

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 389**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2010 PCT/US2010/033345**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127336**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2010 E 10718379 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2424557**

54 Título: **Compstatina modificada con esqueleto peptídico y modificaciones c-terminales**

30 Prioridad:

01.05.2009 US 174575 P
04.03.2010 US 339458 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2018

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut
Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**LAMBRIS, JOHN D. y
QU, HONGCHANG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 655 389 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).

Compstatina modificada con esqueleto peptídico y modificaciones c-terminales**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Esta invención se refiere a la activación de la cascada del complemento en el cuerpo. En particular, esta invención proporciona péptidos y peptidomiméticos capaces de enlazar con la proteína C3 e inhibir la activación del complemento.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El sistema del complemento humano es un jugador poderoso en la defensa frente a organismos patógenos y la medicación de respuestas inmunes. El complemento puede activarse mediante tres vías diferentes: la clásica, lectina, y vías alternativas. El evento de activación principal que es compartido por las tres vías es la escisión proteolítica de la proteína central del sistema del complemento, C3, en sus productos de activación C3a y C3b por C3 convertasas. La generación de estos fragmentos lleva a la opsonización de células patógenas por C3b e iC3b, un proceso que las vuelve susceptibles a fagocitosis y depuración, y a la activación de células inmunes mediante una interacción con receptores del complemento (Markiewski & Lambris, 2007, *Am J Pathol* 171: 715-727). El depósito de C3b en células objetivo también induce la formación de nuevos complejos de convertasa e inicia de este modo un bucle de auto-amplificación.

Un conjunto de plasma y proteínas de unión de la superficie celular regula cuidadosamente la activación del complemento para evitar que células huésped se auto-ataquen por la cascada del complemento. Sin embargo, la activación excesiva o la regulación inapropiada del complemento puede llevar a una variedad de condiciones patológicas, variando de enfermedades autoinmunes a inflamatorias (Holers, 2003, *Clin Immunol* 107: 140-51; Markiewski & Lambris, 2007, *supra*; Ricklin & Lambris, 2007, *Nat Biotechnol* 25: 1265-75; Sahu et al., 2000, *J Immunol* 165: 2491-9). El desarrollo de inhibidores del complemento terapéuticos es por lo tanto latamente deseable. En este contexto, el C- y C3b han emergido como objetivos prometedores debido a que su papel central en la cascada permite la inhibición simultánea del inicio, amplificación, y activación descendente del complemento (Ricklin & Lambris, 2007, *supra*).

La compstatina fue el primer inhibidor del complemento no derivado del huésped que demostró era capaz de bloquear las tres vías de activación (Sahu et al., 1996, *J Immunol* 157: 884-91; Patente U.S. 6.319.897). Este tridecapéptido cíclico enlaza con tanto C3 como C3b y evita la escisión de C3 nativo por C3 convertasas. Su alta eficacia inhibidora se confirmó por una serie de estudios usando modelos experimentales que apuntaban a su potencial como un agente terapéutico (Fiane et al., 1999a, *Xenotransplantation* 6: 52-65; Fiane et al., 1999b, *Transplant Proc* 31:934-935; Nilsson et al., 1998 *Blood* 92: 1661-1667; Ricklin & Lambris, 2008, *Adv Exp Med Biol* 632: 273-292; Schmidt et al., 2003, *JBiomater Mater Res A* 66: 491-499; Soulika et al., 2000, *Clin Immunol* 96: 212-221). La optimización progresiva de la compstatina ha producido análogos con actividad mejorada (Ricklin & Lambris, 2008, *supra*; WO2004/026328; WO2007/062249). Uno de estos análogos se está probando actualmente en pruebas clínicas para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la causa principal de ceguera en pacientes de edad avanzada en naciones industrializadas (Coleman et al., 2008, *Lancet* 372: 1835-1845; Ricklin & Lambris, 2008, *supra*). En vista de su potencial terapéutico en AMD y otras enfermedades, la optimización adicional de la compstatina para lograr una eficacia incluso mayor es de considerable importancia.

Estudios de estructura-actividad anteriores han identificado la naturaleza cíclica del péptido de compstatina y la presencia de tanto un giro β como un grupo hidrófobo como características clave de la molécula (Morkikis et al., 1998, *Protein Sci* 7:619-627; WO99/13899; Morikis et al., 2002, *J Biol Chem* 277: 14942-14953; Ricklin & Lambris, 2008, *supra*). Por ejemplo, la WO99/13899 divulgaba que los residuos de aminoácidos en las posiciones 5 a 8 tienen una conformación restringida formando un giro β Tipo I y afirmando que la presencia de Gly en la posición 8 era la más favorable para esta estructura. Otro trabajo que usa compstatina y análogos de compstatina para el desarrollo de modelos de farmacóforos reveló que reemplazando Gly⁸ con Ala eliminó la actividad inhibidora del péptido (Mallik and Morikis, 2005, *J Am Chem Soc* 127:10967-10976). Se descubrió que los residuos hidrófobos en las posiciones 4 y 7 eran de particular importancia, y sus modificaciones con aminoácidos no naturales generó un análogo con actividad mejorada 264 veces sobre el péptido de compstatina original (Katragadda et al., 2006, *J Med Chem* 49: 4616-4622; WO2007/062249).

Aunque los pasos de optimización previos se han basado en estudios de selección combinatoria, estructuras de solución, y modelos computacionales (Chiu et al., 2008, *Chem Biol Drug Des* 72: 249-256; Mulakala et al., 2007, *Bioorg Med Chem* 15: 1638-1644; Ricklin & Lambris, 2008, *supra*), la publicación reciente de una estructura de co-cristal de compstatina en complejo con el fragmento del complemento C3c (Janssen et al., 2007, *J Biol Chem* 282: 29241-29247; WO2008/153963) representa un hito importante para iniciar la optimización racional. La estructura de cristal reveló un sitio de enlace superficial en la interfaz de los dominios de macroglobulina (MG) 4 y 5 de C3c y mostró que 9 de los 13 aminoácidos estaban implicados directamente en el enlace, ya sea a través de

enlaces de hidrógeno o efectos hidrófobos. En comparación con la estructura del péptido de compstatina en solución (Morikis *et al.*, 1998, *supra*), la forma de enlace de la compstatina experimentó un cambio conformacional, con un cambio en la localización del giro β de los residuos 5-8 a 8-11 (Janssen *et al.*, 2007, *supra*; WO2008/153963).

- 5 En vista de lo anterior, está claro que el desarrollo de péptidos de compstatina modificados o miméticos con incluso mayor actividad constituiría un avance significativo en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención proporciona análogos y miméticos del péptido que inhibe el complemento, compstatina, ICVVQDWGHHRCT (C2-C12 cíclico); SEQ ID NO:1), que tienen actividad de inhibición del complemento mejorada en comparación con la compstatina.

- 15 Un aspecto de la invención presenta un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado (ICVVQDWGHHRCT (C2-C12 cíclico); SEQ ID NO:1), en el que la Gly en la posición 8 se modifica para restringir la conformación del esqueleto del péptido en esa localización. En una realización, el esqueleto se restringe reemplazando la Gly con N-metil Gly. El péptido puede modificarse adicionalmente por uno o más de: reemplazo de His en la posición 9 con Ala; reemplazo de Val en la posición 4 con Trp o un análogo de Trp; reemplazo de Trp en la posición 7 con un análogo de Trp; acetilación del residuo N terminal; y reemplazo de Thr en la posición 13 con Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile. En realizaciones particulares, el análogo de Trp en la posición 4 es 1-metil Trp o 1-formil Trp y el análogo de Trp en la posición 7, si lo hay es un Trp halogenado.

- 25 Ciertas realizaciones presentan un análogo de compstatina que comprende un péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO:2, que es:

- Xaa1 - Cys - Val - Xaa2 - Gin - Asp - Xaa3 - Gly - Xaa4 - His - Arg - Cys - Xaa5 (C2-C12 cíclico) en donde Gly en la posición 8 se modifica para restringir la conformación del esqueleto del péptido en esa localización, y en donde:

- 30 Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu o un dipéptido que comprende Gly-Ile;
Xaa2 es Trp, Trp halogenado, Trp que comprende un alcoxi inferior o sustituyente de alcanilo en la posición 1;
Xaa3 es Trp o Trp halogenado; Xaa4 es His, Ala, Phe o Trp; y
35 Xaa5 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile, en donde un -OH carboxi terminal de cualquiera de Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile está opcionalmente reemplazado por -NH₂.

