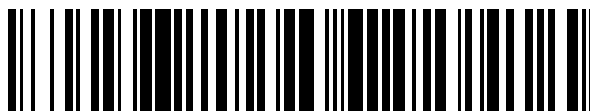


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 625**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2012 PCT/EP2012/069898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050616**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 12778672 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2764140**

54 Título: **Modulación de la especificidad de polipéptidos estructurados**

30 Prioridad:

07.10.2011 GB 201117408

29.03.2012 GB 201205612

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

19.01.2018

73 Titular/es:

BICYCLE THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)

Meditrina

Babraham Research Campus Cambridge CB22

3AT, GB

72 Inventor/es:

TITE, JOHN;

WALKER, EDWARD;

STACE, CATHERINE y

TEUFEL, DANIEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 650 625 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

Modulación de la especificidad de polipéptidos estructurados

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos que están unidos covalentemente a proteínas de andamiaje de tal modo que se delimitan dos o más bucles peptídicos entre los puntos de enlazamiento al andamiaje. La invención describe péptidos que son específicos de la proteasa calicreína plasmática humana.

- Los péptidos cíclicos son capaces de unirse con alta afinidad y especificidad de diana a dianas proteicas y por ello son una clase de moléculas atractiva para el desarrollo de productos terapéuticos. De hecho, se usan ya exitosamente varios péptidos cíclicos en clínica, como por ejemplo el péptido antibacteriano vancomicina, el fármaco inmunosupresor ciclosporina o el fármaco anticanceroso ocreotida (Driggers, y col., *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7 (7), 608-24). Las buenas propiedades de unión son el resultado de una superficie de interacción relativamente grande formada entre el péptido y la diana, así como de la flexibilidad conformacional reducida de las estructuras cíclicas. Típicamente, los macrociclos se unen a superficies de varios cientos de angstroms cuadrados, como por ejemplo el péptido cíclico CVX15 antagonista de CXCR4 (400 Å²; Wu, B., y col., *Science* 330 (6007), 1066-71), un péptido cíclico con el motivo Arg-Gly-Asp de unión a la integrina αVβ3 (355 Å²) (Xiong, J. P. y col., *Science* 2002, 296 (5565), 151-5) o el inhibidor peptídico cíclico upaína-1 de unión al activador de plasminógeno de tipo urocinasa (603 Å²; Zhao, G., y col., *J Struct Biol* 2007, 160 (1), 1-10).

- Debido a su configuración cíclica, los macrociclos peptídicos son menos flexibles que los péptidos lineales, conduciendo a una menor pérdida de entropía tras la unión a dianas y dando como resultado una mayor afinidad de unión. La flexibilidad reducida conduce también a conformaciones específicas de diana bloqueadas, aumentando la especificidad de unión en comparación con péptidos lineales. Este efecto se ha ejemplificado por un potente y selectivo inhibidor de la metaloproteinasa de matriz 8, (MMP-8), que perdía su selectividad frente a otras MMP cuando se abría su anillo (Cherney, R. J., y col., *J Med Chem* 1998, 41 (11), 1749-51). Las propiedades de unión favorables conseguidas mediante la macrociclación son aún más pronunciadas en péptidos multicíclicos que tienen más de un anillo peptídico como, por ejemplo, en vancomicina, nisina o actinomicina.

- Diferentes equipos de investigación han anclado anteriormente polipéptidos con residuos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp, D. S. y McNamara, P. E., *J. Org. Chem*, 1985; Timmerman, P. y col., *ChemBioChem*, 2005). Meloen y colaboradores han usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para una ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos sobre andamiajes sintéticos para la mimesis estructural de superficies proteicas (Timmerman, P. y col., *ChemBioChem*, 2005). Se divulgan procedimientos para la generación de compuestos candidatos a fármacos donde dichos compuestos se generan ligando polipéptidos que contienen cisteína con un andamiaje molecular, como por ejemplo tris(bromometil)benceno, en los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161.

- El documento WO2004/077062 divulga un procedimiento de selección de un compuesto candidato a fármaco. En particular, este documento divulga diversas moléculas de andamiaje que comprenden un primer y segundo grupos reactivos, y poner en contacto dicho andamiaje con una molécula adicional para formar al menos dos ligaduras entre el andamiaje y la molécula adicional en una reacción de acoplamiento.

- El documento WO2006/078161 divulga compuestos de unión, compuestos inmunogénicos y peptidomiméticos. Este documento divulga la síntesis artificial de diversas recopilaciones de péptidos tomados de proteínas existentes. Se combinan entonces estos péptidos con un péptido sintético constante que tiene algunos cambios aminoacídicos introducidos para producir colecciones combinatorias. Al introducir esta diversidad mediante la ligadura química para separar péptidos que presentan diversos cambios aminoacídicos, se proporciona una oportunidad aumentada de encontrar la actividad de unión deseada. La Figura 1 de este documento muestra una representación esquemática de la síntesis de diversos constructos peptídicos de bucle. Los constructos divulgados en este documento se basan en péptidos funcionalizados con -SH, típicamente que comprenden residuos de cisteína y grupos heteroaromáticos en el andamiaje, típicamente que comprenden sustituyentes halógeno bencílico tales como bisbromofenilbenceno o trisbromofenilbenceno. Tales grupos reaccionan forman una ligadura tioéter entre el péptido y el andamiaje

- Se ha desarrollado recientemente un enfoque combinatorio basado en exhibición en fago para generar y cribar en grandes colecciones de péptidos bicíclicos dianas de interés (Heinis, y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7; véase también la solicitud de patente internacional WO2009/098450). Brevemente, se exhibieron en fago colecciones combinatorias de péptidos lineales que contienen tres residuos de cisteína y dos regiones de seis aminoácidos aleatorios (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) y se ciclaron ligando covalentemente las cadenas laterales de cisteína con una molécula pequeña (tris-(bromometil)benceno). Los péptidos bicíclicos aislados en selecciones de afinidad con las proteasas humanas catepsina G y calicreína plasmática (PK) tenían constantes inhibitoras nanomolares. El mejor inhibidor, PK15, inhibe la PK humana (hPK) con una K_i de 3 nM. Las similitudes en las secuencias

aminoácidas de varios péptidos bicíclicos aislados sugerían que ambos bucles peptídicos contribuyen a la unión. PK15 no inhibía PK de rata (81 % de identidad de secuencia) ni las serinproteasas humanas homólogas factor XIa (HfXIa; 69 % de identidad de secuencia) o trombina (36 % de identidad de secuencia) a la máxima concentración ensayada (10 μ M) (Heinis, y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7). Este hallazgo sugería que el inhibidor bicíclico es altamente específico y que no se inhibirán otras serinproteasas humanas similares a tripsina. Un inhibidor peptídico pequeño sintético tal como PK15, que tiene la potencia y selectividad de diana anteriormente descritas, tiene aplicación potencial como producto terapéutico para controlar la actividad de PK en angioedema hereditario, una enfermedad potencialmente mortal que se caracteriza por episodios recurrentes de edema, ni para prevenir la activación por contacto en cirugía de derivación cardiopulmonar.

10

Se aisló el péptido PK15 de una colección basada en el péptido PK2, H-ACSDRFRNCPLWSGTCG-NH₂, en que se aleatorizaba el segundo bucle de 6 aminoácidos. La secuencia de PK15 era H-ACSDRFRNCPADEALCG-NH₂, y la constante de unión CI50 por calicreína humana era de 1,7 nM.

15 Resumen de la invención

Se ha analizado la especificidad de polipéptidos estructurados seleccionados frente a calicreína humana de una serie de colecciones con diferentes longitudes de bucle. Como resultado, se ha tenido éxito en aislar péptidos estructurados capaces de unirse a calicreína con especificidades de unión mejoradas.

20

En un primer aspecto, se proporciona un ligando peptídico específico de calicreína humana que comprende un polipéptido que comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de tal modo que se formen al menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, donde los bucles del ligando peptídico comprenden tres, cuatro o cinco, pero menos de seis, aminoácidos.

25

Sorprendentemente, se ha encontrado que los péptidos que comprenden menos de 6 aminoácidos en cada bucle pueden tener una afinidad de unión mucho mayor por calicreína. Por ejemplo, los péptidos 5x5 descritos en la presente memoria consiguen constantes de unión de 0,08 nM o menos.

30

En una realización, los bucles del ligando peptídico comprenden tres aminoácidos y el polipéptido tiene la secuencia de consenso G_rFxxG_rRVxG_r, donde G_r es un grupo reactivo.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser uno de los polipéptidos expuestos en la Tabla 3.

35

En otra realización, los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende la secuencia de consenso G_rGGxxNG_r, donde G_r es un grupo reactivo.

Por ejemplo, dos bucles adyacentes del polipéptido pueden comprender la secuencia de consenso G_rGGxxNG_rRxxxxG_r.

40

Por ejemplo, el polipéptido puede ser uno de los péptidos expuestos en la Tabla 4.

En una realización, los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo G_rX^W/_FPX^K/_RG_r, donde G_r es un grupo reactivo. En el presente contexto, la referencia a un "primer" bucle no denota necesariamente una posición particular del bucle en una secuencia. En algunas realizaciones, sin embargo, el primer bucle puede ser un bucle proximal en una secuencia peptídica de extremo amino a extremo carboxi. Por ejemplo, el polipéptido comprende además un segundo bucle distal que comprende el motivo G_r^T/_LH^Q/_TxLG_r. Los ejemplos de secuencias del primer bucle incluyen G_rxWPARG_r, G_rxWPSRG_r, G_rxFPFRG_r y G_rxFPYRG_r. En estos ejemplos, x puede ser cualquier aminoácido, pero es por ejemplo S o R.

50

En una realización, los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo G_rxHxDLG_r, donde G_r es un grupo reactivo.

55

En una realización, los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle que comprende el motivo G_rTHxxLG_r, donde G_r es un grupo reactivo.

En una realización, el polipéptido comprende dos bucles adyacentes que comprenden el motivo G_rX^W/_FPX^K/_RG_r^T/_LH^Q/_TDLG_r.

60

Se ha mostrado que la naturaleza de ciertas posiciones puede influir en otras posiciones de la secuencia. En particular, los experimentos realizados con los péptidos 06-34 y 06-34-03 demuestran que la posiciones 1 y 6

influyen en la posición 4. Preferiblemente, la posición 4 es A solo si las posiciones 1 y 6 son S y T, respectivamente.

En los ejemplos de la presente memoria, la numeración hace referencia a las posiciones en los bucles, e ignora los grupos reactivos. Por tanto, en $G_rX^W/F_PX^K/R_GT/LHQ/TDLG_r$, x está en posición 1 y T/L en posición 6.

5

Por ejemplo, el polipéptido puede ser uno de los polipéptidos expuestos en la Tabla 4, Tabla 5 o Tabla 6.

Por ejemplo, el ligando polipeptídico puede comprender uno de los polipéptidos expuestos en las Tablas 4 a 6.

10 En las realizaciones anteriores, el grupo reactivo es preferiblemente un aminoácido reactivo. Preferiblemente, el aminoácido reactivo es cisteína.

Pueden prepararse como se describe anteriormente variantes de los polipéptidos de acuerdo con este aspecto de la invención, identificando aquellos residuos que están disponibles para mutación y preparando colecciones que
15 incluyan mutaciones en esas posiciones. Por ejemplo, el polipéptido 06-56 en la Tabla 4 puede mutar sin pérdida de actividad en las posiciones Q4 y T10 (véanse los Ejemplos siguientes). Pueden seleccionarse ligandos polipeptídicos que comprendan mutaciones en estas posiciones que tienen actividad de unión mejorada en comparación con 06-56.

20 En un aspecto adicional, se proporciona un ligando polipeptídico de acuerdo con el aspecto precedente de la invención que comprende uno o más sustituyentes aminoacídicos no naturales y que es resistente a la degradación por proteasa.

Se ha encontrado que ciertos aminoácidos no naturales permiten la unión a calicreína plasmática con K_i de nM,
25 mientras que aumentan significativamente el tiempo de residencia en el plasma.

En una realización, se selecciona el aminoácido no natural de N-metilarginina, homoarginina e hidroxiprolina. Preferiblemente, se usan derivados de N-metilo y homoderivados de arginina para reemplazar la arginina, y la prolina 3 puede reemplazarse preferiblemente por hidroxiprolina, ácido azetidincaboxílico o un aminoácido alfa-
30 sustituido, tal como ácido aminoisobutírico. En otra realización, la arginina puede reemplazarse por guanidilfenilalanina.

En una realización, el polipéptido comprende un primer bucle que comprende el motivo $G_rXWPARG_r$, donde P se reemplaza por ácido azetidincaboxílico y/o R se reemplaza por N-metilarginina y/o R se reemplaza por
35 homoarginina y/o R se reemplaza por guanidilfenilalanina.

En una realización, el polipéptido comprende un primer bucle que comprende el motivo $G_rXFPYRG_r$, donde R se reemplaza por N-metilarginina y/o R se reemplaza por homoarginina, y donde la prolina se reemplaza por ácido azetidincaboxílico y/o R se reemplaza por guanidilfenilalanina.

40

Se describe también un procedimiento para producir un ligando polipeptídico mutante para producir un nivel mejorado de actividad de unión para una diana frente a la de un ligando polipeptídico original, donde el ligando polipeptídico original comprende un polipéptido que comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos
45 del polipéptido de tal modo que se formen al menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, que comprende las etapas de: (a) para cada una de las dos o más posiciones aminoacídicas en cada una de las secuencias de bucle, producir n colecciones diferentes de mutantes, consistiendo cada colección en los polipéptidos originales en que una de dichas posiciones aminoacídicas en la secuencia de bucle ha mutado por reemplazo con uno de n aminoácidos no originales diferentes; (b) cribar en cada colección la unión a la diana original y puntuar
50 cada mutación y (c) identificar las posiciones aminoacídicas en que se toleran mutaciones y (d) producir uno o más polipéptidos mutantes que comprenden una o más mutaciones localizadas en las posiciones aminoacídicas identificadas en la etapa (c).

En una realización, la etapa (d) comprende preparar una colección que comprende polipéptidos que incorporan
55 mutaciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas identificadas en la etapa (c) y cribar en la colección polipéptidos con un nivel mejorado de actividad de unión a la diana.

El valor de n puede seleccionarse de acuerdo con el número de mutantes diferentes que se pretenda crear en cada colección. Por ejemplo, si se desean mutantes que comprendan todos los aminoácidos naturales posibles, n puede ser 20. Si se incluyen aminoácidos no naturales, tales como aminoácidos N-metilados, n puede ser mayor de 20, tal como 22 o 23. Por ejemplo, n puede ser 2 o más; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

60

Se proporciona también una colección de ligandos polipeptídicos donde los ligandos polipeptídicos comprenden un polipéptido que comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de tal modo que se formen al menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, consistiendo dicha colección en m diferentes
5 mutantes de un ligando polipeptídico en que se ha mutado una posición aminoacídica definida en las secuencias de bucle por reemplazo por uno de m diferentes aminoácidos, donde m es al menos 2.

Se proporciona también un conjunto de colecciones de ligandos polipeptídicos, donde los ligandos polipeptídicos comprenden un polipéptido que comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias
10 de bucle, y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de tal modo que se formen al menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, comprendiendo dicho conjunto dos o más colecciones de ligandos polipeptídicos y consistiendo cada una de dichas colecciones de ligandos polipeptídicos en m diferentes mutantes de un ligando polipeptídico en que se ha mutado una posición aminoacídica definida en las secuencias de bucle por reemplazo por uno de m diferentes aminoácidos.

15 Preferiblemente, m está entre 2 y 20; en realizaciones, m es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, o más, como se propone con respecto a n anterior.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un ligando peptídico que comprende un polipéptido que
20 comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un andamiaje molecular que forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de tal modo que se formen al menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, donde el péptido se modifica mediante la incorporación de al menos un aminoácido no natural.

25 Preferiblemente, el ligando peptídico de acuerdo con el presente aspecto de la invención es resistente a proteasas. La sustitución o sustituciones aminoacídicas no naturales aumentan el nivel de resistencia a proteasas del polipéptido.

En una realización, se selecciona el aminoácido no natural de N-metilarginina, homoarginina y ácido
30 azetidincarboxílico y guanidilfenilalanina. Preferiblemente, se usan derivados de N-metilo y homoderivados de arginina para reemplazar a arginina, y el ácido azetidincarboxílico reemplaza a prolina. En otra realización, puede reemplazarse la arginina por guanidilfenilalanina.

Breve descripción de las figuras

35 **Figura 1** Selección en fago de péptidos bicíclicos. (a) Colecciones en fago de péptidos bicíclicos. Se indican los aminoácidos aleatorios como "X", alanina como "A" y los tres residuos constantes de cisteína como "C". (b) Formato de las estructuras peptídicas bicíclicas sintetizadas químicamente que tienen bucles de 3, 5 o 6 aminoácidos. Se generan las estructuras ligando péptidos lineales a través de tres cadenas laterales de cisteína con
40 tris(bromometil)benceno (TBMB). Los aminoácidos que varían en los péptidos bicíclicos se indican con "Xaa". (c-e) Secuencias de péptidos bicíclicos aislados de la colección 5x5 (c), la colección 3x3 A (d) y la colección 3x3 B (e). Las similitudes en aminoácidos se resaltan por sombreado.

Figura 2 Comparación de los aminoácidos de superficie de hPK y serinproteasas homólogas. (a) Estructura de hPK
45 (entrada de PDB 2ANW) con representación superficial. Los átomos de aminoácidos que se exponen en la superficie y más cercanos que 4, 8 y 12 Å a la benzamidina (en gris) unida al bolsillo S1 están teñidos más oscuros. (b) Estructura de hPK. Se resaltan las cadenas laterales de aminoácidos que son diferentes en hFXla. (c) Estructura de hPK. Se resaltan las cadenas laterales de aminoácidos que son diferentes en rPK.

50 **Figura 3** Representación gráfica del procedimiento usado para la determinación de los residuos preferidos para mutación en ligandos polipeptídicos.

Figura 4 Análisis de las sustituciones aminoacídicas en el péptido 06-34 (Tabla 4) en la unión del péptido a
55 caliceína plasmática 2 nM. Para cada posición, se muestra el efecto de diversas mutaciones en esa posición, en comparación con la secuencia original.

Figura 5 Análisis de las sustituciones aminoacídicas en el péptido 06-56 (Tabla 4) en la unión del péptido a
caliceína plasmática 2 nM. Para cada posición, se muestra el efecto de diversas mutaciones en esa posición, en
60 comparación con la secuencia original.

Figura 6 Análisis de las sustituciones aminoacídicas en el péptido 06-56 (Tabla 4) en la unión del péptido a
caliceína plasmática 10 nM. Para cada posición, se muestra el efecto de diversas mutaciones en esa posición, en

comparación con la secuencia original.

Figura 7 Resultado del espectro de masas que muestra los aspectos de masas de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ después de exposición a plasma de rata al 35 % a t₀, 1 día, 2 días y 3 días (procedimiento 1). Las precisiones de masa varían algo debido a iones interferentes y las bajas concentraciones de los fragmentos; sin embargo es posible la identificación de fragmentos proteolíticos discretos.

Figura 8 Estructuras químicas de los metabolitos M1, M2 y M3 de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ identificados después de exposición a plasma de rata.

Figura 9 Estructura química del compuesto principal Ac-06-34-18(TMB)-NH₂.

Figura 10 Ensayo de inhibición enzimática de calicreína por el compuesto principal Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ y sus derivados de primer bucle permutado. Se observa una espectacular reducción de la afinidad, subrayando la importancia de la integridad del farmacóforo WPAR.

Figure 11 Estructuras químicas de la arginina y sus análogos.

Figura 12 Estructura química del Trp y análogos hidrófobos potenciales.

Figura 13 Estructuras químicas de la Pro y análogos restringidos potenciales.

Figura 14 Inhibición comparativa de calicreína por Aze3, NMeArg5 y Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ doblemente modificado.

Figura 15 Estructuras químicas de la alanina y derivados de la misma.

Figura 16 Inhibición comparativa de calicreína por F2Y4, F2Y2 HR5 y Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ doblemente modificado.

Descripción detallada de la invención

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por los especialistas en la materia, tal como en las técnicas de química de péptidos, cultivo celular y exhibición en fago, química de ácidos nucleicos y bioquímica. Se usan técnicas estándares de biología molecular, genética y procedimientos bioquímicos (véanse Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc.), que se incorporan a la presente memoria como referencia.

Un ligando peptídico, como se hace referencia en la presente memoria, hace referencia a un péptido unido covalentemente a un andamiaje molecular. Típicamente, tales péptidos comprenden dos o más grupos reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes con el andamiaje, y una secuencia delimitada entre dichos grupos reactivos a la que se hace referencia como la secuencia de bucle, puesto que forma un bucle cuando el péptido se une al andamiaje. En el presente caso, los péptidos comprenden al menos tres grupos reactivos y forman al menos dos bucles en el andamiaje.

Los grupos reactivos son grupos capaces de formar un enlace covalente con el andamiaje molecular. Típicamente, los grupos reactivos están presentes en cadenas laterales aminoácidas del péptido. Son ejemplos grupos que contienen amino tales como cisteína, lisina y selenocisteína.

Especificidad, en el contexto de la presente memoria, hace referencia a la capacidad de un ligando de unirse o interaccionar de otro modo con su diana asociada con la exclusión de entidades que sean similares a la diana. Por ejemplo, especificidad puede hacer referencia a la capacidad de un ligando de inhibir la interacción de una enzima humana, pero no una enzima homóloga de una especie diferente. Usando el enfoque descrito en la presente memoria, puede modularse la especificidad, es decir aumentarse o disminuirse, para hacer a los ligandos más o menos capaces de interaccionar con homólogos o parálogos de la diana pretendida. No se pretende que especificidad sea sinónimo de actividad, afinidad o aidez, y la potencia de la acción de un ligando sobre su diana (tal como por ejemplo afinidad de unión o nivel de inhibición) no está necesariamente relacionada con su especificidad.

Actividad de unión, como se usa en la presente memoria, hace referencia a medidas de unión cuantitativas tomadas

de ensayos de unión, por ejemplo como se describen en la presente memoria. Por lo tanto, actividad de unión hace referencia a la cantidad de ligando peptídico que está unida a una concentración de diana dada.

Multiespecificidad es la capacidad de unirse a dos o más dianas. Típicamente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una sola diana, tal como un epítipo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades conformacionales. Sin embargo, pueden desarrollarse péptidos que pueden unirse a dos o más dianas; anticuerpos específicos duales, por ejemplo como se conocen en la materia a la que se hace referencia anteriormente. En la presente invención, los ligandos peptídicos pueden ser capaces de unirse a dos o más dianas y son por lo tanto multiespecíficos. Preferiblemente, se unen a dos dianas, y son específicos duales. La unión puede ser independiente, lo que significaría que los sitios de unión para las dianas en el péptido no están estructuralmente impedidos por la unión de una u otra de las dianas. En este caso, ambas dianas pueden unirse independientemente. Más generalmente, se espera que la unión de una diana impida al menos parcialmente la unión de la otra.

Hay una diferencia fundamental entre un ligando específico dual y un ligando con especificidad que engloba dos dianas relacionadas. En el primer caso, el ligando es específico de ambas dianas individualmente e interacciona con cada una de manera específica. Por ejemplo, el primer bucle en el ligando puede unirse a una primera diana, y un segundo bucle a una segunda diana. En el segundo caso, el ligando es no específico debido a que no diferencia entre las dos dianas, por ejemplo interaccionando con un epítipo de las dianas que es común a ambas.

En el contexto de la presente invención, es posible que un ligando que tiene actividad con respecto, por ejemplo, a una diana y un ortólogo, pueda ser un ligando biespecífico. Sin embargo, en una realización el ligando no es biespecífico, sino que tiene una especificidad menos precisa de tal modo que se une tanto a la diana como a uno o más ortólogos. En general, un ligando que no se ha seleccionado frente tanto a una diana como a su ortólogo es menos probable que sea biespecífico como resultado de la modulación de la longitud del bucle.

Si los ligandos son verdaderamente biespecíficos, en una realización al menos una de las especificidades de diana de los ligandos será común entre los ligandos seleccionados, y el nivel de esa especificidad puede modularse por los procedimientos divulgados en la presente memoria. Una segunda o adicionales especificidades no tienen que ser compartidas, y no tienen que ser sujeto de los procedimientos expuestos en la presente memoria.

Una diana es una molécula o parte de la misma con la que los ligandos peptídicos se unen o interaccionan de otro modo. Aunque se observa la unión como un prerrequisito para actividad de la mayoría de clases, y puede ser una actividad en sí misma, se prevén otras actividades. Por tanto, la invención no requiere la medida de la unión directa o indirectamente.

El andamiaje molecular es cualquier molécula que sea capaz de conectar el péptido en múltiples puntos para conferir uno o más rasgos estructurales al péptido. No es un reticulante, porque no reemplaza simplemente un enlace disulfuro; en lugar de ello, proporciona dos o más puntos de enlazamiento para el péptido. Preferiblemente, el andamiaje molecular comprende al menos tres puntos de enlazamiento para el péptido, a los que se hace referencia como grupos reactivos de andamiaje. Estos grupos son capaces de reaccionar con los grupos reactivos del péptido formando un enlace covalente. Se describen a continuación estructuras preferidas para andamiajes moleculares.

