla 1.

TABLA 1

Péptido	Secuencia de péptido (N → C)
CP2	NPVLVKDATGSTQFGPVQALGAQYSMWKLLK (SEQ ID NO: 2)
CP1	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL (SEQ ID NO: 1)
C04A	PAI A QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL (SEQ ID NO: 3)
C27A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIE A ILL (SEQ ID NO: 4)
E23A	PAICQRATATLGTVGSNTSGT T AIEACILL (SEQ ID NO: 5)
E25A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEI A ACILL (SEQ ID NO: 6)
Δ8-22	PAICQRA-----EIEACILL (SEQ ID NO: 7)
Δ8-22 oxidado	PAICQRA-----EIEACILL (SEQ ID NO: 7)
Δ8-22 Abu	PAI a QR-----EIE Aa ILL (SEQ ID NO: 8)
Polar Assortant	IALILEPICCQERAA (SEQ ID NO: 9)

CP1 es un péptido aislado purificado derivado de una proteína de cubierta de astrovirus humano, comprendiendo el péptido una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 CP2 es un péptido purificado aislado, derivado de una proteína de cubierta de astrovirus humano, comprendiendo el péptido una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

10 Utilizando CP1 como el péptido original, se hicieron cuatro sustituciones de alanina (C04A, C27A, E23A, E25A) (los residuos sustituidos con alanina están en negrita y subrayados en la tabla 1). Las deleciones internas del residuo 8 al residuo 22 se hicieron para el péptido Δ8-22 (deleciones internas se muestran como guiones en la tabla 1). Se recubrieron los derivados CP2, CP1, y CP1 en una placa. Después del bloqueo, se adicionaron cantidades crecientes de C1q durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por la detección de C1q con antisueros a C1q. La unión de C1q por los diversos derivados de péptidos se muestra en la figura 3. Los datos representan lecturas por triplicado para cada compuesto péptido. CP1 unido a C1q de una manera dependiente de la dosis (figura 3A). Mientras CP2 se unía menos C1q que CP1, se unió C1q a niveles similares a los de HNP-1 (figura 3A).

15 Como se muestra en la tabla 1, CP1 contiene dos residuos de cisteína en las posiciones 4 y 27, que se sustituyeron individualmente con alanina en C04A y C27A. Los residuos de cisteína de CP1 fueron dirigidos para determinar si el enlace disulfuro en CP1 es necesario para la activación de la vía clásica. Como se conoce en la técnica, los reguladores peptídicos de C3 (Compstatina) y C1q (péptido 2J), ambos de los cuales contienen dos residuos de cisteína en sus secuencias de aminoácidos, requieren la ciclación mediante enlace disulfuro para la actividad (Sahu et al., 1996. J. Immunol. 157, 884-891; Roos et al., 2001. J. Immunol. 167, 7052-7059). Las sustituciones de cisteína no tuvieron efectos significativos sobre la unión C1q (figura 3B) o la activación de C4 (figura 5). Sin embargo, ambas sustituciones de cisteína demostraron pérdida de la actividad reguladora del complemento en los ensayos hemolíticos (figura 6B). Esto sugiere que, aunque la ciclación a través del enlace disulfuro de los residuos de cisteína no es crítico para la unión de C1q, la ciclación parece tener un efecto variable sobre su capacidad para inhibir la activación del sistema del complemento. De este modo, aunque no está vinculado por ninguna teoría, el enlace disulfuro de los residuos de cisteína puede ser importante para la conformación y estabilidad apropiadas del péptido, como se sugiere por el modelo estructural de E23A (figura 9B).

30 Como se muestra en la tabla 1, los residuos de ácido glutámico en las posiciones 23 y 25 también se sustituyeron por alanina. La sustitución de los residuos de ácido glutámico se realizó debido a que estos aminoácidos cargados negativamente pueden desempeñar un papel en la interacción CP con residuos de lisina no hidroxilados sobre la molécula C1q. Los péptidos E23A y E25A demostraron un enlace eficaz a C1q (figura 3C) y una actividad reguladora similar o mayor que CP1 en todos los ensayos funcionales (figuras 5 y 6). En particular, E23A mostró una regulación superior de la activación de la vía clásica en comparación con todos los otros derivados de péptidos probados. Parece que la sustitución de uno del ácido glutámico cargado negativamente por el residuo de alanina neutro mejora la actividad reguladora del péptido.

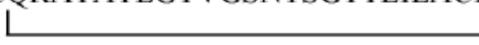
Como se muestra en la tabla 1, el péptido Δ8-22 era una delección de los residuos 8-22 de E23A. Este péptido fue activo en todos los ensayos funcionales probados y unido a C1q (figura 3D). Este péptido Δ8-22 retiene los dos residuos de cisteína y dos residuos de ácido glutámico y es la mitad del tamaño de CP1 (15 residuos frente a 30 residuos).

- 5 El péptido Δ8-22 (SEQ ID No. 7) se oxidó durante la síntesis para formar un enlace disulfuro entre los dos residuos de cisteína (Δ8-22 oxidado). Este péptido fue activo en todos los ensayos funcionales probados. Los dos residuos de cisteína se reemplazaron en el péptido Δ8-22 con un derivado de cisteína que no forma un enlace disulfuro, de manera que el péptido permanece reducido. (péptido Abu Δ8-22; SEQ ID No. 8). Este péptido fue activo en todos los ensayos funcionales probados. Con el péptido Polar Assortant (SEQ ID No. 9), los 15 residuos de aminoácidos del péptido Δ8-22 se mezclaron. Este péptido también fue activo en todos los ensayos funcionales probados.

Delecciones, sustituciones y modificaciones de péptidos racionales

Se describen una serie de delecciones, sustituciones y modificaciones del péptido de CP1, como se muestra en la tabla 2 siguiente. El objeto de la invención describe un péptido sintético aislado, purificado que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-35, como se muestra en las tablas 1 y 2.

TABLA 2

Péptido	Astrovirus CP1	
	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 1)
		
	Delecciones internas	
	PAICQRATATLGT - - - NTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 10)
	PAICQRATATL - - - - - SGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 11)

	PAICQRATA ----- - TTEIEACILL	(SEQ ID NO: 12)
Δ8-22	PAICQRA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 7)
	Deleciones terminal N	
	- AICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 13)
	-- ICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 14)
	--- CQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 15)
	Deleciones terminal C	
	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIL -	(SEQ ID NO: 16)
	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACI --	(SEQ ID NO: 17)
	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEAC- --	(SEQ ID NO: 18)
	Deleciones terminal N y C	
CP1, aa 8-22	TATLGTVGSNTSGTT	(SEQ ID NO: 19)
CP2, aa 9-23	TGSTQFGPVQALGAQ	(SEQ ID NO: 20)
	Barrido de alanina incluyendo las siguientes sustituciones especificas	
C04A	PAIAQRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILL	(SEQ ID NO: 3)
C27A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIEAAILL	(SEQ ID NO: 4)
C04,27A	PAIAQRATATLGTVGSNTSGTTEIEAAILL	(SEQ ID NO: 21)
E23A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTAIEACILL	(SEQ ID NO: 5)
E25A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTEIAACILL	(SEQ ID NO: 6)
E23,25A	PAICQRATATLGTVGSNTSGTTAIAACILL	(SEQ ID NO: 22)
E23A, Δ8-22	AICQRA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 23)
E23A, Δ8-22	PAACQRA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 24)
E23A, Δ8-22	PAIAQRA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 25)
E23A, Δ8-22	PAICARA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 26)
E23A, Δ8-22	PAICQAA ----- EIEACILL	(SEQ ID NO: 27)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- AIEACILL	(SEQ ID NO: 28)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EAEACILL	(SEQ ID NO: 29)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EIAACILL	(SEQ ID NO: 30)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EIEAAILL	(SEQ ID NO: 31)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EIEACALL	(SEQ ID NO: 32)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EIEACIAL	(SEQ ID NO: 33)
E23A, Δ8-22	PAICQRA ----- EIEACILA	(SEQ ID NO: 34)



Deleciones internas

5 Como se describe anteriormente, CP1 tiene 30 residuos de aminoácidos de longitud y se alinea con los diez primeros residuos de HNP-1, como se muestra en la figura 2A. La alineación de estas dos moléculas se basó en los residuos de cisteína en el extremo N y C que se requieren para la ciclación de CP1. Esto condujo a una región interna de 18 residuos de CP1 que no comparte homología de secuencia con HNP-1. Las deleciones internas cada vez más grandes de CP1 se sintetizan y se evalúan para la unión de C1q y MBL (tabla 2, deleciones internas).

Deleciones terminales N y C

10 Como se muestra en la tabla 2 (deleciones terminales N y C), los aminoácidos terminales N y C se suprimen de forma progresiva individualmente hasta cada residuo de cisteína de CP1. Adicionalmente, tanto las deleciones de terminales N y C de CP1 y CP2 se hacen para crear péptidos de 15 aminoácidos. Estos compuestos péptidos modificados se sintetizan y se evalúan para la unión de C1q y MBL para determinar si estos residuos flanqueantes se requieren para la actividad de unión de C1q y MBL. Estas deleciones ayudan a determinar el tamaño mínimo del compuesto péptido requerido para regular la activación del complemento.

15 Barrido de alanina

El barrido de alanina se realiza para identificar residuos de aminoácidos específicos que son responsables de la actividad de un péptido. Con el barrido con alanina, se utiliza alanina para sustituir cada residuo secuencialmente. La sustitución de un aminoácido esencial da como resultado un cambio en la actividad del péptido, con el grado de actividad tomado como una medida relativa de la importancia del aminoácido que está siendo sustituido.

20 La materia objeto describe compuestos péptidos sustituidos con alanina en ciertas posiciones. La materia objeto describe un péptido sintético, aislado, purificado, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, en la que uno o más de los aminoácidos están sustituidos con alanina, en la que el péptido regula la activación del complemento. En una o más realizaciones, los aminoácidos sustituidos con alanina están en las posiciones 4, 23, 25, o 27.

25 Dos posiciones de residuos de ácido glutámico se sustituyen tanto individual como conjuntamente con alanina (tabla 2, en negrita y subrayada). Aunque no está vinculado por ninguna teoría, la molécula de CP de tipo salvaje puede interactuar con residuos de lisina reactivos sobre C1q y MBL que se requieren para unir las serinas proteasas C1s-C1r-C1r-C1s y MASP2, respectivamente. Dada la carga negativa asociada con el ácido glutámico, estos residuos pueden interactuar directamente con los residuos lisina cargados positivamente en C1q y MBL para facilitar la unión CP. Dos posiciones de residuo de cisteína, tanto individual como conjuntamente, están sustituidas con alanina (tabla 30 2, en negrita y subrayada).