- En ciertas realizaciones, Xaa2 participa en una interacción no polar con C3. En otras realizaciones, Xaa3 participa en un enlace de hidrógeno con C3. En varias realizaciones, el análogo de Trp de Xaa2 es un triptófano halogenado, como 5-fluoro-1-triptófano o 5-fluoro-1-triptófano. En otras realizaciones, el análogo de Trp en Xaa2 comprende un sustituyente de alcoxi inferior o alquilo inferior en la posición 5, por ejemplo, 5-metoxitriptófano o 5-metilriptófano. En otras realizaciones, el análogo de Trp en Xaa2 comprende un sustituyente de alquilo inferior o alquenoilo inferior en la posición 1, con realizaciones ejemplares comprendiendo 1-metilriptófano o 1-formilriptófano. En otras realizaciones, el análogo de Trp de Xaa3 es un triptófano halogenado como 5-fluoro-1-triptófano o 6-fluoro-1-triptófano. En realizaciones particulares, Xaa2 es 1-metilriptófano o 1-formilriptófano y Xaa3 comprende opcionalmente 5-fluoro-1-triptófano.

- En ciertas realizaciones, Xaa1 es Ac-Ile, Xaa2 es 1-metil-Trp o 1-formil-Trp, Xaa3 es Trp, Xaa4 es Ala, y Xaa5 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile, En particular, Xaa5 puede ser Ile, N-metil Thr o N-metil He. En particular, el análogo de compstatina comprende cualquiera de las SEQ ID NOS: 5, 7, 8, 9, 10 ó 11.

- 50 En algunas realizaciones, el compuesto comprende un péptido producido por la expresión de un polinucleótido que codifica el péptido. En otras realizaciones, el compuesto se produce al menos en parte por síntesis de péptidos. También puede usarse una combinación de métodos sintéticos.

- 55 Otro aspecto de la invención presenta un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un componente adicional que extiende la retención in vivo del compuesto. El componente adicional es polietilenglicol (PEG) en una realización. El componente adicional es una molécula pequeña de enlace a albúmina en otra realización, el componente adicional es un péptido de enlace a albúmina. El péptido de enlace a albúmina puede comprender la secuencia RLIEDICLPWGCLWEDD (SEQ ID NO: 14). Realizaciones particulares comprenden cualquiera de las SEQ ID NOS: 5, 7, 8, 9, 10 ó 11 ligadas al péptido de enlace a albúmina. Opcionalmente, el compuesto y el péptido de enlace a albúmina se separan por un espaciador. El espaciador puede ser una molécula de polietilenglicol (PEG), como mini-PEG o mini-PEG 3.

- 65 Otro aspecto de la invención presenta el compuesto que inhibe la activación del complemento, comprende un mimético no peptídico o peptídico parcial de cualquiera de las SEQ ID NOS: 5, 7, 8, 9, 10 ó 11, en donde el

compuesto se enlaza a C3 e inhibe la activación del complemento con al menos actividad 500 veces mayor de lo que lo hace el péptido que comprende la SEQ ID NO:1 bajo condiciones de ensayo equivalentes.

Los análogos, conjugados y miméticos de compstatina de la invención son de utilidad práctica para cualquier propósito para el que se utiliza la misma compstatina, como se conoce en la técnica y se describe con mayor detalle en la presente. Ciertos de estos usos implican la formulación de los compuestos en composiciones farmacéuticas para la administración a un paciente. Tales formulaciones pueden comprender sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, así como uno o más diluyentes, portadores, excipientes y similares farmacéuticamente aceptables, como estaría dentro del alcance del experto en la técnica.

Varias características y ventajas de la presente invención se entenderán con referencia a la descripción detallada, dibujos y ejemplos que siguen.

DESCRIPCION DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Definiciones:

A lo largo de la especificación y reivindicaciones se usan varios términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la presente invención. A dichos términos se les debe dar su significado ordinario en la técnica a menos que se especifique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben ser interpretados de una manera consistente con la definición proporcionada en la presente.

El término "aproximadamente" como se usa en la presente cuando se hace referencia a un valor medible como una cantidad, una duración temporal, y similares, se pretende que abarque variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para hacer y usar los compuestos y composiciones divulgados.

El término "compstatina" como se usa en la presente se refiere a un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1, ICVVQDWGHRCT (C2-C12 cíclico). El término "análogo de compstatina" se refiere a una compstatina modificada que comprende sustituciones de aminoácidos naturales y no naturales, o análogos de aminoácidos, así como modificaciones dentro o entre varios aminoácidos, como se describe con mayor detalle en la presente, y como se conoce en la técnica. Cuando se hace referencia a la localización de aminoácidos o análogos particulares dentro de la compstatina o análogos de compstatina, esas localizaciones son referidas algunas veces como "posiciones" dentro del péptido, con las posiciones numeradas de 1 (Ile en compstatina) a 13 (Thr en compstatina). Por ejemplo, el residuo Gly ocupa la "posición 8".

Los términos "farmacéuticamente activo" y "biológicamente activo" se refieren a la capacidad de los compuestos de la invención de unirse con C3 o fragmentos de la misma e inhibir la activación del complemento. Esta actividad biológica puede medirse por uno o más de los varios ensayos reconocidos en la técnica, como se describe con mayor detalle en la presente.

Como se usa en la presente, "alquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico saturado opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido con de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclooctilo, adamantilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término "alquilo inferior" se refiere a un hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico saturado opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo). Los grupos alquilo inferior incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo y neopentilo.

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

Como se usa en la presente, "alcanoilo", que puede usarse de manera intercambiable con "acilo", se refiere a un residuo acílico alifático lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido con de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Los grupos alcanoilo incluyen, pero no están limitados a, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilopentanoilo, isopentanoilo, 2-metil-butirilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, y similares. El término "alcanoilo inferior" se refiere a un residuo acílico alifático lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo). Los grupos alcanoilo inferior incluyen, pero no están limitados a, formilo, acetilo, n-propionilo, iso-propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo,

iso-pentanoilo, y similares.

Como se usa en la presente, "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromático mono- o bicíclico, opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido con de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 carbonos. Ejemplos no limitativos incluyen, por ejemplo, fenilo y naftilo.

Como se usa en la presente, "aralquilo" se refiere a radicales de alquilo que llevan un sustituyente de arilo y tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido con de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos aralquilo pueden estar opcionalmente sustituidos. Ejemplos no limitativos incluyen, por ejemplo, bencilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo.

Como se usan en la presente, los términos "alcoxi" y "alcoxilo" se refieren a un grupo alquil-O- opcionalmente sustituido en el que alquilo es como se ha definido anteriormente. Grupos alcoxi y alcoxilo ejemplares incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi y heptoxi, entre otros.

Como se usa en la presente, "carboxi" se refiere a un grupo -C(=O)OH .

Como se usa en la presente, "alcoxycarbonilo" se refiere a un grupo -C(=O)O- alquilo, donde alquilo es como se ha definido anteriormente.

Como se usa en la presente, "aroilo" se refiere a un grupo -C(=O)- arilo, en el que arilo es como se ha definido anteriormente. Grupos aroilo ejemplares incluyen benzoilo y naftoilo.

Típicamente, las fracciones químicas sustituidas incluyen uno o más sustituyentes que reemplazan el hidrógeno en localizaciones seleccionadas en una molécula. Sustituyentes ejemplares incluyen, por ejemplo, halo, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, sulfhidrilo, hidroxilo (-OH), alcoxilo, ciano (-CN), carboxilo (-COOH), acilo (alcanoilo: -C(=O)R); -C(=O)O- alquilo, aminocarbonilo (-C(=O)NH_2), aminocarbonilo -N-sustituido (-C(=O)NHR), CF_3 , CF_2CF_3 , y similares. En relación con los sustituyentes adicionales, cada fracción R" puede ser, independientemente, cualquiera de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo, por ejemplo.

Como se usa en la presente, "aminoácido L" se refiere a cualquiera de los aminoácidos alfa levógiros de origen natural presentes normalmente en proteínas o los ésteres de alquilo de esos aminoácidos alfa. El término "aminoácido D" se refiere a aminoácidos alfa dextrógiros. A menos que se especifique lo contrario, todos los aminoácidos referidos en la presente con aminoácidos L.

"Hidrófobo" o "no polar" se usan como sinónimos en la presente, y se refieren a cualquier interacción inter- o intra- molecular no caracterizada por un dipolo.

"PEGilación" se refiere a la reacción en la que por lo menos una fracción de polietilenglicol (PEG), independientemente de su tamaño se une químicamente a una proteína o péptido para formar un conjugado PRG-péptido. "PEGilado" significa que por lo menos una fracción de PEG, independientemente de su tamaño, se une químicamente a un péptido o proteína. El término PEG está acompañado generalmente por un sufijo numérico que indica el peso molecular medio aproximado de los polímeros de PEG; por ejemplo, PEG-8.000 se refiere a polietilenglicol que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 8.000.

Como se usa en la presente, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto original se modifica haciendo sales de ácidos o bases del mismo. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, sales de ácidos minerales u orgánicos, residuos como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos como ácidos carboxílicos; y similares. Así, el término "sal de adición de ácido" se refiere al derivado de sal correspondiente de un compuesto original que se ha preparado por la adición de un ácido. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales convencionales o las sales de amonio cuaternarias del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, tales sales convencionales incluyen, pero no están limitadas a, las derivadas de ácidos inorgánicos como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico isetiónico, y similares. Ciertos compuestos ácidos o básicos de la presente invención pueden existir como zwitteriones. Se contempla que todas las formas de los compuestos, incluyendo el ácido libre, base libre, y zwitteriones, estén dentro del alcance de la presente invención.