Se realiza el cribado de la actividad de unión (o cualquier otra actividad deseada) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia, por ejemplo de tecnología de exhibición en fago. Por ejemplo, pueden usarse dianas inmovilizadas en una fase sólida para identificar y aislar los miembros de unión de un repertorio. El cribado permite la selección de los miembros de un repertorio de acuerdo con las características deseadas.

El término colección hace referencia a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La colección está compuesta por miembros que no son idénticos. En este sentido, colección es sinónimo de repertorio. Las diferencias de secuencia entre los miembros de la colección son responsables de la diversidad presente en la colección. La colección puede tomar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una colección de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene solo uno o un número limitado de miembros de la colección.

En una realización, se incorporan ácidos nucleicos a vectores de expresión para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una colección puede tomar la forma de una población de organismos hospedadores, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la colección en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su correspondiente miembro polipeptídico. Por tanto, la población de organismos hospedadores tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

En una realización, una colección de ácidos nucleicos codifica un repertorio de polipéptidos. Cada miembro ácido nucleico de la colección tiene preferiblemente una secuencia relacionada con uno o más de otros miembros de la colección. Se entiende por secuencia relacionada una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50 % de identidad, por ejemplo al menos un 60 % de identidad, por ejemplo al menos un 70 % de identidad, por ejemplo al menos un 80 % de identidad, por ejemplo al menos un 90 % de identidad, por ejemplo al menos un 95 % de identidad, por ejemplo al menos un 98 % de identidad, por ejemplo al menos un 99 % de identidad con al menos otro miembro de la colección. La identidad puede juzgarse en un segmento continuo de al menos 3 aminoácidos, por ejemplo al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, por ejemplo al menos 12 aminoácidos, por ejemplo al menos 14 aminoácidos, por ejemplo al menos 16 aminoácidos, por ejemplo al menos 17 aminoácidos o la longitud completa de la secuencia de referencia.

Un repertorio es una recopilación de variantes, en este caso variantes polipeptídicas, que difieren en su secuencia. Típicamente, la localización y naturaleza de los grupos reactivos no variará, pero las secuencias que forman los bucles entre ellos pueden aleatorizarse. Los repertorios difieren en tamaño, pero debería considerarse que comprenden al menos 10^2 miembros. Pueden construirse repertorios de 10^{11} o más miembros.

Un conjunto de ligandos polipeptídicos, como se usa en la presente memoria, hace referencia a una pluralidad de ligandos polipeptídicos que pueden someterse a selección en los procedimientos descritos. Potencialmente, un conjunto puede ser un repertorio, pero puede ser también una recopilación pequeña de polipéptidos, de al menos 2 hasta 10, 20, 50, 100 o más.

Un grupo de ligandos polipeptídicos, como se usa en la presente memoria, hace referencia a dos o más ligandos. En una realización, un grupo de ligandos comprende solo ligandos que comparten al menos una especificidad de diana. Típicamente, un grupo consistirá en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, 20, 50, 100 o más ligandos. En una realización, un grupo consiste en 2 ligandos.

(A) Construcción de ligandos peptídicos

(i) Andamiaje molecular

Se describen andamiajes moleculares, por ejemplo, en el documento WO2009098450 y referencias citadas en el mismo, particularmente los documentos WO2004077062 y WO2006078161.

Como se señala en los documentos anteriores, el andamiaje molecular puede ser una molécula pequeña, tal como una molécula orgánica pequeña.

En una realización, el andamiaje molecular puede ser, o puede estar basado en, monómeros naturales tales como nucleósidos, azúcares o esteroides. Por ejemplo, el andamiaje molecular puede comprender un polímero corto de tales entidades, tales como un dímero o un trímero.

En una realización, el andamiaje molecular es un compuesto de toxicidad conocida, por ejemplo de baja toxicidad. Los ejemplos de compuestos adecuados incluyen colesterol, nucleótidos, esteroides o fármacos existentes tales como tamazepam.

En una realización, el andamiaje molecular puede ser una macromolécula. En una realización, el andamiaje molecular es una macromolécula compuesta por aminoácidos, nucleótidos o carbohidratos.

En una realización, el andamiaje molecular comprende grupos reactivos que son capaces de reaccionar con un grupo o grupos funcionales del polipéptido formando enlaces covalentes.

El andamiaje molecular puede comprender grupos químicos como aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, azidas, anhídridos, succinimidas, maleimidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

En una realización, el andamiaje molecular puede comprender o puede consistir en tris(bromometil)benceno, especialmente 1,3,5-tris(bromometil)benceno ('TBMB'), o un derivado del mismo.

En una realización, el andamiaje molecular es 2,4,6-tris(bromometil)mesitileno. Es similar al 1,3,5-tris(bromometil)benceno, pero contiene adicionalmente tres grupos metilo enlazados con el anillo de benceno. Esto tiene la ventaja de que los grupos metilo adicionales pueden formar contactos adicionales con el polipéptido y por ello añadir restricción estructural adicional.

El andamiaje molecular de la invención contiene grupos químicos que permiten a los grupos funcionales del polipéptido de la colección codificada de la invención formar ligaduras covalentes con el andamiaje molecular. Dichos grupos químicos se seleccionan de entre una amplia variedad de funcionalidades incluyendo aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, anhídridos, succinimidas, maleimidas, azidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

(ii) Polipéptido

Los grupos reactivos de los polipéptidos pueden proporcionarse por cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales. Los grupos reactivos de los polipéptidos pueden seleccionarse de entre grupos tiol, grupos amino, grupos carboxilo, grupos guanidinio, grupos fenólicos o grupos hidroxilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos pueden seleccionarse de entre grupos azida, cetocarboxilo, alquino, vinilo o haluro de alquilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos para ligar con un andamiaje molecular pueden ser los extremos amino o carboxi del polipéptido.

En algunas realizaciones, cada uno de los grupos reactivos del polipéptido para ligar a un andamiaje molecular son del mismo tipo. Por ejemplo, cada grupo reactivo puede ser un residuo de cisteína. Se proporcionan detalles adicionales en el documento WO2009098450.

En algunas realizaciones, los grupos reactivos para ligar a un andamiaje molecular pueden comprender dos o más tipos diferentes, o pueden comprender tres o más tipos diferentes. Por ejemplo, los grupos reactivos pueden comprender dos residuos de cisteína y un residuo de lisina, o pueden comprender un residuo de cisteína, un residuo de lisina y una amina N-terminal.

Puede emplearse cisteína porque tiene la ventaja de que su reactividad es la más diferente de todos los demás aminoácidos. Los grupos reactivos de andamiaje que podrían usarse en el andamiaje molecular para reaccionar con los grupos tiol de las cisteínas son haluros de alquilo (o también llamados halogenoalcanos o haloalcanos). Son ejemplos bromometilbenceno (el grupo reactivo de andamiaje ejemplificado por TBMB) o yodoacetamida. Otros grupos reactivos de andamiaje que se usan para acoplar selectivamente compuestos a cisteínas en proteínas son las maleimidas. Los ejemplos de maleimidas que puede usarse como andamiajes moleculares en la invención incluyen: tris-(2-maleimidoetil)amina, tris-(2-maleimidoetil)benceno y tris(maleimido)benceno. La selenocisteína es también un aminoácido natural que tiene una reactividad similar a la cisteína y puede usarse para las mismas reacciones. Por tanto, siempre que se mencione cisteína, es típicamente aceptable sustituir por selenocisteína a menos que el contexto sugiera otra cosa.

Las lisinas (y aminas primarias del extremo N de péptidos) son también adecuadas como grupos reactivos para modificar péptidos en fago por ligadura con un andamiaje molecular. Sin embargo, son más abundantes en proteínas de fago que las cisteínas y hay un mayor riesgo de que las partículas de fago puedan reticularse o que puedan perder su infectividad. No obstante, se ha encontrado que las lisinas son especialmente útiles en reacciones intramoleculares (p.ej., cuando un andamiaje molecular está ya ligado al péptido de fago) para formar una segunda o consecutiva ligadura con el andamiaje molecular. En este caso, el andamiaje molecular reacciona preferentemente con lisinas del péptido exhibido (en particular lisinas que están en estrecha proximidad). Son grupos reactivos de andamiaje que reaccionan selectivamente con aminas primarias las succinimidas, aldehídos o haluros de alquilo. En el grupo bromometil que se usa en una serie de ejemplos acompañantes, los electrones del anillo de benceno pueden estabilizar el estado de transición catiónico. Este haluro de arilo particular es por lo tanto 100-1000 veces más reactivo que los haluros de alquilo. Los ejemplos de succinimidas para uso como andamiaje molecular incluyen tris-(aminotriacetato de succinimidilo) y ácido 1,3,5-benzenotriacético. Los ejemplos de aldehídos para uso como andamiaje molecular incluyen triformilmetano. Los ejemplos de haluros de alquilo para uso como andamiaje molecular incluyen 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trimetilbenceno, 1,3,5-tris(bromometil)benceno y 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno.

Los aminoácidos con grupos reactivos para ligadura con un andamiaje molecular pueden localizarse en cualquier posición adecuada en el polipéptido. Para influir en las estructuras particulares o bucles creados, las posiciones de los aminoácidos que tienen los grupos reactivos pueden variarse por el operario especialista, p.ej. mediante manipulación del ácido nucleico que codifica el polipéptido, para mutar el polipéptido producido. Mediante tal medio, puede manipularse la longitud de bucle de acuerdo con la presente enseñanza.

Por ejemplo, el polipéptido puede comprender la secuencia AC(X)_nC(X)_mCG, donde X representa un aminoácido natural aleatorio, A alanina, C cisteína y G glicina, y n y m, que pueden ser iguales o diferentes, son números entre 3 y 6.

(iii) Grupos reactivos del polipéptido

El andamiaje molecular de la invención puede unirse al polipéptido a través de grupos funcionales o reactivos en el polipéptido. Estos se forman típicamente a partir de las cadenas laterales de aminoácidos particulares encontrados en el polímero polipeptídico. Tales grupos reactivos pueden ser una cadena lateral de cisteína, una cadena lateral de lisina o un grupo amino N-terminal o cualquier otro grupo reactivo adecuado. De nuevo, pueden encontrarse detalles en el documento WO2009098450.

Son ejemplos de grupos reactivos de aminoácidos naturales el grupo tiol de cisteína, el grupo amino de lisina, el grupo carboxilo de aspartato o glutamato, el grupo guanidinio de arginina, el grupo fenólico de tirosina o el grupo hidroxilo de serina. Los aminoácidos no naturales pueden proporcionar un amplio intervalo de grupos reactivos incluyendo una azida, un cetocarbonilo, un alquino, un vinilo o un grupo haluro de alquilo. El grupo amino y carboxilo de los extremos del polipéptido pueden servir también como grupos reactivos para formar enlaces covalentes con un andamiaje molecular/núcleo molecular.

Los polipéptidos de la invención contienen al menos tres grupos reactivos. Dichos polipéptidos pueden contener también cuatro o más grupos reactivos. Cuantos más grupos reactivos se usen, más bucles pueden formarse en el andamiaje molecular.

En una realización preferida, se generan polipéptidos con tres grupos reactivos. La reacción de dichos polipéptidos con un andamiaje molecular/núcleo molecular que tiene una simetría rotacional triple genera un solo isómero de producto. La generación de un solo isómero de producto es favorable por varias razones. Los ácidos nucleicos de las colecciones de compuestos codifican solo las secuencias primarias del polipéptido, pero no el estado isomérico de las moléculas que se forman tras reacción del polipéptido con el núcleo molecular. Si solo puede formarse un isómero de producto, la asignación del ácido nucleico al isómero de producto está claramente definida. Si se forman múltiples isómeros de producto, el ácido nucleico no puede dar información sobre la naturaleza del isómero de producto que se aisló en un cribado o proceso de selección. La formación de un solo isómero de producto es también ventajosa si se sintetiza un miembro específico de una colección de la invención. En este caso, la reacción química del polipéptido con el andamiaje molecular procura un solo isómero de producto en lugar de mezclas de isómeros.

En otra realización de la invención, se generan polipéptidos con cuatro grupos reactivos. La reacción de dichos polipéptidos con un andamiaje molecular/núcleo molecular que tiene simetría tetraédrica genera dos isómeros de producto. Aunque los dos isómeros de producto diferentes están codificados por uno y el mismo ácido nucleico, la naturaleza isomérica del isómero aislado puede determinarse sintetizando químicamente ambos isómeros, separando los dos isómeros y ensayando en ambos isómeros la unión a un ligando diana.

En una realización de la invención, al menos uno de los grupos reactivos de los polipéptidos es ortogonal a los grupos reactivos restantes. El uso de grupos reactivos ortogonales permite dirigir tales grupos reactivos ortogonales a sitios específicos del núcleo molecular. Las estrategias de ligadura que implican grupos reactivos ortogonales pueden usarse para limitar el número de isómeros de producto formados. En otras palabras, al elegir grupos reactivos distintos o diferentes para uno o más de los al menos tres enlaces entre aquellos elegidos para el resto de los al menos tres enlaces, puede conseguirse útilmente un orden particular de unión o dirección de los grupos reactivos específicos del polipéptido a posiciones específicas en el andamiaje molecular.

En otra realización, se hacen reaccionar los grupos reactivos del polipéptido de la invención con ligadores moleculares, donde dichos ligadores son capaces de reaccionar con un andamiaje molecular de modo que el ligador se interponga entre el andamiaje molecular y el polipéptido en el estado unido final.

En algunas realizaciones, los aminoácidos de los miembros de las colecciones o conjuntos de polipéptidos pueden reemplazarse por cualquier aminoácido natural o no natural. Se excluyen de estos aminoácidos intercambiables aquellos que albergan grupos funcionales para reticular los polipéptidos con un núcleo molecular, de tal modo que solo las secuencias de bucle son intercambiables. Las secuencias polipeptídicas intercambiables tienen secuencias aleatorias, secuencias constantes o secuencias con aminoácidos aleatorios y constantes. Los aminoácidos con grupos reactivos están localizados en posiciones definidas en el polipéptido, puesto que la posición de estos aminoácidos determina el tamaño de bucle.

En una realización, un polipéptido con tres grupos reactivos tiene la secuencia $(X)_l Y (X)_m Y (X)_n Y (X)_o$, donde Y representa un aminoácido con un grupo reactivo, X representa un aminoácido aleatorio, m y n son números entre 3 y 6 que definen la longitud de los segmentos polipeptídicos interpuestos, que pueden ser iguales o diferentes, y l y o son números entre 0 y 20 que definen la longitud de los segmentos polipeptídicos flanqueantes.

Pueden usarse alternativas a las conjugaciones mediadas por tiol para enlazar el andamiaje molecular con el péptido a través de interacciones covalentes. Como alternativa, estas técnicas pueden usarse en la modificación o

enlazamiento de restos adicionales (tales como moléculas pequeñas de interés que son distintas del andamiaje molecular) con el polipéptido después de seleccionarse o aislarse de acuerdo con la presente invención- en esta realización entonces el enlazamiento claramente no tiene que ser covalente y puede abarcar enlazamiento no covalente. Estos procedimientos pueden usarse en lugar de (o en combinación con) los procedimientos mediados por tiol mediante producción de fago que exhibe proteínas y péptidos portadores de aminoácidos no naturales con los grupos reactivos químicos necesarios, en combinación con moléculas pequeñas que portan el grupo reactivo complementario, o incorporación de aminoácidos no naturales a un polipéptido sintetizado química o recombinantemente cuando la molécula se elabora después de la fase de selección/aislamiento. Pueden encontrarse detalles adicionales en el documento WO2009098450 o Heinis, y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7.

(iv) Combinación de bucles para formar moléculas multiespecíficas

Los bucles de ligandos peptídicos, o repertorios de ligandos peptídicos, se combinan ventajosamente mediante secuenciación y síntesis *de novo* de un polipéptido que incorpora los bucles combinados. Como alternativa, pueden sintetizarse ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos.

Cuando se van a combinar repertorios, particularmente repertorios de bucle único, los ácidos nucleicos que codifican los repertorios se digieren y religan ventajosamente formando un repertorio novedoso que tiene diferentes combinaciones de bucles a partir de los repertorios constituyentes. Los vectores de fago pueden incluir poliligadores y otros sitios para enzimas de restricción que pueden proporcionar puntos únicos para el corte y la religación de vectores, creando los ligandos peptídicos multiespecíficos deseados. Los procedimientos para manipular colecciones de fago son bien conocidos con respecto a anticuerpos, y pueden aplicarse también en el presente caso.

(v) Enlazamiento de grupos efectores y grupos funcionales

Los grupos efectores y/o funcionales pueden enlazarse, por ejemplo, con los extremos N o C del polipéptido, o con el andamiaje molecular.

Los grupos efectores apropiados incluyen anticuerpos y partes o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, un grupo efector puede incluir una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), un dominio de cadena pesada de anticuerpo CH1, un dominio de cadena pesada de anticuerpo CH2, un dominio de cadena pesada de anticuerpo CH3 o cualquier combinación de los mismos, además de uno o más dominios de región constante. Un grupo efector puede comprender también una región de bisagra de un anticuerpo (tal como una región que se encuentra normalmente entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG).

En una realización preferida adicional de este aspecto de la invención, es un grupo efector de acuerdo con la presente invención una región Fc de una molécula de IgG. Ventajosamente, el grupo efector de ligando peptídico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión de ligando peptídico-Fc que tiene una semivida $t_{1/2}$ de 1 día o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más o 7 días o más. Lo más ventajosamente, el ligando peptídico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión de ligando peptídico-Fc que tiene una semivida $t_{1/2}$ de 1 día o más.

Los grupos funcionales incluyen, en general, grupos de unión, fármacos, grupos reactivos para el enlazamiento de otras entidades grupos funcionales que ayudan a la captación de los péptidos macrocíclicos en células y similares.

La capacidad de los péptidos de penetrar en células permitirá ser efectivos a los péptidos contra dianas intracelulares. Las dianas a las que pueden acceder los péptidos con la capacidad de penetrar en células incluyen factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular tales como tirosina cinasas y moléculas implicadas en la ruta apoptótica. Los grupos funcionales que posibilitan la penetración de células incluyen péptidos o grupos químicos que se han añadido al péptido o al andamiaje molecular. Péptidos tales como los derivados de VP22, tat de VIH, una proteína de homeosecuencia de *Drosophila* (Antennapedia), p.ej. como se describe en Chen y Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007) volumen 35, parte 4, pág. 821 "Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets" e "Intracellular delivery of large molecules and small peptides by cell penetrating peptides" por Gupta y col. en *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) volumen 57 9637. Los ejemplos de péptidos cortos que se ha mostrado que son eficientes en la translocación a través de membranas plasmáticas incluyen el péptido penetratina de 16 aminoácidos de la proteína Antennapedia de *Drosophila* (Derossi y col. (1994) *J Biol. Chem.* volumen 269 pág. 10444 "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes"), el "péptido anfipático modelo" de 18 aminoácidos (Oehlke y col. (1998) *Biochim Biophys Acts* volumen 1414 pág. 127 "Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically") y regiones ricas en arginina de la proteína TAT de VIH. Los enfoques no peptídicos incluyen el uso de miméticos de molécula pequeña o SMOC que pueden enlazarse

fácilmente con biomoléculas (Okuyama y col. (2007) Nature Methods volumen 4 pág. 153 'Small-molecule mimics of an α -helix for efficient transport of proteins into cells'. Otras estrategias químicas para añadir grupos guanidinio a moléculas potencian también la penetración celular (Elson-Scwab y col. (2007) J Biol Chem volumen 282 pág. 13585 "Guanidinylated Neomycin Delivers Large Bioactive Cargo into cells through a heparin Sulphate Dependent Pathway"). Pueden añadirse moléculas de pequeño peso molecular tales como esteroides al andamiaje molecular para mejorar la captación en células.

Una clase de grupos funcionales que pueden enlazarse con ligandos peptídicos incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, tales como Fab, Fv o fragmentos de dominio único. En particular, pueden usarse anticuerpos capaces de aumentar la semivida de ligando peptídico *in vivo*.

Pueden incorporarse también péptidos RGD, que se unen a integrinas que están presentes en muchas células.

En una realización, un grupo efector de ligando peptídico de acuerdo con la invención tiene una semivida $t_{1/2}$ seleccionada de entre el grupo consistente en: 12 horas o más, 24 horas o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más, 8 días o más, 9 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más o 20 días o más. Ventajosamente, un grupo efector de ligando peptídico o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, tendrá una semivida $t_{1/2}$ de un día o más. En una realización adicional más, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Los grupos funcionales incluyen fármacos, tales como agentes citotóxicos para terapia del cáncer. Estos incluyen agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxalilplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida; antimetabolitos (incluyendo los análogos de purina azatioprina y mercaptopurina) o análogos de pirimidina; alcaloides y terpenoides vegetales incluyendo alcaloides de vinca tales como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; podofilotoxina y sus derivados etopósido y tenipósido; taxanos, incluyendo paclitaxel, originalmente conocido como Taxol; inhibidores de topoisomerasa incluyendo camptotecinas: irinotecán y topotecán, e inhibidores de tipo II incluyendo amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido. Agentes adicionales pueden incluir antibióticos antitumorales que incluyen el inmunosupresor dactinomicina (que se usa en trasplantes de riñón), doxorubicina, epirubicina, bleomicina y otros.

Los posibles grupos efectores incluyen también enzimas, por ejemplo tales como carboxipeptidasa G2, para uso en terapia de enzimas/profármacos, donde el ligando peptídico reemplaza a anticuerpos en ADEPT.

35 (vi) Síntesis

Debería señalarse que una vez se aísla o identifica un polipéptido de interés de acuerdo con la presente invención, entonces su síntesis posterior puede simplificarse siempre que sea posible. Por tanto, no tienen que producirse grupos o conjuntos de polipéptidos por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, puede determinarse la secuencia de los polipéptidos de interés y pueden fabricarse sintéticamente mediante técnicas estándares seguidas de reacción con un andamiaje molecular *in vitro*. Cuando se practica esto, puede usarse la química estándar puesto que no hay ya necesidad de conservar la funcionalidad o integridad de la partícula portadora codificada genéticamente, tal como un fago. Esto posibilita la preparación rápida a gran escala de material soluble para experimentos adicionales o validación. A este respecto, la preparación a gran escala de los candidatos o compuestos principales identificados por los procedimientos de la presente invención podría lograrse usando química convencional tal como se divulga en Timmerman y col.

Por tanto, la invención se refiere también a la fabricación de polipéptidos o conjugados seleccionados como se propone en la presente memoria, donde la fabricación comprende etapas adicionales opcionales como se explican a continuación. En una realización, estas etapas se llevan a cabo en el producto final polipéptido/conjugado mediante síntesis química, en lugar de en el fago.

Opcionalmente, los residuos aminoacídicos en el polipéptido de interés pueden sustituirse cuando se fabrica un conjugado o complejo, p.ej. después de la etapa de aislamiento/identificación inicial.

También pueden extenderse los péptidos, para incorporar por ejemplo otro bucle y por lo tanto introducir múltiples especificidades.

Para extender el péptido, puede extenderse químicamente sencillamente en su extremo N o extremo C o dentro de los bucles usando lisinas protegidas ortogonalmente (y análogos) usando la química en fase sólida o fase de solución estándar. Puede usarse la química de proteínas estándar para introducir un extremo N o C activable. Como alternativa, pueden realizarse adiciones mediante condensación de fragmentos o ligamiento químico nativo, p.ej.,

como se describe en (Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent, SBH. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266: 776-779), o por enzimas, por ejemplo usando subtiligasa como se describe en (Subtiligase: a tool for semisynthesis of proteins Chang TK, Jackson DY, Burnier JP, Wells JA Proc Natl Acad Sci U S A. diciembre de 1994 20; 91(26):12544-8 o en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Tags for labelling protein N-termini with subtiligase for proteomics volumen 18, número 22, 15 de noviembre de 2008, páginas 6000-6003 Tags for labeling protein N-termini with subtiligase for proteomics; Hikari A.I. Yoshihara, Sami Mahrus y James A. Wells).

Como alternativa, los péptidos pueden extenderse o modificarse mediante conjugación adicional mediante enlaces disulfuro. Esto tiene la ventaja adicional de permitir que el primer y segundo péptidos se disocien entre sí una vez en el entorno reductor de la célula. En este caso, podría añadirse el andamiaje molecular (p.ej. TMB) durante la síntesis química del primer péptido para reaccionar con los tres grupos cisteína; podría adjuntarse una cisteína adicional al extremo N del primer péptido, de modo que esta cisteína reaccionara solo con una cisteína libre del segundo péptido.

Se aplican igualmente técnicas similares a la síntesis/acoplamiento de dos macrociclos bicíclicos y biespecíficos, creando potencialmente una molécula tetraespecífica.

Además, la adición de otros grupos funcionales o grupos efectores puede lograrse de la misma manera, usando la química apropiada, el acoplamiento a los extremos N o C o a través de cadenas laterales. En una realización, se realiza el acoplamiento de tal manera que no bloquee la actividad de cualquier entidad.