Acetilación terminal N

35 La materia objeto describe compuestos péptidos con acetilación del extremo N. La acetilación de CP1 aumenta la potencia reduciendo la carga en el extremo N del péptido (esto es, efectos electrostáticos) (Ricklin and Lambris, 2008. Nat. Biotech. 25, 1265-1275). Esta modificación puede ayudar a mejorar la estabilidad in vivo del péptido con respecto a exopeptidasas, como se demostró con Compstation (Ricklin and Lambris, 2008. Nat. Biotech. 25, 1265-1275). El compuesto péptido sintetizado a partir de la acetilación terminal N, incluye cualquiera de los péptidos descritos anteriormente, en el que el péptido se modifica a través de la acetilación del residuo terminal N.

El sistema del complemento y las enfermedades asociadas con su desregulación

40 Aunque el complemento es una defensa vital del huésped frente a organismos patógenos tales como bacterias y algunos virus encapsulados, su activación no controlada puede causar daños devastadores en las células huésped. El daño del tejido huésped mediado por el complemento ha sido implicado en una amplia variedad de enfermedades, incluyendo patologías autoinmunes tales como: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia Gravis, anemia hemolítica autoinmune, glomerulonefritis membranoproliferativa y enfermedad del suero. También se ha identificado que contribuye a la patogénesis de las siguientes enfermedades: 45 síndrome de dificultad respiratoria de adultos (ARDS), lesiones por isquemia-reperusión (incluyendo accidente cerebrovascular e infarto del miocardio), complicaciones de alo y xenotrasplante (incluyendo rechazo hiperagudo y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)), enfermedad de Alzheimer, lesiones por quemaduras, daño por hemodiálisis, daño por bypass cardiopulmonar y hemoglobulinuria paroxística nocturna (PNH).

50 El angioedema hereditario (HAE) es un trastorno genético muy raro causado por niveles reducidos de o inhibidor C1 no funcional; síntomas del HAE incluyen edema agudo. El inhibidor de C1 regula naturalmente la activación de C1, y

el tratamiento de edema agudo requiere una infusión sustancial de inhibidor de C1 o transfusión de plasma. Debido a que el astrovirus CP bloquea funcionalmente la activación de C1, el uso de los compuestos péptidos descritos para tratar HAE satisface una necesidad terapéutica debido a que el inhibidor C1 tiene que purificarse a partir de sueros humanos de múltiples sujetos y, por lo tanto, podría estar contaminado con patógenos humanos transmitidos por la sangre. La administración terapéutica de los compuestos péptidos descritos regula C1, ya sea en terapia complementaria con inhibidor C1 o como tratamiento terapéutico independiente.

Los compuestos péptidos descritos pueden regular selectivamente la activación de C1q y MBL sin afectar la actividad de la vía alternativa y son, de este modo, ideales para prevenir y tratar enfermedades mediadas por la activación desregulada de las vías clásica y de la lectina. La vía alternativa es esencial para la vigilancia inmunológica contra patógenos invasores, y los seres humanos con defectos de vías alternativas sufren graves infecciones bacterianas. Al ligar e inactivar C1q y MBL, los compuestos péptidos pueden regular eficazmente la activación de la vía clásica y de la lectina, dejando intacta la vía alternativa.

El término "regula", tal como se usa en este documento, se refiere a i) controlar, reducir, inhibir o regular la función biológica de una enzima, proteína, péptido, factor, subproducto o derivado de la misma, ya sea individualmente o en complejos; ii) reducir la cantidad de una proteína, péptido o derivado biológico de los mismos, in vivo o in vitro; o iii) interrumpir una cadena biológica de sucesos, cascadas o vías que se sabe que comprenden una serie relacionada de reacciones biológicas o químicas. Por ejemplo, el término "regula" se puede utilizar de este modo para describir la reducción de la cantidad de un solo componente de la cascada del complemento en comparación con una muestra de control, la reducción de la velocidad o la cantidad total de formación de un componente o complejo de componentes, o la reducción de la actividad global de un proceso complejo o serie de reacciones biológicas, dando lugar a resultados tales como la lisis celular, la formación de enzimas convertasas, la formación de complejos de ataque de membrana derivadas del complemento, la inflamación o la enfermedad inflamatoria. En un ensayo in vitro, el término "regula" se puede referir al cambio o reducción medible de algún evento biológico o químico, pero el experto en el arte apreciará que el cambio o reducción medible no necesita ser total para ser "regulador".

Formulación y administración farmacéutica

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas capaces de regular el sistema del complemento, que comprende al menos un compuesto péptido, como se ha discutido anteriormente, y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en forma de comprimidos, pastillas, polvos, comprimidos para deshacer en la boca, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones o jarabes.

Algunos ejemplos de portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen: lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metil celulosa. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular usando procedimientos conocidos en la técnica para proporcionar una liberación rápida, normal o sostenida o retardada del ingrediente activo.

La divulgación se refiere a un método para regular el sistema del complemento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto las composiciones descritas anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan mezclando el compuesto péptido que tiene el grado apropiado de pureza con portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de formulaciones y métodos para preparar tales formulaciones son bien conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles como un agente profiláctico y terapéutico para diversos trastornos y enfermedades, como se ha expuesto anteriormente. En una realización, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto péptido. En otra realización, la composición comprende al menos otro ingrediente activo eficaz para tratar al menos una enfermedad asociada con daño del tejido mediado por el complemento. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en este documento, se refiere a la cantidad total de cada componente activo que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el sujeto.

El término "sujeto", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier sujeto para el que se desee el diagnóstico, el pronóstico o la terapia. Por ejemplo, un sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un primate humano o no humano (tal como un simio, mono, orangután o chimpancé), un perro, gato, conejillo de indias, conejo, rata, ratón, caballo, ganado, o vaca.

Como se utiliza en este documento, "tratar", "que trata", o "tratamiento" se refiere a administrar una terapia en una cantidad, manera (por ejemplo, programa de administración) y/o modo (por ejemplo, ruta de administración), eficaz para mejorar un trastorno (por ejemplo, un trastorno descrito en este documento) o un síntoma del mismo, o para prevenir o retardar la progresión de un trastorno (por ejemplo, un trastorno descrito en este documento) o un síntoma del mismo. Esto puede ser evidenciado, por ejemplo, por una mejora en un parámetro asociado con un trastorno o un síntoma del mismo, por ejemplo, hasta un grado estadísticamente significativo o hasta un grado detectable para un experto en el arte. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y se

puede adaptar al sujeto. Mediante la prevención o ralentización de la progresión de un trastorno o de un síntoma del mismo, un tratamiento puede prevenir o retardar el deterioro resultante de un trastorno o de un síntoma del mismo en un sujeto afectado o diagnosticado.

- 5 La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto péptido varía dependiendo de varios factores, tales como la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, el tiempo de administración, la ruta de administración, la velocidad de excreción del compuesto empleado, la duración del tratamiento, la coterapia implicada, y la edad, género, peso y condición del sujeto, etc. Un experto en el arte puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz. De acuerdo con lo anterior, un experto en el arte puede necesitar titular la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico máximo.
- 10 La dosis diaria eficaz está generalmente dentro del intervalo desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 mg/kg. Esta dosis se puede lograr a través de un régimen de dosificación diaria de 1-6 veces. Alternativamente, se puede lograr un tratamiento óptimo a través de una formulación de liberación sostenida con un régimen de dosificación menos frecuente.
- 15 Las formulaciones farmacéuticas se pueden adaptar para su administración por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por vía oral, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica) o parenteral (incluyendo inyecciones o infusiones subcutánea, intracutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intrasinovial, intrasternal, intratecal, intralesional, intravenosa o intradérmica). Para la administración humana, las formulaciones preferiblemente cumplen los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, según lo requerido por la agencia de la Food and Drug Administration (FDA).
- 20

Terapias combinadas

Una realización adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con el daño del tejido mediado por el complemento. Aunque las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico activo, también se pueden utilizar en combinación con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos que sean efectivos para prevenir o tratar la enfermedad. En este aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para administración antes, simultáneamente y/o después de uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales eficaces en el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con el daño del tejido mediado por el complemento.

25

30 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, ya sea solo o en combinación con un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un corticosteroide o un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD).

Ejemplos de NSAID incluyen: salicilatos (tales como aspirina, amoxiciprina, benorilato, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, faislamina, salicilato de metilo, salicilato de magnesio y salicilato de salicílico (salsalato)), ácidos arilalcanoicos (tales como diclofenaco, aceclofenaco, acemetacina, bromfenaco, etodolaco, indometacina, Ketorolaco, nabumetona, sulindaco y tolmetino), ácidos 2-arilpropiónicos (tales como ibuprofeno, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, loxoprofeno, naproxeno, ácido tiaprofénico y suprofeno), ácidos N-arilantranílico (tales como, ácido mefenámico y ácido meclofenámico), derivados de pirazolidina (tales como fenilbutazona, azapropazona, metamizol, oxifenbutazona y sulfiprazona), oxicam (tales como piroxicam, lornoxicam, meloxicam y tenoxicam), inhibidores de la COX-2 (tales como etoricoxib, lumiracoxib y parecoxib), sulfonanilidas tales como nimesulida, y otras tales como licofelona y ácidos grasos omega-3.

35

40

Ejemplos de corticosteroides incluyen: triamcinolona (Aristocort®), cortisona (comprimidos de acetato Cortone®), dexametasona (Decadron® Elixir), prednisona (Deltasone®) y metilprednisolona (Medrol®).

Ejemplos de DMARD incluyen: metotrexato (Rheumatrex®), leflunomida (Arava®), etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), anakinra (Kineret®), sulfasalazina (Azulfidine EN-Tabs®), antimaláricos, sales de oro, d-penicilamina, ciclosporina A, ciclofosfamida y azatioprina.

45

Soliris™ (eculizumab) es un anticuerpo monoclonal anti-C5 humanizado. Ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la rara forma de anemia hemolítica, hemoglobinuria paroxística nocturna. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar en combinación con Soliris™ en el tratamiento de la hemoglobinuria nocturna paroxística, enfermedades del corazón, enfermedades pulmonares, enfermedades autoinmunes, asma, así como el cuidado auxiliar de trasplantes.

50

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar con el agente o agentes adicionales en terapia de combinación, conjuntamente o por separado, o combinando las composiciones farmacéuticas y el agente o agentes adicionales en una composición. La dosificación se administra y se ajusta para lograr el manejo máximo de las afecciones. Por ejemplo, tanto las composiciones farmacéuticas como el agente o agentes adicionales están presentes usualmente a niveles de dosificación comprendidos entre aproximadamente

55

10% y aproximadamente 150%, más preferiblemente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, de la dosificación normalmente administrada en régimen de monoterapia.

Ejemplos

5 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, proporcionados únicamente con fines ilustrativos. No deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la invención de ninguna manera.