Descripción:

De acuerdo con la presente invención, se ha empleado información sobre las características biológicas y fisicoquímicas de la compstatina que enlaza con C3 para diseñar péptidos de compstatina con actividad significativamente mejorada en comparación con el péptido de compstatina original. En algunas realizaciones, los análogos tienen al menos 500 veces más actividad que la compstatina. En otras realizaciones, los análogos tienen 350-, 400-, 450-, 500-, 550-, 600- veces o más actividad que la compstatina, en comparación utilizando los ensayos descritos en los ejemplos.

Los análogos de compstatina sintetizados de acuerdo con los enfoques anteriores han demostrado que poseen actividad mejorada en comparación con el péptido original, es decir hasta aproximadamente 99 veces (Mallik, B. *et al.*, 2005, *supra*; WO2004/026328), y hasta aproximadamente 264 veces (Katragadda *et al.*, 2006, *supra*; WO2007/062249). Los análogos de acuerdo con la presente invención demuestran actividad mejorada mediante la modificación en una posición de compstatina no utilizada hasta ahora, y puede impartir actividad mejorada a la compstatina o cualquier análogo actualmente descrito. Los análogos de la presente invención poseen por lo tanto incluso mayor actividad que o el péptido original o análogos del mismo producidos hasta la fecha, como se demuestra por ensayos in vitro como se muestra en las figuras y en los Ejemplos descritos en la presente.

La tabla siguiente muestra la secuencia de aminoácidos y las actividades inhibitoras del complemento de análogos ejemplares seleccionados con actividad significativamente mejorada sobre la compstatina (Ic[CVVQDWGHHRC]T; SEQ ID NO: 1). Los análogos seleccionados son referidos por modificaciones específicas de las posiciones designadas (1-13) en comparación con un análogo de compstatina potente (Ac-Ic[CV(1-MeW)QDWGAHRC]T-NH₂, SEQ ID NO:4, también referido como péptido 14 en el Ejemplo 1) que se describió en la WO2007/062249. Los péptidos de las SEQ ID NOS: 5 y 7-11 (también referidos como péptidos 15 y 17-21 en el Ejemplo 1) son representativos de modificaciones hechas de acuerdo con la presente invención, resultando en análogos de compstatina significativamente más potentes.

Análogos de compstatina ejemplares, IC₅₀, y veces de cambio en relación a la SEQ ID**NO:4 (Ac- Ic[CV(1-MeW)QDWGAHRC]T-NH₂), IC₅₀ de 206 nM):**

SEQ ID NO:	Pept. N°	Xaa ⁸	Xaa ¹³	Secuencia	IC ₅₀ (nM)	Veces de cambio
5	15	Sar*	Thr	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC]T-NH ₂	159	1.30
7	17	Sar	Ile	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC]I-NH ₂	92	2.24
8	18	Sar	Leu	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC]L-NH ₂	108	1.91
9	19	Sar	Nle	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC](Nle)-NH ₂	109	1.90
10	20	Sar	(NMe)Thr	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC](N-MeT)-NH ₂	86	2.40
11	21	Sar	(NMe)Ile	Ac-Ic[CV(1-MeW)QDW(N-MeG)AHRC](N-MeI)-NH ₂	62	3.32

*Sar = N-ME Gly

Una modificación de acuerdo con la presente invención comprende restricción del esqueleto del péptido en la posición 8 del péptido. En una realización particular, el esqueleto se restringe reemplazando glicina en la posición 8 (Gly⁸) con N-metil glicina. Se hace referencia a péptidos ejemplares 8 y 15 como se trata en el Ejemplo 1.

Sin querer estar ligado o limitado por la teorías, cabe destacar que la N-metilación puede afectar a un péptido de diversas maneras. Primero, el donante de hidrógeno potencial se reemplaza con un grupo metilo, que no puede formar un enlace de nitrógeno. Segundo, el grupo N-metilo es un débil donante de electrones lo que significa que puede aumentar ligeramente la basicidad del grupo carbonilo colindante. Tercero, el tamaño del grupo N-metilo podría provocar restricción estérica. Finalmente, la N-metilación puede cambiar la población trans/cis del enlace de amida, cambiando así la conformación del péptido local de una manera similar a la prolina.

El aumento de la actividad de [Trp(Me)⁴Gly(N-Me)⁸Ala⁹]-Ac-compstatina (SEQ ID NO:5; péptido 15) es una mejora notable en comparación con el análogo anteriormente más activo, [Trp(Me)⁴Gly⁸Ala⁹]-Ac-compstatina (SEQ ID NO:4; péptido 14). La N-metilación de Gly⁸ mejora probablemente el reconocimiento del objetivo y la estabilidad del complejo por giro β tipo enlace reforzado, restricciones del esqueleto locales aumentadas e interacciones hidrófobas mejoradas que implican la cadena lateral de Trp⁷.

En realizaciones particulares, la modificación en la posición 8 se suplementa con una modificación adicional que comprenden reemplazar Thr en la posición 13 con Ile, Leu, Nle (norleucina), N-metil Thr o N-metil Ile. Se hace referencia a los péptidos ejemplares 16, 17, 18, 19, 20 y 21 (SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 9, 10 y 11) como se trata en el Ejemplo 1. De nuevo, sin querer estar limitado o ligado por la teoría, se descubrió que el reemplazo de Thr con Ile hidrófobo es beneficioso. Los efectos similares observados para los dos isómeros de Ile (es decir, Leu y Nle)

sugieren que las propiedades fisicoquímicas y estéricas, en lugar de los contactos específicos, pueden ser responsables de esta mejora. Sin embargo, se observó una mejora más distintiva en la afinidad y la actividad tras la N-metilación del esqueleto de tanto Thr¹³ y Ile¹³. Mientras que las mejoras observadas pueden haber sido resultado de restricciones del esqueleto aumentadas, y por lo tanto penalizaciones entrópicas conformacionales menores tras el enlace, también es el caso de que la naturaleza del residuo en la posición 13 puede influir adicionalmente en la formación y estabilización de conformaciones activas, ya sea estéricamente o mediante la formación de contactos hidrófobos intramoleculares.

Las modificaciones anteriormente descritas en la posición 8 y la posición 13 pueden combinarse con otras modificaciones de compstatina mostradas anteriormente para mejorar la actividad, para producir péptidos con actividad inhibidora del complemento significativamente mejorada. Por ejemplo, la acetilación del término N aumenta típicamente la actividad inhibidora del complemento de la compstatina y sus análogos. Por consiguiente, la adición de un grupo acilo en el término amino del péptido, incluyendo pero no limitado a N-acetilación, es una realización preferida de la invención, de utilidad particular cuando los péptidos se preparan sintéticamente. Sin embargo, es algunas veces ventajoso preparar los péptidos por expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido en un sistema de expresión procariota o eucariota, o por la transcripción y traducción in vitro. Para estas realizaciones, puede utilizarse el término N de origen natural.

Como otro ejemplo, se conoce que la sustitución de Ala por His en la posición 9 mejora la actividad de la compstatina y es una modificación preferida de los péptidos de la presente invención también. También se ha determinado que la sustitución de Tyr por Val en la posición 4 puede dar lugar a una mejora modesta en la actividad (Klepeis et al., 2003, J Am Chem Soc 125: 8422-8423).

También se ha divulgado en la WO2004/026328 y WO2007/0622249 que Trp y ciertos análogos de Trp en la posición 4, así como ciertos análogos de Trp en la posición 6, combinados especialmente con Ala en la posición 9, produce actividad muchas veces mayor que la de la compstatina. Estas modificaciones se usan también ventajosamente en la presente invención también.

En particular, los péptidos que comprenden 5-fluoro-L-triptófano o 5-metoxi-, 5-metil- o 1-metil-triptófano, o 1-formil-triptófano en la posición 4 han demostrado que poseen actividad 31-264 veces mayor que la de la compstatina. Particularmente preferidos con el 1-metil y 1-formil triptófano. Se cree que un enlace de hidrógeno 'N'-mediado por indol no es necesario en la posición 4 para el enlace y actividad de la compstatina. La ausencia de este enlace de hidrógeno o reducción del carácter polar reemplazando hidrógeno con alquilo inferior, alcanilo o nitrógeno de indol en la posición 4 potencia el enlace y actividad de la compstatina. Sin querer estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción particulares, se cree que una interacción hidrófoba o efecto en la posición 4 refuerza la interacción de la compstatina con C₃. Por consiguiente, las modificaciones de Trp en la posición 4 o la posición 7 de análogos de Trp que mantienen o potencian la interacción hidrófoba anteriormente mencionada se contemplan en la presente invención como una modificación ventajosa en combinación con las modificaciones en las posiciones 8 y 13 como se describe anteriormente. Tales análogos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a los análogos ejemplificados en la presente, así como derivados no sustituidos o alternativamente sustituidos de los mismos. Ejemplos de análogos adecuados pueden encontrarse por referencia en las siguientes publicaciones, y muchas otras Beene, et al., 2002, Biochemistry 41: 10262-10269 (que describe, entre otros análogos de Trp, individualmente y multi-halogenados); Babitzky & Yanofsky, 1995, J. Biol. Chem. 270: 12452-12456 (que describe, entre otros, Trp metilados y halogenados y otros análogos de Trp e indol); y las Patentes U.S. 6.214.790. 6.169.057. 5.776.970. 4.870.097. 4.576.750 and 4.299.838. Los análogos de Trp pueden introducirse en el péptido de compstatina por expresión in vitro o in vivo, o por síntesis de péptidos, como se conoce en la técnica.