(vii) Modificación peptídica

Para desarrollar los péptidos bicíclicos (biciclos; péptidos conjugados con andamiajes moleculares) hasta una molécula similar a fármaco adecuada, tanto para inyección inhalación, administración nasal, ocular, oral o tópica, tienen que considerarse una serie de propiedades. Tienen que diseñarse al menos las siguientes para un compuesto principal bicíclico dado:

- Estabilidad a proteasas, tanto si esto se refiere a estabilidad del biciclo ante proteasas plasmáticas, proteasas epiteliales ("ancladas a membrana"), proteasas gástricas e intestinales, proteasas de superficie pulmonar, proteasas intracelulares y similares. La estabilidad a proteasas debería mantenerse entre diferentes especies de tal modo que pueda desarrollarse un candidato a compuesto principal bicíclico en modelos animales así como administrarse con confianza a seres humanos.

- Reemplazo de residuos sensibles a la oxidación, tales como triptófano y metionina, por análogos resistentes a la oxidación para mejorar el perfil de estabilidad farmacéutica de la molécula. Un perfil de solubilidad deseable, que es función de la proporción de residuos cargados e hidrófilos frente a hidrófobos, lo que es importante con fines de formulación y absorción.

- Un equilibrio correcto de residuos cargados frente a hidrófobos, ya que los residuos hidrófobos influyen en el grado de unión a proteína plasmática y por tanto la concentración de la fracción disponible libre en plasma, mientras que los residuos cargados (en particular argininas) pueden influir en la interacción del péptido con las membranas fosfolípicas en superficies celulares. Los dos en combinación pueden influir en la semivida, volumen de distribución y exposición del fármaco peptídico, y pueden adaptarse de acuerdo con el criterio de valoración clínico. Además, la correcta combinación y número de residuos cargados frente a hidrófobos puede reducir la irritación en el sitio de inyección (cuando se administra subcutáneamente el fármaco peptídico).

- Una semivida adaptada, dependiendo de la indicación clínica y del régimen de tratamiento. Puede ser prudente desarrollar una molécula no modificada para exposición corta en un entorno de gestión de dolencia aguda, o desarrollar un péptido bicíclico con modificaciones químicas que potencie la semivida plasmática y por ello sea óptimo para la gestión de estados patológicos más crónicos.

Los enfoques para estabilizar los candidatos a péptidos terapéuticos frente a la degradación proteolítica son numerosos, y se superponen con el campo de los peptidomiméticos (para revisiones, véanse Gentilucci y col., Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203 y Nestor y col., Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Estos incluyen

- Ciclación de péptido.

- Cobertura N-terminal y C-terminal, habitualmente acetilación N-terminal y amidación C-terminal.

- Barridos de alanina para revelar y potencialmente retirar el sitio o sitios de ataque proteolítico.

5 • Reemplazo por D-aminoácidos para sondear los requisitos estéricos de la cadena lateral aminoacídica, para aumentar la estabilidad proteolítica por impedimento estérico y por la tendencia de los D-aminoácidos a estabilizar las conformaciones de giro β (Tugyi y col. (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

10 • Reemplazo por N-metil/N-alquilaminoácidos para conferir protección proteolítica por modificación directa del enlace amida escindible (Fiacco y col., Chembiochem. (2008), 9(14), 2200-3). La N-metilación tiene también un fuerte efecto sobre los ángulos de torsión del enlace peptídico, y se cree que ayuda a la penetración celular y la disponibilidad oral (Biron y col. (2008), Angew. Chem. Int. Ed., 47, 2595 -99).

- Incorporación de aminoácidos no naturales, es decir, empleando

15 - Cadenas laterales isoestéricas/isoeléctricas que no son reconocidas por proteasas, pero no tienen efecto sobre la potencia de diana.

20 - Cadenas laterales aminoacídicas restringidas, de tal modo que se impida conformacional y estéricamente la hidrólisis proteolítica del enlace peptídico cercano. En particular, esto se refiere a análogos de prolina, cadenas laterales voluminosas, derivados sustituidos en C α (donde el derivado más sencillo es Aib, H₂N-C(CH₃)₂-COOH) y cicloaminoácidos, siendo un derivado sencillo el ácido aminociclopropilcarboxílico).

- Sucedáneos de enlace peptídico, y los ejemplos incluyen

25 - N-alquilación (véase anteriormente, es decir CO-NR)

- Enlaces peptídicos reducidos (CH₂-NH-)

- Peptoides (N-alquilaminoácidos, NR-CH₂-CO)

- Tioamidas (CS-NH)

- Azapéptidos (CO-NH-NR)

30 - Trans-alquenos (RHC=C-)

- Retroinversos (NH-CO)

- Sustitutos de urea (NH-CO-NHR)

- Modulación de la longitud del esqueleto peptídico

35 - Es decir, $\beta^{2/3}$ -aminoácidos, (NH-CR-CH₂-CO, NH-CH₂-CHR-CO),

- Sustituciones en el carbono alfa de aminoácidos, lo que restringe las conformaciones de esqueleto, siendo el derivado más sencillo el ácido aminoisobutírico (Aib).

40 Debería señalarse explícitamente que algunas de estas modificaciones pueden servir también para mejorar deliberadamente la potencia del péptido frente a la diana o, por ejemplo, para identificar sustitutos potentes para los aminoácidos sensibles a la oxidación (Trp y Met). Debería señalarse también que el compuesto principal bicíclico Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ alberga ya dos modificaciones que confieren resistencia a la degradación proteolítica, siendo 45 estas cobertura N/C-terminal y bi(ciclación).

(B) Repertorios, conjuntos y grupos de ligandos polipeptídicos

(i) Construcción de colecciones

50 Las colecciones pretendidas para selección pueden construirse usando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo como se expone en el documento WO2004/077062, o sistemas biológicos, incluyendo sistemas de vector de fago como se describen en la presente memoria. Son conocidos en la materia otros sistemas de vector, e incluyen otros fagos (por ejemplo fago lambda), vectores de expresión de plásmido bacteriano, vectores de 55 expresión basados en células eucarióticas, incluyendo vectores de levadura, y similares. Por ejemplo, véanse el documento WO2009098450 o Heinis y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7.

60 Los sistemas no biológicos, tales como aquellos expuestos en el documento WO2004/077062, están basados en enfoques de cribado químico convencionales. Son sencillos, pero carecen de la potencia de los sistemas biológicos, puesto que es imposible, o al menos impracticablemente costoso, cribar grandes colecciones de ligandos peptídicos. Sin embargo, son útiles cuando, por ejemplo, tienen que cribarse solo un número pequeño de ligandos peptídicos. El cribado mediante dichos ensayos individuales, sin embargo, puede ser prolongado y el número de moléculas únicas

en que puede ensayarse la unión a una diana específica generalmente no supera las 10^6 entidades químicas.

- En contraposición, los procedimientos de cribado o selección biológicos permiten generalmente el muestreo de un número mucho mayor de moléculas diferentes. Por tanto, los procedimientos biológicos pueden usarse en la aplicación de la invención. En procedimientos biológicos, se ensayan las moléculas en un solo recipiente de reacción y aquellas con propiedades favorables (es decir, unión) se separan físicamente de las moléculas inactivas. Están disponibles estrategias de selección que permiten generar y ensayar simultáneamente más de 10^{13} compuestos individuales. Son ejemplos de técnicas de selección por afinidad potentes la exhibición en fago, exhibición en ribosoma, exhibición en ARNm, exhibición en levadura, exhibición bacteriana o procedimientos de aptámeros de ARN/ADN. Estos procedimientos de selección biológica *in vitro* tienen en común que los repertorios de ligando están codificados por ADN o ARN. Permiten la propagación e identificación de ligandos seleccionados por secuenciación. La tecnología de exhibición en fago se ha usado, por ejemplo, para el aislamiento de anticuerpos con muy altas afinidades por virtualmente cualquier diana.
- 15 Cuando se usa un sistema biológico, una vez se elige un sistema de vector y se clonan una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de interés en el vector de colección, puede generarse diversidad en las moléculas clonadas experimentando mutagénesis antes de la expresión; como alternativa, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse antes de la mutagénesis y practicarse rondas adicionales de selección.
- 20 La mutagénesis de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo por procedimientos moleculares estándares. Es de particular uso la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis y Faloona (1987) *Methods Enzymol.*, 155: 335, incorporada a la presente como referencia). La PCR, que usa múltiples ciclos de replicación de ADN catalizados por una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN para amplificar la secuencia diana de interés, es bien conocida en la materia. Se ha discutido la construcción de diversas colecciones de anticuerpos en Winter y col. (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55, y referencias citadas en el mismo.

Como alternativa, dada las longitudes de cadena corta de los polipéptidos de acuerdo con la invención, preferiblemente las variantes se sintetizan *de novo* y se insertan en vectores de expresión adecuados. La síntesis peptídica puede llevarse a cabo mediante técnicas estándares conocidas en la materia, como se describe anteriormente. Están ampliamente disponibles sintetizadores peptídicos automatizados, tales como el Applied Biosystems ABI 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.)

(ii) Diversidad codificada genéticamente

- 35 En una realización, los polipéptidos de interés están codificados genéticamente. Esto ofrece la ventaja de una diversidad potenciada junto con facilidad de manejo. Es un ejemplo de una colección polipeptídica genética una colección de exhibición en ARNm. Es otro ejemplo una colección de paquetes de exhibición genética replicable (rgdp) tal como una colección de exhibición en fago. En una realización, los polipéptidos de interés están codificados genéticamente como una colección de exhibición en fago.

Por tanto, en una realización el complejo de la invención comprende un paquete de exhibición genética replicable (rgdp) tal como una partícula de fago. En estas realizaciones, el ácido nucleico puede estar comprendido en el genoma de fago. En estas realizaciones, el polipéptido puede estar comprendido por la cubierta de fago.

- 45 En algunas realizaciones, la invención puede usarse para producir una colección combinatoria codificada genéticamente de polipéptidos que se generan traduciendo una serie de ácidos nucleicos a los correspondiente polipéptidos y ligando moléculas de dicho andamiaje molecular con dichos polipéptidos.

- 50 La colección combinatoria codificada genéticamente de polipéptidos puede generarse por exhibición en fago, exhibición en levadura, exhibición en ribosoma, exhibición bacteriana o exhibición en ARNm.

Las técnicas y metodología para practicar la exhibición en fago pueden encontrarse en el documento WO2009098450.

- 55 En una realización, puede practicarse el cribado poniendo en contacto una colección, conjunto o grupo de ligandos polipeptídicos con una diana y aislando uno o más miembros que se unen a dicha diana.

- En otra realización, se ponen en contacto los miembros individuales de dicha colección, conjunto o grupo con una diana en un cribado y se identifican los miembros de dicha colección que se unen a dicha diana.

En otra realización, se ponen en contacto simultáneamente los miembros de dicha colección, conjunto o grupo con

una diana y se seleccionan los miembros que se unen a dicha diana.

La diana o dianas pueden ser un péptido, una proteína, un polisacárido, un lípido un ADN o un ARN.

5 La diana puede ser un receptor, un ligando de receptor, una enzima, una hormona o una citocina.

La diana puede ser una proteína procariótica, una proteína eucariótica o una proteína arqueal. Más específicamente, el ligando diana puede ser una proteína de mamífero o una proteína de insecto o una proteína bacteriana o una proteína fúngica o una proteína vírica.

10 El ligando diana puede ser una enzima, tal como una proteasa.

Debería señalarse que la invención abarca también ligandos polipeptídicos aislados de un cribado de acuerdo con la invención. En una realización, el procedimiento o procedimientos de cribado de la invención comprenden además la
15 etapa de: fabricar una cantidad del polipéptido aislado capaz de unirse a dichas dianas.

La invención se refiere también a ligandos peptídicos que tienen más de dos bucles. Por ejemplo, pueden crearse polipéptidos tricíclicos unidos a un andamiaje molecular uniendo los extremos N y C de un polipéptido bicíclico unido a un andamiaje molecular de acuerdo con la presente invención. De esta manera, los extremos N y C unidos crean
20 un tercer bucle, haciendo un polipéptido tricíclico. Esta realización no tiene que llevarse a cabo en fago, sino que puede llevarse a cabo en un conjugado de polipéptido-andamiaje molecular como se describe en la presente memoria. Unir los extremos N y C es un asunto de química peptídica rutinaria. En caso de necesitar alguna orientación, el extremo C puede activarse y/o los extremos N y C pueden extenderse, por ejemplo, añadiendo un cisteína a cada extremo y uniéndolos entonces por enlace disulfuro. Como alternativa, la unión puede lograrse
25 mediante el uso de una región ligadora incorporada a los extremos N/C. Como alternativa, los extremos N y C pueden unirse mediante un enlace peptídico convencional. Como alternativa, puede emplearse cualquier medio adecuado para unir los extremos N y C, por ejemplo podría realizarse la N-C-ciclación mediante técnicas estándares, por ejemplo como se divulga en Linde y col. Peptide Science 90, 671-682 (2008) "Structure-activity relationship and metabolic stability studies of backbone cyclization and N-methylation of melanocortin peptides", o como en Hess y
30 col. J. Med. Chem. 51, 1026-1034 (2008) "Backbone cyclic peptidomimetic melanocortin-4 receptor agonist as a novel orally administered drug lead for treating obesity". Es una ventaja de tales moléculas tricíclicas la evitación de la degradación proteolítica de los extremos libres, en particular por la acción de exoproteasa. Es otra ventaja de un polipéptido tricíclico de esta naturaleza que el tercer bucle puede utilizarse para funciones generalmente aplicables tales como unión a BSA, entrada celular o efectos de transporte, marcaje o cualquier otro uso. Se señalará que este
35 tercer bucle no estará típicamente disponible para selección (porque no se produce en el fago, sino solo en el conjugado de polipéptido-andamiaje molecular) y así su uso para otras de tales funciones biológicas deja todavía ventajosamente ambos bucles 1 y 2 para la selección/creación de especificidad.

(iii) Purificación de fago

40 Puede usarse cualquier medio para la purificación del fago. Pueden aplicarse técnicas estándares en la presente invención. Por ejemplo, puede purificarse el fago por filtración o por precipitación, tal como precipitación con PEG; las partículas de fago pueden producirse y purificarse por precipitación con polietilenglicol (PEG) como se describe anteriormente. Pueden encontrarse los detalles en el documento WO2009098450.

45 En caso de necesitar orientaciones adicionales, se hace referencia a Jespers y col. (Protein Engineering Design and Selection 2004 17(10): 709-713. Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries). En una realización, puede purificarse el fago como se enseña en la misma. El texto de esta publicación se incorpora específicamente a la presente memoria como referencia para el procedimiento de purificación de fago; en particular,
50 se hace referencia a la sección de materiales y procedimientos que empieza en la parte inferior de la columna derecha en la página 709 de Jespers y col.

Además, el fago puede purificarse como se publica por Marks y col. J.Mol.Biol vol 222 pág. 581-597, que se incorpora específicamente a la presente memoria como referencia para la descripción particular de cómo se lleva a
55 cabo la producción/purificación de fago.

(iv) Química de reacción

La presente invención hace uso de las condiciones químicas para la modificación de polipéptidos que retienen
60 ventajosamente la función e integridad del elemento codificado genéticamente del producto. Específicamente, cuando el elemento codificado genéticamente es un polipéptido exhibido sobre la superficie de un fago que lo codifica, la química ventajosamente no compromete la integridad biológica del fago. En general, se proponen las

condiciones en el documento WO2009098450.

(C) Uso de ligandos polipeptídicos de acuerdo con la invención

5 Los ligandos polipeptídicos seleccionados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, *in vitro* y en aplicaciones de diagnóstico *in vivo*, ensayo *in vitro* y aplicaciones de reactivo y similares. Los ligandos que tienen niveles seleccionados de especificidad son útiles en aplicaciones que implican ensayar en animales no humanos, donde es deseable la reactividad cruzada, o en aplicaciones de diagnóstico, donde tiene que controlarse cuidadosamente la reactividad cruzada con
10 homólogos o parálogos. En algunas aplicaciones tales como aplicaciones de vacuna, puede explotarse la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria ante intervalos predeterminados de antígenos para adaptar una vacuna de enfermedades y patógenos específicos.

Se prefieren los ligandos peptídicos sustancialmente puros de al menos un 90 a 95 % de homogeneidad para administración a un mamífero, y es más preferido de 98 a 99 % o más de homogeneidad para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, pueden usarse los péptidos seleccionados para diagnóstico o terapia (incluyendo extracorpórea) o en el desarrollo y práctica de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) Immunological Methods, volúmenes I y II, Academic Press, NY).

20 Los ligandos peptídicos de la presente invención encontrarán típicamente uso en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunitarios (que incluyen, pero sin limitación, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

25 En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" hace referencia a la administración de la composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas patológicos se pongan de manifiesto.

30 Están disponibles sistemas de modelo animal que pueden usarse para cribar la efectividad de los ligandos peptídicos en la protección ante o el tratamiento de la enfermedad. El uso de los sistemas de modelo animal se facilita por la presente invención, que permite el desarrollo de ligandos polipeptídicos que pueden reaccionar de forma cruzada con dianas humanas y animales, permitiendo el uso de modelos animales.

35 Los procedimientos para el ensayo de lupus sistémico eritematoso (LSE) en ratones sensibles son conocidos en la materia (Knight y col. (1978) J Exp. Med., 147: 1653; Reinersten y col. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). Se ensaya la miastenia grave (MG) en ratones SJL/J hembra mediante la inducción de la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom y col. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). Se induce la artritis en una cepa sensible de ratones mediante la inyección de colágeno de tipo II (Stuart y col. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo mediante el que se induce artritis por adyuvante en ratas sensibles mediante la inyección de proteína de choque térmico micobacteriana (Van Eden y col. (1988) Nature, 331: 171). Se induce la tiroiditis en ratones mediante la administración de tiroglobulina como se describe (Maron y col. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes sacarina insulín dependiente (IDDM) aparece naturalmente o puede inducirse en ciertas cepas de
45 ratones tales como aquellas descritas por Kanasawa y col. (1984) Diabetologia, 27: 113. La EAE en ratón y rata sirve como modelo para EM en seres humanos. En este modelo, se induce la enfermedad desmielinizante mediante la administración de proteína básica de mielina (véanse Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer y col., eds., Grune and Stratton, Nueva York, pág. 179-213; McFarlin y col. (1973) Science, 179: 478; y Satoh y col. (1987) J. Immunol., 138: 179).

50 Generalmente, se utilizarán los presentes ligandos peptídicos en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, cualquiera que incluya suero salino y/o medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer lactato.
55 Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden elegirse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes y reponedores de electrolitos tales como
60 aquellos basados en dextrosa de Ringer. Pueden estar también presentes conservantes y otros aditivos tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición).

Los ligandos peptídicos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas separadamente o junto con otros agentes. Estos pueden incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y diversos fármacos inmunoterapéuticos tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros junto con anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión a los mismos de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos peptídicos, estén o no combinados antes de la administración.

10

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de aquellas comúnmente conocidas por los especialistas en la materia. Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, pueden administrarse los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión a los mismos de la invención a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándares. La administración puede ser de cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, pulmonar o también apropiadamente, por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerán de la edad, sexo y condición del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, las contraindicaciones y otros parámetros para tener en cuenta por el médico clínico.

20 Los ligandos peptídicos de esta invención pueden liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes del uso. Esta técnica se ha mostrado que es efectiva y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la materia. Se apreciará por los especialistas en la materia que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse al alza para compensar.

25

Las composiciones que contienen los presentes ligandos peptídicos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, se define una cantidad adecuada para lograr al menos una inhibición parcial, supresión, modulación, muerte o algún otro parámetro mensurable de una población de células seleccionadas como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades necesarias para conseguir esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunitario propio del paciente, pero oscilan generalmente de 0,005 a 5,0 mg de ligando peptídico seleccionado por kilogramo de peso corporal, siendo las más comúnmente usadas dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, pueden administrarse también composiciones que contienen los presentes ligandos peptídicos o cócteles de los mismos a dosificaciones similares o ligeramente menores.

30

Puede utilizarse una composición que contiene un ligando peptídico de acuerdo con la presente invención en entornos profilácticos y terapéuticos para ayudar a la alteración, inactivación, muerte o retirada de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, pueden usarse los repertorios de polipéptidos seleccionados descritos en la presente memoria de forma extracorpórea o *in vitro* selectivamente para matar, agotar o retirar efectivamente de otro modo una población de células diana de una recopilación heterogénea de células. Puede combinarse de modo extracorpóreo sangre de un mamífero con los ligandos peptídicos seleccionados, con lo que se matan las células indeseadas o se retiran de otro modo de la sangre para devolver al mamífero de acuerdo con técnicas estándares.

40

45 (D) Mutación de polipéptidos

Se genera típicamente la diversidad deseada variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Se seleccionan las posiciones para cambiar de tal modo que se construyan colecciones para cada posición individual en las secuencias de bucle. Cuando sea apropiado, pueden omitirse una o más posiciones del procedimiento de selección, por ejemplo si resulta evidente que esas posiciones no están disponibles para mutación sin pérdida de actividad.

50

La variación puede conseguirse entonces por aleatorización, durante la cual se reemplaza el aminoácido residente por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un muy gran número de variantes, o reemplazando el aminoácido residente por uno o más de un subconjunto definido de aminoácidos, produciendo un número más limitado de variantes.

55

Se han reseñado diversos procedimientos para introducir tal diversidad. Los procedimientos para mutar posiciones seleccionadas son también bien conocidos en la materia e incluyen el uso de oligonucleótidos desapareados u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado varias colecciones de anticuerpos sintéticos orientando las mutaciones a los bucles de unión a antígeno. Podrían usarse las mismas técnicas en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, se ha aleatorizado la región H3 de un Fab de unión a

60

toxoide del tétanos para crear un intervalo de nuevas especificidades de unión (Barbas y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457). Se han adjuntado regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias a segmentos del gen V de línea germinal para producir grandes colecciones con regiones estructurales mutadas (Hoogenboom y Winter (1992) R Mol. Biol., 227: 381; Barbas y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim y col. (1994) EMBO J, 13: 692; Griffiths y col. (1994) EMBO J, 13: 3245; De Kruif y col. (1995) J. Mol. Biol., 248: 97). Tal diversificación se ha extendido para incluir algunos o todos de los otros bucles de unión a antígeno (Crameri y col. (1996) Nature Med., 2: 100; Riechmann y col. (1995) BiolTechnology, 13: 475; Morphosys, WO97/08320, supra).

Sin embargo, puesto que los polipéptidos usados en la presente invención son mucho menores que los anticuerpos, el procedimiento preferido es sintetizar polipéptidos mutantes *de novo*. Se describe anteriormente la mutagénesis de polipéptidos estructurados, con relación a la construcción de colecciones.

Se describe adicionalmente la invención a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

15 EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

Clonación de colecciones de fago

Se generaron colecciones de fago de acuerdo con Heinis y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7). En Heinis y col., se clonaron los genes que codifican un péptido semialeatorio con la secuencia Xaa-Cys-(Xaa)₃-Cys-(Xaa)₃-, el ligador Gly-Gly-Ser-Gly y los dos dominios libres de disulfuro D1 y D2 (Kather y col., *J Mol Biol* 2005, 354 (3), 666-78) en la orientación correcta en el vector de fago fd0D12 para obtener la "colección 3x3". Se crearon por etapas los genes que codifican el repertorio peptídico y los dos genes de 3 dominios en dos reacciones PCR consecutivas. En primer lugar, se amplificaron por PCR los genes de D1 y D2 con los dos cebadores prepcr (5'-GGCGTTCTGGCGCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3') y sfi2fo (5'-GAAGCCATGGCCCCGAGGCCCGGACGGAGCATTGACAGG-3'; el sitio de restricción está subrayado) usando el vector fdg3p0ss21 (Kather, y col., *J Mol Biol* 2005, 354 (3), 666-78) como molde. En segundo lugar, se adjuntó el ADN que codifica los péptidos aleatorios a una reacción PCR usando el cebador sficx3ba: 5'-TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCANNKTGTNNKNNKNNKTGCNNKNNKNNKNNKTGTNNKGGGCGTTCTGGC GCTG-3' (el sitio de restricción está subrayado) y sfi2fo. El ligamiento de 55 y 11 µg de plásmido fd0D12 digerido con *Sfi*I y el producto de PCR procuró 5,6x10⁸ colonias en 10 placas 2YT de 20x20 cm con cloranfenicol (30 µg/ml). Se rasparon las colonias de las placas con medios 2YT, se suplementaron con glicerol al 15 % y se almacenaron a -80 °C. La construcción de las colecciones descritas en la presente memoria empleaban la misma técnica para generar el péptido semialeatorio Pro-Ala-Met-Ala-Cys-(Xaa)₃-Cys-(Xaa)₃-Cys para una colección 3x3, por ejemplo, y por lo tanto reemplazaban la secuencia del cebador sficx3ba por: 5'-TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCATGTNNKNNKNNKTGCNNKNNKNNKTGTGGCGGTTCTGGCGCTG-3'. Se generaron colecciones con otras longitudes de bucle siguiendo la misma metodología.