Materiales y métodos

Ejemplo 1 - Preparación de HAstV-1 CP, péptidos, IgG agregado por calor, sueros, eritrocitos y soluciones reguladoras del complemento

10 El HAstV-1 CP de tipo salvaje se expresó a partir de un baculovirus recombinante en células de *Spodoptera frugiperda* (línea IPLB-Sf21) y se purificó como se describió previamente (Bonaparte et al., 2008. J. Virol. 82, 817-827). Los péptidos HNP-1, CP1 y CP2 se obtuvieron de Biomatik, mientras que C04A, C27A, E23A, E25A y d8-22 se adquirieron de GenScript. Antes del envío, los compuestos péptidos se analizaron por HPLC y ESI-espectrometría de masas. Tras la recepción, los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM y se almacenaron a -80°C. La IgG humana agregada por calor se preparó usando métodos conocidos en la técnica (Bonaparte et al., 2008. J. Virol. 82, 817-827). El suero humano normal combinado (NHS) se derivó de la sangre de voluntarios humanos sanos de acuerdo con un protocolo aprobado por Institutional Review Board (IRB 02-06-EX-0216, Escuela de Medicina de Virginia Oriental) y fue agrupado, dividido en alícuotas y congelado a -80°C, usando métodos conocidos en la técnica (Cunnion et al., 2001. Infect. Immun. 69, 6796-6803). Se generaron eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos utilizando métodos conocidos en la técnica (Bonaparte et al., 2008. J. Virol. 82, 817-827). Se usaron soluciones reguladoras de complemento estándar: GVBS⁺⁺ (solución salina estandarizada-Veronal, gelatina al 0.1%, CaCl₂ 0.15 mM y MgCl₂ 1.0 mM) y GVBS⁻ (solución salina estandarizada-Veronal, gelatina al 0.1%, EDTA 0.01 M).

Ejemplo 2 - Protocolos de ELISA C1q para WT CP y compuestos péptidos

25 Para analizar si CP compite con HNP-1 para la unión C1q, se recubrieron péptidos HNP-1 (2.5 µM) sobre placas Maxisorp de 96 pozos (Nunc) en solución reguladora de revestimiento (Na₂CO₃ 100 mM, NaHCO₃, [pH 9.6]) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Las placas se lavaron con PBS/T y se bloquearon con BSA al 3%/PBS, Tween-20 al 0.05% (PBS/T) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se adiciónó una cantidad constante de C1q purificado (10 µg/ml, Complement Technologies, Inc.) a cada pozo, mientras se adicionaron simultáneamente cantidades decrecientes de CP, comenzando a 100 µg/mL y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. BSA fue sustituido por CP como un control negativo para la competencia. Después del lavado, el anticuerpo primario, anticuerpo policlonal de cabra anti-C1q (Complement Technologies, Inc.), se diluyó 1:2,000 en BSA al 3%/PBS/T y se adiciónó a la placa, durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y el anticuerpo secundario, HRP de burro anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), se diluyó 1:2,500 en BSA al 3%/PBS/T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/T y se desarrollaron con tetrametilbenzindina (Sigma), durante 1 min. Las reacciones se detuvieron entonces con 0.1 ml de H₂SO₄ 1 N y se leyó la absorbancia en un lector de placas Synergy HT (Bio-Tek Instruments) a una longitud de onda de 450 nm. Para evaluar la unión competitiva de los péptidos CP, CP1 y CP2 para la unión de C1q, el ensayo se llevó a cabo de una manera idéntica a la descrita anteriormente, excepto que se recubrieron CP1 y CP2 sobre placas (2.5 µM) y se usó BSA en paralelo con CP como control negativo para la competencia.

40 Para determinar la unión de los derivados de péptidos CP a C1q, se recubrieron péptidos a 2.5 µM en la placa y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar y bloquear, se adicionaron cantidades decrecientes de C1q, comenzando a 100 µg/mL, a los pozos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó C1q y las placas se desarrollaron como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3 - Inmunotransferencia de C1s

45 Se incubó un µl de C1 humano parcialmente purificado (0.2 mg/ml, Complement Technologies, Inc.) a 37°C durante 90 minutos, ya sea solo o con inmunoglobulina G agregada por calor (5 µl de una dilución 1:250 de solución de partida de 50 µg/ml), o con cantidades crecientes de los péptidos indicados (stock 250 µM), y se llevó hasta un volumen total de 11 µl en PBS. Después de la incubación, se adiciónó un volumen igual de solución reguladora de carga a todas las muestras, que posteriormente se hirvieron y se sometieron a electroforesis a través de una SDS-PAGE al 8% durante 60 minutos a 140 voltios. El gel se transfirió entonces a nitrocelulosa y se bloqueó con leche desnatada sin grasa (NFD) en PBS. La transferencia se probó con un anticuerpo policlonal de cabra a C1s (Quidel) a una dilución 1:2,000, se lavó con PBS/Tween-20 al 0.1%, seguido de anticuerpo IRDye 680 anti-cabra de burro conjugado con HRP (Li-cor Biosciences) a una dilución 1:10,000 y se lavó con PBS/Tween al 0.1%. A continuación, la transferencia se transformó en una imagen Odyssey imager utilizando el software de la versión 3.0 (Li-cor Biosciences), y la activación de C1s se determinó a partir de las cantidades de las cadenas pesadas y ligeras C1s características de C1s activadas en relación con las especies de proenzima.

Ejemplo 4 - Ensayo de activación de C4

El ensayo de activación de C4 se adaptó de Mallik et al., 2005. J. Med. Chem. 48, 274-286. Se recubrieron los pozos de placas de 96 pozos Immulon-2 con 50 μ l de 1.0 mg/ml de ovalbúmina (Fisher) en solución reguladora de recubrimiento y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS/T y se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y después se incubaron con un anticuerpo antiovalbúmina de conejo (Millipore) diluido en BSA al 3%/PBS a 1:2,000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Durante esta incubación, los péptidos se diluyeron a 0.5 mM en NHS al 10%/GVBS⁺⁺ y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Las placas se lavaron a continuación y las muestras preincubadas se adicionaron a las placas a una dilución 1:4 en GVBS⁺⁺ y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas y se adicionó anticuerpo anti-C4 de cabra (Complement Technologies, Inc.) a una dilución de 1:2,000 en BSA al 3%/PBS durante 1 hora, seguido de otro lavado y un anticuerpo IgG-HRP anti cabra de burro (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido a 1:2,000 en BSA al 3%/PBS durante 1 hora. A continuación, se desarrollaron las placas y se determinaron los valores de absorbancia como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5 - Ensayo hemolítico

Los péptidos se diluyeron a 1.4 mM o 0.77 mM en suero humano no diluido de NHS o desprovisto del factor B (Complement Technologies, Inc.) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación, estos péptidos se diluyeron con GVBS⁺⁺ para igualar el NHS al 2.5%, de los cuales se combinaron 0.25 ml con 0.4 ml de GVBS⁺⁺ y 0.1 ml de glóbulos rojos de oveja sensibilizados (RBC) y se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37°C. El procedimiento se detuvo mediante la adición de 4.0 ml de GVBS⁻, se centrifugó durante 5 minutos a 1,620 x g y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de lisis de cada muestra se normalizó al del control del NHS solamente.

Ejemplo 6 - Titulación de ensayo hemolítico de péptido Polar Assortant en suero desprovisto del factor B

El péptido Polar Assortant se diluyó en serie como se indica en la figura 7 en suero humano no diluido desprovisto del factor B (Complement Technologies, Inc.) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se incluyeron como controles el suero desprovisto del factor B solo, 0.77 mM de Δ 8-22 y DMSO. Estos péptidos se diluyeron a continuación con GVBS⁺⁺ para igualar el NHS al 2.5%, de los cuales se combinaron 0.25 ml con 0.4 ml de GVBS⁺⁺ y 0.1 ml de glóbulos rojos de oveja sensibilizados (RBC) y se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37°C. El procedimiento se detuvo mediante la adición de 4.0 ml de GVBS⁻, se centrifugó durante 5 minutos a 1,620 x g y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de lisis de cada muestra se normalizó al del control del NHS solamente.

Ejemplo 7 - Análisis estadístico

Para los experimentos repetidos, se calcularon los medios y los errores estándar de la media (SEM) usando técnicas conocidas en la técnica (Microsoft Excel XP).

Ejemplo 8 - Análisis de espectrometría de masas de oligomerización de péptidos

Los péptidos sintéticos se purificaron mediante C18 ZipTipsTM (Millipore) antes del análisis de espectrometría de masas, de la siguiente manera: Se pipetearon dos veces a través del ZipTip 10 μ l de acetonitrilo al 70% (ACN)/ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA) para humedecer la resina, seguido por dos lavados de 10 μ l de TFA al 0.1% para equilibrar la resina. La muestra de péptido acidificada se aspiró hacia arriba y hacia abajo cinco veces a través del ZipTip para unir péptidos a la resina. Los contaminantes se lavaron pipeteando TFA al 0.1% tres veces a través del ZipTip antes de eluir los péptidos unidos a un tubo nuevo usando ACN al 70%/TFA al 0.1%. Los péptidos se secaron en un equipo speed vac, se volvieron a suspender en 10 μ l de TFA al 0.1% antes de mezclar con la matriz (ácido α -ciano-4 hidroxicinámico o ácido sinapínico) en una proporción de 1: 4 antes del análisis. La espectrometría de masas se realizó utilizando un Bruker Daltonics Ultraflex IITM MALDI-TOF-TOF y los datos adquiridos tanto en el reflectron como en modos lineales positivos.

Ejemplo 9 - Modelación de homología del péptido E23A

La secuencia de aminoácidos de E23A se subió al servidor CPHmodels 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>, Lund et al., 2002. Resumen en la conferencia CASP5 A102). El programa alineó el E23A con la defensina 1 de la planta de *Vigna radiata* (VrD1), que proporcionó la plantilla y las coordenadas del banco de datos de la proteína (PDB) para generar el modelo estructural. Las coordenadas PDB para el E23A se subieron posteriormente a FirstGlance en JMol, versión 1.45 (<http://firstglance.jmol.org>) para visualizar la estructura.