En ciertas realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina se reemplaza con un análogo que comprende un sustituyente de 1-alquilo, más particularmente un sustituyente de alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₅) como se ha definido anteriormente. Estos incluyen, pero no están limitados a, N(α) metil triptófano, N(α) formil triptófano y 5-metilriptófano. En otras realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina se reemplaza con un análogo que comprende un sustituyente de 1-alcanilo, más particularmente un sustituyente de alcanilo inferior (por ejemplo, C₁-C₅) como se define anteriormente. Adicionalmente a los análogos especificados, estos incluyen pero no están limitados a 1-acetil-L-triptófano y L-β-homotriptófano.

En la WO2007/0622249 se divulgó que la incorporación de 5-fluoro-L-triptófano en la posición 7 en la compstatina aumento la entalpía de la interacción entre la compstatina y C₃, en relación a la compstatina de tipo salvaje, mientras que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 4 en la compstatina disminuyó la entalpía de esta interacción. Por consiguiente, las modificaciones de Trp en la posición 7, como se describe en la WO2007/062224, se contemplan como modificaciones útiles en combinación con las modificaciones en las posiciones 8 y 13 como se describe anteriormente.

Los péptidos de compstatina modificados de la presente invención pueden prepararse por varios métodos sintéticos de síntesis de péptidos mediando la condensación de uno o más residuos de aminoácidos, de acuerdo con métodos de síntesis de péptidos convencionales. Por ejemplo, los péptidos se sintetizan de acuerdo con

metodologías en fase sólida estándar, como se puede realizar en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems modelo 431A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Otros métodos de sintetizar péptidos o peptidomiméticos, ya sea por metodologías en fase sólida o en fase líquida, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Durante el curso de la síntesis de péptidos, pueden protegerse/desprotegerse grupos amino y carboxilo de cadena ramificada como sea necesario, usando grupos protectores conocidos comúnmente. Un ejemplo de un método sintético de péptidos adecuado se expone en el Ejemplo 1. La modificación utilizando grupos protectores alternativos para péptidos y derivados de péptidos será aparente para los expertos en la técnica.

Alternativamente, ciertos péptidos de la invención pueden producirse por expresión en un sistema procariota o eucariota adecuado. Por ejemplo, un constructo de ADN puede insertarse en un vector plásmido adaptado para la expresión en una células bacteriana (como *E.coli*) o una célula de levadura (como *Saccharomyces cerevisiae*), o en un vector de baculovirus para la expresión en una células de insecto o un vector viral para la expresión en una célula mamífera. Tales vectores comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula huésped, posicionados de tal manera que permitan la expresión del ADN en la células huésped. Tales elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de inicio de la transcripción y, opcionalmente, secuencias potenciadoras.

Los péptidos también pueden producirse por la expresión de una molécula de ácido nucleico in vitro o in vivo. Un constructo de ADN que codifica un concatémoro de los péptidos, el límite superior del concatémoro siendo dependiente del sistema de expresión utilizado, puede introducirse en un sistema de expresión in vivo. Después de que el concatémoro se ha producido, se alcanza la escisión entre la Asn C-terminal y la G N-terminal siguiente por exposición del polipéptido a hidracina.

Los péptidos producidos por expresión génica en un sistema procariota o eucariota recombinante pueden purificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Una combinación de expresión génica y métodos sintéticos pueden utilizarse también para producir análogos de compstatina. Por ejemplo, un análogo puede producirse por expresión génica y someterse posteriormente a uno o más procesos sintéticos post-traslacionales, por ejemplo para modificar el término N- o C- o para ciclar la molécula.

Ventajosamente, los péptidos que incorporan aminoácidos no naturales, por ejemplo, aminoácidos metilados, pueden producirse por expresión in vivo en un sistema procariota o eucariota adecuado. Por ejemplo, los métodos como los descritos por Katragadda & Lambris (2006, Protein Expression and Purification 47: 289-295) para introducir análogos de Trp no naturales en compstatina mediante la expresión en auxótrofos de *E.coli* pueden utilizarse para introducir aminoácidos N-metilados u otros no naturales en las posiciones seleccionadas de compstatina.

La estructura de la compstatina se conoce en la técnica, y las estructuras de los análogos precedentes se determinan por medios similares. Una vez que una conformación particular deseada de un péptido corto se ha comprobado, los métodos para diseñar un péptido o peptidomimético para ajustar con esa conformación son bien conocidos en la técnica. De particular relevancia para la presente invención, el diseño de los análogos del péptido pueden refinarse adicionalmente considerando la contribución de varias cadenas laterales de residuos de aminoácidos, como se ha tratado anteriormente (es decir, para el efecto de grupos funcionales o para consideraciones estéricas).

Se apreciara por los expertos en la técnica que un imitador de péptido puede servir igualmente bien como un péptido para el propósito de proporcionar la conformación de esqueleto específica y funcionalidades de cadena lateral requeridas para el enlace con C3 e inhibir la activación del complemento. Por consiguiente, se contempla que esté dentro del alcance de la presente invención para producir compuestos que enlazan con C3, que inhiben el complemento mediante el uso de aminoácidos de origen natural, derivados de aminoácidos, análogos o moléculas no de aminoácidos capaces de unirse para formar la conformación del esqueleto apropiada. Un análogo no peptídico, o un análogo que comprende componentes peptídicos y no peptídicos, es referido a veces en la presente como un "peptidomimético" o "mimético isostérico", para designar sustituciones o derivaciones de los péptidos de la invención, que posee las mismas características y/o otras funcionales conformacionales del esqueleto, para ser suficientemente similar a los péptidos ejemplificados para inhibir la activación del complemento.

El uso de peptidomiméticos para el desarrollo de análogos de péptidos de alta afinidad es bien conocido en la técnica (ver por ejemplo, Vagner et al., 2008, Curr. Opin. Chem. Biol. 12: 292-296; Robinson et al., 2008, Drug Disc. Today 13: 944-951). Asumiendo restricciones rotacionales similares a las de los residuos de aminoácidos dentro de un péptido, pueden analizarse los análogos que comprenden fracciones no de aminoácidos, y verificarse sus motivos conformacionales, por una variedad de técnicas computacionales que son bien conocidas en la técnica.

Los péptidos de compstatina modificados de la presente invención pueden modificarse por la adición de componentes de polietilenglicol (PEG) al péptido. Como es bien conocido en la técnica, la PEGilación puede aumentar la vida media de péptidos y proteínas terapéuticos in vivo. En una realización, el PEG tiene un peso

molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000. En otra realización el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000. En otra realización el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000. En una realización ejemplar, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5.000. El polietilenglicol puede ser una cadena ramificada o lineal, y preferiblemente es una cadena lineal.

Los análogos de compstatina de la presente invención pueden enlazarse covalentemente con PEG mediante un grupo de ligamiento. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. (Revisado en Kozlowski A. et al. 2001, *BioDrugs* 15: 419-29; ver también, Harris JM and Zalipsky S, eds. *Poly(ethylene glycol)*, Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series 680 (1997)). Ejemplos no limitativos de grupos de ligamiento aceptables incluyen un grupo éster, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un carbohidrato, un grupo succinimida (incluyendo sin limitación, succinimidil succinato (SS), succinimidil propionato (SPA), succinimidil carboximetilato (SCM), succinimidil succinamida (SSA) y N-hidroxi succinimida (NHS)), un grupo epóxido, un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, sin limitación, carbonilimidazol (CDI)), un grupo nitro fenilo (incluyendo, sin limitación, carbonato de nitrofenilo (NPC) o carbonato de triclorofenilo (TPC)), un grupo triesilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina o una amina primaria. En ciertas realizaciones, el grupo de ligamiento es un grupo succinimida. En una realización, el grupo de ligamiento es NHS.

Los análogos de compstatina de la presente invención pueden acoplarse alternativamente directamente con PEG (es decir, sin un grupo de ligamiento) mediante un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo. En una realización, el PEG se acopla con un residuo de lisina añadido al término C de compstatina.