Selecciones de fago

Se diluyeron soluciones madre en glicerol de colecciones de fago hasta DO₆₀₀=0,1 en 500 ml de cultivos de 2YT/cloranfenicol (30 µg/ml) y se produjo fago a 30 °C durante una noche (15-16 h). Se purificó el fago y se modificó químicamente como se describe en Heinis, y col., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), se incubó hPK biotinilado 502-7 (3 µg) (IHPKA, de plasma humano, Innovative Research, Novi, MI, EE.UU.) con 50 µl de perlas magnéticas de estreptavidina prelavadas (Dynal, M-280 de Invitrogen, Paisley, RU) durante 10 minutos a TA. Se lavaron las perlas 3 veces antes de bloquear con 0,5 ml de tampón de lavado (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 1 mM) que contiene 1 % de BSA y 0,1 % de Tween 20 durante 30 minutos a TA con rotación. Se bloquearon simultáneamente fagos modificados químicamente (típicamente 10¹⁰-10¹¹ u.t. disueltos en 2 ml de tampón de lavado) mediante la adición de 1 ml de tampón de lavado que contiene 3 % de BSA y 0,3 % de Tween 20. Se mezclaron entonces las perlas bloqueadas con el fago modificado químicamente bloqueado y se incubaron durante 30 minutos en una rueda giratoria a TA. Se lavaron las perlas 8 veces con tampón de lavado que contiene 0,1 % de Tween 20 y dos veces con tampón de lavado antes de incubación con 100 µl de glicina 50 mM, pH 2,2 durante 5 minutos. Se transfirieron los fagos eluidos a 50 µl de Tris-Cl 1 M, pH 8 para neutralización, se incubaron con 30 ml de células TG1 a DO₆₀₀= 0,4 durante 90 minutos a 30 °C y se sembraron las células en placas grandes de 2YT/cloranfenicol. Se practicaron una o dos rondas adicionales de adsorción usando los mismos procedimientos. En la segunda ronda de selección, se usaron perlas magnéticas recubiertas con neutravidina para prevenir el enriquecimiento de péptidos específicos de estreptavidina. Se prepararon las perlas de neutravidina haciendo reaccionar 0,8 mg de neutravidina (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) con 0,5 ml de perlas magnéticas activadas por tosilo (Dynal, M-280 de Invitrogen, Paisley, RU) de acuerdo con las instrucciones del suministrador.

Clonación y expresión de PK humana, de mono y de rata

Se expresó el dominio catalítico de PK humana, de mono y de rata en células de mamífero como precursor inactivo que tiene un propéptido conectado de forma N-terminal a través de un sitio de escisión proTEV con el dominio catalítico. Se clonó el vector de expresión y se expresó la proteína, se activó y se purificó como se describe a continuación. Se adquirieron los genes sintéticos que codifican una secuencia señal de PK, un marcador de polihistidina, un sitio de escisión proTEV, el dominio catalítico maduro de PK y un codón de terminación en Geneart (Regensburg, Alemania) (Materiales suplementarios). Se preparó el ADN de plásmido que contiene los genes sintéticos de PK humana, de mono (*Macaca mulatta*) y de rata y se transfirió el gen al vector de expresión de mamífero pEXPR-IBA42 (IBA Biotechnology, Göttingen, Alemania) usando el par de enzimas de restricción *Xho*I y *Hind*III (Fermentas, Vilnius, Letonia) y ADN ligasa T4 (Fermentas). Se transformaron los plásmidos ligados en células electrocompetentes XL-1 blue (Stratagene, Santa Clara, EE.UU.) y se sembraron en placas de agar 2YT que contenían ampicilina (10 µg/ml). Se produjo ADN de los tres vectores de expresión (llamados mPK, rPK y hPK) y se confirmaron las secuencias correctas por secuenciación de ADN (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

Se expresaron las tres calicreínas plasmáticas ortólogas en células de mamífero como sigue. Se hicieron crecer 50 ml de células HEK-293 adaptadas a suspensión en medio ExCell 293 libre de suero (SAFC Biosciences, St. Louis, MO) en presencia de glutamina 4 mM y el inhibidor de histona desacetilasa ácido valproico (3,75 mM) en un matraz de 100 ml agitado orbitalmente a 180 rpm en una incubadora ISF-4-W (Kühner AG, Birsfelden, Suiza) a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 %. Se transfectaron células de riñón embrionarias (HEK-293) a alta densidad celular (20 x 10⁶ células/ml) (Backliwal y col., *Biotechnol Bioeng* 2008, 99 (3), 721-7) con los tres plásmidos (300 µg/ml) usando polietilenimina lineal (PEI, Polysciences, Eppenheim, Alemania). Al final de la fase de producción de 7 días, se recolectaron las células por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retiró cualquier desecho celular adicional del medio mediante filtración a través de membranas PES de 0,45 µm (TPP de 250 ml de baja unión a proteína Filter-top). Se purificó la proteína marcada con polihistidina por cromatografía de afinidad de Ni usando resina Ni-NTA, tampón de lavado (NaCl 500 mM, Na₂HPO₄ 25 mM, pH 7,4) y tampón de elución (NaCl 500 mM, Na₂HPO₄ 25 mM, pH 7,4, imidazol 500 mM). Se activó parcialmente la proteína con (50 unidades) de proTEV (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU. y se purificó adicionalmente por cromatografía de afinidad de Ni y filtración en gel (columna PD10, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7).

Desarrollo de polipéptidos con actividad de unión mejoradaAleatorización de posiciones individuales

Construcción de colección: Para cartografiar los aminoácidos en los péptidos bicíclicos de unión a calicreína, se construyó un conjunto de colecciones pequeñas. Para un biciclo que comprende 2 bucles de 5 residuos, se generaron 10 colecciones separadas cada una con aleatorización en un codón particular de la secuencia peptídica. Se diseñaron los oligonucleótidos para cada colección para mutar el ADN de genoma de fago mediante mutagénesis dirigida a sitio. La mutagénesis incorporaba la aleatorización del codón de interés (cambio a NNS) y la retirada de un sitio de restricción ApaL1 único de la secuencia de genoma molde. Se purificó el producto de mutagénesis usando el kit de purificación por PCR QIAgen QIAquick con elución en agua ultrapura. Se usó cada colección para transformar separadamente TG1 de *E coli* por electroporación con una máquina BioRad Micropulser (programa Ec1) y cubeta BioRad de 1 mm. Después de 1 hora de recuperación a 37 °C en 1 ml de medio SOC, se hicieron crecer los transformantes de la colección durante una noche en 25 ml de caldo 2TY que contiene antibiótico para hacer crecer selectivamente los transformantes de la colección solo. Se recolectaron las bacterias por centrifugación, se purificó el ADN de fago de colección de *E coli* usando un kit QIAgen Plasmid Plus Midi y se eluyó con agua destilada. Se digirió el ADN purificado con ApaL1 durante 2 horas en tampón 4 de New England Biolabs para retirar el material original. Después de la digestión, se repurificó el ADN usando el kit de purificación por PCR de QIAgen (como anteriormente) y se usó para transformar TG1 (electroporación, como se describe anteriormente). Después de la recuperación de 1 hora en SOC, se sembraron los transformantes en placas de LB-agar que contenían antibióticos selectivos y se permitieron crecer las colonias durante una noche a 37 °C.

Ensayo de unión de clones individuales: Se escogieron las colonias transformantes de la colección aleatoriamente y se hicieron crecer como cultivos individuales en caldo 2TY que contenía antibiótico selectivo. Se secuenció el ADN de las colonias escogidas usando un secuenciador de ADN QIAgen PyroMark Q96 para revelar la sustitución aminoacídica presente en cada clon. Cuando se aisló, se ensayó en un clon de cada sustitución única la unión a calicreína plasmática humana como sigue. Se recolectó el sobrenadante que contiene fago del cultivo y se ciclaron los fagos con trisbromometilbenceno (TBMB) basándose en los procedimientos de Heinis y col. (*Nature Chemical Biology* vol. 5 pág. 502-507 (2009)). Se ensayó en los fagos purificados de este proceso la unión a calicreína plasmática humana biotinilada usando un ensayo de unión basado en placa homogénea; se midió la lectura de ensayo en un lector de placas BMG Labtech Pherastar FS. Se promediaron los datos de unión cuantitativos de muestras de ensayo por triplicado (media) y se expresaron como señal:fondo (en que el fondo era una muestra

ensayada sin material diana). Se expresó la señal:fondo como % de la muestra original paralela. Las barras de error denotan la desviación estándar de la media. Los ensayos mostrados son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Se correlacionaron los datos de ensayo con las secuencias peptídicas. Las sustituciones marcadas en gris no se ensayaron (no se aisló un clon del muestreo de colección aleatorio). Se ensayó en paralelo una muestra de biciclo sin unión (arbitrario) para ilustrar el valor basal del ensayo.

Aleatorización de dominios peptídicos

- Construcción de colección:* Se generaron colecciones de fago pequeñas de acuerdo con los procedimientos de Heinis y col. como se describen en "Clonación de colecciones de fago" anteriormente. Se modificó el cebador sficx3ba de tal modo que la porción que codifica el biciclo estuviera basada en la secuencia de ADN del biciclo 5x5 original (5x5: dos bucles de 5 residuos) con solo 4-6 codones aleatorizados a NNS. Los codones aleatorizados eran aquellos que codifican el dominio peptídico/motivo de interés.
- 15 *Ensayo de unión de clones individuales:* Se escogieron colonias de transformantes de la colección, o colonias del resultado de la selección, y se hicieron crecer como cultivos individuales en caldo 2TY que contenía antibiótico selectivo. Se secuenció el ADN de las colonias escogidas usando un secuenciador de ADN QIAgen PyroMark Q96 para revelar la sustitución aminoacídica presente en cada clon, y se ensayó la unión a calicreína plasmática humana como sigue. Se recolectó el sobrenadante que contiene fago del cultivo y se ciclaron los fagos con trisbromometilbenceno (TBMB) basándose en los procedimientos de Heinis y col. (Nature Chemical Biology vol. 5
- 20 pág. 502-507 (2009)). Se ensayó en el fago purificado de este proceso la unión a calicreína plasmática humana biotinilada usando un ensayo de unión basado en placa homogénea; lectura de ensayo medida en un lector de placas BMG Labtech Pherastar FS. Se promediaron los datos de unión cuantitativos de muestras de ensayo por duplicado (media) y se expresaron como señal:fondo. Los datos de ensayo mostrados son representativos de al
- 25 menos 2 experimentos independientes. Los datos de ensayo se correlacionaban con las secuencias peptídicas.

Síntesis y purificación de péptidos bicíclicos

- Se muestran las secuencias peptídicas en las Tablas 1 y 2. La síntesis peptídica se basaba en la química de Fmoc, usando un sintetizador peptídico Symphony fabricado por Peptide Instruments. Se emplearon Fmoc-aminoácidos estándares (Sigma, Merck), con los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Gln(Trt); His(Trt); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc), Tyr(tBu) (Sigma). El reactivo de acoplamiento era HCTU (Pepceuticals), se empleó diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma) como base y se consiguió la desprotección con piperidina al 20 % en DMF (AGTC). Se practicaron las síntesis a escala de 100 μ mol usando
- 35 resina Fmoc-Rink amida AM 0,37 mmol/g (AGTC), se utilizaron Fmoc-aminoácidos con un exceso de 4 veces y la base estaba a un exceso de 4 veces con respecto a los aminoácidos. Se disolvieron los aminoácidos a 0,2 M en DMF, HCTU a 0,4 M en DMF y DIPEA a 1,6 M en N-metilpirrolidona (Alfa Aesar). Los tiempos de acoplamiento eran generalmente de 30 minutos, y los tiempos de desprotección de 2 x 2,5 minutos. Se acopló Fmoc-N-metilglicina (Fmoc-Sar-OH, Merck) durante 1 h y los tiempos de desprotección y acoplamiento para el siguiente residuo eran de
- 40 20 min y 1 h, respectivamente. Después de la síntesis, se lavó la resina con diclorometano y se secó. Se efectuó la escisión de los grupos protectores de cadena lateral y del soporte usando 10 ml de TFA/H₂O/iPr₃SiH/ditiotreitol 95:2,5:2,5:2,5 v/v/v/v durante 3 horas. Después de la escisión, se retiró la resina gastada por filtración y se añadió el filtrado a 35 ml de dietiléter que se había enfriado a -80 °C. Se centrifugó el sedimento peptídico, se desechó el sobrenadante etérico y se lavó el sedimento peptídico con éter frío dos veces más. Se resolubilizaron entonces los
- 45 péptidos en 5-10 ml de acetonitrilo-agua y se liofilizaron. Se retiró una muestra pequeña para análisis de la pureza del producto bruto por espectrometría de masas (MALDI-TOF, Voyager DE de Applied Biosystems). Después de la liofilización, se tomaron los polvos peptídicos en 10 ml de clorhidrato de guanidinio 6 M en H₂O, se suplementaron con 0,5 ml de ditiotreitol 1 M y se cargaron en una columna de HPLC preparativo C8 Luna (Phenomenex). Se acidificaron los disolventes (H₂O, acetonitrilo) con ácido hetapfluorobutírico al 0,1 %. El gradiente oscilaba de 30-70
- 50 % de acetonitrilo en 15 minutos a un caudal de 15/20 ml/min, usando un sistema de HPLC preparativo Gilson. Se combinaron las fracciones que contienen material peptídico lineal puro (como se identifica por MALDI) y se modificaron con trisbromometilbenceno (TBMB, Sigma). Para esto, se diluyó el péptido lineal con H₂O hasta ~35 ml, se añadieron ~500 μ l de TBMB 100 mM en acetonitrilo y se inició la reacción con 5 ml de NH₄HCO₃ 1 M en H₂O (pH 8). Se dejó proseguir la reacción durante ~30-60 min a TA y se liofilizó una vez se completó la reacción (a juzgar por MALDI). Después de la liofilización, se purificó el péptido modificado como anteriormente, reemplazando la
- 55 columna Luna C8 por una Gemini C18 (Phenomenex), y cambiando el ácido a ácido trifluoroacético al 0,1 %. Se combinaron las fracciones puras que contenían el material modificado con TMB correcto, se liofilizaron y se mantuvieron a -20 °C para almacenamiento.
- 60 Se adquirieron los aminoácidos no naturales de las fuentes expuestas en la Tabla 7.

Se acoplaron habitualmente los aminoácidos voluminosos o impedidos (NMe-Ser, NMe-Trp, NorHar, 4PhenylPro,

Agb, Agp, NMeArg, Pen, Tic, Aib, Hyp, NMe-Ala, NMe-Cys, 4,4-BPAI, 3,3-DPA, Dpg, 1NAI, 2NAI, Aze, 4BenzylPro, Ind) durante 1 hora (20 min de desprotección) y 6 h para el residuo siguiente (20 min de desprotección). Se usó HCTU como reactivo de acoplamiento como anteriormente. La escala era habitualmente de 50 μmol .

5 Ensayos enzimáticos

- Se realizaron los ensayos enzimáticos funcionales en Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 1 mM y BSA 1 mg/ml (todos de Sigma UK) pH 7,4 a 25 °C en placas de 96 pocillos negros sólidos. Brevemente, se incubaron calicreína plasmática humana 26,5 pM (adquirida en Stratech, RU) o calicreína plasmática de rata 500 pM (expresada y purificada internamente) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de péptido de prueba durante 15 minutos antes de la adición del sustrato fluorogénico Z-PheArg-AMC (Enzo Lifesciences UK) hasta una concentración de ensayo final de 100 μM en DMSO al 4 %. Se midió la liberación de AMC usando un Pherastar FS (BMG Labtech), excitación a 360nm, emisión a 460 nm. Se calculó la tasa de la fase lineal de la reacción, típicamente de 5 a 45 minutos, con el software de análisis de datos MARS (BMG labtech). Se usó entonces la tasa para calcular CI50 y Ki en Prism (GraphPad). Se usó una ecuación de regresión no lineal de inhibición de cuatro parámetros para calcular la CI50. Se usó la ecuación de Ki de ajuste de un sitio para calcular la Ki, restringiendo la Ki a la Km del sustrato, que es de 150 μM . Todos los valores de Ki/CI50 son la media de al menos dos experimentos independientes, y al menos tres para los péptidos con valores de Ki menores de 1 nM.
- Se disolvieron los péptidos en forma de sales de TFA en su forma en polvo y se prepararon habitualmente soluciones madre en agua. Se centrifugaron y filtraron todas las soluciones (filtros de jeringa de 20 μm) antes de la medida de absorción a 280 nm. Se calcularon los coeficientes de extinción basándose en el contenido de Trp/Tyr del péptido y del de TMB (el núcleo de TMB, cuando está contenido en un péptido, tiene un ϵ de $\sim 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para péptidos que contienen aminoácidos no naturales como propiedades cromofóricas sospechadas (es decir, NorHar, 4PhenylPro, 3Pal, 4Pal, Tic, 4GuanPhe, 4,4-BPAI, 3,3-DPA, 1NAI, 2NAI, 4BenzylPro, Ind), se determinaron las concentraciones pesando el polvo y disolviendo el péptido en una cantidad definida de agua. Se prepararon estos independientemente dos veces, para péptidos con una Ki de calicreína de 1 nM o menos.

Elaboración de perfiles de estabilidad plasmática

- Se emplearon tres procedimientos para valorar la estabilidad de biciclos (péptidos conjugados con andamiajes moleculares) en plasma.

Procedimiento 1:

- Se desarrolló un ensayo de elaboración de perfiles de estabilidad plasmática que empleaba detección espectrométrica de masas (MALDI-TOF, Voyager DE, Applied Biosystems) de la masa original, hasta el momento en que la masa del péptido original ya no era observable. Específicamente, se incubaron 200 μM de péptido en presencia de plasma de rata o humano al 35 % (Sera labs, usando citrato como anticoagulante) a 37 °C, que se suplementó con 1 x PBS (derivado de una solución madre 10 xPBS, Sigma). En diversos puntos temporales (es decir, $t = 0, 3, 24 \text{ h}$, después de ello diariamente hasta 10 días), se añadieron 2 μl de muestra a 18 μl de bicarbonato de amonio 30 mM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo:H₂O. Se congelaron las muestras a -80 °C hasta el momento del análisis. Para el análisis espectrométrico de masas que determina la ventana de detección aproximada del péptido, se punteó la muestra de acetonitrilo:H₂O diluida de un punto temporal dado directamente (0,7 μl) sobre la placa de MALDI. Se recubrió la matriz (ácido alfa-cianocinámico, Sigma, preparado en forma de una solución saturada en acetonitrilo:agua 1:1 que contiene un 0,1 % de ácido trifluoroacético) sobre la muestra (1 μl). En un entorno de intensidad láser similar en MALDI TOF, pudo determinarse entonces el tiempo hasta que el péptido original no era ya detectable. Debería señalarse que este es un ensayo cualitativo que sirve para detectar cambios relativos en la estabilidad plasmática.

Procedimiento 2:

- Para obtener los datos de estabilidad más rápidamente, se valoraron también los péptidos en plasma al 95 %. Aquí se omitió el PBS y se diluyó directamente una solución madre de péptido 1 mM (en DMSO) en plasma (es decir, 2,5 μl de solución madre en 47,5 μl de plasma), dando una concentración final de 50 μM . Se tomaron muestras de 5 μl en los puntos temporales apropiados y se congelaron a -80 °C. Para análisis, se descongelaron las muestras, se mezclaron con 15 μl de acetonitrilo:metanol 1:1 y se centrifugaron a 13 k durante 5 min. Se aspiraron 5 μl del sobrenadante que contiene péptido y se mezclaron con bicarbonato de amonio 30 mM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo:H₂O. Se punteó entonces 1 μl de esta en la placa de MALDI y se analizó como se describe anteriormente. Como anteriormente, debería señalarse que este es un ensayo cualitativo que sirve para detectar cambios relativos en la estabilidad plasmática.

Procedimiento 3:

- Para obtener la estabilidad plasmática cuantitativamente, se enviaron soluciones madre peptídicas (1 mM en DMSO) a Biofocus, RU, quienes practicaron el análisis. Se diluyeron los péptidos a 100 uM con agua y se diluyeron 1:20 en plasma (concentración final 5 uM, con plasma al 95 %), se muestrearon según fuera apropiado, se precipitaron como anteriormente y se cuantificaron usando un Waters Xevo TQ-MS.

Ejemplo 1: Identificación de residuos preferidos para la actividad de unión

- 10 A partir de los ejemplos de péptidos 5x5 mostrados en la Tabla 4, es posible identificar los aminoácidos que están conservados entre péptidos con afinidad de unión. Para determinar cuáles residuos se prefieren para actividad de unión, se estudiaron adicionalmente representantes de dos de las familias de péptidos identificadas. Estos eran el péptido 06-34, que comprende un motivo CXWPARC en el primer bucle del biciclo, y el péptido 06-56, que comprende un motivo CGGxxNCR entre ambos bucles del biciclo. Para cada secuencia peptídica, se creó un conjunto de 10 colecciones de fago en que 9 de los residuos de bucle se mantenían constantes y el otro residuo se aleatorizaba de modo que pudiera expresarse cualquier aminoácido en la colección en esa posición. (Véase “Aleatorización de posiciones individuales- construcción de colección” en los Procedimientos anteriores). Para cada colección, se cribó en un conjunto de 20 clones de fago seleccionados aleatoriamente la unión a calicreína humana en un ensayo de unión a fago para identificar los residuos críticos para la unión a diana. (Véase “Aleatorización de posiciones individuales- ensayo de unión de clones individuales” en los Procedimientos anteriores). Se muestran los datos de este experimento en las Figuras 4-6.

- Para el péptido 06-34 (Figura 4), resulta evidente que la Arg1 del biciclo puede reemplazarse por una variedad de aminoácidos diferentes y la unión a calicreína plasmática humana se retiene o potencia. En contraposición, el reemplazo de los residuos 2, 3, 4, 5 (Trp2, Pro3, Ala4, Arg5) por la mayoría de aminoácidos reducía en gran medida la señal observada en un ensayo que se estableció con un corte riguroso para productos de unión de alta afinidad. La Val6 puede reemplazarse por muchos aminoácidos diferentes y la actividad de unión de retiene o potencia. El reemplazo de los demás residuos del segundo bucle indicaba que solo la Leu10 podía reemplazarse por una variedad de diferentes aminoácidos reteniendo actividad. Las posiciones 7, 8 y 9 tienen una capacidad limitada de sustitución y no se identificaron sustituciones que potenciaran la unión.

- Para el péptido 06-56 (Figuras 5 y 6), resulta evidente que las glicinas en posición 1 o 2 son los residuos más preferidos para unión a calicreína plasmática, como la arginina, triptófano y treonina en la posiciones 6, 8 y 9. La glutamina en posición 4 y la treonina en la posición 10 pueden reemplazarse por una variedad de residuos reteniendo una buena actividad de unión. Los tres residuos restantes, prolina en posición 1, asparagina en posición 5 y treonina en posición 7, tienen una capacidad limitada de sustitución.

Análisis de reemplazos de aminoácidos

- 40 A partir del análisis precedente, resulta evidente que, para 06-34, la posición 1 y la posición 6 pueden reemplazarse por una variedad de aminoácidos y seguir reteniendo una actividad mayor o igual a la del péptido original. Para evaluar si estas observaciones se mantendrían con péptidos sintéticos aislados, se diseñó un conjunto de péptidos de acuerdo con los hallazgos de la Figura 4, donde se reemplazó la Arg1 por serina y donde se sustituyó la Val6 por treonina, metionina o leucina. Se sintetizaron también péptidos que emplean diversas combinaciones de estas sustituciones. Estas sustituciones producían una mayor señal de unión en el ensayo (Tabla 5).

- 50 Todos los péptidos sintéticos variantes tenían una actividad aproximadamente equivalente o una actividad potenciada frente a la calicreína plasmática humana en ensayos de inhibición enzimática en comparación con el péptido original 06-34, indicando que este tipo de análisis podía usarse para ajuste fino de las afinidades de unión a diana, y sugiriendo una vía para identificar los candidatos peptídicos a compuestos principales de muy altas potencias.

- Se ensayaron también los péptidos frente a calicreína plasmática de rata en ensayos de enzimas aisladas. La sustitución de Arg1 por Ser1 tenía un impacto marginal sobre la actividad frente a calicreína de rata, mientras que las sustituciones de Val6 por treonina, metionina o leucina generaban péptidos con potencia notablemente aumentada frente a calicreína plasmática de rata. La actividad de calicreína humana se retenía completamente. Por tanto, al determinar las posiciones susceptibles de sustituciones, pueden identificarse péptidos con propiedades deseables, tales como reactividad cruzada por ortólogo de diana.