Resultados

Ejemplo 10 - CP compete con el péptido HNP-1 para la unión al C1q

Estudios anteriores han demostrado que el CP expresado como una proteína recombinante expresada en baculovirus y purificado a partir de lisados de células de insecto puede unir eficientemente a C1q y MBL con la inhibición resultante de las vías del complemento clásica y de lectina (Bonaparte et al., 2008, Hair et al., 2010). Anteriormente, se demostró que el péptido neutrófilo humano defensin-1 (HNP-1) puede unir a C1q y MBL, regulando la activación de las vías clásica y de la lectina del complemento, respectivamente ((van den Berg et al., 1998. *Blood*. 92, 3898-3903; Groeneveld et al., 2007. *Molec. Immunol.* 44, 3608-3614). Dado que el CP también posee estas propiedades, se analizaron las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas y se encontró una región de homología limitada entre HNP-1 y los residuos 79-139 del WT CP. A continuación, se analizó si el CP podía competir directamente con HNP-1 para la unión a C1q usando un método ELISA de competición en el que se recubrió el péptido HNP-1 en la placa ELISA. La figura 1 es un gráfico que representa CP de forma dependiente de la dosis compitiendo con la defensina 1 de neutrófilos humanos (HNP-1) para la unión a C1q. Una cantidad fija de C1q purificado y cantidades crecientes de CP se adicionaron simultáneamente. El C1q adherente unido a HNP-1 se detectó con anticuerpo policlonal a C1q. La señal de C1q unida disminuyó con cantidades crecientes de CP, lo que indica que CP compite de forma dependiente de la dosis con HNP-1 para la unión de C1q (figura 1, mostrada como círculos). Por el contrario, cuando se sustituyó BSA por CP, no se detectó competencia para la unión de C1q (figura 1, mostrada como triángulos), y se observó la misma falta de competencia con aldolasa y albúmina de huevo (datos no mostrados). Además, no se observó unión cuando BSA se recubrió en la placa en lugar de HNP-1. Aunque no están vinculados por ninguna teoría, estos datos son consistentes con HNP-1 y CP que unen C1q de una manera comparable para regular la activación de la vía clásica (Hair et al., 2010. *J. Virol.* 82, 817-827).

Ejemplo 11 - Identificación de un péptido CP con homología para HNP-1 que compite con WT CP para la unión a C1q

Debido a que el CP compitió eficientemente con HNP-1 para la unión a C1q, se analizó si CP y HNP-1 compartían cualquier homología en el nivel de secuencia de aminoácidos. La alineación de la molécula CP de 787 aminoácidos con el péptido HNP-1 de 30 aminoácidos se realizó usando Clustal W (Larkin et al., 2007. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948). Se observó una región de homología entre HNP-1 y los residuos 79-139 de la molécula CP (figura 2A). Para determinar si esta secuencia de CP retenía las funciones de regulación del complemento de WT CP, se sintetizaron dos péptidos de 30 residuos que codificaban los residuos 79-108 (CP1) y 109-138 (CP2) de la molécula CP (figura 2A). CP1 alineado con los primeros 10 residuos de HNP-1, mientras que CP2 alineado con los últimos 20 residuos. Para determinar si los péptidos CP1 y CP2 podrían unirse directamente a C1q y competir con WT CP para unirse a C1q, se realizó un ELISA de competición en el que se recubrieron CP1 y CP2 en la placa ELISA. Una cantidad fija de C1q purificado y cantidades crecientes de WT CP se adicionaron simultáneamente, y el C1q unido se detectó entonces con anticuerpo policlonal a C1q. En ausencia de CP, C1q se unió eficientemente por el péptido CP1; sin embargo, la señal de C1q disminuyó con cantidades crecientes de CP, lo que indica que CP compitió de forma dependiente de la dosis con CP1 para la unión de C1q (figura 2B, mostrada como una línea punteada). Cuando BSA se sustituyó por CP en las mismas condiciones, CP1 se unió eficientemente a C1q y no se observó competencia (figura 2B, mostrada en triángulos). En contraste con CP1, CP2 no compiten por la unión C1q (figura 2B, mostrada en cuadrados). De este modo, 79-108 residuos de CP eran suficientes para unir C1q de una manera similar a WT CP.

Ejemplo 12 - Unión de derivados de péptidos CP a C1q

La capacidad del péptido CP1 para unirse competitivamente a C1q de una manera similar a WT CP condujo a un análisis inicial de los residuos de péptidos que son críticos para estas actividades. Se sintetizaron sustituciones de aminoácidos dirigidas y una delección grande del péptido CP1 original, como se muestra en la tabla 1 anterior. C04A y C27A fueron diseñados para evaluar si enlace disulfuro putativo entre los dos residuos de cisteína en CP1 fueron necesarios para la unión de C1q y regulación de la activación del complemento. Se sintetizaron E23A y E25A para evaluar si estos residuos de ácido glutámico cargados negativamente se requerían para la unión de C1q y la regulación del complemento. Finalmente, se diseñó un péptido que suprime los residuos internos 8-22 (Δ 8-22) para determinar si esta región, que no tiene homología con HNP-1, era necesaria para la unión de C1q y la regulación de la activación del complemento. Este péptido, Δ 8-22, retenía los dos residuos de cisteína y dos residuos de ácido glutámico.

Para determinar si estos péptidos podrían unirse a C1q, se llevaron a cabo ensayos de unión en los que se recubrieron los diversos derivados de péptidos en una placa ELISA. Se añadieron cantidades crecientes de C1q purificado y se detectó a continuación C1q con anticuerpo policlonal a C1q. CP1 dependiente de la dosis unió C1q (figura 3A), consistente con su capacidad para competir con WT CP para la unión de C1q (figura 2B). CP2 unido a C1q a niveles similares a los de HNP-1 (figura 3A), demostrando que mientras este péptido no compite con CP para la unión de C1q, conserva la capacidad de unirse a C1q, posiblemente como resultado de su homología con el C-terminal de 20 aminoácidos de HNP-1. La capacidad de C04A y C27A para unirse a C1q se analizó a continuación, y ambos péptidos unieron C1q de forma similar a CP1 (figura 3B). Se encontró que E23A y E25A se unen a C1q a niveles entre los de CP1 y CP2 (figura 3C), y esta tendencia también se observó para el péptido Δ 8-22 (figura 3D).

En resumen, aunque todos los péptidos del derivado CP1 se unieron a C1q, el grado de unión varió dependiendo de la sustitución de aminoácidos. Aunque no estaban unidos por ninguna teoría, ni los residuos de cisteína (C04 y C27)

ni los residuos de ácido glutámico (E23 y E25) parecían desempeñar un papel crítico en la unión de C1q. Además, el péptido $\Delta 8-22$, que tiene una delección de los 15 residuos de aminoácidos internos de CP1, aún conserva la actividad de unión C1q. De este modo, los derivados de CP1 demuestran individualmente que la unión a C1q no es dependiente ni del residuo de ácido glutámico ni de cualquier residuo de cisteína, lo que sugiere que no se requiere la ciclación a través de un enlace disulfuro.

Ejemplo 13 - El péptido CP1 regula la activación de C1s

El CP purificado puede regular la activación de la vía clásica a nivel de C1, uniendo C1q e impidiendo la escisión de la proenzima C1s (Hair et al., 2010. *J. Virol.* 82, 817-827). Para evaluar si los péptidos CP1 y CP2 eran capaces de regular también la activación de C1, se incubó el complejo C1 parcialmente purificado durante 90 minutos a 37°C con IgG agregada por calor (un potente estimulador de la activación de la vía clásica) con cantidades crecientes de CP1 y CP2. Para evaluar la activación de C1s, se detectó la escisión de la proenzima C1s en las cadenas pesada y ligera. C1 incubado solo mostró una activación espontánea mínima de C1s, mientras que C1 en presencia de IgG agregada por calor demostró una escisión robusta de C1s (figura 4A, carriles 1 y 2). La incubación de C1 e IgG agregada por calor con cantidades crecientes de escisión de C1s suprimido dependiente de la dosis de CP1 (figura 4A, carriles 3-6) a niveles observados para la activación espontánea de C1 (figura 4A, carril 1). En contraste con CP1, CP2 no demostró una regulación significativa de la escisión de C1s en ninguna de las concentraciones ensayadas (figura 4B, carriles 3-6). La cuantificación por formación de imágenes Odyssey de la regulación de la escisión de C1s para CP1 y CP2 en dos experimentos independientes para cada péptido validó estos resultados (figuras 4C-4D). Aunque CP2 demostró una unión mínima a C1q (figura 3A) y no demostró la capacidad para regular la escisión de C1s (figuras 4B y 4D), se probó si una combinación de CP1 y CP2 daría como resultado una mayor regulación de la escisión de C1s que CP1 solo. CP1 y CP2 juntos resultaron en no más regulación de la escisión de C1s que la observada para CP1 solo. Consistente con la capacidad de los derivados de péptidos para unirse a C1q, se encontró que todos los derivados de péptidos de CP1 inhibían la activación de C1s como se demostró para CP1 (datos no mostrados). Aunque no está unido a ninguna teoría, la capacidad de CP1 para regular la activación en el primer componente de la vía clásica, C1, sugiere que este péptido regula la activación de la vía clásica de una manera comparable a WT CP.

Ejemplo 14 - Regulación de la actividad del complemento por el péptido CP en ensayos funcionales

Para determinar la capacidad de los compuestos péptidos para regular la activación del complemento en ensayos funcionales, se utilizaron un ensayo de activación de C4 y un ensayo hemolítico. Para el ensayo de activación de C4, se modificó un método conocido en la técnica (Mallik et al., 2005. *J. Med. Chem.* 48, 274-286) de modo que las placas de ELISA se recubrieron con ovoalbúmina a las que se les permitió a los anticuerpos antiovalbúmina unirse, imitando una diana inmunocompleja. Después, los diversos compuestos péptidos se diluyeron a 0.5 mM en NHS al 10%/GVBS⁺⁺, se incubaron durante 15 minutos y posteriormente se adicionaron a cada pozo. La activación de la vía clásica (C4) se ensayó detectando la deposición de fragmentos C4 usando un anticuerpo policlonal anti-C4. Como se muestra en la figura 5, NHS solo, NHS + BSA y NHS + DMSO demostraron una deposición similar de los fragmentos C4, mientras que el NHS tratado con WT CP reguló la activación de C4. CP1 demostró un efecto inhibitorio del 35%, mientras que CP2 no tuvo efecto sobre la activación de C4, en consonancia con los resultados observados para la activación de C1s (figura 4). Los compuestos péptidos C04A, C27A, E25A y $\Delta 8-22$ inhibieron la activación del complemento de C4 en un 20-45%. E23A potentemente suprimió la activación de C4 en un 90%.

La regulación del compuesto péptido de la actividad del complemento de suero se evaluó en un ensayo estándar de complemento hemolítico. Los eritrocitos de oveja se sensibilizaron con anticuerpo y se incubaron con NHS, con o sin preincubación de péptidos, y se midió la actividad del complemento hemolítico. A diferencia del ensayo de activación con C4, las tres vías del complemento (clásicas, lectinas y alternativas) estaban presentes y pudieron haber contribuido a la actividad reguladora observada. Sin embargo, la activación inicial del complemento fue impulsada principalmente por el anticuerpo sobre los eritrocitos y, de este modo, la vía clásica. Como se muestra en la figura 6A, NHS ya sea solo o en presencia de eritrocitos lisados con DMSO como se esperaba. La lisis regulada de CP2 a un nivel similar a CP1 (66% de inhibición) en contraste con el ensayo de activación de C4, en la que el péptido CP2 no tenía efecto regulador. C04A tuvo un efecto mínimo sobre la lisis de eritrocitos, mientras que C27A fue más inhibitorio (85% de inhibición). Similar al efecto visto en el ensayo de activación de C4, E23A inhibió eficazmente la lisis de eritrocitos (85% de inhibición) en comparación con E25A, que tenía 60% de inhibición. El compuesto péptido $\Delta 8-22$ inhibió la lisis de eritrocitos en un 75%.