Como una alternativa a la PEGilación, la depuración in vivo de péptidos puede también reducirse ligando los péptidos con ciertas otras moléculas o péptidos. Por ejemplo, ciertos péptidos de enlace a albúmina muestran una vida media inusualmente larga de 2,3 h cuando se inyectan por bolo intravenoso en conejos (Dennis et al., 2002, *J Biol Chem.* 277: 35035-35043). Un péptido de este tipo, fusionado con el factor anti-tejido Fab de D3H44 permitió al Fab enlazar con albúmina a la vez que retienen la capacidad del Fab de enlazar el factor del tejido (Nguyen et al., 2006, *Protein Eng Des Sel.* 19: 291-297.). Esta interacción con la albúmina resultó en depuración in vivo significativamente reducida y vida media extendida en ratones y conejos, cuando se compara con el Fab D3H44 del tipo salvaje, comparable con los observados para moléculas de Fab PEGiladas, inmunoadhesinas, y fusiones de albúmina. La WO2007/062249 describe un análogo de compstatina fusionado con un péptido de enlace a albúmina (ABP) e informa que la proteína de fusión es activa en la inhibición de la activación del complemento. Sin embargo, la síntesis era larga y la producción del producto de la fusión fue menor que lo deseado. El ejemplo 2 de la presente expone estrategias de síntesis mejoradas que utilizan un ABP así como una molécula pequeña de enlace a albúmina (ABM), y emplean opcionalmente un espaciador entre los componentes. Esos procedimientos resultaron en la producción de conjugados de análogos de ABP- y ABM-compstatina capaces de inhibir la activación del complemento y también mostrar supervivencia in vivo extendida. De hecho, el ABP era capaz de mejorar la vida media de un análogo de compstatina 21 veces sin comprometer significativamente su actividad inhibidora. Así, tales conjugados permiten la administración sistémica del inhibidor sin infusión.

La actividad inhibidora de la activación del complemento de análogos, peptidomiméticos y conjugados de compstatina pueden probarse por una variedad de ensayos conocidos en la técnica. En una realización, se utiliza el ensayo descrito en el Ejemplo 1. Una lista no exhaustiva de otros ensayos se expone en la Patente U.S. 6.319.897, WO99/13899 WO2004/026328 and WO2007/06224 incluyendo, pero no limitado a, (1) enlace de péptidos con C3 y fragmentos de C3; (2) varios ensayos hemolíticos; (3) medición de escisión mediada por C3 convertasa de C3; y (4) medición de escisión del Factor B por el Factor D.

Los péptidos y peptidomiméticos descritos en la presente son de utilidad práctica para cualquier propósito para el que se utiliza la misma compstatina, como se conoce en la técnica. Tales usos incluyen, pero no están limitados a: (1) inhibir la activación del complemento en el suero, tejidos u órganos de un paciente (humano o animal), que puede facilitar el tratamiento de ciertas enfermedades o condiciones, incluyendo pero no limitado a, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cáncer y trastornos respiratorios como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), inflamación alérgica, enfisema, bronquitis, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonía, síndrome de dificultad respiratoria (SDR - neonatal y adulto), rinitis y sinusitis; (2) inhibir la activación del complemento que tiene lugar durante el trasplante de células u órganos, o en el uso de órganos artificiales o implantes (por ejemplo, recubriendo o tratando de otra manera las células, órganos, órganos artificiales o implantes con un péptido de la invención); (3) inhibir la activación del complemento que tiene lugar durante la derivación extracorpórea de fluidos fisiológicos (sangre, orina) (por ejemplo, recubriendo el entubado mediante los que se derivan los fluidos con un péptido de la invención); y (4) selección de bibliotecas de moléculas pequeñas para identificar otros inhibidores de la activación de la compstatina (por ejemplo, ensayos de alto rendimiento en fase líquida- o sólida- diseñados para medir la capacidad de un compuesto de prueba de competir con un análogo de compstatina para enlazar con C3 o un fragmento de C3).

Para implementar una o más de las utilidades mencionadas anteriormente, otro aspecto de la invención presente composiciones farmacéuticas que comprenden los análogos o conjugados de compstatina descritos y ejemplificados en la presente. Tal composición farmacéutica puede consistir del ingrediente activo solamente, en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el ingrediente activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más ingredientes adicionales, o alguna combinación de estos. El ingrediente activo puede estar presente en la composición farmacéutica en la forma de un éster o sal fisiológicamente aceptable, como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, como es bien conocido en la técnica.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquier método conocido o desarrollado en lo sucesivo en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos preparatorios incluyen el paso de llevar el ingrediente activo en asociación con un portador o uno o más de otros ingredientes accesorios, y luego, si es necesario o deseable, dar forma o envasar el producto en una unidad de dosis individual o multi-dosis deseada.

Como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que un inhibidor del complemento puede combinarse y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el inhibidor del complemento a un mamífero.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Se pretende que ilustren, no que limiten, la invención.

Ejemplo 1

Se realizó un escaneo de mono-N^α-metilación en [Tyr⁴Ala⁹]-Ac-compstatina (Ac-Ic[CVYQDWGAHRC]T-NH₂; SEQ ID NO:3). En base a los resultados del ensayo de estos análogos, se realizó la N-metilación selectiva y sustitución en la posición 13 en [Trp(Me)⁴Ala⁹]-Ac-compstatina (Ac-Ic[CV^(1-MeW)QDWGAHRC]T-NH₂; SEQ ID NO:4). Los análogos seleccionados se caracterizaron adicionalmente usando resonancia de plasmones superficiales (SPR) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC). También se realizaron simulaciones dinámicas moleculares (MD) para investigar posibles mecanismos para el aumento observado en la afinidad.

Materiales y Métodos:

Abreviaturas. Ac, grupo acetilo; AcM, acetamidometilo; Boc, terc-butoxicarbonilo; CHARMM, Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics; DCM, diclorometano; DIC, 1,3-diisopropilcarbodiimida; DIPEA, N,N-diisopropiletilamina; DMF, N,N-dimetilformamida; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; ESI, ionización por electrospray; Fmoc, 9-fluorenilmetoxycarbonilo; HOAt, 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol; ITC, calorimetría de titulación isotérmica; MALDI, ionización por desorción láser asistida por matriz; MBHA, 4-metilbenzohidrilamina; MOE, entorno operativo molecular; NAMD, dinámica molecular a nanoescala; Nle, L-norleucina; NMP, N-metilpirrolidinona; RMSD, desviación cuadrática media; SPR, resonancia de plasmones superficiales; TIPS, triisopropilsilano; Trt, tritilo.

Productos Químicos. Se obtuvieron resina de amida de Rink MBHA de baja carga y los siguientes aminoácidos Fmoc de Novabiochem (San Diego, CA): Ile, Cys(AcM), Val, Tyr(tBu), Gln(Trt), Asp(OtBu), Trp(Boc), Gly, Sar, Ala, MeAla, His(Trt), Arg(Pmc), Melle, Nle, Phe, and Thr(tBu). Se adquirieron DIC y Fmoc-Trp(Me)-OH de AnaSpec (San Jose, CA). Se adquirió HOAt de Advanced ChemTech (Louisville, KY). Se obtuvieron NMP y DCM de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Todos los otros reactivos químicos para la síntesis se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se usaron sin purificación adicional.

Síntesis y purificación de péptidos. Todos los péptidos se sintetizaron manualmente por metodología en fase sólida Fmoc usando DIC y HOAt como reactivos de acoplamiento. Cuando los aminoácidos N-metilados no estaban disponibles comercialmente, la N^α-metilación se realizó usando la metodología optimizada informada por Biron et al. (2006, J Peptide Sci 12:213-219). Se usaron los siguientes procedimientos para la síntesis de los péptidos lineales se colocó resina de amida de Rink MBHA (294 mg, 0,34 mmol/g) en una jeringuilla de polipropileno HSW de 10 ml con fritas en la parte inferior (Torviq, Niles, MI) y se hinchó en DCM (5 ml) durante 30 minutos. Tras la retirada del grupo protector Fmoc (25% de piperidina en NMP, 5 ml, 5 y 10 min), la resina se lavó cuatro veces con NMP (5 ml por lavado) y DCM (5 ml por lavado), y se acoplaron los aminoácidos individuales con la resina. Por cada acoplamiento, se usaron 3 equivalentes (3 mmol) del aminoácido, HOAt, y DIC, con 10 min de preactivación en NMP. Todos los acoplamientos se realizaron durante 1 hora y se monitorizaron por la prueba de Kaiser o la prueba de cloranilo. En caso de un resultado de la prueba positivo, el acoplamiento se repitió hasta que se observó un resultado de la prueba negativo.