- 60 Para demostrar la posibilidad de reemplazar estas dos posiciones por aminoácidos no naturales para tener la capacidad de introducir funcionalidades o propiedades que no estén presentes en el péptido original, se reemplazaron Arg1 y Val6 en 06-34-03 por alanina o N-metilglicina (sarcosina), o por N-metilserina en posición 1, y

se evaluó la unión. Notablemente, como se muestra en la Tabla 6, las posiciones 1/6 son susceptibles de retirada de la cadena lateral totalmente, ya que los péptidos R1A/V6A (06-34-03 Ala1,6) retenían toda la potencia en comparación con el original. El reemplazo de los residuos 1,6 por N-metilglicina (06-34-03 NMeGly1,6) causaba una reducción de la potencia, sin embargo, la afinidad de unión permanecía en el intervalo nanomolar bajo. La introducción de una N-metilserina en posición 1 causa una pérdida de 10 veces de potencia, pero la unión permanece en el intervalo picomolar. Por tanto, pueden identificarse ciertas posiciones en el biciclo que permiten cambios en la estructura del esqueleto peptídico o las cadenas laterales que podrían permitir una mejora potenciada de la estabilidad a proteasas, una solubilidad potenciada, un potencial de agregación reducido y la introducción de grupos funcionales ortólogos.

Ejemplo 2: Análisis detallado del dominio WPAR

Se analizó el motivo WPAR identificado en el Ejemplo 1 en el contexto del péptido 06-34-03, para identificar alternativas o mejoras del motivo WPAR. Se construyó una colección donde las posiciones 1, 6, 7, 8, 9 y 10 de 06-34-03 estaban fijadas y las posiciones 2, 3, 4 y 5 estaban aleatorizadas (véase "Aleatorización de dominios peptídicos- construcción de colecciones" en los Procedimientos anteriores). Se practicaron las selecciones frente a calicreína plasmática humana a una variedad de rigores (véase "Selecciones de fago" en los Procedimientos anteriores). Se identificaron todas las secuencias de resultado y se analizó la unión a diana (véase "Aleatorización de dominios peptídicos- ensayo de unión de clones individuales" en los Procedimientos anteriores). La Tabla 17 enumera cada secuencia única, su abundancia relativa en el resultado de selección (frecuencia) y un número de rango de acuerdo con la fuerza de la unión a diana.

La Tabla 17 muestra que el motivo WPAR confiere la mejor unión a calicreína plasmática humana, aunque se recuperan otras secuencias de unión a calicreína de selecciones con alta abundancia. Estas incluyen, pero sin limitación: WPSR, WPAR, WSAR, WPFR, WPYR, FPFR y FPFR. Los motivos más efectivos y abundantes en las posiciones 2, 3, 4 y 5 pueden resumirse como: $W_F P \times K_R$

La Tabla 18(A) muestra que WPAR y WPSR eran los más abundantes en los resultados de selección más rigurosos; FPFR y FPYR eran abundantes en los resultados de selección menos rigurosos. Esto indicaría que las secuencias similares a WPAR son productos de unión más fuerte que las secuencias similares a FPFR. El análisis de cada motivo (en el contexto de 06-34-03) en el ensayo de unión a diana (Tabla 18(B)), revela que WPAR en las posiciones 2, 3, 4 y 5 de la secuencia de 06-34-03 es la secuencia óptima para unión a calicreína.

Ejemplo 3: Optimización de la secuencia fuera de WPAR

Se han estudiado el motivo WPAR y sus variantes en el contexto del péptido 06-34-03. La Figura 1 demuestra que algunas posiciones fuera del motivo WPAR pueden mantener la unión a calicreína cuando se sustituyen por otros residuos. Para estudiar los determinantes no WPAR de la unión a calicreína, se generó una colección de fago con una secuencia de WPAR fija y todas las demás posiciones aleatorizadas (CxWPARCxxxxC) como se describe en "Aleatorización de dominios peptídicos- construcción de colección" en los Procedimientos anteriores.

Se aislaron 80 miembros de colección aleatorios directamente del agrupamiento de colección (no selección) y se ensayó la unión a calicreína tanto a alto como a bajo rigor (Véase "Aleatorización de dominios peptídicos- ensayo de unión de clones individuales" en los Procedimientos anteriores). Estos miembros de colección, que contienen secuencias aleatorias fuera de WPAR, mostraban poca o ninguna unión a calicreína plasmática humana (datos no mostrados), indicando que el motivo WPAR solo no es suficiente para retener una unión a calicreína mensurable: el resto de la secuencia bicíclica debe contribuir también o influir en la interacción.

Se practicaron las selecciones frente a calicreína plasmática humana con esta colección para estudiar los determinantes no WPAR de la unión a calicreína, y para aislar la secuencia peptídica que contiene WPAR óptima. Se aislaron sobre 150 secuencias de resultado de selección y se cribó la unión a calicreína plasmática humana (como se describe en los Procedimientos anteriores). Se clasificaron las secuencias en orden de unión a calicreína y se alinearon las 50 secuencias superiores en la Tabla 19. La Tabla 19 muestra que el residuo en posición 1 no afecta a la unión a calicreína, pero se observa un fuerte consenso por histidina en posición 7 (lo que apoya los hallazgos del Ejemplo 1 anteriores). El péptido 06-34-03, derivado del trabajo del Ejemplo 1, es una de las mejores secuencias. La composición del segundo bucle muestra claras tendencias que confieren una fuerte unión a calicreína cuando está con un motivo WPAR.

Los mejores productos que contienen WPAR de unión a calicreína plasmática humana tienen la tendencia:

C X W P A R C T_L H Q_T D L C

H7, D9 y L10 están fuertemente conservados en las secuencias de unión a calicreína que contienen WPAR.

Se identificaron dos motivos en el segundo bucle bicíclico (posiciones 6-10):

1. $\text{C X W P A R C } \overset{\text{Q}}{\text{T}} \text{H } \overset{\text{Q}}{\text{T}} \text{D L C}$ (posiciones 6, 7 y 10: "THxxL")
2. $\text{C X W P A R C } \overset{\text{Q}}{\text{T}} \text{I L } \overset{\text{Q}}{\text{T}} \text{D L C}$ (posiciones 7, 8 y 10: "xHxDL")

Se agruparon sobre 120 productos de unión a calicreína plasmática humana (secuencias de resultado de selección) 5 identificados de 2 formas diferentes, de acuerdo con su derivación de los motivos "THxxL" o "xHxDL". Para todos los grupos, la señal de ensayo de unión a calicreína media para las secuencias de resultado se señaló como medida de la unión a calicreína para un grupo dado (Tabla 20).

- Los datos del ensayo de unión a calicreína mostrados en la Tabla 20 demuestran que los motivos 'THxxL' y 'xHxDL' 10 dan como resultado la mejor unión a calicreína cuando están en un péptido bicíclico con un motivo WPAR. La combinación de los dos motivos 'THxDL' da la unión máxima con la calicreína plasmática humana e incluye la secuencia del segundo bucle 'THQDL' del péptido 06-34-03.

Ejemplo 4: Análisis sistemático de la estabilidad plasmática

- 15 Para un biciclo inhibidor de calicreína, es pertinente obtener un perfil de estabilidad a proteasas adecuado, de tal modo que tenga un bajo aclaramiento impulsado por proteasa en plasma u otros entornos relevantes. En un ensayo de estabilidad plasmática comparativa rápido (sección de procedimientos, procedimiento 1) que observaba la desaparición progresiva del péptido original en plasma de rata, se encontró que la alanina N-terminal (que está 20 presente en el momento de las selecciones y estaba incluida originalmente en péptidos sintéticos de secuencias de compuestos principales) se retira rápidamente de todas las secuencias bicíclicas ensayadas tanto por plasma de rata como humano. Esta degradación se evitaba sintetizando un candidato a compuesto principal que carecía de ambas alaninas N y C-terminales. Para retirar los puntos de reconocimiento potenciales de aminopeptidasas y carboxipeptidasas, se cubre el extremo amino libre que reside ahora en Cys1 del candidato a compuesto principal 25 con anhídrido acético durante la síntesis peptídica, conduciendo a una molécula que está acetilada N-terminalmente. De igual forma, se sintetiza la cisteína C-terminal en forma de amida para retirar el punto de reconocimiento potencial de carboxipeptidasas. Por tanto, los candidatos a compuestos principales bicíclicos tienen la siguiente secuencia genérica: $\text{Ac-C}_1\text{AA}_1\text{AA}_2\text{AA}_n\text{C}_2\text{AA}_{n+1}\text{AA}_{n+2}\text{AA}_{n+3}\text{C}_3(\text{TMB})\text{-NH}_2$, donde "Ac" hace referencia a acetilación N-terminal. "-NH₂" hace referencia a amidación C-terminal, donde "C₁, C₂, C₃" hacen referencia a la primera, 30 segunda y tercera cisteínas en la secuencia, donde "AA₁" a "AA_n" hacen referencia a la posición del aminoácido (cuya naturaleza "AA" se define por las selecciones descritas anteriormente) y donde "(TMB)" indica que la secuencia peptídica se ha ciclizado con TBMB o cualquier otro andamiaje reactivo adecuado.

- Debido a la alta afinidad de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ tanto por calicreína humana (K_i= 0,17 nM) como de rata (C_i50= 35 1,7 nM), se eligió este biciclo para el desarrollo del compuesto principal. Usando el mismo ensayo de elaboración del perfil de estabilidad plasmática rápido descrito anteriormente, Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ tenía una ventana de observabilidad de aproximadamente 2 días (sección de procedimientos, procedimiento 1) que es igual a una semivida plasmática en rata de ~2 h (determinada cuantitativamente por LC/MS, véase a continuación, tabla 23, procedimiento 3).

- 40 En un esfuerzo por identificar el sitio o sitios de reconocimiento proteolítico en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂, se muestreó el péptido en plasma de rata al 35 % con el tiempo (procedimiento 1) y se analizó en cada muestra la aparición progresiva de fragmentos peptídicos usando espectrometría de masas MALDI-TOF. El masa original de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ es de 1687 Da. Con el tiempo (Figura 7), aparecen fragmentos de masas 1548,6 (M₁), 1194,5 (M₂) y 45 1107,2 (M₃). A partir de la secuencia de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ (Ac-C₁S₁W₂P₃A₄R₅C₂L₆H₇Q₈D₉L₁₀C₃-NH₂), puede calcularse que el pico de M₁ corresponde a Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que carece de Arg5 (-R5). Este parece ser el evento proteolítico inicial, que es seguido por la retirada del segmento de 4 aminoácidos WPAR en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ (M₂, -WPAR), y finalmente se escinde el primer bucle completo de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ (M₃, -SWPAR) (Figura 8). A partir de estos datos, resulta evidente que la Arg5 de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ es el sitio de 50 reconocimiento de proteasa plasmática de rata principal que es responsable de la degradación del biciclo.

Sustituciones de alanina y permutación del primer bucle:

- Habiendo identificado a Arg5 en la constitución del sitio de reconocimiento de proteasas plasmáticas de rata, se 55 emprendió una campaña de síntesis química de derivados de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ con el objetivo de identificar candidatos con la mayor estabilidad proteolítica plasmática. De forma crucial, tales modificaciones no deberían afectar a la potencia contra calicreína humana o de rata. Se practicó una exploración inicial respecto al papel de la secuencia/farmacóforo WPAR (Figura 9, 10) reemplazando W₂P₃ por A₂A₃ o A₂Q₃ y permutando partes del primer bucle entero del biciclo. La Tabla 8 siguiente muestra las secuencias y afinidades respectivas frente a calicreína.

60

A partir de estos datos, resulta evidente que la retirada simultánea de W_2P_3 reduce radicalmente la unión a calicreína por un factor de ~ 100000 , volviendo efectivamente la molécula farmacológicamente inerte. La importancia de la *secuencia* correcta de aminoácidos está subrayada por los cuatro péptidos permutados (Scram2-4), ya que todos ellos exhiben una reducción sustancial de afinidad hacia calicreína (Figura 10). Curiosamente, todos los

5 péptidos tienen un perfil de estabilidad en plasma de rata aproximadamente idéntico (entre 1 y 2 días, procedimiento 1), indicando que el reconocimiento de proteasa plasmática se basa en la *presencia* de la arginina (Figura 7) y no en su *posición* en la secuencia.

A continuación, se generaron cinco derivados de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ donde W_2 , P_3 , A_4 , R_5 y C_2 se

10 reemplazaron por sus respectivas contrapartidas D-enantioméricas (Tabla 9).

A partir de los datos, resulta evidente que el reemplazo por D-aminoácido de A_4 , R_5 y C_2 aumenta la estabilidad peptídica frente a proteasas plasmáticas. Como la escisión de Arg5 por proteasas plasmáticas de rata parece ser el primer evento en la degradación peptídica, ocurrirá la hidrólisis inicial de enlaces peptídicos en el lado N- y/o C-

15 terminal de Arg5. Es plausible que reemplazar los aminoácidos en cualquier lado de Arg5 por sus D-enantiómeros bloquee la hidrólisis del enlace peptídico adyacente por impedimento estérico. Es más, este es un efecto que se ha observado anteriormente (Tugyi y col. (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

El efecto perjudicial de la sustitución por D-aminoácidos sobre las afinidades por calicreína es llamativo en todos los

20 casos; las pérdidas de potencias oscilan de 300 (D-Arg5) a 45000 veces (D-Trp2). Esto subraya la importancia de una exhibición tridimensional correcta de estas cadenas laterales al bolsillo de unión a biciclo de calicreína. Es igualmente llamativo el efecto de D-Ala4: aquí, cambiar la orientación de un solo grupo metilo (que es la cadena lateral de Ala) reduce la afinidad 7000 veces.

25 N-metilaciones:

A continuación, se reemplazaron sistemáticamente los residuos en el primer bucle por sus contrapartidas N-metilo. La N-metilación sirve como protección directa del enlace peptídico mismo; sin embargo, debido a la ausencia de

30 hidrógeno de amida, la adición de volumen estérico (el grupo metilo) y los cambios en los ángulos torsionales preferidos, se esperan pérdidas de potencias.

La Tabla 10 resume los datos.

La N-metilación de aminoácidos en el bucle 1 exhibe un efecto perjudicial menos drástico en conjunto sobre la

35 potencia. En particular, la N-metilación de Arg5 sigue procurando un producto de unión nanomolar de un dígito (reducción de 20 veces de afinidad en comparación con el péptido de tipo silvestre) y su estabilidad en plasma de rata supera el tiempo de ensayo (no era observable fragmentación del péptido en MS), haciendo de este un candidato a compuesto principal mejorado atractivo. Como con las sustituciones con D-aminoácidos, la N-metilación de residuos adyacentes a Arg5 confiere una estabilidad potenciada al péptido, presuntamente mediante interferencia

40 estérica que afecta a la hidrólisis catalizada por proteasa de enlaces peptídicos N y/o C-terminales de Arg5. Es notable que la Ser1 puede estar N-metilada sin una pérdida significativa de potencia, indicando que la integridad del esqueleto peptídico en esta posición no es esencial para la unión.

Sustituciones de arginina:

45 Dada la importancia de la Arg5 en el reconocimiento por proteasas plasmáticas de rata, se ensayó un conjunto de análogos de arginina en el compuesto principal Ac-06-34-18(TMB)-NH₂. Se muestran las estructuras químicas en la Figura 11 y se muestran los datos de potencia frente a estabilidad en la Tabla 11.

50 Llamativamente, todos los análogos de arginina aumentan la estabilidad del péptido más allá del tiempo de la ventana de ensayo, confirmando la importancia de la integridad de Arg5 en el reconocimiento de proteasa plasmática. Aumentar (HomoArg) o disminuir la longitud de la cadena lateral (Agb, Agp) disminuye en ambos casos la afinidad, sin embargo el análogo HomoArg sigue procurando un producto de unión muy bueno ($K_i = 2,1$ nM) de estabilidad potenciada. El alargamiento del esqueleto aminoacídico con un grupo metileno en Arg5 (un denominado

55 beta-aminoácido) con retención de la misma cadena lateral (β -homoArg5) procura también un producto de unión de estabilidad potenciada, sin embargo al precio de una reducción más significativa de la afinidad ($K_i = 8,2$ nM). Reemplazar la parte alifática de la cadena lateral de Arg por un anillo fenilo procura una cadena lateral de resonancia estabilizada, más voluminosa y rigidizada que contiene guanidilo (4GuanPhe). De todos los análogos de Arg ensayados, 4GuanPhe tenía la máxima afinidad (reducción de 2 veces en comparación con el tipo silvestre) con

60 una estabilidad plasmática potenciada. De forma interesante, el grupo guanidilfenilo es estructuralmente cercano al conocido inhibidor de calicreína de molécula pequeña benzamidina (Stürzebecher y col. (1994), *Novel plasma Kallikrein inhibitors of the benzamidine type*. Braz J Med Biol Res. 27(8): 1929-34; Tang y col. (2005), *Expression*,

crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma Kallikrein. J.Biol.Chem. 280: 41077-89). Además, se han empleado fenilguanidinas derivatizadas como inhibidores selectivos de otra serinproteasa, uPA (Sperl y col., (4-Aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase (2000) Proc Natl Acad Sci U S A. 97(10): 5113-8). Por tanto, el Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que contiene 4GuanPhe5 puede verse como un inhibidor de molécula pequeña cuya selectividad está conferida por el péptido bicíclico circundante. Esto puede comprender un principio para otros inhibidores basados en biciclo, donde se "injerta" un inhibidor de molécula pequeña conocido de baja selectividad en un biciclo en la posición correcta, conduciendo a una molécula de potencia y selectividad superior.

- 10 La modificación del grupo guanidilo de Arg mismo, por metilación (SDMA, NDMA), retirada de la carga positiva (Cit, donde el grupo guanidilo se reemplaza por el grupo urea isoestérico, pero no cargado) o delección de la Arg en conjunto (Δ Arg) tiene efectos fuertemente perjudiciales sobre la potencia de unión a calicreína. Por tanto, la integridad y presencia del grupo guanidilo es crucial, mientras que la naturaleza de la cadena lateral que conecta con el grupo guanidilo o esqueleto en Arg5 no lo es. Es notable que la Arg5 pueda reemplazarse también por lisina, sin embargo de nuevo con afinidades reducidas (véase el péptido WPAK).

En resumen, los datos hasta ahora indican que Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que emplean HomoArg, NMeArg o 4GuanPhe como reemplazos de arginina podrían constituir candidatos de estabilidad plasmática potenciada con altas afinidades.

20

Ejemplo 5: Mejora de la potencia de un candidato a compuesto principal mediante modificaciones no naturales y combinación con modificaciones potenciadoras de la estabilidad plasmática

Puede conseguirse viablemente mejorar la potencia de un candidato bicíclico dado mediante varios mecanismos.

- 25 Estos se han abordado parcialmente en el Ejemplo 4, y pueden reescribirse como sigue:

1. Incorporar restos hidrófobos que explotan el efecto hidrófobo y conducen a menores tasas de disociación, de tal modo que se consigan mayores afinidades.

- 30 2. Incorporar grupos cargados que explotan las interacciones iónicas a largo alcance, conduciendo a tasas de asociación más rápidas y mayores afinidades (véase, por ejemplo, Schreiber y col., *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31).

3. Incorporar restricciones adicionales al péptido, es decir,

35

- Restringir las cadenas laterales de aminoácidos correctamente de tal modo que la pérdida de entropía sea mínima tras unión a diana,
- restringir los ángulos de torsión del esqueleto de tal modo que la pérdida de entropía sea mínima tras unión a diana.

- 40 introducir ciclaciones adicionales en la molécula por razones idénticas.

(para revisiones, véanse Gentilucci y col., Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203 y Nestor y col., Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

- 45 Triptófano y sustituciones análogas hidrófobas:

Inicialmente, se sustituyeron una serie de aminoácidos hidrófobos en el sitio Trp2 para identificar candidatos que podrían reemplazar al triptófano sensible a oxidación e identificar candidatos que podrían aumentar la potencia (abordando el primer punto anterior). Se muestran las cadenas laterales de estos aminoácidos en la Figura 12 y se resumen los datos de afinidad en la Tabla 12 siguiente.

50

Como se esperaba, ninguna de las modificaciones aumenta la estabilidad plasmática. La 2-naftilalanina está muy estrechamente relacionada con Trp2 y exhibe una potencia ligeramente más débil que el tipo silvestre, haciendo de este un buen reemplazo resistente a la oxidación para Trp2. De forma interesante, 3,3-DPA2 tiene una estructura que es muy diferente de Trp, aunque el péptido correspondiente retiene una alta potencia. Esto puede indicar que el bolsillo de contacto de Trp con calicreína podría explotarse para una mayor afinidad de unión identificando una entidad hidrófoba diseñada correctamente.

55

Análogos de prolina:

60

A continuación, interesaba determinar el papel de Pro3 en el farmacóforo WPAR en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂. Se eligieron 4-hidroxi- o 4-fluoro-trans-(L)-prolina (HyP3, 4FluoPro3) por su propiedad conocida de inducción de rigidez

y helicidad adicionales en el esqueleto peptídico (Figura 15, Tabla 13). Adicionalmente, la presencia del hidroxilo en HyP prueba la accesibilidad al disolvente de la cadena lateral de prolina. Las K_i de los derivados respectivos eran casi idénticas a la del tipo silvestre, indicando que los efectos sobre el esqueleto peptídico son despreciables, pero demostrando también que la cadena lateral es accesible. Para elaborar esto adicionalmente, se ensayaron dos derivados adicionales de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que contenían una extensión voluminosa en el carbono γ y de la cadena lateral de Pro3 (4Phenyl-Pro, 4BenzylPro). El primero exhibía una conservación sorprendente de potencia, mientras que la del segundo estaba fuertemente afectada, demostrando que la cadena lateral de Pro es accesible, pero limitado a solo distintas modificaciones. A pesar del volumen estérico en estas modificaciones, la estabilidad plasmática era idéntica a la de tipo silvestre. Por tanto, estas modificaciones no mejoran la selectividad frente a otras proteasas.

Para probar el efecto del tamaño del anillo de prolina sobre la unión, se substituyó por el análogo de Pro de 4 miembros altamente restringido ácido azetidincarboxílico (Aze) y el anillo de 6 miembros más flexible (ácido piperidínico, Pip) la Pro3. El Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Aze3 se une a calicreína con la máxima afinidad de todos los derivados hasta ahora, superando la del tipo silvestre por un factor de 3 (Figura 14). Parece haber una relación inversa entre el tamaño de anillo y K_i , lo que sugeriría que la restricción conformacional en la posición 3 de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ es clave para una molécula de unión fuerte.

La flexibilidad de la cadena lateral de prolina para tolerar grupos voluminosos grandes se subraya por los análogos de prolina bi/tricíclicos Tic, NorHar e Ind (Figura 13). Particularmente para los dos últimos casos, las afinidades están todavía dentro del intervalo nanomolar de un dígito.

Finalmente, se buscó probar el requisito de estructura de anillo en Pro3 en conjunto. Con este fin, se eligió ácido aminoisobutírico (Aib, Figura 13, Tabla 13) que, debido a su doble sustitución de metilo en el carbono α , tiene un fuerte efecto estructural sobre los aminoácidos vecinos en la inducción de helicidad α o 3_{10} (Toniolo y col. (1993), Biopolymers 33, 1061-72; Karle y col. (1990), Biochemistry 29, 6747-56). Notablemente, este aminoácido no cíclico no natural es bien tolerado en lugar de Pro3, a una K_i de 1,2 nM. Por tanto, el papel de Pro3 en el farmacóforo WPAR es introducir una restricción en el esqueleto peptídico. Esta restricción puede potenciarse empleando un análogo de prolina con tamaño de anillo reducido (véase Aze3). A la inversa, el anillo de prolina puede reemplazarse con relativa eficiencia por aminoácidos no cíclicos pero inductores de estructura, tales como Aib.

Análogos misceláneos:

En la Tabla 10, se mostraba que la Ser1 en el bucle 1 de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ podía N-metilarse con un impacto muy pequeño sobre la potencia (K_i de 0,5 frente a 0,17 nM en WT). Se buscó determinar si esta localización toleraba una sustitución doble grande en el C α en posición 1. Con este fin, se reemplazó la Ser1 por Dpg (dipropilglicina) (Figura 15). La afinidad de este péptido por calicreína es de 1,1 nM, indicando que la posición 1 es muy flexible para acomodar virtualmente cualquier residuo voluminoso. Por tanto, esta posición en el bucle 1 podía explotarse para la inclusión deliberada de funcionalidades o grupos químicos deseables, incluyendo aminoácidos solubilizantes, radiomarcajes, marcajes de tinte, ligadores, sitios de conjugación, etc.

Se ensayaron también varios análogos de alanina en posición 4. Como ya se ha observado con las N-metil y D-alaninas (Tabla 2, 3), la Ala4 es altamente sensible a la orientación estérica en C α , o a la modificación en el esqueleto mismo. Dos derivados más de esta clase subrayan esto, ya que la elongación del esqueleto peptídico en Ala4 (β -Ala4) reduce radicalmente la afinidad ($\sim 20 \mu\text{M}$). Como se esperaba por D-Ala4, Aib4 reduce la afinidad en casi la misma medida (289 nM, Figura 15 y Tabla 14). Notablemente, la extensión de la cadena lateral de Ala por un metileno (Aba4) parece mejorar la afinidad por calicreína.

Finalmente, se reemplazó la cisteína central (Cys2) por un análogo más voluminoso y más restringido, penicilamina (Pen, Figura 15) con la esperanza de aumentar la estabilidad proteolítica debida al acceso espacial reducido al punto de reconocimiento de proteasa Arg5 vecino. Es más, la estabilidad en plasma de rata se potenciaba ligeramente, sin embargo la potencia caía significativamente, subrayando la importancia de la integridad completa de este residuo conector del andamiaje estructural.