Para probar si los péptidos estaban regulando la activación de la vía alternativa, se aumentó la cantidad de suero utilizada durante la preincubación, disminuyendo eficazmente la concentración de los péptidos probados a 0.77 mM, de manera que se produjo una inhibición mínima en NHS (figura 6B). La actividad reguladora de los péptidos en la vía clásica sola se evaluó a continuación utilizando suero desprovisto del factor B en el ensayo hemolítico, utilizando las mismas cantidades de péptido y suero (figura 6B). En contraste con la falta de regulación observada para NHS, el péptido CP1 parental reguló la activación de la vía del complemento clásica en suero desprovisto del factor B. Además, los compuestos péptidos E23A, E25A y $\Delta 8-22$ regularon la activación de la vía del complemento clásica significativamente. Aunque no está vinculado por ninguna teoría, a cantidades más altas de suero, donde la vía alternativa comienza a ser más eficientemente activada, varios péptidos continuaron a regular eficientemente la

activación de la vía clásica, pero no la activación global del complemento, lo que sugiere que la vía alternativa está mediando la hemólisis. La comparación de la actividad reguladora de las figuras 5 y 6 indican que E23A efectúa una buena regulación del complemento.

5 El péptido Polar Assortant mostró inicialmente una regulación significativa de la actividad de la vía clásica en un ensayo hemolítico con NHS y suero desprovisto del factor B (datos no mostrados). Para explorar adicionalmente la actividad reguladora de este péptido en la vía clásica, se realizó una dilución del péptido Polar Assortant en suero desprovisto del factor B. En contraste con la falta de regulación observada para el NHS solo y el vehículo DMSO, el péptido Polar Assortant reguló la activación de la vía clásica de forma dependiente de la dosis significativamente más allá de $\Delta 8-22$ (figura 7, compara $\Delta 8-22$ 0.77 mM frente a Polar Assortant 0.77 mM).

10 Ejemplo 15 - Péptidos CP no se oligomerizan en estructuras de orden superior

Para caracterizar adicionalmente los péptidos CP, se evaluó si estos compuestos podían oligomerizar en estructuras de orden superior, tales como dímeros, trímeros, etc. Para evaluar la oligomerización del péptido CP, se analizaron los siete péptidos CP de la tabla 1 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF -TOF en los modos lineal y de reflexión. En ambos modos, se encontró que todos los péptidos eran monoméricos, sin picos mayores que llevan una relación de masa a carga (m/z) mayor que la masa teórica del péptido probado. Las figuras 8A-8B muestran los modos lineal y de reflexión, respectivamente. Mientras que el modo lineal tiene menor resolución que el modo de reflexión, ambos modos demuestran que E23A es monomérico sin que otros picos de orden superior sean evidentes.

Ejemplo 16 - Modelo estructural para E23A basado en la homología con la defensina de la planta VrD1

20 Dada la identificación de E23A como un regulador altamente potente de la activación de la vía clásica, se generó un modelo estructural para el péptido E23A. La secuencia de aminoácidos de E23A se cargó en el servidor modelos CPH 3.0. Este programa es un recurso de modelado de homología de proteínas donde el reconocimiento de plantillas se basa en la alineación de perfil-perfil guiada por la estructura secundaria y las predicciones de exposición (Lund et al., 2002. Resumen en la conferencia CASP5 A102). De acuerdo con la homología discutida anteriormente
25 entre CP y HNP-1, los modelos CPH 3,0 alinearon los residuos 2-29 de E23A a los residuos 17-44 de la defensina de la planta de 46 residuos, defensina 1 de planta de *Vigna radiata* (VrD1) (figura 9A). Basado en la estructura de la solución de resonancia magnética nuclear de VrD1 (Liu et al., 2006. Proteins. 63, 777-786), un modelo de E23A fue generado por modelos CPH 3.0 y mostrado en FirstGlance en JMol (figura 9B). La Figura 9A representa una hélice alfa de terminal N de 11 residuos seguida por dos hebras beta antiparalelas. La hélice alfa y las hebras beta están
30 conectadas por dos bucles desordenados de 3-5 residuos. Se muestran los dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro (representado como un cilindro delgado) entre la hélice alfa y la segunda hebra beta, que puede jugar un papel en la estabilización de la estructura global.

Diseño del compuesto péptido racional

Ejemplo 17 - Síntesis de péptidos análogos de CP1

35 Los análogos de péptidos de CP1 se sintetizan comercialmente. Estos péptidos modificados se analizan después para la interacción con C1q y MBL en ensayos de unión conocidos en la técnica (Hair et al., 2010. Molec. Immunol. 47, 792-798)). Estos ensayos se describen brevemente a continuación.

Ejemplo 18 - Unión de C1q

40 Los análogos de péptidos de CP se recubren sobre placas de microtitulación a diversas concentraciones y se analizan por su capacidad para unirse a C1q purificado (CompTech). Se detecta la unión de C1q con anticuerpo monoclonal anti-C1q (Quidel), seguido por HRP anti-ratón de burro (Santa Cruz Biotech). Las placas se desarrollan entonces con tetrametilbenzindina, las reacciones se terminan con H_2SO_4 , y se lee la absorbancia a 450 nm. Un control positivo para la unión C1q consiste en CP1, mientras que los controles negativos son BSA. Se determinan las condiciones iniciales para la unión de cada péptido y luego se realizan diluciones en serie de los péptidos por
45 triplicado para determinar la significación estadística y calcular los valores de unión medio-máximos según se ha informado previamente (Hair et al., 2010. Molec. Immunol. 47, 792-798). Se usan valores de unión media-máximos para evaluar la afinidad de unión relativa de cada análogo de péptido.

Ejemplo 19 – Unión de MBL

50 La unión de MBL se lleva a cabo de una manera similar al ensayo de unión de C1q descrito anteriormente. Se utilizan sueros purificados anti-MBL de cabra y de MBL humano, seguido por HRP anti-cabra de burro para la detección de MBL. De nuevo, se calculan y se comparan los valores de unión medio-máximos entre los compuestos péptidos.

55 Se ensaya la capacidad de los derivados de péptidos CP para inhibir la activación de C1 y MBL en ensayos funcionales. Los análogos de péptido CP que se unen específicamente a C1q y MBL se evalúan por su capacidad para inhibir la activación de la vía clásica y de la lectina en ensayos funcionales. Además de los ensayos específicos

para la inhibición de C1 y MBL, se utiliza un ensayo de activación del complemento iniciado por anticuerpo para determinar los valores de IC_{50} de los análogos de péptidos tanto en suero humano como en suero de rata. Esto permite la comparación directa de la actividad funcional relativa de los péptidos.

Ejemplo 20 - Ensayo de activación de C1

5 Los compuestos péptidos se analizan en cuanto a su capacidad para inhibir la activación de C1 en el ensayo de escisión de inmunotransferencia de C1s. C1 (CompTech) e IgG agregada por calor se incuban con cantidades crecientes de los péptidos. C1s se detecta con un anticuerpo policlonal de cabra para C1s (Quidel), seguido por un anticuerpo anti-cabra de burro conjugado con colorante infrarrojo (Li-Cor Biosciences) para análisis en un sistema de formación de imágenes infrarroja Odyssey (Li-Cor Biosciences). C1 en ausencia o presencia de IgG agregada por calor se incluye en cada transferencia como control negativo y positivo para la escisión de C1s, respectivamente. Para comparar el grado de inhibición de la escisión de C1s por los diversos péptidos CP, las cadenas pesadas y ligeras de C1s se cuantifican con respecto al precursor de C1s utilizando el software Odyssey 3.0 y se determina el porcentaje de activación de C1. La IgG agregada por calor + CP1 sirve como un control positivo de la inhibición de la escisión de C1s y también se puede usar para normalizar valores entre experimentos, si es necesario.

15 Ejemplo 21 - Ensayo de activación de MBL

Se utiliza un ensayo de activación de MBL comercial (HyCult) (Hair et al., 2010. *Molec. Immunol.* 47, 792-798) para evaluar los análogos de péptidos CP. El suero humano normal (NHS) se incubaba con cantidades crecientes de los péptidos y se evalúa para la inhibición de la vía de la lectina usando el kit comercial. El NHS solo sirve como un control positivo para la activación de la lectina, mientras que el NHS inactivado por calor sirve como un control negativo para la activación. NHS + CP se usan como control para demostrar la inhibición de la activación de la vía de la lectina.

Alternativamente, se usa un ensayo de activación de la lectina conocido en la técnica (Groeneveld et al., 2007. *Molec. Immunol.* 44, 3608-3614) para evaluar los compuestos péptidos.

Ejemplo 22 - Ensayo de activación del complemento de suero iniciado por un anticuerpo

25 Para comparar directamente la actividad inhibidora de CP1 y sus análogos de péptidos, se utiliza un ensayo de activación del complemento de suero iniciado por anticuerpo. Este ensayo es una modificación del protocolo utilizado por el Dr. John Lambris y colegas (Universidad de Pensilvania) para calcular los valores de IC_{50} de Compstatina y sus análogos (Mallik et al., 2005. *J. Med. Chem.* 48, 274-286). La inhibición de la activación del complemento se evalúa midiendo la inhibición de la fijación de C4 en suero a complejos ovalbuminanti- ovalbúmina en NHS. Los pozos de microtitulación se recubren con ovalbúmina (10 mg/ml). Los pozos se saturan entonces con BSA (10 mg/ml) durante una hora a temperatura ambiente y se adiciona una dilución 1:2,000 de anticuerpo anti-ovalbúmina de conejo para formar inmunocomplejos mediante los cuales puede activarse el complemento. A continuación, se adicionan directamente a cada pozo péptidos a diversas concentraciones, seguido de una dilución 1:80 de NHS en GVB⁺⁺. Después de una incubación de 30 minutos, se detecta C4 unido usando una dilución 1:2,000 de un anticuerpo anti-C4 de cabra, seguido de una dilución 1:2,500 de anticuerpo secundario HRP anti-cabra de burro. Las placas se desarrollan entonces con tetrametilbenzidina, las reacciones se terminan con H₂SO₄, y se lee la absorbancia a 450 nm. El porcentaje de inhibición se normaliza considerando 100% de activación igual a la activación que ocurre en ausencia de péptido. El NHS inactivado por calor se utiliza como un control negativo para la activación. NHS + CP1 se usan como control de la inhibición de la activación.

40 Los valores de IC_{50} para los compuestos péptidos seleccionados se determinan trazando el porcentaje de inhibición frente a la concentración de péptidos. CP inhibe la activación de C4 a través de las vías clásica y de la lectina, y CP tiene efectos nominales sobre la activación de la vía alternativa (Bonaparte et al., 2008. *J. Virol.* 82, 817-827, Hair et al., 2010. *Molec. Immunol.* 47, 792-798). Utilizando CP1 como punto de referencia, de este modo se determinan directamente las actividades inhibitoras relativas para todos los compuestos péptidos.