El grupo amino N-terminal se acetiló con 20 equivalentes de anhídrido acético y 2 equivalentes de DIPEA en 5 ml de DCM durante 30 min. Los péptidos lineales que contenían residuos de Cyc(AcM) se ciclaron en resina usando acetato de talio en DMF/anisol (19:1) a temperatura ambiente durante 3 h. La resina se lavó cuatro veces

con DMF, DCM, y DCM/dietiléter (1:1) (cada 5 ml por lavado), y se secó bajo vacío durante 4 h. Los péptidos se escindieron a partir de resina con una mezcla de 95% de TFA, 2,5% de agua, y 2,5% de TIPS durante 3 horas. Tras la evaporación del TFA al vacío, los péptidos se precipitaron y lavaron tres veces con 30 ml de dietil éter frío por lavado. El líquido se separó del sólido por centrifugación y se decantó. Los péptidos brutos se secaron en aire y se disolvieron en acetonitrilo y 0,1% de TFA en agua (1:3) antes de la purificación por RP-HPLC preparatoria (columna Vydac C₁₈ 218TP152022, Western Analytical Products, Murrieta, CA) y elución con un gradiente lineal de 15-50% de acetonitrilo en solución de 0,1% de TFA acuosa durante 35 min a un caudal de 15 ml/min. Se recogieron las fracciones que contenían los productos deseados, se concentraron, y se liofilizaron. Los péptidos purificados se aislaron en rendimientos generales del 10-15% y eran >95% puros como se determinó por RP-HPLC analítica (columna Phenomenex 00G-4041-E0 Luna 5m C18 100A, 250x4.60 mm; Phenomenex, Torrance, CA). Se confirmó la masa de cada péptido usando instrumentos ThermoQuest Finnigan LCQ Duo y Waters MALDI micro MX.

Purificación de C3. El C3 se purificó a partir de plasma humano nuevo obtenido del banco de sangre del Hospital de la Universidad de Pennsylvania. Brevemente, el plasma se fraccionó con 15% (p/v) de PEG 3350, y el pellet se resuspendió en 20 mM de tampón de fosfato, pH 7.8, y después se sometió a cromatografía de intercambio de aniones en una columna DEAE-HR 40 (50 3 5 cm; Millipore Inc., Billerica, MA) con el mismo tampón. Las proteínas se eluyeron con 6 l de un gradiente lineal (15-70%) de 20 mM de tampón de fosfato, pH 7.8, que contenía 500 mM de NaCl. El C3 se purificó adicionalmente en una columna Superdex 200 26/60 de exclusión por tamaño (Amersham Biosciences) y una columna Mono S (Amersham Biosciences) para separar el C3 del C3(H₂O).

Inhibición de la activación del complemento. Se evaluó la capacidad de los análogos de compstatina para inhibir la activación de la vía clásica del complemento por ELISA (Mallik et al., 2005, J Med Chem 48:274-86). Brevemente, el complemento se activó en suero humano usando un complejo antígeno-anticuerpo en presencia o ausencia de análogos de compstatina, y el depósito de fragmentos de C₃ en la superficie de la placa se detectó usando un anticuerpo anti-C3 HRP-conjugado policlonal. Los datos de absorbancia obtenidos a 405 nm se tradujeron en % de inhibición, en base a la absorbancia correspondiente al 100% de la activación del complementos. Se trazó el porcentaje de inhibición se trazó frente a la concentración de péptido, y el conjunto de datos resultante se ajustó a la función de respuesta a dosis logística usando software Origin 7.0. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron de los parámetros ajustados que produjeron el valor de χ^2 más bajo. Cada análogo se ensayó al menos de tres a siete veces. Las desviaciones estándar estaban todas dentro del 30% del valor medio.

Análisis ITC. Todos los experimentos de ITC se realizaron con el calorímetro Microcal VP-ITC (Microcal Inc., Northampton, MA), usando concentraciones de proteína de 1,8-5 μ M de C3 en la célula y concentraciones de péptido de 40-100 μ M de análogos de compstatina individuales en la jeringuilla. Todas las titulaciones se realizaron en PBS (10 mM de tampón de fosfato con 150 mM de NaCl, pH 7,4) a 25° C usando múltiples inyecciones de péptido de 2-7 μ l cada una. Las isotermas brutas se corrigieron para los valores de dilución sustrayendo las inyecciones de péptido que representan isotermas en el tampón. Las isotermas resultantes se ajustaron a un sitio individual de modelos de sitios usando software Origin 7.0, y el modelo que produjo el valor de χ^2 más bajo se consideró apropiado para el conjunto de datos respectivo. La energía libre de Gibbs se calculó como $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Cada experimento se repitió al menos dos veces. Los errores estaban dentro del 20% de los valores medios.

Análisis SPR. Se analizaron las cinéticas de la interacción entre C3b y cada análogo de compstatina por SPR en un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare Corp., Piscataway, NJ) a 25°C usando PBS-T (10 mM de fosfato sódico, 150 mM de NaCl, 0,005% de Tween-20, pH 7.4) como el tampón de corrida, como se describe anteriormente. Brevemente, se inmovilizó C3b biotinilado (30 μ g/ml) en un chip de detección recubierto con estreptavidina, y se inyectó una serie de dilución en serie doble (1 μ M-500 pM) de cada análogo durante 2 min a 30 μ l/min, con una fase de disociación de 5-10 min. El péptido Trp(Me)⁴-Ac-compstatina se incluyó en cada serie experimental como un control interno y referencia. El análisis de datos se realizó usando Scrubber (BioLogic Software, Campbell, Australia). Las señales de una células del flujo sin tratar y un conjunto de inyecciones en blanco de tampón se sustrajeron para corregir los efectos del tampón y los artefactos de inyección. Los datos del biosensor procesados se ajustaron globalmente a un modelo de enlace Langmuir 1:1, y se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_D) a partir de la ecuación $K_D = k_d/k_a$. Las soluciones de péptido se inyectaron por duplicado en cada experimento, y cada ensayo de selección se realizó al menos dos veces. El error de k_d y k_a estaba dentro del 10% de los valores medios.

Simulación de dinámicas moleculares. Todas las simulaciones de MD se realizaron con el programa NAMD (Phillips, et al., 2005, J. Comput. Chem. 26:1781-1802) usando el campo de fuerza CHARMM27. Para los análogos de compstatina libres, se adoptó la estructura de NMR (Morikis & Lambris, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30: 1026-1036) (código PDB: 1A1P) para construir estructuras de partida. Se introdujeron mutaciones puntuales con el programa Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group, 2005). Los residuos mutados de los análogos de compstatina se minimizaron usando CHARMM (Brooks et al., 1983, J. Comput. Chem. 4: 187-217) versión c33b1, con el conjunto de parámetros CHARMM27 (MacKerell et al., 1998, J. Phys. Chem. B 102: 3586-3616), mientras que se colocaron restricciones harmónicas en los átomos del esqueleto. Los residuos de C3c del complemento que faltaban de la estructura del cristal se añadieron usando modelado por homología y también se minimizaron usando CHARMM.

Se mantuvieron las moléculas de agua cristalográficas en el archivo PDB, y las estructuras se solvataron en cajas periódicas cúbicas de moléculas de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983, J. Chem. Phys. 79: 926-935). Las distancias entre los bordes de la caja de simulación de agua y el átomo más cercano de los solutos era por lo menos 10 Å. Se añadieron luego contraiones de sodio y cloruro usando el programa VMD (Humphrey et al., 1996, J. Mol. Graphics 14: 33-38, 27-28) para mantener la electroneutralidad de los sistemas.

Los sistemas se minimizaron primero en tres pasos consecutivos, durante los cuales la proteína se mantuvo inicialmente fija y se permitió que las moléculas de agua se moviesen durante 10.000 pasos de gradiente del conjugado; después sólo se mantuvo fijo el esqueleto de la proteína durante 100.000 pasos; finalmente, se permitió que se moviesen todos los átomos para 10.000 pasos adicionales. Se usó el método de Ewald de malla de partículas (Darden et al., 1993, J. Chem. Phys. 98: 10089-10092) para tratar interacciones electrostáticas de intervalo largo en condiciones de aislamiento periódico con una rejilla de aproximadamente 1 punto por Å. Se conmutaron suavemente interacciones de van der Waals no enlazadas durante 3 Å entre 9 y 12 Å. Las longitudes de enlace que implicaban enlaces con átomos de hidrógeno se restringieron usando SHAKE (Ryckaert et al., 1977, J. Comput. Phys. 23: 327-341). El periodo de tiempo para toda la simulación de MD fue 2 fs. Se usó el pistón Nose-Hoover Langevin (Feller et al., 1995, J. Chem. Phys. 103: 4613-4621; Martyna et al., 1994, J. Chem. Phys. 101: 4177-4189) para el control de presión, con el periodo de pistón establecido a 20 fs y un decaimiento de pistón de 100 fs. Las simulaciones de MD a 100 ps se llevaron a cabo a volumen constante, durante el que los sistemas se calentaron a 310 K en incrementos de 30 K; una simulación de MD isobárica isotérmica posterior se usó para 20 ns y 5 ns para ajustar la densidad del solvente sin ninguna restricción en todos los átomos de soluto para los análogos y complejos de compstatina libres, respectivamente. Finalmente, se obtuvieron las estructuras de energía más bajas de los archivos de trayectoria equilibrados por MD y se usaron posteriormente en el análisis de contribución de entropía y estructura.