55 Combinación de potenciación de la estabilidad plasmática y potenciación de la potencia de aminoácidos no naturales en un compuesto principal bicíclico único

Las sustituciones no naturales en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que retenían una potencia apreciable y la máxima estabilidad en plasma de rata (determinada por el procedimiento 1) eran las variantes de Arg5 homoarginina (HomoArg5), 4-guanidilfenilalanina (4GuanPhe5) y N-metilarginina (NMeArg5). Las sustituciones no naturales en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que aumentaban la potencia en comparación con el péptido de tipo silvestre eran el análogo de Pro3 ácido azetidincarboxílico (Aze3) y el análogo de Ala4 ácido 2-aminobutírico (Aba4). Por tanto, se combinaron

Aze3 y Aba4 con los promotores de estabilidad a proteasas HomoArg5, 4GuanPhe5 y NMeArg5 para determinar si esto procuraría candidatos peptídicos con alta estabilidad plasmática y potencia aumentada.

Las Tablas 15 y 16 presentan las afinidades de los diversos constructos, junto con las estabilidades plasmáticas.

5 En primer lugar, la determinación cuantitativa de las semividas en plasma de rata (4ª columna, Tabla 15) de péptidos que contienen análogos de arginina reveló que la N-metilación de Arg5 era la más potente en la protección del péptido ($t_{1/2} > 20$ h), seguida de HomoArg5 y GuanPhe5. El fuerte efecto protector de la N-metilación de Arg no es quizás sorprendente, ya que previene directamente la hidrólisis del enlace peptídico. Tras la inclusión de Aze3 en
10 estos compuestos, podía potenciarse la afinidad de estos péptidos en todos los casos, haciendo a Ac-(06-34-18) Aze3 HomoArg5 y Ac-(06-34-18) Aze3 NMeArg5 candidatos atractivos para desarrollo posterior (Tabla 15, Figura 16).

El efecto potenciador de la afinidad de Aba4 no pudo reproducirse en el contexto de Aze3 ni ninguno de los
15 análogos de arginina, ya que los valores de K_i eran mayores que los observados sin Aba4. Por tanto, los efectos potenciadores de la potencia de Aze3 son independientes del tipo de sustitución de arginina, mientras que aquellos de Aba4 probablemente no.

Finalmente, se reduce significativamente la actividad hacia calicreína de rata de estos péptidos (Tabla 15). Sin
20 embargo, estos valores son relativos y no cuantitativos en esta etapa, ya que la preparación de proteína calicreína de rata no es trivial y contenía impurezas.

Ejemplo 6: Potenciación de la estabilidad plasmática del compuesto principal bicíclico de calicreína FPYR libre de Trp y potenciación de la afinidad por Aze3

25 A partir del resultado de selección de los Ejemplos 1-4, se descubrieron varias secuencias semejantes a Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ que tenían una alta abundancia, pero contenían motivos WPAR alterados. Estos eran WPSR y FPYR. El último en particular es interesante ya que carece de triptófano sensible a la oxidación.

30 Se sintetizaron los biciclos que contienen WPSR, FPYR, WPYR y FPAR y se compararon con el péptido original WPAR (Tabla 21).

Como se esperaba, ninguno de los péptidos exhibía una estabilidad plasmática significativamente diferente. El
reemplazo de Trp2 por Phe2 provoca una reducción de 40 veces de K_i , subrayando el requisito de la cadena lateral
35 de Trp2 más voluminosa. Sin embargo, esta reducción puede compensarse reemplazando Ala4 por Tyr4 (dando el motivo FPYR), de modo que la afinidad aumenta de nuevo a casi la de la secuencia WPAR de tipo silvestre ($K_i = 0,46$ nM). Por tanto, existe una interacción cooperativa entre los residuos en posición 2 y posición 4 del biciclo Ac-06-34-18(TMB)-NH₂. Dada la alta afinidad de unión a diana y la falta de Trp2 en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Phe2Tyr4, se investigó este candidato para aumentar la semivida en plasma de rata empleando el enfoque descrito en el
40 ejemplo anterior. Además, se investigó la interacción entre Phe2 y Tyr4 al sustituir estos residuos por análogos aminoácidos no naturales.

Sustituciones no naturales de Phe2/Tyr4 en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Phe2Tyr4

45 Se practicó un conjunto no exhaustivo de síntesis que incorporan reemplazos en Phe2 o Tyr4 en el compuesto principal Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Phe2Tyr4. Se eligieron aminoácidos no naturales del mismo conjunto que en la Figura F6 y se resumen los datos de afinidad en la Tabla 22.

Aquí, la sustitución con cualquiera de los aminoácidos ensayados es generalmente bien tolerada,
50 independientemente de si la cadena lateral es una entidad heteroaromática (3Pal, 4Pal), aromática y voluminosa (1Nal, 2Nal, 4,4-BPal) o cicloalifática (Cha). 3Pal es bien tolerado en la posición 2 ($K_i = 0,91$), lo que es interesante ya que Pal contiene un grupo ionizable (es decir, que podría explotarse para formulación). Sin embargo, parece que la combinación Phe2/Tyr4 original sigue siendo la más potente.

Estabilización de Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Phe2Tyr4 en plasma de rata y efecto de la sustitución de azetidina 3

Se preparó Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ Phe2Tyr4 con sustituciones de homoarginina, 4-guanidifenilalanina y N-
metilarginina, en ausencia y presencia de Aze3. HomoArg/4Guanphe son bien tolerados, con valores de K_i casi
60 idénticos al péptido Phe2Tyr2 original (Tabla 23) y se potenciaba la estabilidad en plasma de rata por un factor de 13 ($t_{1/2} = 12,2$ h, Tabla 23). Además, los valores de CI₅₀ por calicreína de rata son similares a los del original, indicando que este es un candidato atractivo para estudios *in vivo*.

La sustitución de Pro3 por Aze3 en el contexto de FPYR procuraba de nuevo candidatos peptídicos con afinidad potenciada, es más se generó un péptido con una K_i menor de 1 nM que tendría probablemente una semivida mayor de 20 h en rata (Ac-(06-34-18) Phe2 Aze3Tyr4 NMeArg5).

- 5 A menos que se afirme otra cosa, puede usarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención. Se describen anteriormente procedimientos, dispositivos y materiales adecuados para tales usos.

Tablas

10

Tabla 1 Especificidad de diana de péptidos bicíclicos con diferentes longitudes de bucle. Se indican los valores de K_i para hPK y diferentes proteasas parálogas y ortólogas. Los valores de K_i son medias de al menos dos medidas.

Péptido bicíclico	Número de aminoácidos en bucles	K_i (nM)						
		Proteasas ortólogas			Proteasas parálogas			
		Calicreína plasmática humana (hPK)	Calicreína plasmática de mono (mPK)	Calicreína plasmática de rata (rPK)	Factor Xla humano (hfXla)	Trombina humana	Plasmina humana	Factor Xlla humano
PK15	6x6	3	4	941	75.000	> 75.000	> 75.000	> 75.000
2A2	5x5	5	6	7	> 75.000	> 75.000	> 75.000	> 75.000
2A10	5x5	18	23	66	75.000	> 75.000	30.000	> 75.000
3B3	3x3	8	11	24	57	> 75.000	> 75.000	> 75.000
3B8	3x3	7	9	12	52	> 75.000	> 75.000	> 75.000
P16	3x3	40	37	53	699	> 75.000	> 75.000	> 75.000

- 15 **Tabla 2** Homologías de secuencia alrededor del sitio activo de serinproteasas parálogas y ortólogas de hPK. (*) Basadas en la estructura cristalina de hPK (entrada de PDB 2ANW) donde se eligió el ligando benzamidina unido en el bolsillo S1 como centro.

Región comparada		Número de aminoácidos	Identidad de secuencia con calicreína plasmática humana (hPK)					
			Proteasas ortólogas		Proteasas parálogas			
			Calicreína plasmática humana (hPK)	Calicreína plasmática de rata (rPK)	Factor Xla humano (hfXla)	Trombina humana	Plasmina humana	Factor Xlla humano
Todos los aminoácidos			95 %	81 %	69 %	36 %	34 %	35 %
Aminoácidos de superficie a una distancia específica del sitio activo*	4 Å	14	100 %	100 %	100 %	71 %	86 %	79 %
	8 Å	19	100 %	100 %	83 %	79 %	74 %	63 %
	12 Å	41	100 %	93 %	84 %	61 %	54 %	56 %

20 **Tabla 3: Péptidos 3x3**

Péptido	Secuencia												K_i media de calicreína (nM)	CI50 de trombina
3B8	ACFKHCRVACA	A	C	F	K	H	C	R	V	A	C	A	0,95	>10000
3A3	ACFPKCRVACA	A	C	F	P	K	C	R	V	A	C	A	43,1	
3B9	ACFDPCRIVICA	A	C	F	D	P	C	R	V	I	C	A	90,8	
3B2	ACFKNCRVNCA	A	C	F	K	N	C	R	V	N	C	A	9	
06-64	ACFNKCRVNCA	A	C	F	N	K	C	R	V	N	C	A	4,8	

06-94	ACFKQCRVNCA	A	C	F	K	Q	C	R	V	N	C	A	0,7	>10000
06-71	ACFYKCRVNCA	A	C	F	Y	K	C	R	V	N	C	A	15,2	
3B3	ACFKACRVNCA	A	C	F	K	A	C	R	V	N	C	A	0,59	>10000

Tabla 4: péptidos 5x5

	Secuencia																	Ki media de calicreína (nM)	Cl50 de trombina	Factor Xlla
06-01	ACAWPARCLTVDLCA	A	C	A	W	P	A	R	C	L	T	V	D	L	C	A	<0.1*	>10000	>10000	
06-34	ACRWPARCVHQDLCA	A	C	R	W	P	A	R	C	V	H	Q	D	L	C	A	<0.3*	>10000	>10000	
06-57	ACSWPARCNHQDLCA	A	C	S	W	P	A	R	C	N	H	Q	D	L	C	A	0.4	>10000	>10000	
06-59	ACRWPARCLTTSLCA	A	C	R	W	P	A	R	C	L	T	T	S	L	C	A	0.5	>10000	>10000	
06-54 (2A2) T	ACRWPARCTHQNYCA	A	C	R	W	P	A	R	C	T	H	Q	N	Y	C	A	0.49	>10000	>10000	
06-09	ACTWPARCTHQNWCA	A	C	T	W	P	A	R	C	T	H	Q	N	W	C	A	1.2	>10000	>10000	
06-143	ACFPSHDCDGRRMCA	A	C	F	P	S	H	D	C	D	G	R	R	M	C	A	1.27	>10000	>10000	
06-56	ACGGPQNCRTWTTCa	A	C	G	G	P	Q	N	C	R	T	W	T	T	C	A	2.1	>10000	>10000	
06-157	ACNWPYRCLHTDLCA	A	C	N	W	P	Y	R	C	L	H	T	D	L	C	A	3.3	>10000	>10000	
06-61	ACSWPYRCLHQDYCA	A	C	S	W	P	Y	R	C	L	H	Q	D	Y	C	A	5.8	>10000	>10000	
06-64 T	ACGVPYRCTHQEMCA	A	C	G	V	P	Y	R	C	T	H	Q	E	M	C	A	6.9	>10000	>10000	
06-A2*	ACTWPARCTMONWCA	A	C	T	W	P	A	R	C	T	M	Q	N	W	C	A	181	>10000	>10000	

06-63 T	ACADPWACLFRRPCA	A	C	A	D	P	W	A	C	L	F	R	R	P	C	A	1277	>10000	>10000
1E6	ACAWPARCLTTSLCG	A	C	A	W	P	A	R	C	L	T	T	S	L	C	G	0.16	>10000	>10000
2A10	ACTYPYKCLHQNLC	A	C	T	Y	P	Y	K	C	L	H	Q	N	L	C	A	4.98		
1B1	ACAWPAKCLTRELCA	A	C	A	W	P	A	K	C	L	T	R	E	L	C	A	8.1		
1F7	ACGGYNNCRAFSYCA	A	C	G	G	Y	N	N	C	R	A	F	S	Y	C	A	2.2		

Tabla 5 – Sustituciones en 06-34 basadas en la identificación de residuos no críticos con aminoácidos naturales

Péptido	Secuencia	CI50 de PK humana (nM)	CI50 de PK de rata (nM)
06-34	ACRWPARCVHQDLCA*	0,19	7,38
06-34-01	AC S WPARCVHQDLCA	0,15	6,12
06-34-02	ACRWPARC T HQDLCA	0,16	1,09
06-34-03 (01+02)	AC S WPARC T HQDLCA	0,082	0,87
06-34-04	ACRWPARC M HQDLCA	0,075	0,56
06-34-05	ACRWPARC L HQDLCA	0,076	0,62
06-34-17 (01+04)	AC S WPARC M HQDLCA	0,073	0,44
06-34-18 (01+05)	AC S WPARC L HQDLCA	0,070	0,56
06-34-19 (01+05+R/K)	AC S WPA K C L HQDLCA	0,19	4,67
*: La numeración de residuos es de izquierda a derecha, donde los residuos 1-5 están en el bucle 1 y los residuos 6-10 están en el bucle 2.			

5 Tabla 6- Sustituciones en 06-34 basadas en la identificación de residuos no críticos con aminoácidos N-metilados

Péptido	Secuencia	Ki de PK humana (nM)
06-34	ACRWPARCVHQDLCA	0,128
06-34-03 - Ala1,6	AC A WPARC A HQDLCA	0,147
06-34-03 - N-MeGlyl,6	AC N-MeG WPARC N-MeG HQDLCA	24,8
06-34-18	AC S WPARC L HQDLCA	0,040
06-34-18 -N-MeSer1	AC N-MeS WPARC L HQDLCA	0,560

Tabla 7

10

Suministrador	Nombre breve	Nombre químico completo
AGTC	D-Asp	Fmoc-D-Asp(tBu)-OH
Anaspec	NDM-Arg	Fmoc-Nww-dimetil-L-arginina
Anaspec	NMe-Ser	Fmoc-Nα-metil-O-terc-butil-L-serina
Anaspec	NMe-Trp	Fmoc-Nα-metil-L-triptófano
Anaspec	NorHar	Ácido Fmoc-L-1,2,3,4-tetrahidro-norharman-3-carboxílico
Anaspec	4PhenylPro	Ácido Fmoc-(2S,4S)-4-fenilpirrolidin-2-carboxílico
Iris Biotech	Agb	Fmoc-L-Agb(Boc)2-OH
Iris Biotech	Agp	Fmoc-L-Agp(Boc)2-OH
Iris Biotech	β-Ala	Fmoc-beta-Ala-OH
Iris Biotech	Cit	Fmoc-Cit-OH
Iris Biotech	D-Cys	Fmoc-D-Cys-OH
Iris Biotech	β-HArg	Fmoc-L-beta-HArg(Pbf)-OH
Iris Biotech	NMe-Arg	Fmoc-L-MeArg(Mtr)-OH
Iris Biotech	3Pal	Fmoc-L-3Pal-OH
Iris Biotech	4Pal	Fmoc-L-4Pal-OH
Iris Biotech	Pen	Fmoc-Pen(Trt)-OH
Iris Biotech	D-Pro	Fmoc-D-Pro-OH
Iris Biotech	Tic	Fmoc-L-Tic-OH
Iris Biotech	D-Trp	Fmoc-D-Trp-OH
Merck Novabiochem	Aib	Fmoc-Aib-OH
Merck Novabiochem	D-Ala	Fmoc-D-Ala-OH
Merck Novabiochem	D-Arg	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH
Merck Novabiochem	4GuanPhe	Fmoc-Phe(bis-Boc-4-guanidino)-OH
Merck Novabiochem	D-Gln	Fmoc-D-Gln(Trt)-OH
Merck Novabiochem	D-His	Fmoc-D-His(Trt)-OH
Merck Novabiochem	Hyp	Fmoc-Hyp(tBu)-OH
Merck Novabiochem	D-Leu	Fmoc-D-Leu-OH
Merck Novabiochem	NMe-Ala	Fmoc-L-MeAla-OH
Merck Novabiochem	NMe-Cys	Fmoc-N-Me-Cys(Trt)-OH
Merck Novabiochem	SDMA	Fmoc-SDMA(Boc)2-ONa
Merck Novabiochem	HArg	Fmoc-L-HArg(Boc)2-OH

Peptech Corporation	4,4-BPAI	Fmoc-L-4,4'-bifenilalanina
Peptech Corporation	3,3-DPA	Fmoc-L-3,3-difenilalanina
Peptech Corporation	Dpg	Fmoc-dipropilglicina
Peptech Corporation	1NAI	Fmoc-L-1-naftilalanina
Peptech Corporation	2NAI	Fmoc-L-2-naftilalanina
Peptech Corporation	Pip	Ácido Fmoc-L-pipecólico
Polypeptide Group	Aba	Ácido Fmoc-L-2-aminobutírico
Polypeptide Group	Aze	Ácido Fmoc-L-azetidin-2-carboxílico
Polypeptide Group	4BenzylPro	Ácido (2S,4R)-Fmoc-4-bencilpirrolidin-2-carboxílico
Polypeptide Group	Cha	Fmoc-beta-ciclohexil-L-alanina
Polypeptide Group	4FluoPro	Ácido (2S,4R)-Fmoc-4-fluoropirrolidin-2-carboxílico
Polypeptide Group	Ind	Ácido Fmoc-L-indolin-2-carboxílico

Tabla 8

Péptido	Secuencia	Ki (nM) (caliceína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	Ac-CSWPARCLHQDLC	0,17	2
Ac-(06-34-18) A2A3	Ac-CSAAARCLHQDLC	18545	1
Ac-(06-34-18) A2Q3	Ac-CSAQARCLHQDLC	15840	1
Ac-(06-34-18) Scram1	Ac-CPSAWRCLHQDLC	1091	2
Ac-(06-34-18) Scram2	Ac-CWASPRCLHQDLC	11355	2
Ac-(06-34-18) Scram3	Ac-CAPWSRCLHQDLC	1892	1
Ac-(06-34-18) Scram4	Ac-CWARSPCLHQDLC	67500	1

5 Tabla 9

Efectos comparativos de la sustitución con D-aminoácidos sobre la potencia y estabilidad en plasma de rata

Péptido	Ki (nM) (caliceína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) D-Trp2	7558	2
Ac-(06-34-18) D-Pro3	680	3
Ac-(06-34-18) D-Ala4	1203	>10
Ac-(06-34-18) D-Arg5	52	>10
Ac-(06-34-18) D-Cys2	234	>10

10 Tabla 10

Efectos comparativos de la N-metilación de residuos del bucle 1 y Cys2 sobre la potencia y estabilidad en plasma de rata.

Péptido	Ki (nM) (caliceína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) NMeSer1	0,5	3
Ac-(06-34-18) NMeSer1, NMeAla4	444	>10
Ac-(06-34-18) NMeTrp2	228	5
Ac-(06-34-18) NMeAla4	343	>10
Ac-(06-34-18) NMeArg5	3,5	>10
Ac-(06-34-18) NMeCys2	418	10

15

Tabla 11

Efectos comparativos de análogos de arginina en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂ sobre la potencia y estabilidad. Obsérvese que la modificación Δ Arg no exhibía ninguna inhibición hasta péptido 100 μM.

20

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) HomoArg5	2,1	>10
Ac-(06-34-18) Agb5	83	>10
Ac-(06-34-18) Agp5	1770	>10
Ac-(06-34-18) β homoArg5	8,2	>10
Ac-(06-34-18) 4GuanPhe5	0,3	>10
Ac-(06-34-18) SDMA5	1415	>10
Ac-(06-34-18) NDMA5	510	>10
Ac-(06-34-18) Cit5	7860	>10
Ac-(06-34-18) Δ Arg5	>100000	>10

Tabla 12

5 Efectos de la afinidad comparativa de aminoácidos hidrófobos sustituyentes de Trp2 en Ac-06-34-18(TMB)-NH₂

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) 1NAL2	10,7	2
Ac-(06-34-18) 2NAL2	0,50	2
Ac-(06-34-18) 3Pal2	59	2
Ac-(06-34-18) 4Pal2	72	2
Ac-(06-34-18) Cha2	4,7	2
Ac-(06-34-18) 4,4,BPal2	464	2
Ac-(06-34-18) 3,3-DPA2	1,5	2
Ac-(06-34-18) NorHar2	24	2

Tabla 13

10 Afinidades comparativas obtenidas para derivados de prolina con sustituyentes en el carbono gamma, análogos de tamaños de anillo variables, derivados bi/tricíclicos y aminoácidos restringidos tales como Aib

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) HyP3	0,41	2
Ac-(06-34-18) 4FluoPro3	0,24	2
Ac-(06-34-18) 4Phenyl Pro3	0,58	2
Ac-(06-34-18) 4Benzyl Pro3	191	2
Ac-(06-34-18) Aze3	0,06	2
Ac-(06-34-18) Pip3	0,26	2
Ac-(06-34-18) Tic3	13,51	2
Ac-(06-34-18) NorHar3	2,99	2
Ac-(06-34-18) Ind3	1,35	2
Ac-(06-34-18) Aib3	1,20	2

Tabla 14

15

Efectos comparativos de sustituciones misceláneas de Ser1, Ala4 y Cys2

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2
Ac-(06-34-18) Dpg1	1,09	2
Ac-(06-34-18) Aba4	0,07	2
Ac-(06-34-18) β -Ala4	17450	10
Ac-(06-34-18) Aib4	289	7

Ac-(06-34-18) Cys2ToPen2	2162	5
--------------------------	------	---

Tabla 15

Potenciación comparativa de la potencia inducida por la incorporación de Aze3 en candidatos estabilizados en plasma. ¹ Estabilidades comparativas estimadas de acuerdo con el procedimiento 1. ² Se determinó la semivida real de las estabilidades peptídicas en plasma de rata de acuerdo con el procedimiento 3. ³ Los valores de CI50 son relativos, no absolutos.

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días ¹	t _{1/2} (h) en plasma de rata ²	CI50 (nM) (calicreína de rata) ³
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17	2,0	2,3	1,7
Ac-(06-34-18) HomoArg5	2,1	>10	10,7	64
Ac-(06-34-18) 4GuanPhe5	0,34	>10	2,8	21
Ac-(06-34-18) NMeArg5	3,5	>10	>20	98
Ac-(06-34-18) Aze3 HomoArg5	0,14	>10	nd	nd
Ac-(06-34-18) Aze3 4GuanPhe5	0,17	>10	nd	nd
Ac-(06-34-18) Aze3 NMeArg5	1,30	>10	nd	nd

10 Tabla 16

Efecto sobre la potencia tras la inclusión de Aba4 en péptidos que contienen Aze3 y las modificaciones estabilizantes en plasma NMeArg5, HomoArg5, y 4GuanPhe5.

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)
Ac-(06-34-18) tipo silvestre	0,17
Ac-(06-34-18) Aze3 Aba4 NMeArg5	2,8
Ac-(06-34-18) Aze3 Aba4 HomoArg5	0,9
Ac-(06-34-18) Aze3 Aba4 4GuanPhe5	0,2

15

Tabla 17

Se identificaron 42 compuestos de unión a calicreína únicos a partir de selecciones usando un motivo WPAR aleatorizado en posiciones 2, 3, 4 y 5 en la secuencia 06-34-03. Se clasificaron las secuencias de acuerdo con la unión a calicreína y se señaló la abundancia relativa en los resultados de selección totales.

20

Secuencia												Rango	Frecuencia	
C	S	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	1	24
C	S	W	P	S	R	C	T	H	Q	D	L	C	2	51
C	S	F	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	3	17
C	S	W	L	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	4	8
C	S	F	P	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	5	12
C	S	F	P	F	K	C	T	H	Q	D	L	C	6	4
C	S	W	A	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	7	1
C	S	H	P	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	8	2
C	S	H	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	9	1
C	S	W	P	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	10	3
C	R	F	P	F	K	C	T	H	Q	D	L	C	11	1
C	S	F	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	12	2
C	S	L	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	13	3
C	S	W	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	14	7
C	S	F	P	I	R	C	T	H	Q	D	L	C	15	1
C	S	L	P	F	K	C	T	H	Q	D	L	C	16	1
C	S	L	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	17	4
C	S	Y	P	I	R	C	T	H	Q	D	L	C	18	2
C	S	W	S	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	19	10
C	S	L	P	F	K	C	T	H	Q	D	L	C	20	1
C	S	Y	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	21	1
C	S	F	P	Y	K	C	T	H	Q	D	L	C	22	1
C	S	F	P	W	R	C	T	H	Q	D	L	C	23	1
C	S	W	H	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	24	1
C	S	L	P	F	R	C	T	H	Q	D	L	C	25	2
C	S	Y	P	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	26	2
C	S	W	W	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	27	1
C	S	W	P	Y	K	C	T	H	Q	D	L	C	28	1
C	S	F	L	Y	K	C	T	H	Q	D	L	C	29	2
C	S	L	P	I	R	C	T	H	Q	D	L	C	30	1
C	S	M	P	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	31	2
C	S	I	P	F	K	C	T	H	Q	D	L	C	32	1
C	S	Y	P	W	R	C	T	H	Q	D	L	C	33	1
C	S	F	P	F	W	C	T	H	Q	D	L	C	34	1
C	S	F	S	Y	K	C	T	H	Q	D	L	C	35	1
C	S	W	S	Y	R	C	T	H	Q	D	L	C	36	1
C	S	F	M	Y	K	C	T	H	Q	D	L	C	37	1
C	S	Q	V	V	G	C	T	H	Q	D	L	C	38	1
C	R	W	P	Y	H	C	T	H	Q	D	L	C	39	1
C	S	L	F	D	H	C	T	H	Q	D	L	C	40	1
C	S	H	R	R	W	C	T	H	Q	D	L	C	41	1
C	S	W	Q	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	42	1

Tabla 18

- 5 A. Abundancia de un motivo particular en cada resultado. Se analizaron las secuencias de resultado de acuerdo con el rigor de selección. Se calculó el % de un motivo particular en el resultado de una selección de rigor particular. B. Unión a calicreína plasmática humana de motivos particulares en posiciones 2, 3, 4 y 5 (con las posiciones 1, 6, 7, 8, 9 y 10 fijadas a las de 06-34-03).