45 Se determinan los valores de IC_{50} para los péptidos CP en suero de rata normal (NRS). Se ha demostrado que el CP de tipo salvaje y CP1 suprimen la activación del complemento iniciada por anticuerpos en NRS (Hair et al., 2010. *Molec. Immunol.* 47, 792-798). La determinación de los valores de IC_{50} para los compuestos péptidos en NRS son críticos para experimentos de variación de dosis en ratas.

Otros aspectos, modificaciones y realizaciones están dentro del alcance de las siguientes.

50 Referencias:

1. Bonaparte, R.S., Hair, P.S., Banthia, D., Marshall, D.M., Cunnion, K.M., Krishna, N.K. 2008. Human astrovirus coat protein inhibits serum complement activation via C1, the first component of the classical pathway. *J. Virol.* 82, 817-827.
2. Carvalho A.O., Gomes, V.M. 2009. Plant defensins - prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.* 30, 1007-1020.

55

3. Castellano, G., Melchiorre, R., Loverre, A., Ditunno, P., Montinaro, V., Rossini, M., Divella, C., Battaglia, M., Lucarelli, G., Annunziata, G., Palazzo, S., Selvaggi, F.P., Staffieri, F., Crovace, A., Daha, M.R., Mannesse, M., van Wetering, S., Schena, F.P., Grandaliano, G. 2010. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *Amer. J. Pathol.* 176, 1-12.
- 5 4. Cunnion, K.M., Lee, J.C., Frank, M.M. 2001. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69, 6796-6803.
5. Fryer J.P., Leventhal, J.R., Pao, W., Stadler, C., Jones, M., Walsh, T., Zhong, R., Zhang, Z., Wang, H., Goodman, D.J., Kurek, M., d'Apice, A.J., Blondin, B., Ivancic, D., Buckingham, F., Kaufman, D., Abecassis, M., Stuart, F., Anderson, B.E. 2000. Synthetic peptides which inhibit the interaction between C1q and immunoglobulin and prolong xenograft survival. *Transplantation.* 70, 828-836.
- 10 6. Groeneveld, T.W.L., Ramwadhoebe, T.H., Trouw, L.A., van den Ham, D.L., van der Borden, V., Drijfhout, J.W., Hiemstra, P.S., Daha, M.R., Roos, A. 2007. Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation. *Molec. Immunol.* 44, 3608-3614.
7. Hair, P.S., Gronemus, J.Q., Crawford, K.B., Salvi, V.P., Cunnion, K.M., Thielens, N.M., Arlaud, G.J., Rawal, N., Krishna, N.K. 2010. Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation. *Molec. Immunol.* 47, 792-798.
- 15 8. Huwiler, K.G., Mosher, D.F., Vestling, M.M. 2003. Optimizing the MALDI-TOF-MS observation of peptides containing disulphide bonds. *J. Biomolec. Tech.* 14, 289-297.
9. Kojima, T., Del Carpio C.A., Tajiri, H., Yoshikawa, K., Saga, S., Yokoyama, I. 1999. Inhibition of complement-mediated immune hemolysis by peptides derived from the constant domain of immunoglobulin. *Transplantation.* 67, 637-638.
- 20 10. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23, 2947-2948.
- 25 11. Lauvrak, V., Brekke, O.H., Ihle, Ø., Lindqvist, B.H. 1997. Identification and characterization of C1q-binding phage displayed peptides. *Biol. Chem.* 378, 1509-1519.
12. Lee, H., Green, D.J., Lai, L., Hou, Y.J., Jensenius, J.C., Liu, D., Cheong, C., Park, C.G., Zhang, M. 2010. Early complement factors in the local tissue immunocomplex generated during intestinal ischemia/reperfusion injury. *Mol. Immunol.* 47, 972-981.
- 30 13. Liu, Y.J., Cheng, C.S., Lai, S.M., Hsu, M.P., Chen, C.S., Lyu, P.C. 2006. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins.* 63, 777-786.
14. Lund, O., Nielsen, M., Lundegaard, C., Worning, P. 2002. CPHmodels 2.0: X3M a Computer Program to Extract 3D Models. Abstract at the CASP5 conference A102.
- 35 15. Mallik, B., Katragadda, M., Spruce, L.A., Carafides, C., Tsokos, C.G., Morikis D., Lambris, J.D. 2005. Design and NMR characterization of active analogs of Compstatin containing non-natural amino acids. *J. Med. Chem.* 48, 274-286.
16. Messmer, B.T., Benham, C.J., Thaler, D.S. 2000. Sequential determination of ligands binding to discrete components in heterogeneous mixtures by iterative panning and blocking (IPAB). *J. Mol. Biol.* 296, 821-832.
17. Ricklin, D., Lambris, J.D. 2007. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotech.* 25, 1265-1275.
- 40 18. Roos, A., Nauta, A.J., Broers, D., Faber-Krol, M.C., Trouw, L.A., Drijfhout, J.W., Daha, M.R. 2001. Specific inhibition of the classical complement pathway by C1q-binding peptides. *J. Immunol.* 167, 7052-7059.
19. Sahu, A., Kay, B.K., Lambris, J.D. 1996. Inhibition of complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J. Immunol.* 157, 884-891.
- 45 20. Taylor K., Barran, P.E., Dorin, J.R. 2007. Structure - activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers.* 90, 1-7.
21. Tjernberg, J., Ekdahl, K.N., Lambris, J.D., Korsgren, O., Nilsson, B. 2008. Acute antibody-mediated complement activation mediates lysis of pancreatic islets cells and may cause tissue loss in clinical islet transplantation. *Transplantation.* 85, 1193-1199.
- 50 22. van den Berg, R.H., Faber-Krol, M.C., van Wetering, S.P., Hiemstra, S., Daha, M.R. 1998. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood.* 92, 3898-3903.

23. Zhang, M., Takahashi, K., Alicot, E.M., Vorup-Jensen, T., Kessler, B., Thiel, S., Jensenius, J.C., Ezekowitz, R.A., Moore, F.D., Carroll, M.C. 2006. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J. Immunol.* 177, 4727-4734.
24. Zhang, X.-L., Selsted, M.E., Pardi, A. 1992. NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 1. Resonance assignment and secondary structure determination of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry.* 31, 11348-11356.
- 5

Reivindicaciones

1. Un péptido sintético que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 que aparece en la tabla 1.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido se modifica por acetilación del residuo terminal N.
- 5 3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para uso en la regulación del sistema del complemento en un sujeto.
- 10 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con daño del tejido mediado por el complemento, en la que la enfermedad asociada con el daño del tejido mediado por el complemento se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y miastenia Gravis, anemia hemolítica autoinmune, glomerulonefritis membranoproliferativa, enfermedad del suero, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (ARDS), lesión por isquemia-reperusión, accidente cerebrovascular, infarto del miocardio, lesión de alo o xenoinjerto, rechazo hiperagudo, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), enfermedad de Alzheimer, lesiones por quemaduras, daño por hemodiálisis, daño por bypass cardiopulmonar, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y angioedema hereditario (HAE).
- 15 6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición es para la administración con al menos un otro ingrediente activo eficaz en el tratamiento de la enfermedad, en la que el al menos otro ingrediente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente no esteroideo antiinflamatorio, un corticosteroide, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un inhibidor de C1 y eculizumab.

20

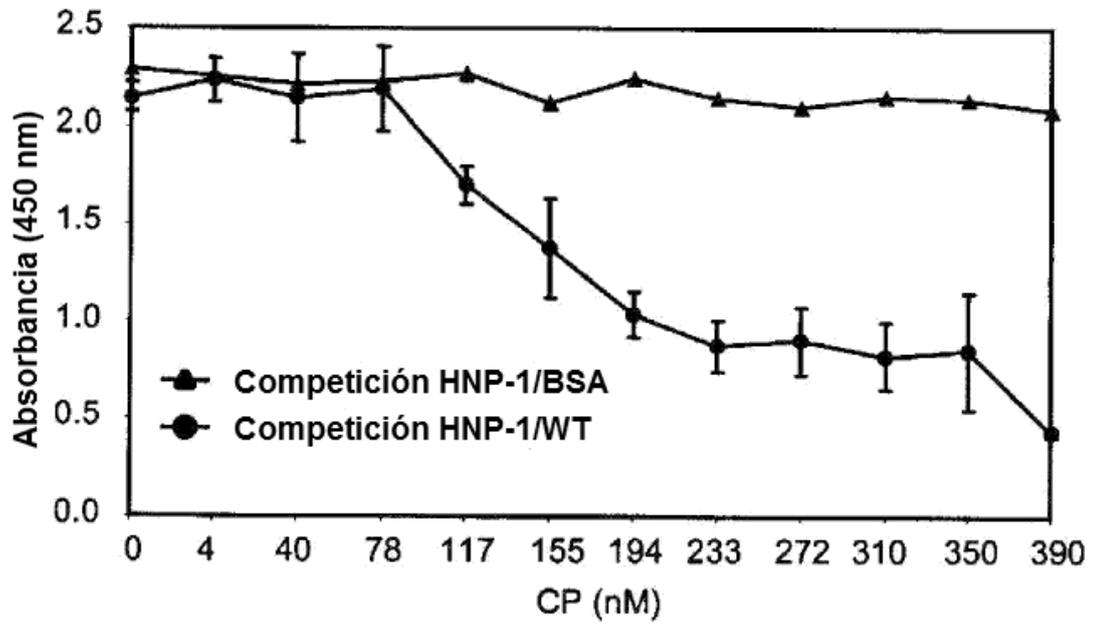
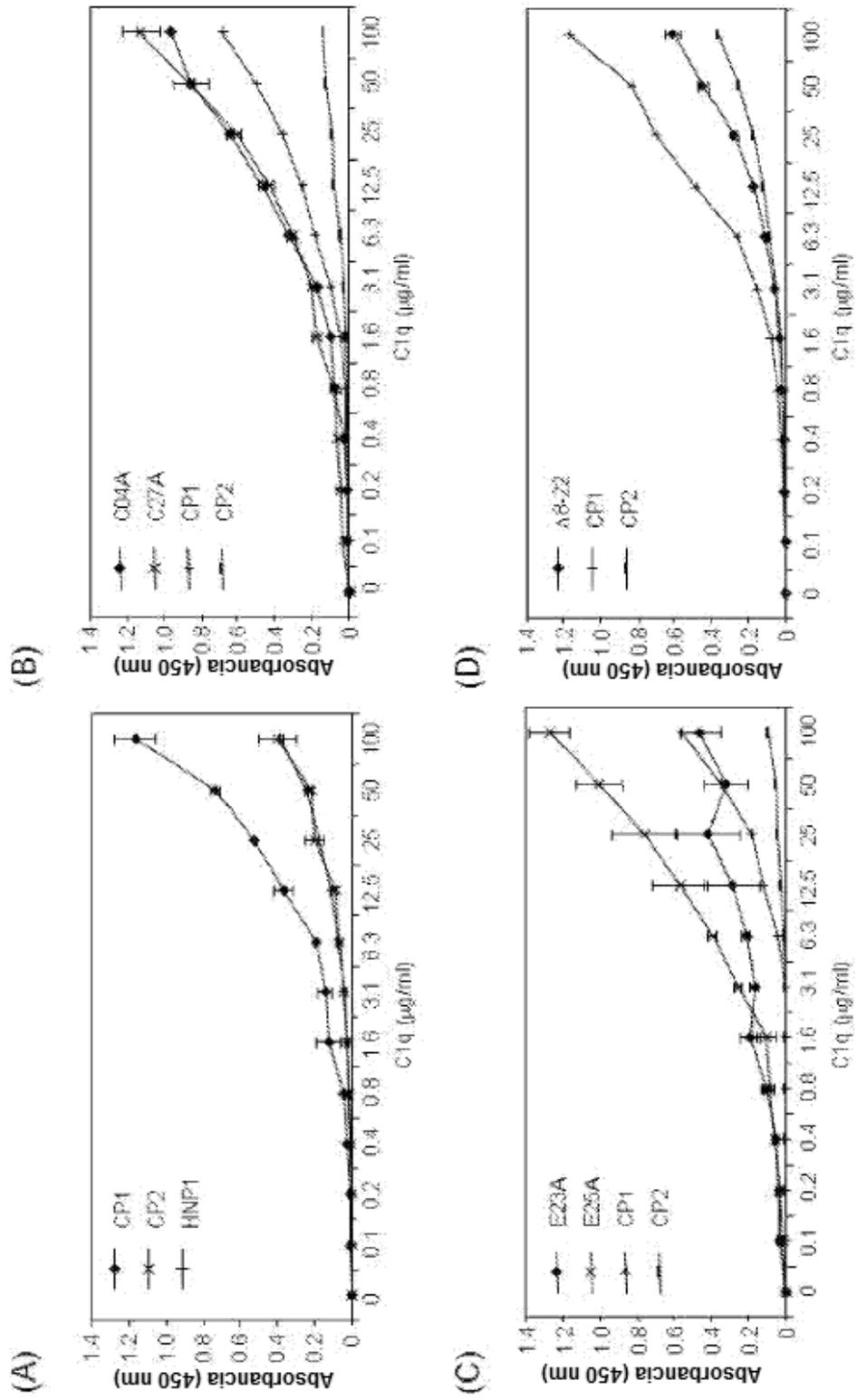