Resultados:

Inhibición de la activación del complemento. Se realizó un escaneo de la N-metilación del esqueleto en una plantilla de [Tyr⁴ Ala⁹]-Ac-compstatina (péptido 1; SEQ ID NO:3) para generar los análogos 2-13 (Tabla 1-1). Aunque el péptido 1 era menos potente que el compuesto de partida actual, [Trp(Me)⁴ Ala⁹]-Ac-compstatina (péptido 14, SEQ ID NO:4), se eligió para el escaneo inicial debido a su coste inferior de síntesis. Se evaluó luego la capacidad de cada péptido de inhibir la activación del complemento por ELISA y se comparó con la actividad del péptido 1 (Tabla 1-1). El efecto más negativo se observó para la N-metilación de Val³, Tyr⁴ y Ala⁹, que volvió los péptidos 3, 4, y 9 completamente inactivos. Por el contrario, la N-metilación de Gly⁸ y Thr¹³ produjo los péptidos 8 y 13 con potencia ligeramente aumentada (1,7 y 1,3 veces, respectivamente). La N-metilación en todas las otras posiciones resultó en actividad inhibidora detectable, aún significativamente reducida (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Inhibición de la activación por la vía clásica del complemento por análogos N^α-metilados de [Tyr⁴ Ala⁹]-Ac-compstatina (péptido 1; SEQ ID NO:3)

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ (CP, μM)	IC ₅₀ -veces de cambio ^a
1 ^b	Ac-I[CVYQDWGAHRC]T-NH ₂ (SID 3)	2.4	1
2	Ac-I[(NMe)CVYQDWGAHRC]T-NH ₂	7.5	0.3
3	Ac-I[C(NMe)VYQDWGAHRC]T-NH ₂	NA	NA
4	Ac-I[CV(NMe)YQDWGAHRC]T-NH ₂	NA	NA
5	Ac-I[CVY(NMe)QDWGAHRC]T-NH ₂	33	0.07
6	Ac-I[CVYQ(NMe)DWGAHRC]T-NH ₂	44	0.06
7	Ac-I[CVYQD(NMe)WGAHRC]T-NH ₂	25	0.1
8	Ac-I[CVYQDW(NMe)GAHRC]T-NH ₂	1.43	1.7
9	Ac-I[CVYQDWG(NMe)AHRC]T-NH ₂	NA	NA
10	Ac-I[CVYQDWGA(NMe)HRC]T-NH ₂	94	0.03
11	Ac-I[CVYQDWGAH(NMe)RC]T-NH ₂	32	0.08
12	Ac-I[CVYQDWGAHR(NMe)C]T-NH ₂	154	0.02
13	Ac-I[CVYQDWGAHRC](NNMe)T-NH ₂	1.89	1.3

Nota: ^a en relación al péptido 1. NA: no activo, ^b Datos de Sahu et al., 1996, J. Immunol. 157: 884-891.

Aplicamos luego los descubrimientos del escaneo de N-metilación al análogo potente actual, Ac-I[CV^(1-MeW)QDWGAHRC] T-NH₂ (SEQ ID NO:4; también referido en la presente como Trp(Me)⁴ Ala⁹]-Ac-compstatina, péptido 14), y análogos sintetizados con N-metilación selectiva y sustituciones de aminoácidos en las posiciones 8 y 13 (péptidos 15-23; Tabla 1-2). Como los estudios anteriores habían indicado limitaciones para sustituir las cadenas laterales en la posición 8 (Morikis et al., 1998, Protein Sci. 7: 619-627; Furlong et al., 2000, Immunopharmacology

48: 199-212), las modificaciones se restringieron a la ausencia (Gly⁸) o presencia de N-metilación (NMeGly⁸, es decir, Sar⁸). Por el contrario, el trabajo anterior demostró que la posición N-terminal 13 permitía más flexibilidad para sustituciones y había incluso sugerido una preferencia por Ile sobre Thr (Morikis & Lambris, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30: 1026-1036). Por lo tanto, investigamos más la importancia de la posición 13 y diseñamos una serie de análogos de Sar⁸ para incluir varios residuos N-metilados, hidrófobos, o aromáticos en esta posición. Consistente con los resultados del escaneo de N-metilación, la introducción de un único grupo N-metilo en la posición 8 (Sar⁸; péptido 15) aumentó la potencia inhibidora por 1,3 veces (Tabla 1-3). Adicionalmente, el reemplazo de Thr por Ile en la posición 13 llevó a un aumento significativo de tanto los péptidos Gly⁸ como Sar⁸. Sin embargo, ninguna de las sustituciones de Ile por Leu o Nle, ni la introducción de His o Phe produjo ninguna mejora sobre el análogo Ile¹³. Por el contrario, la N-metilación de tanto Thr¹³ como Ile¹³ dio lugar a un aumento significativo en la actividad inhibidora (IC₅₀ = 86 y 62 nM, respectivamente), generando los análogos de compstatina más potentes descritos hasta ahora.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 1-2: Evaluación de la potencia inhibidora, cinética, y parámetros termodinámicos para una serie de análogos de compstatina (Ac-Ile-d[Cys-Val-Trp(1-Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys]-Thr-NH₂) (péptido 14, SEQ ID NO:4) con modificaciones en la posición 8 y 13. (Los números en paréntesis seguidos de los números son SEQ ID NOs)

Nº	Xaa ⁸	Xaa ¹³	IC ₅₀ (nM)	k _g (10 ⁶ /Ms)	k _d (10 ⁻³ /s)	K _D SPR (nM)	K _D ITC (nM)	ΔH (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
14 (4)	Gly	Thr	206	1.0	11.3	11.9	15.0	-17.6	6.9	-10.7
15 (5)	Sar	Thr	159	1.3	7.2	5.5	8.5	-11.7	0.6	-11.1
16 (6)	Gly	Ile	154	1.0	11.0	11.0	12.1	-16.6	5.7	-10.9
17 (7)	Sar	Ile	92	1.5	6.6	4.4	6.3	-14.1	2.9	-11.2
18 (8)	Sar	Leu	108	1.3	6.0	4.6	N/D	N/D	N/D	N/D
19 (9)	Sar	Nle	109	1.5	6.6	4.4	N/D	N/D	N/D	N/D
20 (10)	Sar	(NMe)Thr	86	1.3	5.1	3.9	7.2	-17.5	6.4	-11.1
21 (11)	Sar	(NMe)Ile	62	1.5	3.5	2.3	4.5	-17.1	5.7	-11.4
22 (12)	Sar	His	160	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
23 (13)	Sar	Phe	257	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Caracterización cinética del enlace. Los péptidos 15-21 se caracterizaron adicionalmente por SPR para evaluar el efecto de las sustituciones individuales en el perfil cinético y afinidad de enlace para C3b (Tabla 1-2). En general, los valores de K_D relativos mostraron buena consistencia con los resultados de ELISA ($R^2 = 0,79$; Tabla 1-3). La N-metilación de Gly⁸ (péptidos 14 a 15, 16 a 17) mejoró claramente las cinéticas y afinidad del enlace, con efectos significativos en ambas constantes de velocidad cinética. Por el contrario, las sustituciones Thr a Ile (péptidos 14 a 16, 15 a 17) tuvieron sólo un impacto ligero, aún beneficiosos en los perfiles de SPR. De nuevo, la combinación de ambas sustituciones (péptido 17) tuvo un efecto sinérgico, con una afinidad 2,7 veces más fuerte que el péptido 14, en comparación con el impacto de las modificaciones Sar⁸ e Ile¹³ solas (2,2 y 1,1 veces, respectivamente). Las sustituciones en la posición 13 solas parece que influyeron principalmente en la velocidad de disociación ($k_d = 3,4-7,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$); la velocidad de disociación permaneció esencialmente constante para todos los análogos de Sar⁸ ($k_a = 1.3-1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). En esta serie, la N-metilación de Thr¹³ (péptido 20) e Ile¹³ (péptido 21) tuvo de nuevo el impacto más fuerte en la velocidad de disociación, haciendo el análogo 21 el enlazador más fuerte, con un aumento de más de 5 veces en la afinidad sobre el péptido 14. Los isómeros evaluados de Ile¹³ (Leu, Nle, péptidos 18 y 19) tuvieron una influencia despreciable en el perfil y afinidad cinéticos, indicando un modo de enlace común para este supercóntigo.

Caracterización de termodinámicas de enlace. Se realizaron experimentos ITC para los péptidos 15-17 y 20-21 para correlacionar los efectos observados en la afinidad y potencia con sus perfiles termodinámicos (Tabla 1-2 y 1-3). Aunque los valores de K_D absolutos en ITC tendían a ser ligeramente más altos que los de SPR, estaban altamente correlacionados con los resultados de ELISA y SPR ($R^2 = 0,89$ y $0,96$ respectivamente). El valor de entalpía altamente beneficioso ($\Delta H = -17,6 \text{ kcal/mol}$) del compuesto de partida anterior (péptido 14) no fue sobrepasado por ninguno de los análogos de nuevo diseño. Por el contrario, el panel completo tenía valores de entropía significativamente mejorados ($-\Delta S = 0,6 - 5,7 \text{ kcal/mol}$) cuando se comparaban con el péptido 14 ($-\Delta S = 6,9 \text{ kcal/mol}$).