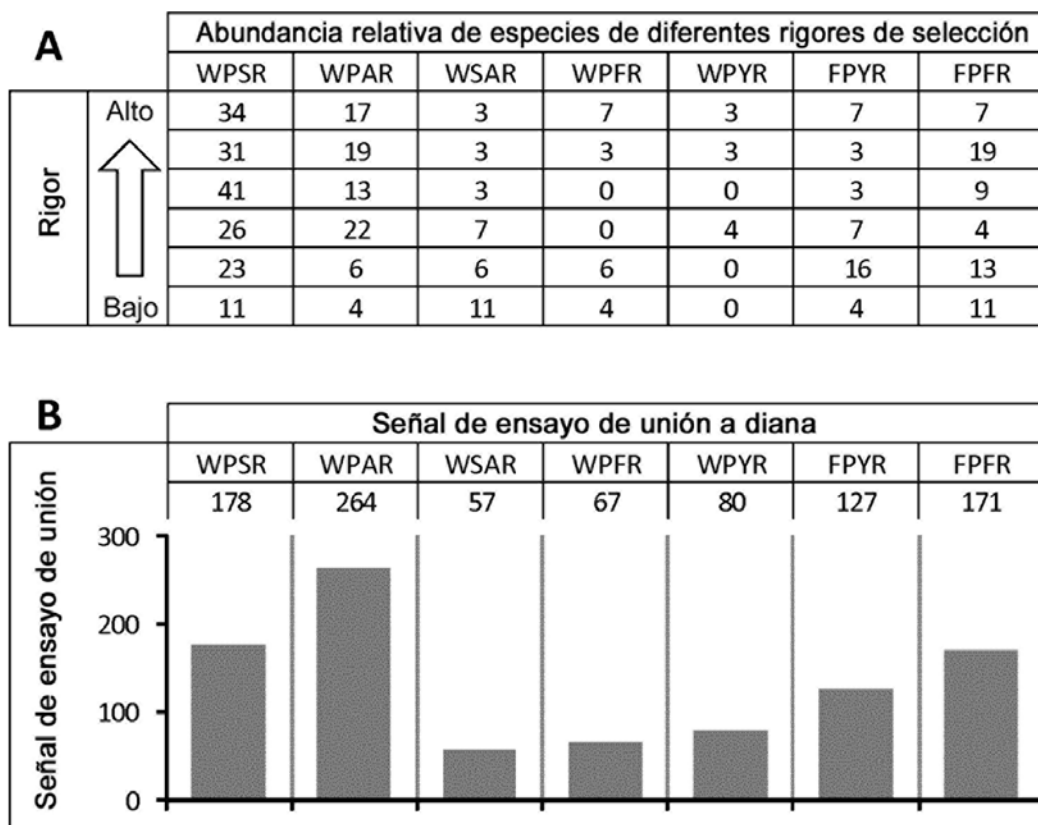


Tabla 19

5 50 primeros compuestos de unión a caliceína que contienen un motivo WPAR. El dominio WPAR estaba fijado en una colección bicíclica con posiciones 1, 6, 7, 8, 9 y 10 aleatorizadas. Se aislaron las secuencias de resultado de selección de caliceína y se ensayó la unión a caliceína. Se clasificaron las secuencias de acuerdo con la unión a caliceína. Se aisló la secuencia del péptido 06-34-03 de la selección y se destaca en rojo. Son visibles tendencias en el segundo bucle de péptidos de unión a caliceína que contienen WPAR.

10

Rango	Secuencia													Señal del ensayo de unión
1	C	N	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	116
2	C	S	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	110
3	C	H	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	110
4	C	P	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	107
5	C	S	W	P	A	R	C	T	H	A	D	L	C	100
6	C	S	W	P	A	R	C	T	H	D	D	L	C	93
7	C	A	W	P	A	R	C	T	H	T	D	L	C	92
8	C	Q	W	P	A	R	C	L	H	T	D	L	C	91
9	C	L	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	90
10	C	T	W	P	A	R	C	T	H	T	D	L	C	88
11	C	H	W	P	A	R	C	T	H	Q	E	L	C	85
12	C	A	W	P	A	R	C	L	H	D	D	L	C	84
13	C	S	W	P	A	R	C	L	H	T	D	L	C	83
14	C	A	W	P	A	R	C	T	H	V	D	L	C	82
15	C	A	W	P	A	R	C	T	H	T	D	F	C	80
16	C	M	W	P	A	R	C	M	H	Q	D	L	C	79
17	C	A	W	P	A	R	C	T	H	A	D	L	C	79
18	C	Q	W	P	A	R	C	M	H	Q	D	M	C	75
19	C	Q	W	P	A	R	C	T	H	S	D	L	C	74
20	C	L	W	P	A	R	C	T	H	A	D	L	C	74
21	C	R	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	73
22	C	Q	W	P	A	R	C	M	H	Q	E	L	C	73
23	C	T	W	P	A	R	C	L	H	Q	D	L	C	73
24	C	S	W	P	A	R	C	T	H	S	H	L	C	72
25	C	V	W	P	A	R	C	T	H	Q	D	L	C	71
26	C	T	W	P	A	R	C	T	H	A	D	L	C	71
27	C	H	W	P	A	R	C	M	H	Q	D	L	C	71
28	C	P	W	P	A	R	C	T	H	T	D	L	C	70
29	C	A	W	P	A	R	C	T	H	Y	D	L	C	70
30	C	P	W	P	A	R	C	T	H	Q	N	L	C	69
31	C	S	W	P	A	R	C	T	H	T	E	L	C	69
32	C	A	W	P	A	R	C	M	H	D	D	L	C	69
33	C	S	W	P	A	R	C	L	H	T	E	L	C	68
34	C	S	W	P	A	R	C	I	H	Q	D	L	C	68
35	C	T	W	P	A	R	C	T	H	T	D	M	C	67
36	C	A	W	P	A	R	C	T	H	T	H	L	C	66
37	C	A	W	P	A	R	C	L	H	A	D	M	C	66
38	C	A	W	P	A	R	C	L	H	Q	D	W	C	63
39	C	D	W	P	A	R	C	M	H	Q	E	F	C	63
40	C	A	W	P	A	R	C	T	H	Q	T	M	C	61
41	C	T	W	P	A	R	C	L	H	Q	H	M	C	61
42	C	S	W	P	A	R	C	V	H	Q	D	M	C	61
43	C	E	W	P	A	R	C	L	H	T	D	L	C	60
44	C	L	W	P	A	R	C	L	T	T	E	L	C	59
45	C	S	W	P	A	R	C	T	H	A	E	M	C	59
46	C	R	W	P	A	R	C	T	H	T	D	L	C	59
47	C	T	W	P	A	R	C	T	H	Q	A	F	C	59
48	C	S	W	P	A	R	C	T	H	S	D	L	C	59
49	C	S	W	P	A	R	C	L	H	D	D	L	C	59
50	C	P	W	P	A	R	C	L	H	T	D	L	C	58

Tabla 20

- 5 Se agruparon las secuencias de resultado de selecciones de calicreína con WPAR fijado en el 1º bucle, y sus señales del ensayo de unión a calicreína asociadas, de acuerdo con su derivación del motivo "THxxL" (A) o el motivo "xHxDL" (B). Se calculó la señal de unión media para todos los miembros de un grupo dado. Los grupos que contienen exactamente el motivo dado se destacan en verde; se muestran también los ejemplos de grupos con un

cambio cualquiera más o menos desde el motivo.

A

Grupos basados en el motivo xHxDL					
Motivo	Unión	Motivo	Unión	Motivo	Unión
THxDL	78,5	xHxDL	70,9	xHxxL	56,1
MHxDL	66,7	xHxDM	52,8	xHxxM	46,3
LHxDL	58,0	xHxEL	51,7	xHxxF	43,8
THxEL	55,9	xHxHM	46,4	xHxxW	33,2
THxHL	52,5	xHxNL	46,2	xTxxL	31,1
LHxEL	52,3	xHxDW	44,2	xHxxE	19,3
THxNL	51,9	xHxHL	44,2		
THxDW	44,9	xHxFL	40,4		
LHxDW	44,7	xTxEL	39,9		
MHxEL	42,4	xTxDL	39,4		
LTxEL	39,9	xHxQL	39,0		
LTxDL	39,4	xHxAL	35,5		
LHxQL	39,0	xHxSL	35,0		
LHxDM	38,0	xTxSL	33,1		
LHxSL	37,4	xHxYL	29,2		
THxAL	35,5				
LHxHL	34,0				
LTxSL	33,1				
THxSL	28,9				

B

Grupos basados en el motivo THxxL					
Motivo	Unión	Motivo	Unión	Motivo	Unión
THxDL	78,5	THxxL	61,0	MHxxx	56,5
MHxDL	66,7	MHxxL	55,0	THxxx	53,4
LHxDL	58,0	LHxxL	47,9	LHxxx	44,4
THxEL	55,9	THxxM	46,3	LTxxx	33,8
THxHL	52,5	LHxxM	39,0		
LHxEL	52,3	LTxxL	38,4		
THxNL	51,9				
THxFL	40,4				
LTxEL	39,9				
LTxDL	39,4				
LHxSL	37,4				
THxAL	35,5				
LHxHL	34,0				
LTxSL	33,1				
THxSL	28,9				

5 Tabla 21

Afinidades y estabildades de variantes del motivo WPAR

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días
Ac-(06-34-18) WPAR	0,17	2
Ac-(06-34-18) FPAR	6,28	2
Ac-(06-34-18) WPYR	0,41	2
Ac-(06-34-18) WPSR	0,44	2
Ac-(06-34-18) FPYR	0,46	2

10 Tabla 22

Efecto de sustituciones en Phe2/Tyr4 con análogos hidrófobos

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)
Ac-(06-34-18) Phe2 Tyr4	0,46
Ac-(06-34-18) Phe2 Cha4	0,91
Ac-(06-34-18) Phe2 3Pal4	2,57
Ac-(06-34-18) Phe2 4Pal4	2,20
Ac-(06-34-18) Phe2 1Nal4	13,5
Ac-(06-34-18) Phe2 2Nal4	7,27
Ac-(06-34-18) Phe2 4,4-BPal4	10,5
Ac-(06-34-18) 3Pal2 Tyr4	0,91
Ac-(06-34-18) 4Pal2 Tyr4	3,56
Ac-(06-34-18) Cha2 Tyr4	1,87

15 Tabla 23

Sumario del efecto de sustituciones de Arg5 y Aze3 sobre Ac-06-34-18(TMB)-NH2 Phe2Tyr4. ¹Estabildades comparativas estimadas de acuerdo con el procedimiento 1. ²Se determinó la semivida real de las estabildades peptídicas en plasma de rata de acuerdo con el procedimiento 3. ³Los valores de CI50 son relativos, no absolutos.

Péptido	Ki (nM) (calicreína humana)	Observable en plasma de rata, en días ¹	t _{1/2} (h) en plasma de rata ²	CI50 (nM) (calicreína de rata) ³
Ac-(06-34-18) Phe2 Tyr4	0,46	2	0,9	13,8
Ac-(06-34-18) Phe2 Tyr4 HomoArg5	0,77	>10	12,2	19,7
Ac-(06-34-18) Phe2 Tyr4 4GuanPhe5	0,40	>10	5,0	2,5
Ac-(06-34-18) Phe2 Tyr4 NMeArg5	3,56	>10	>20	60,2
Ac-(06-34-18) Phe2 Aze3 Tyr4 HomoArg5	0,12	nd	nd	nd
Ac-(06-34-18) Phe2 Aze3Tyr4 4GuanPhe5	0,36	nd	nd	nd
Ac-(06-34-18) Phe2 Aze3Tyr4 NMeArg5	0,97	nd	nd	nd

REIVINDICACIONES

1. Un ligando peptídico específico de calicreína humana que comprende un polipéptido que comprende al menos tres grupos reactivos, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un andamiaje molecular que
5 forma enlaces covalentes con los grupos reactivos del polipéptido de tal modo que se forman el menos dos bucles polipeptídicos en el andamiaje molecular, donde los bucles del ligando peptídico comprenden tres, cuatro o cinco, pero menos de seis, aminoácidos.
2. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde los bucles del ligando peptídico
10 comprenden tres aminoácidos y el polipéptido tiene la secuencia de consenso $G_r FxxG_r RVxG_r$, donde G_r es un grupo reactivo.
3. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende uno de los polipéptidos
15 expuestos en la **Tabla 3**.
4. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende la secuencia de consenso $G_r GGxxNG_r$, donde G_r es un grupo reactivo.
- 20 5. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde dos bucles adyacentes comprenden la secuencia de consenso $G_r GGxxNG_r RxxxxG_r$.
6. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, que comprende uno de los péptidos expuestos en la **Tabla 4**.
- 25 7. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un primer bucle comprende el motivo $G_r x^W/_F P x^K/_R G_r$, donde G_r es un grupo reactivo.
- 30 8. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además un segundo bucle que comprende el motivo $G_r^T/_L H^Q/_T x LG_r$.
9. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde los bucles del ligando peptídico comprenden cinco aminoácidos y un segundo bucle comprende el motivo $G_r x H x DLG_r$, donde G_r es un grupo
35 reactivo; o el segundo bucle comprende el motivo $G_r THxxLG_r$, donde G_r es un grupo reactivo.
10. Un ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, donde dos bucles adyacentes comprenden el motivo $G_r x^W/_F P x^K/_R G_r^T/_L H^Q/_T DLG_r$.
- 40 11. Un ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende uno de los polipéptidos expuestos en la **Tabla 4**, **Tabla 5** o **Tabla 6**.
12. Un ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el primer bucle comprende la secuencia $G_r x WPARG_r$; o donde el primer bucle comprende la secuencia $G_r x WPSRG_r$; o donde
45 el primer bucle comprende la secuencia $G_r x FPFRG_r$; o donde el primer bucle comprende la secuencia $G_r x FPYRG_r$.
13. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 12, donde x es S o R.
14. Un ligando peptídico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el grupo reactivo es
50 cisteína.
15. Un ligando peptídico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende uno o más sustituyentes aminoácidos no naturales y es resistente a la degradación por proteasas.
- 55 16. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 15, donde el aminoácido modificado se selecciona de entre N-metilarginina, homoarginina, hidroxiprolina y guanidilfenilalanina y ácido azetidincarboxílico.
17. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 16, donde el polipéptido comprende un primer bucle que comprende el motivo $G_r x WPARG_r$, donde Pro se reemplaza por ácido azetidincarboxílico y/o R se
60 reemplaza por N-metilarginina u homoarginina o guanidilfenilalanina.
18. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 16, donde el polipéptido comprende un primer

bucle que comprende el motivo $G_r x F P Y R G_r$, donde Pro se reemplaza por ácido azetidincarboxílico y/o R se reemplaza por N-metilarginina u homoarginina o guanidilfenilalanina.

19. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 18, donde el polipéptido comprende un primer
5 bucle que comprende el motivo $G_r x F P Y R G_r$, donde Pro se reemplaza por ácido azetidincarboxílico y/o R se reemplaza por homoarginina.
20. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido comprende un primer
10 bucle que comprende el motivo $G_r x F P Y R G_r$, donde Pro se reemplaza por ácido azetidincarboxílico y R se reemplaza por homoarginina.
21. Un ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende adicionalmente un residuo de alanina N-terminal.
- 15 22. Un ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende acetilación N-terminal y amidación C-terminal.
23. Un ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 15, que comprende uno de los polipéptidos expuestos en la **Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 12, Tabla 13, Tabla 15, Tabla 16, Tabla 17,**
20 **Tabla 19, Tabla 21, Tabla 22 o Tabla 23.**