FIGURA 1

FIGURA 3



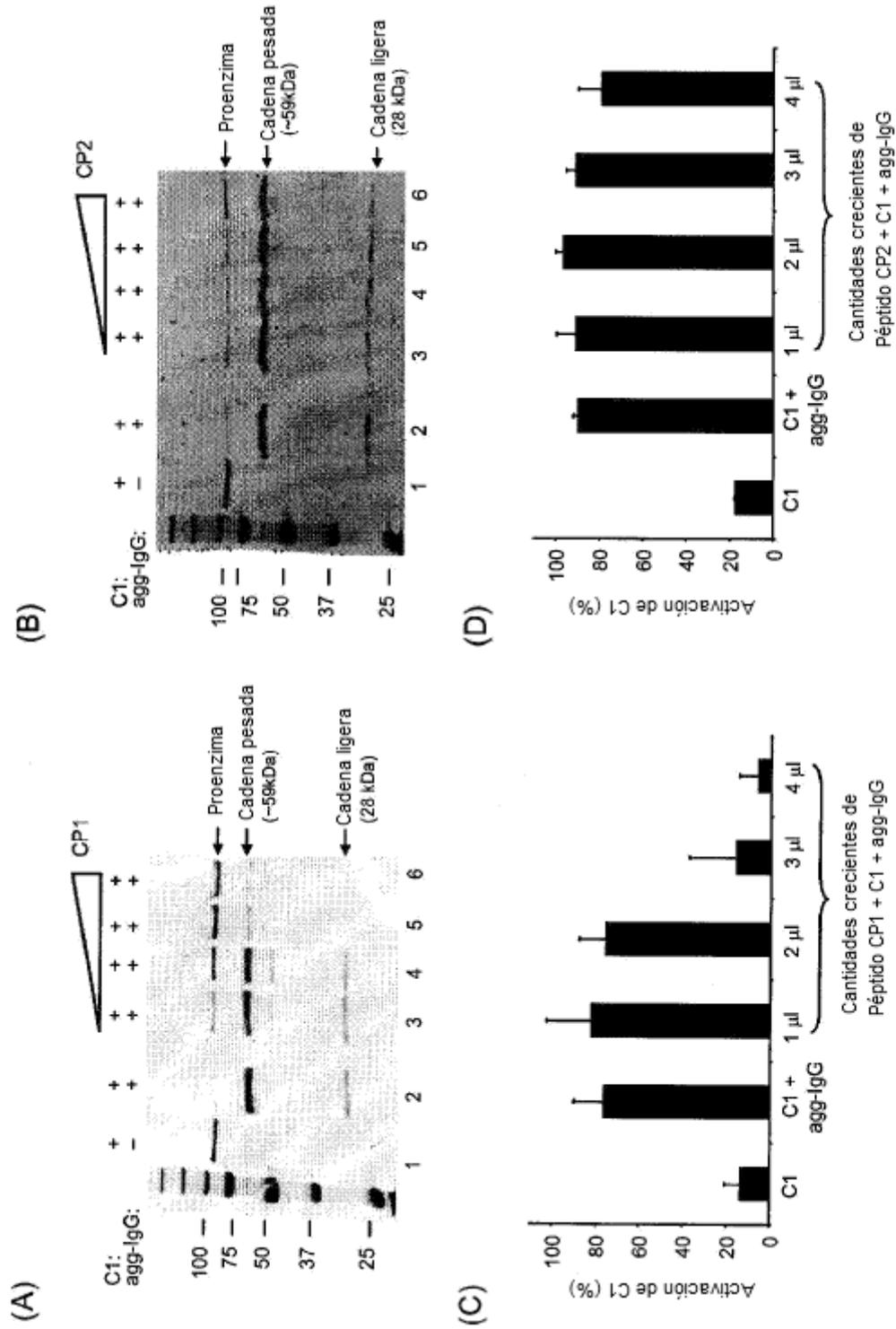


FIGURA 4

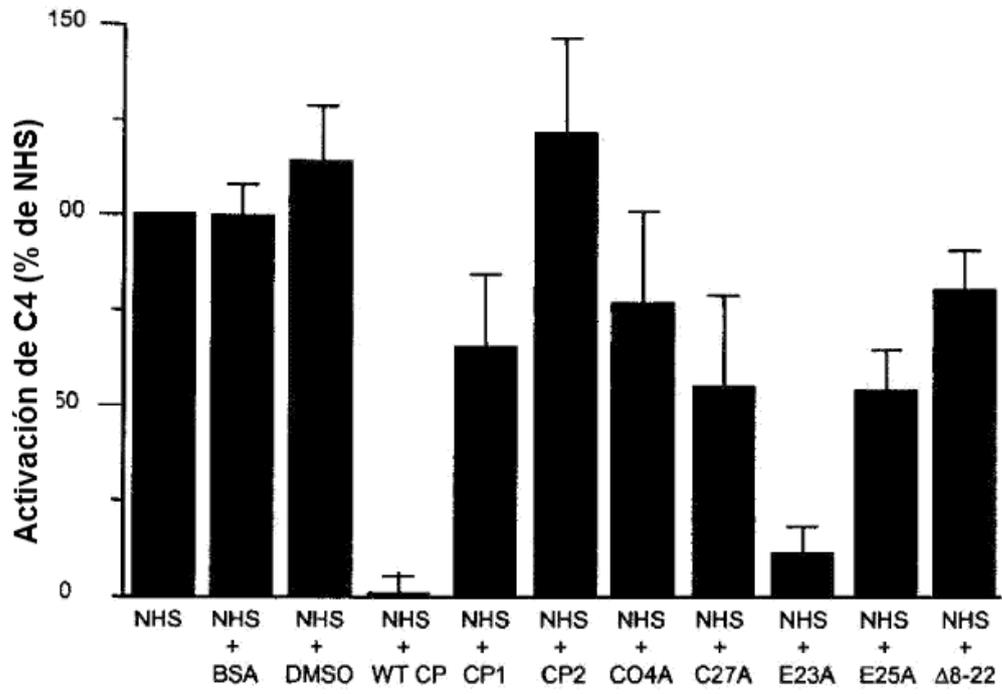


FIGURA 5

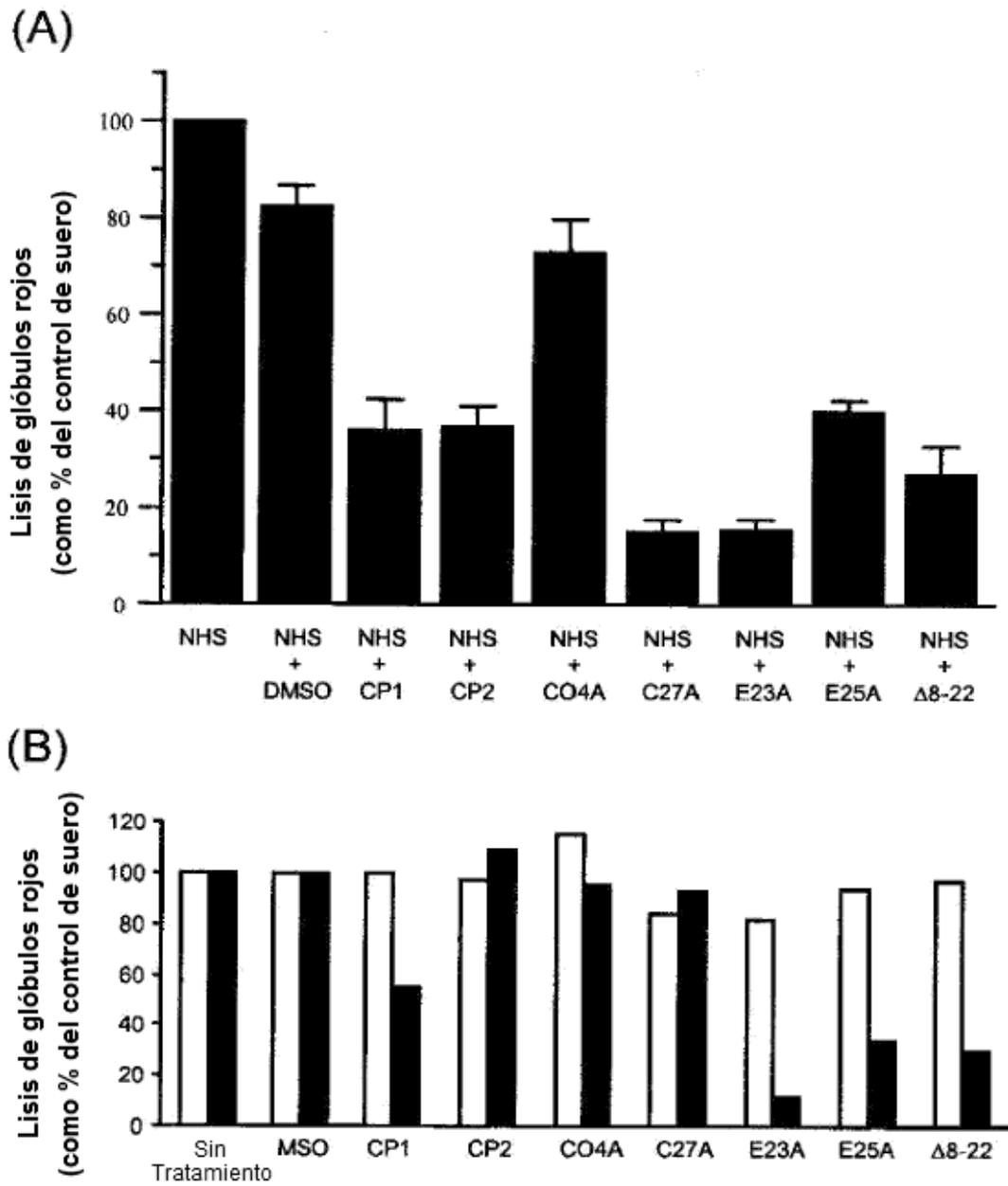


FIGURA 6

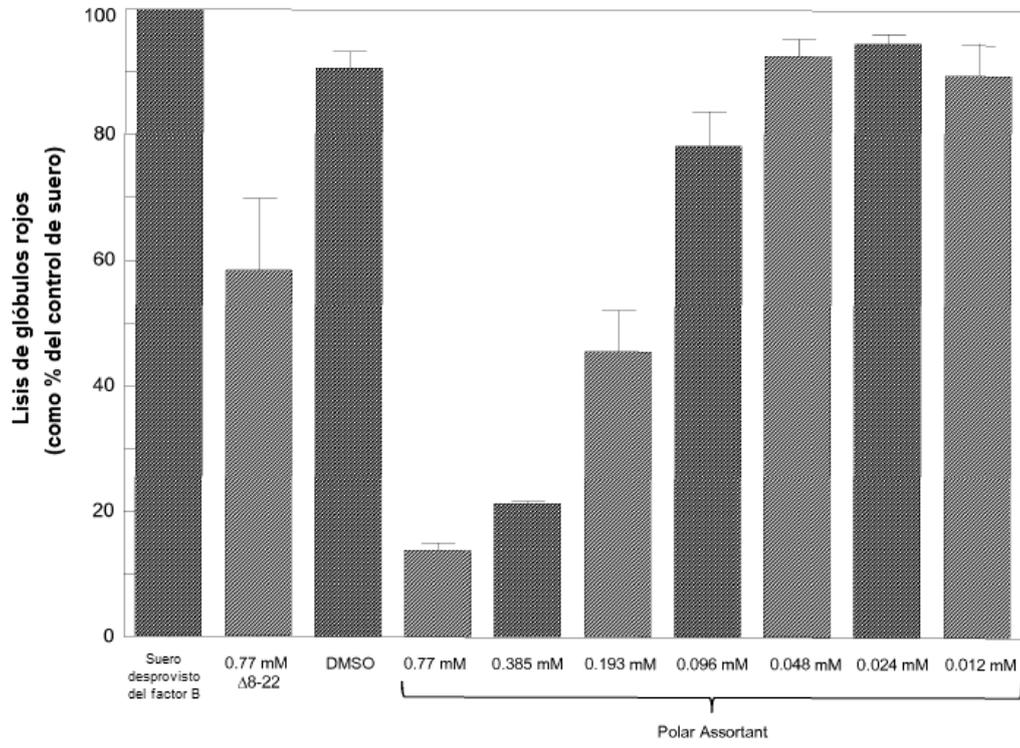


FIGURA 7

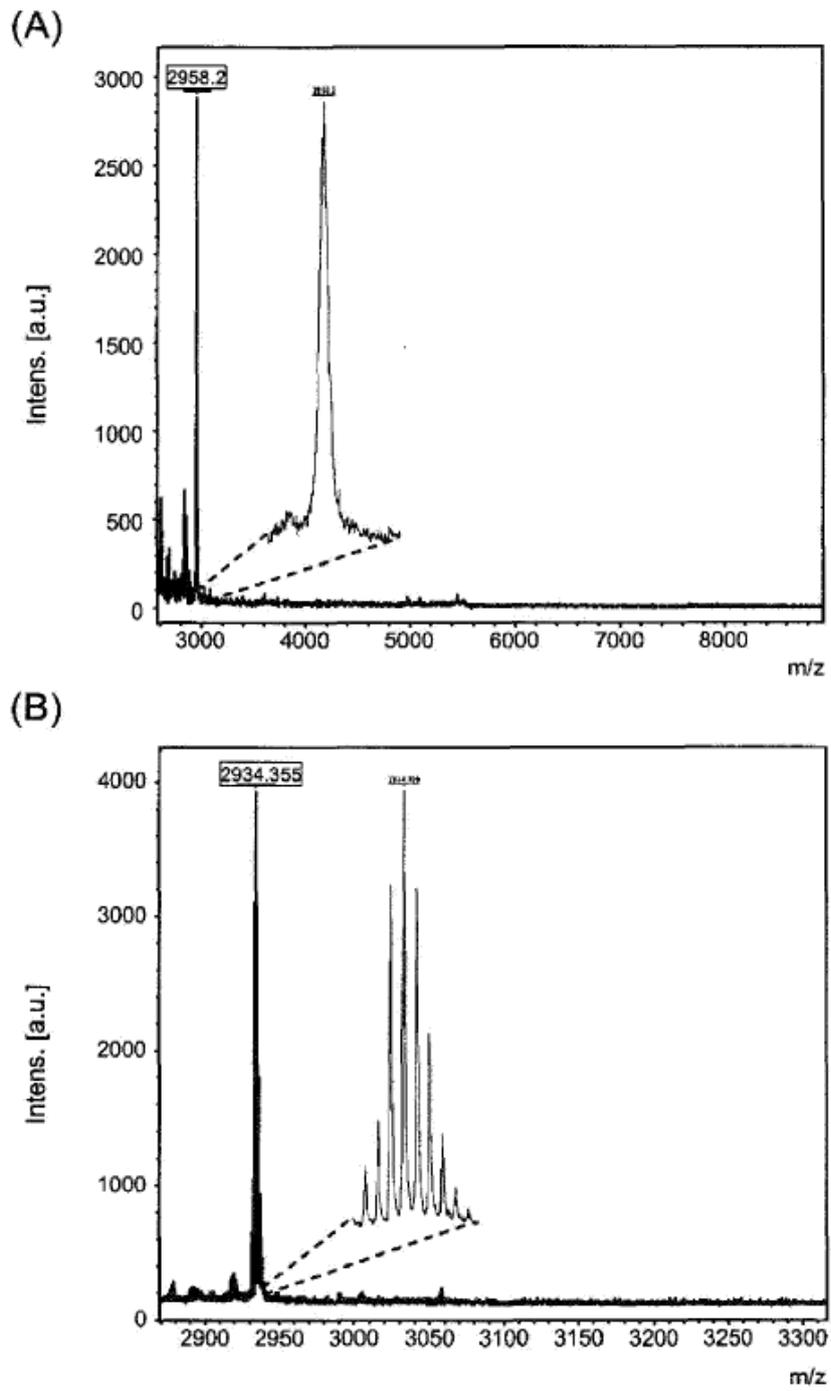


FIGURA 8

(A)

Residuos E23A	2-29	AICQRATATLGTVGSNTSGTTAIEACIL
Residuos VrD1	17-44	TTCAHSCKNRGYIGGNCKGMTRTCYCLV
		: * : : . * : * . * * * * * : :

(B)

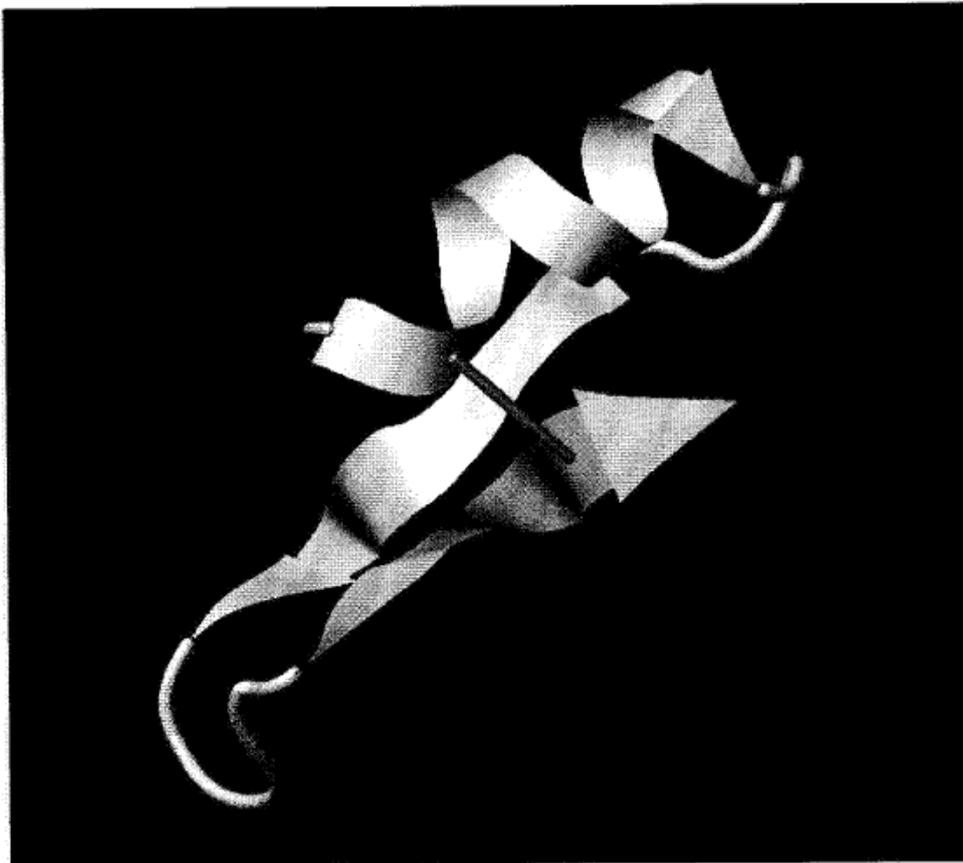


FIGURA 9