Figura 1

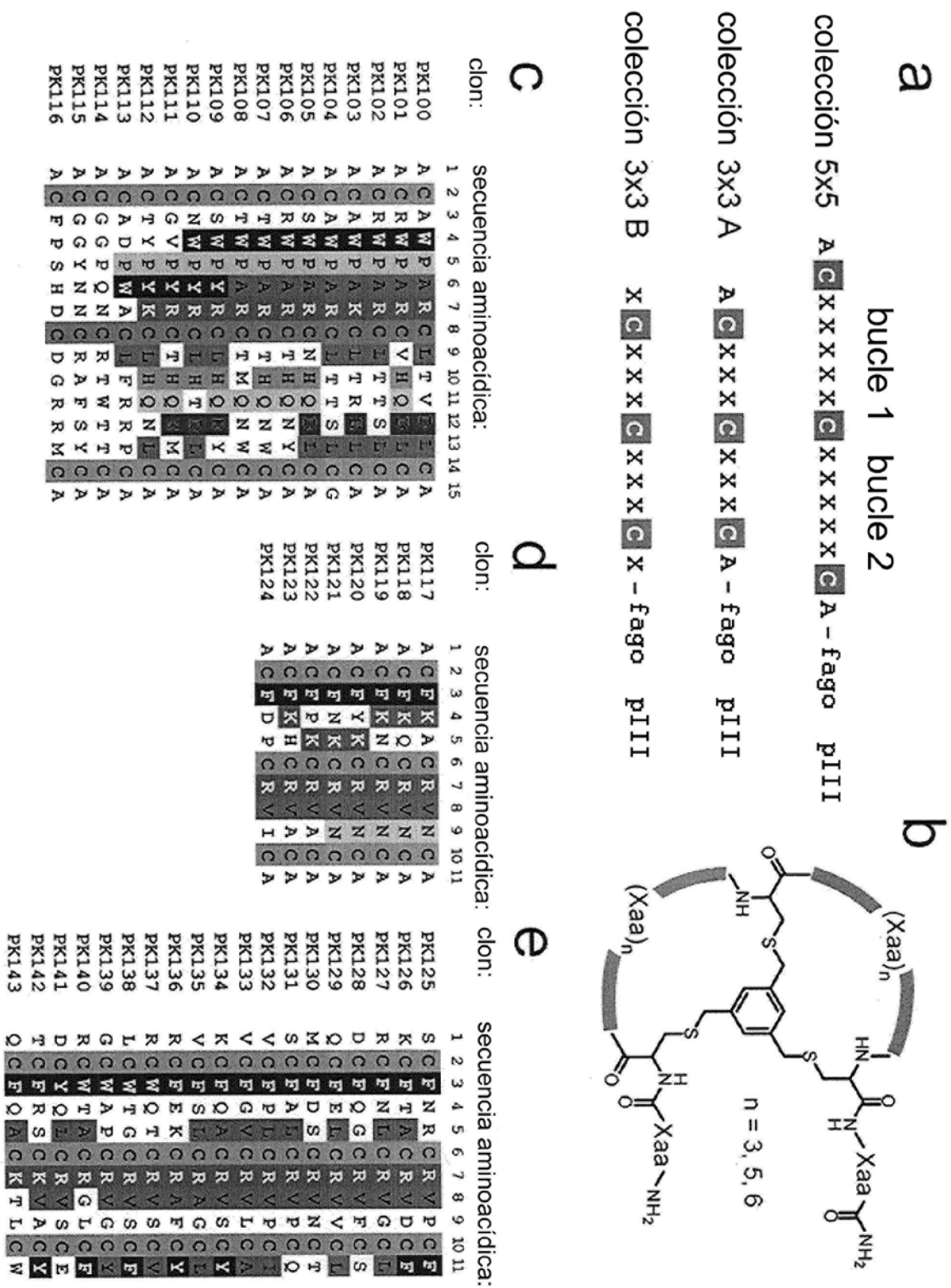


Figura 2

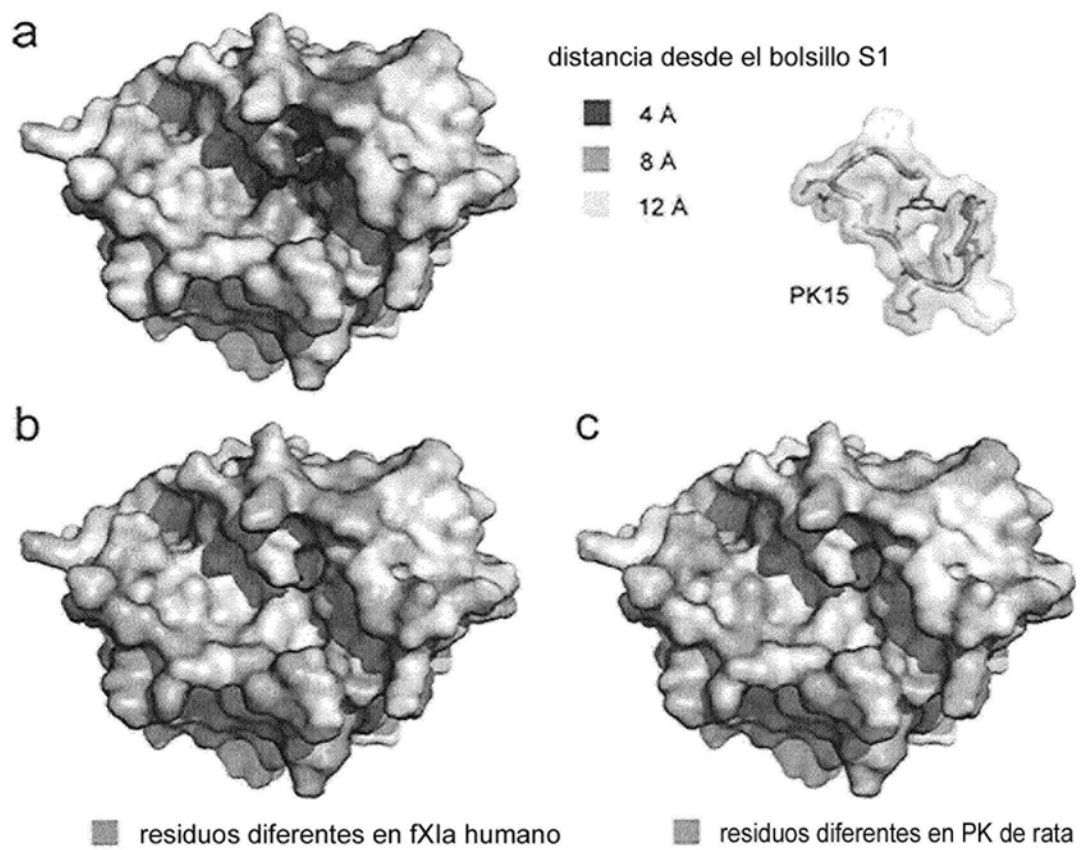


Figura 3

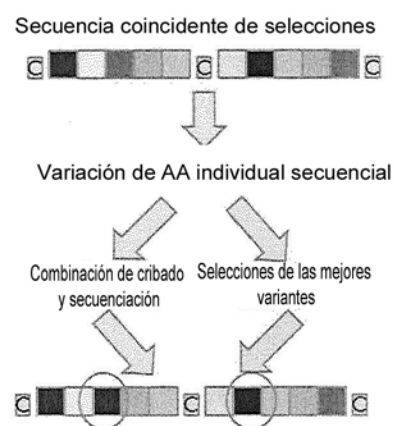


Figura 4

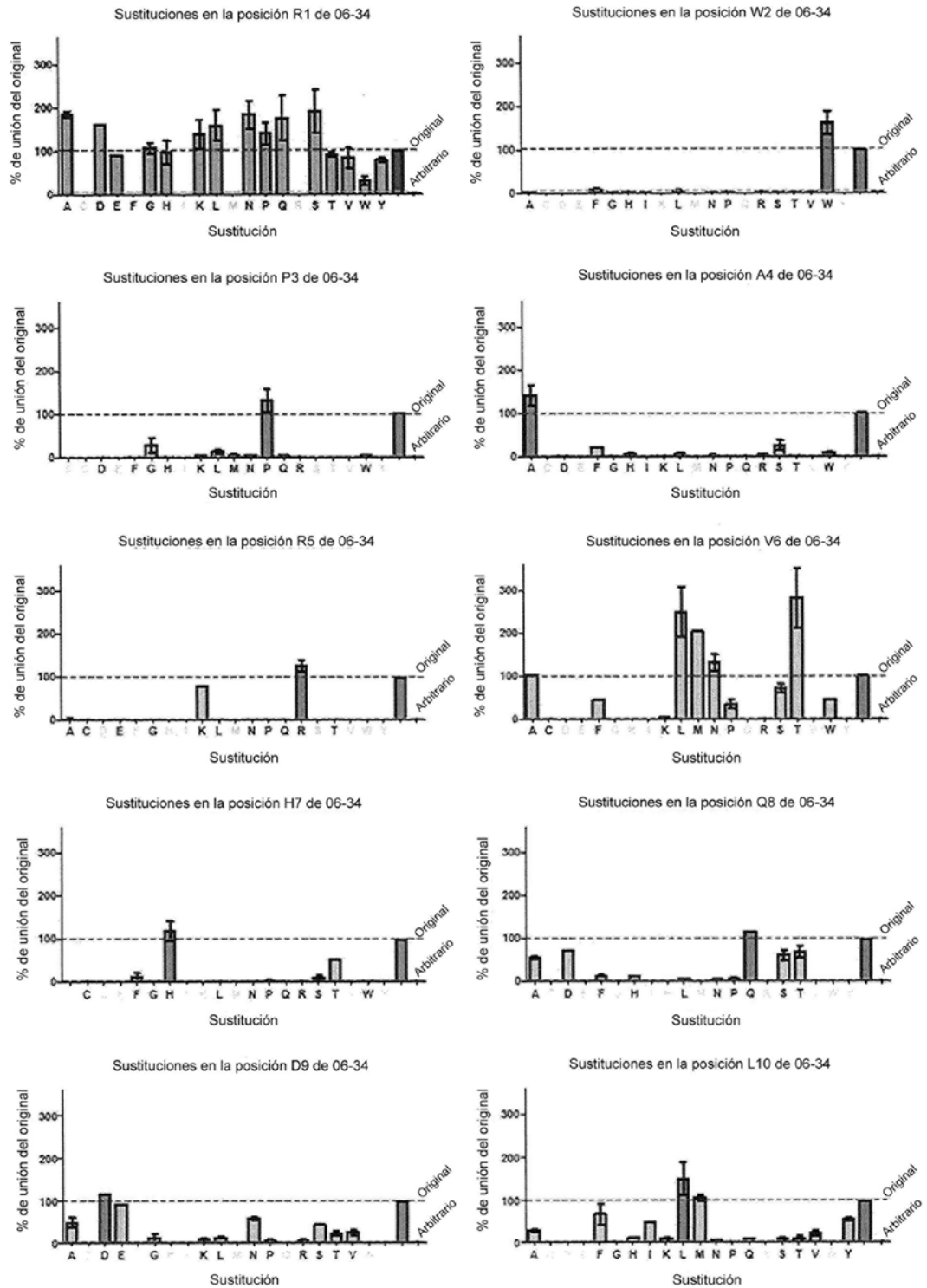


Figura 5

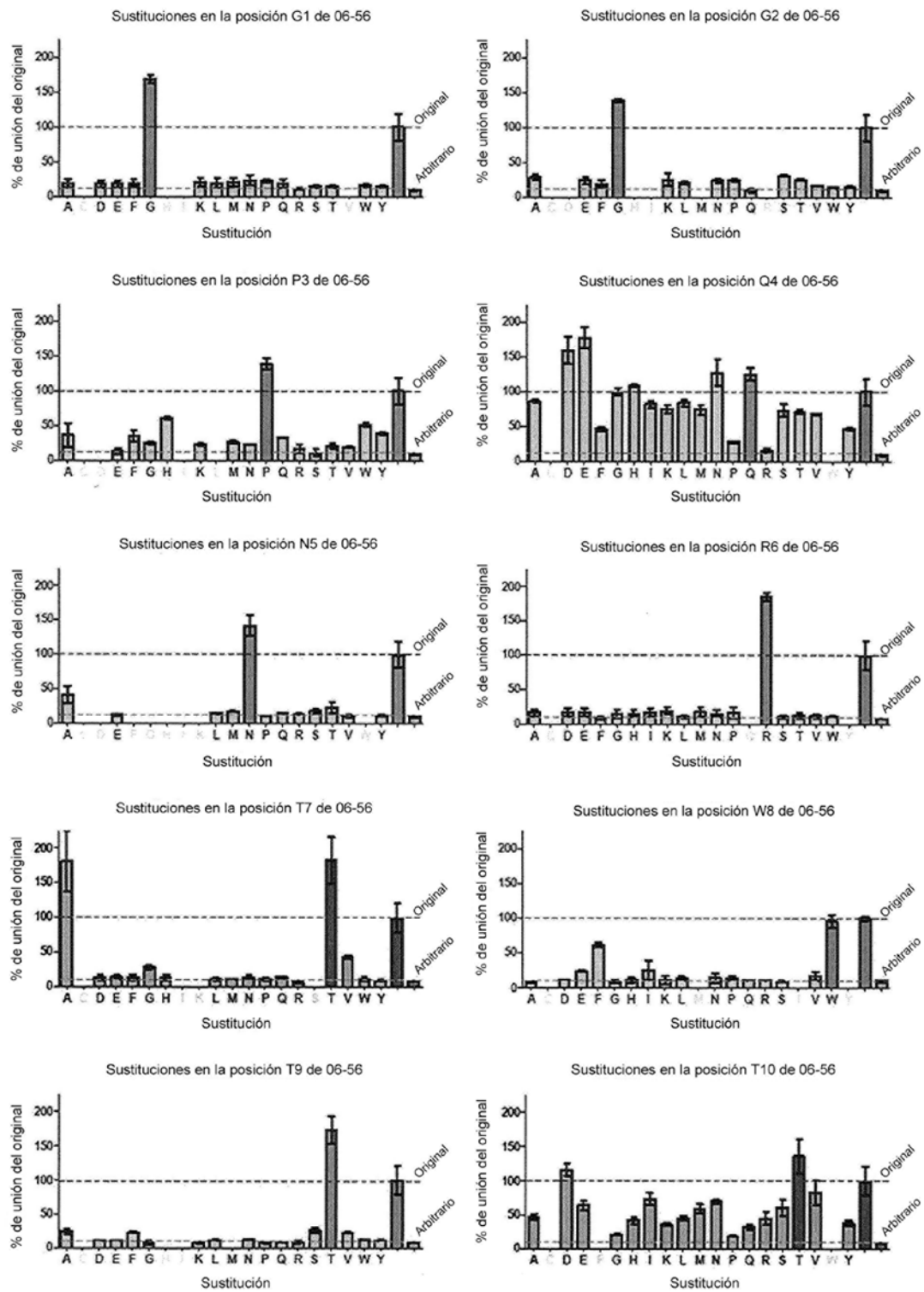


Figura 6

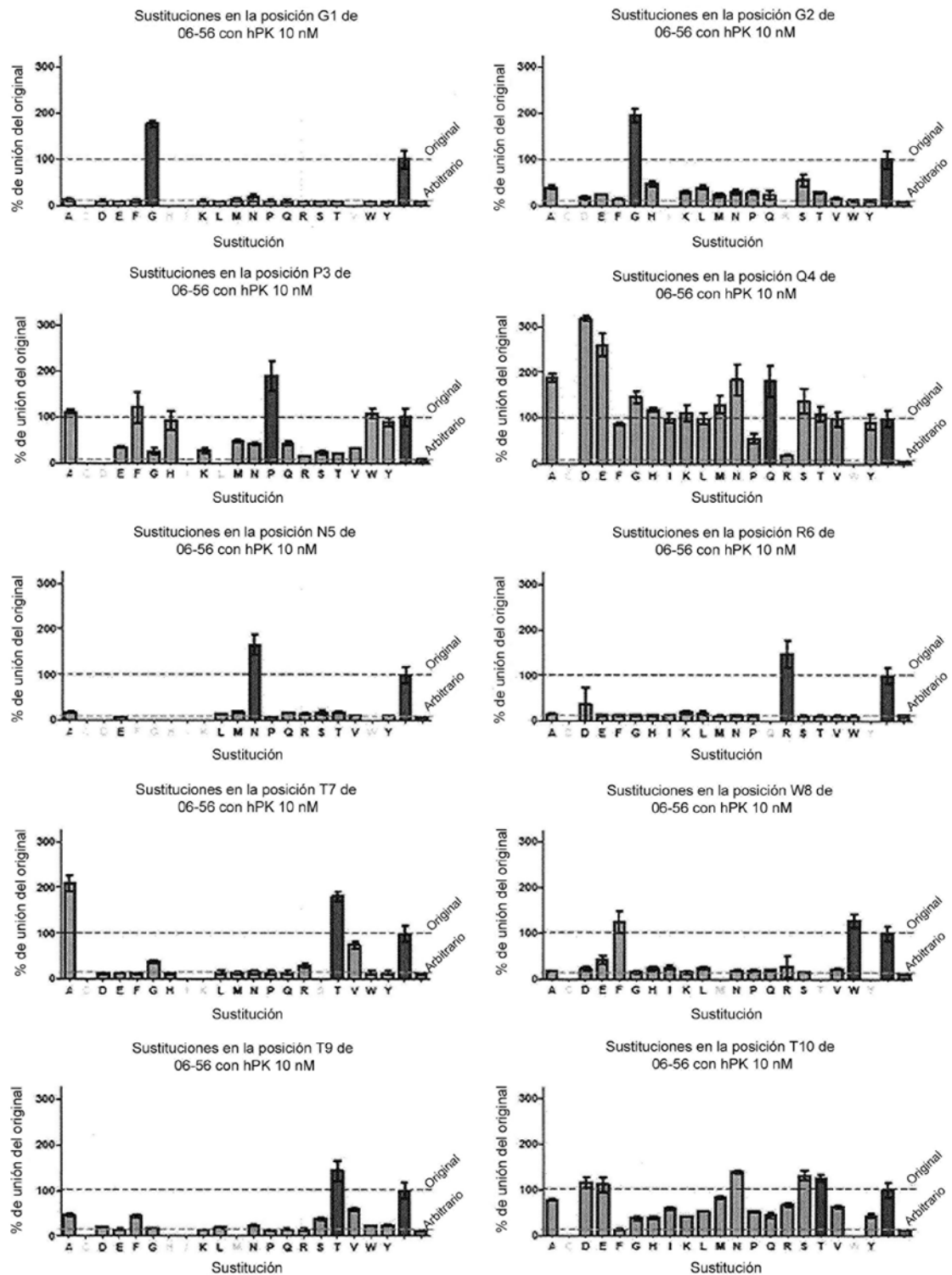


Figura 7

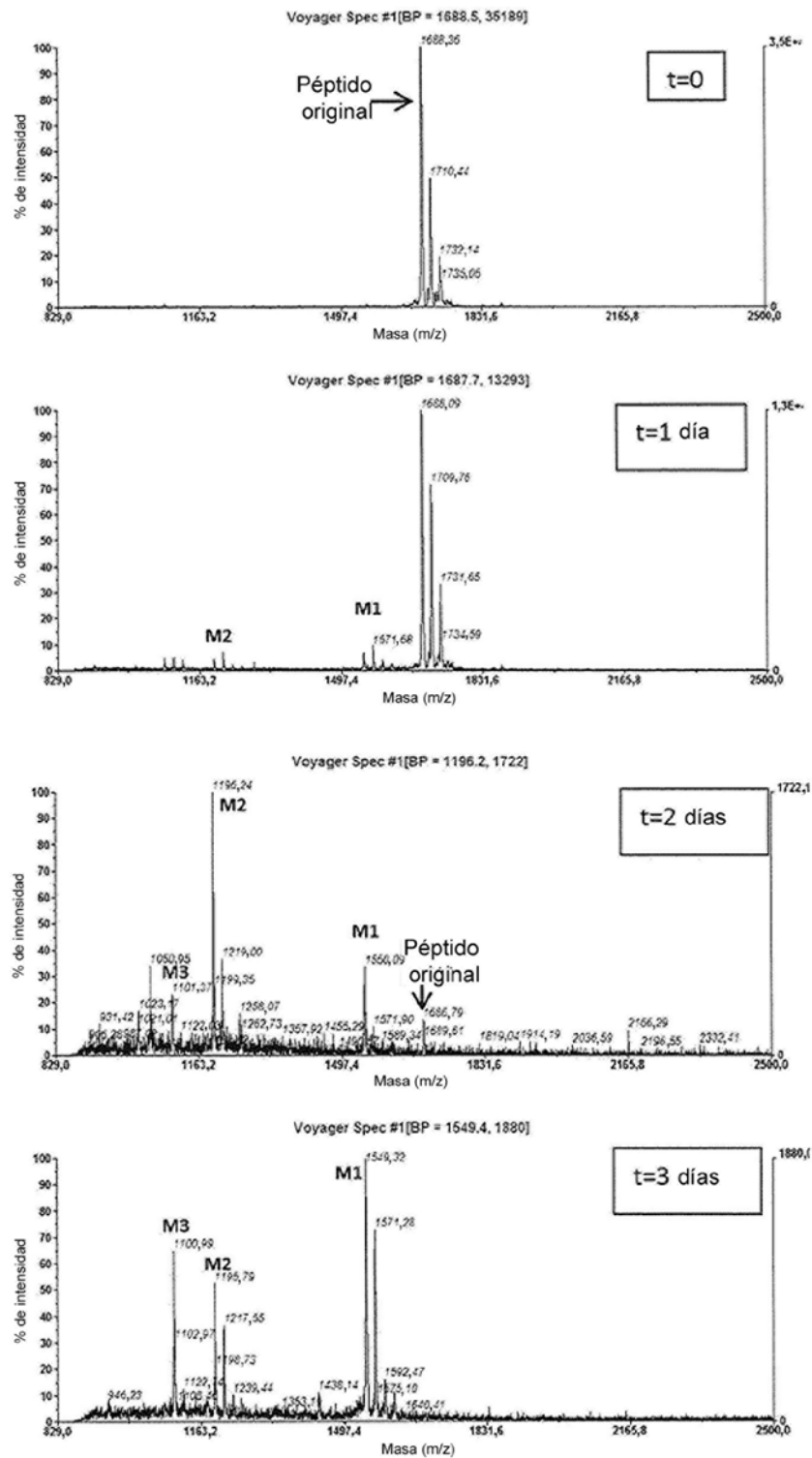


Figura 8

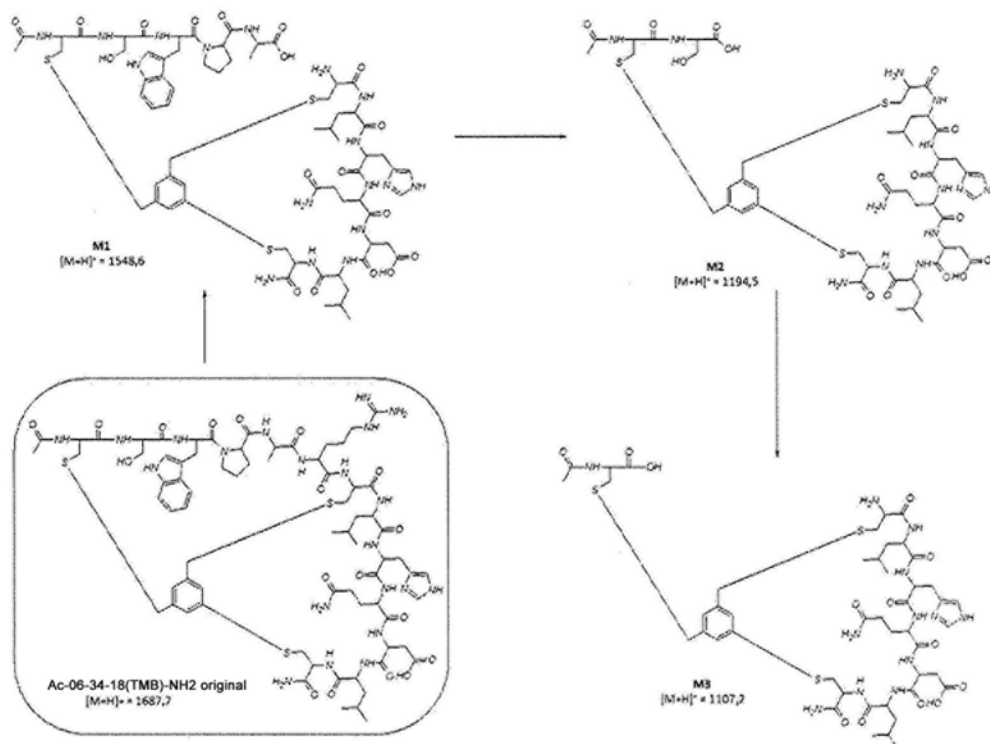


Figura 9

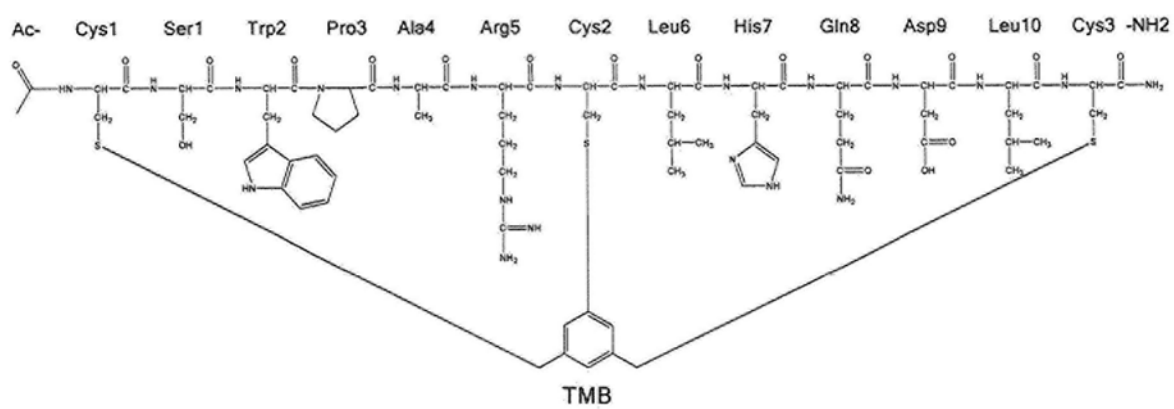


Figura 10

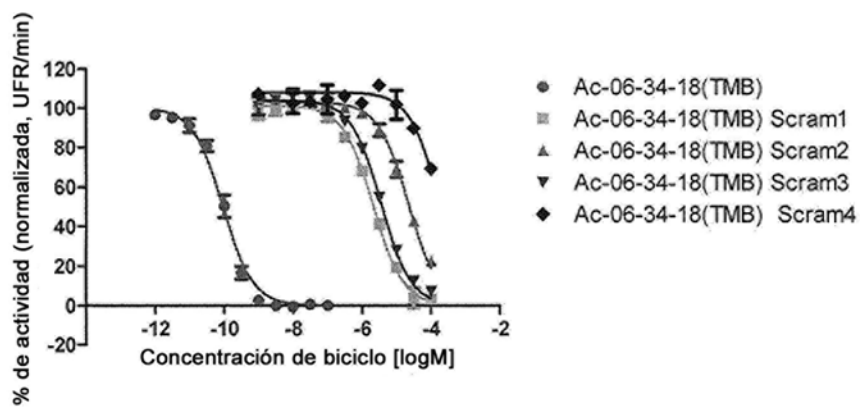


Figura 11

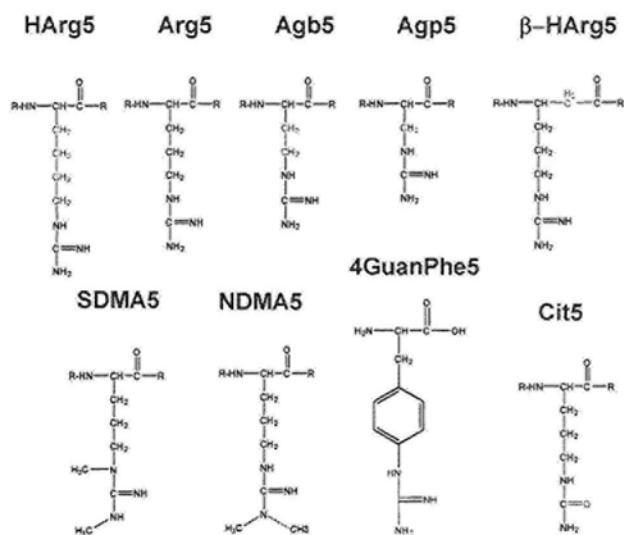


Figura 12

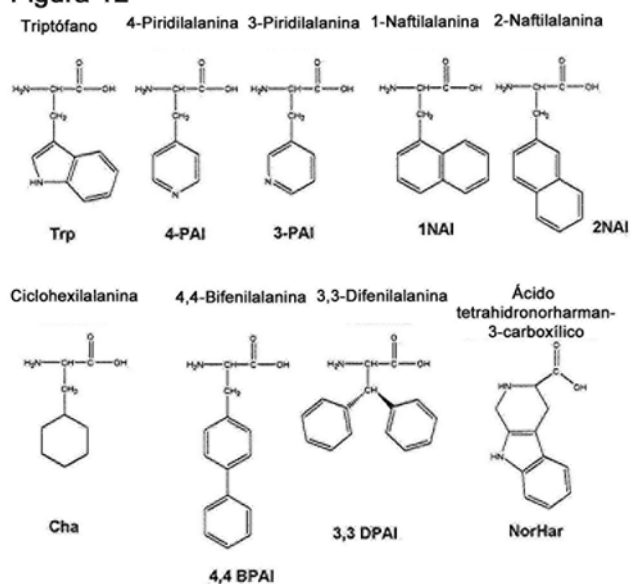


Figura 13

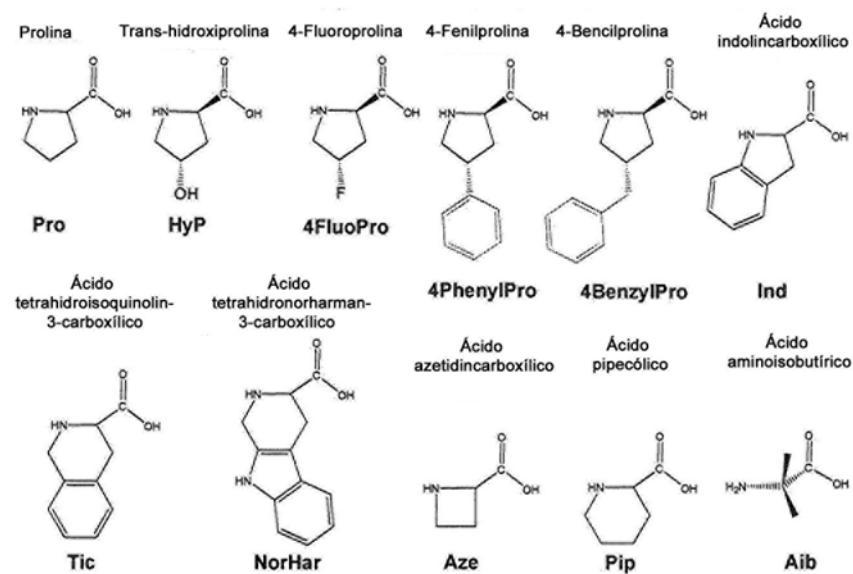


Figura 14

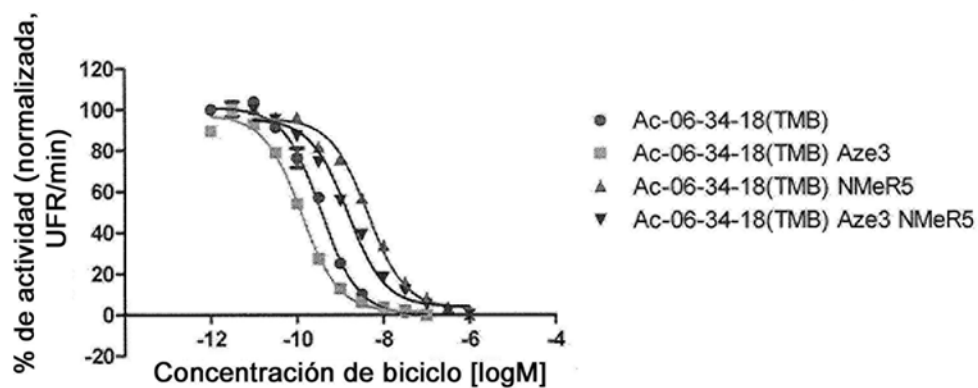


Figura 15

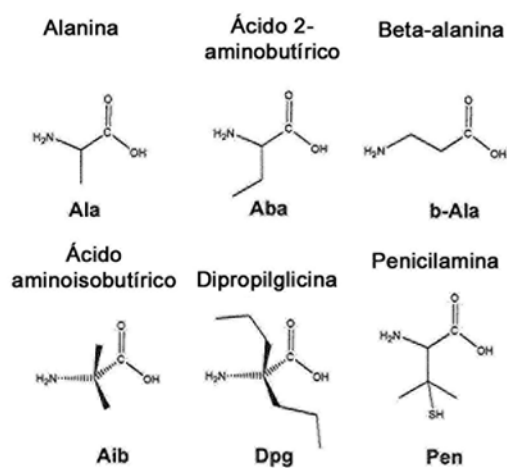


Figura 16