Tabla 1-3: Mejora relativa en los parámetros de potencia y enlace de los análogos de compstatina de nuevo diseño cuando se comparan con [Trp(Me)⁴Ala⁹]-Ac-compstatina (péptido 14)

Nº	Xaa ⁸	Xaa ¹³	rP	rk	rk	rK _D S PR	rK _D IT C	$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
14	Gly	Thr	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0	0	0
15	Sar	Thr	1.3	1.3	1.6	2.2	1.8	5.9	-6.3	-0.4
16	Gly	Ile	1.3	1.0	1.0	1.1	1.2	1.0	-1.3	-0.2
17	Sar	Ile	2.2	1.5	1.7	2.7	2.4	3.5	-4.1	-0.5
18	Sar	Leu	1.9	1.3	1.9	2.6	N/D	N/D	N/D	N/D
19	Sar	Nle	1.9	1.5	1.7	2.7	N/D	N/D	N/D	N/D
20	Sar	(NMe)Thr	2.4	1.3	2.2	3.1	2.4	0.1	-0.5	-0.4
21	Sar	(NMe)Ile	3.3	1.5	3.2	5.2	3.3	0.5	-1.3	-0.7
22	Sar	His	1.3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
23	Sar	Phe	0.8	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

El péptido 15 (Sar⁸Thr¹³; $-\Delta S = 0,6 \text{ kcal/mol}$) mostró la penalización entrópica más baja de todos los análogos de compstatina informados. Sin embargo, la mayoría de esta ganancia entrópica grande se compensó por una pérdida de entalpía favorable ($\Delta\Delta H = 5,9 \text{ kcal/mol}$). Se observaron tendencias similares para el panel completo, indicando la influencia de la compensación entalpía-entropía. Sustituciones adicionales de Ile¹³ por Thr¹³ como en el péptido 17 recapturaron algo de la entalpía perdida ($\Delta H = -14,1 \text{ kcal/mol}$), a la vez que producían algo de ganancia de entropía ($-\Delta S = 2,9 \text{ kcal/mol}$) en el péptido 15. La N-metilación en la posición 13, como en los péptidos 20-21, llevó estos valores de entalpía incluso más cerca que los del péptido 14. En general, la afinidad de enlace aumentada para estos péptidos pareció alcanzarse principalmente por una reducción en la penalización entrópica. Además, los datos de ITC confirmaron los resultados de SPR indicando que fue la sustitución de Sar⁸, y no la de Ile¹³ la que contribuyó más a la afinidad aumentada en gran medida del péptido 17.

Simulaciones de MD. El gran impacto incluso en modificaciones de péptidos pequeñas en los perfiles termodinámicos de los análogos se investigó adicionalmente usando simulaciones de MD en base a la estructura de NMR de la compstatina y la estructura de cristal de [Trp⁴]-Ac-compstatina con C3c (Morikis *et al.*, 1998, *supra*; Janssen *et al.*, 2007, J. Biol Chem. 282: 29241-29247). En el caso de N-metilación en la posición 8 (péptido 17), sospechamos que esta modificación afectó a la cadena lateral del residuo crítico Trp⁷, que está directamente conectado con el nitrógeno de Gly⁸ metilado y ocupa un bolsillo ajustado. Las simulaciones de MD se realizaron por lo tanto para comparar la distribución de moléculas de agua en los bolsillos de enlace de Trp⁷ de los péptidos 14 y 17. Descubrimos que mientras para el péptido 14 podían observarse cuatro moléculas de agua, no se encontró ninguna tras repetir la simulación con el péptido 17. Este resultado indica que la N-metilación en la posición 8

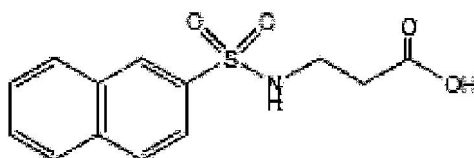
permite que la cadena lateral de Trp⁷ ajuste mejor en el bolsillo de enlace de C3c.

Comparaciones previas entre las estructuras basadas en solución y basadas en proteína han revelado reordenamiento conformacional significativo, incluyendo un cambio en el giro β importante (Janssen *et al.*, 2007, *supra*). Como se ha informado que la N-metilación afecta a la conformación local del esqueleto del péptido, realizamos simulaciones de MD para el péptido 14 y 17 en ausencia y presencia de C3c y después comparamos los conformadores de energía más bajos resultantes de los péptidos libres y enlazados (Chatterjee *et al.*, 2008, *Acc. Chem. Res.* 41: 1331-1342). Los resultados mostraron que el giro β abarca residuos 5-8 abiertos, y se formó un nuevo giro entre los residuos 8 y 11 en las estructuras libres de ambos péptidos. También, los giros β se superponen bien con los de las estructuras enlazadas. Sin embargo, se formó un enlace de hidrógeno intramolecular entre Trp⁷ y Arg¹¹ con una distancia de 2,9 Å solamente en el caso del péptido 17, restringiendo probablemente la conformación del 17 libre y haciéndolo más rígido.

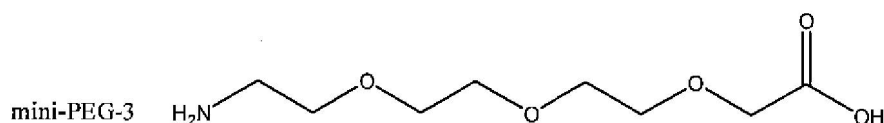
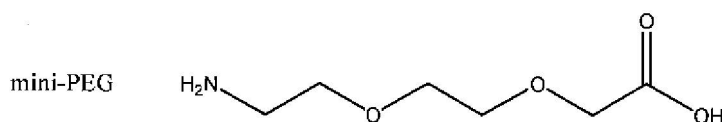
Ejemplo 2

Este ejemplo describe una síntesis mejorada, y determinación de vida media plasmática, de un análogo de compstatina (péptido 17 descrito en el Ejemplo 1: Ac-Ile-c[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-Ile-NH₂; SEQ ID NO:7) conjugado con un péptido de enlace a albúmina (ABP) o una molécula pequeña de enlace a albúmina (ABM), mostrados a continuación.

ABP: Ac-RLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂ (enlace de disulfuro C-C) (SEQ ID NO:14)
ABM.



Se usaron dos moléculas mini-PEG-3 como un espaciador y se acoplaron el C-terminal del péptido 17.



Para la comparación, también se determinó la vida media plasmática del péptido 17 no conjugado.

Materiales y Métodos:

Abreviaturas. Ac, grupo acetilo; AcM, acetamidometilo; DCM, diclorometano; DIC, 1,3-diisopropilcarbodiimida; DIPEA, N,N-diisopropiletilamina; DMF, N,N-dimetilformamida; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; ESI, ionización por electrospray; Fmoc, 9-fluorenilmetoxycarbonilo; HLB, equilibrado hidrófilo-lipófilo; HOAt, 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol; HSW, Henke Sass Wolf; ITC, calorimetría de titulación isotérmica; MALDI, ionización por desorción láser asistida por matriz; MBHA, 4-metilbenz-hidrilamina; Mmt, Monometoxitritilo; NanoESI, ionización de nanoelectropulverización; NMP, N-metilpirrolidinona; PyBOP, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio; SPR, resonancia de plasmones superficiales; TBTA, Tris-(benciltriazolilmetil) amina; TEA, trietilamina; TFA, ácido trifluoroacético; TIPS, triisopropilsilano; Trt, tritilo.

Materiales. se adquirieron DIC y Fmoc-Trp(Me)-OH de AnaSpec (San Jose, CA). Se obtuvieron resina NovaSyn® TGR de baja carga y otros aminoácidos Fmoc de Novabiochem (San Diego, CA). Se adquirieron mini-PEG y mini-PEG-3 de Peptide International (Louisville, Kentucky). Se adquirió HOAt de Advanced ChemTech (Louisville, KY). Se obtuvo ABM de Enamine Ltd. (Kiev, Ucrania). Se obtuvieron NMP y DCM de Fisher Scientific

(Pittsburgh, PA). Se purificó agua usando un sistema de purificación de agua Milli-Q Millipore Corporate, Billerica, MA). Todos los otros reactivos químicos para la síntesis se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se usaron sin purificación adicional.

Síntesis de péptidos lineales (péptido 17-mini-(PEG-3)₂-Lys(Mmt)-NH₂ y ABP). Todos los péptidos se sintetizaron manualmente mediante metodología en fase sólida de Fmoc usando DIC y HOAt como reactivos de acoplamiento. Brevemente, se colocó resina (294 mg, 0,34 mmol/g) en una jeringuilla de polipropileno HSW de 10 ml con fritas en la parte inferior (Torviq, Niles, MI) y se hinchó en DCM (5 ml) durante 30 minutos. Tras la retirada del grupo protector de Fmoc (25% de piperidina en NMP, 5 y 10 min), la resina se lavó cuatro veces con NMP (5 ml por lavado) y DCM (5 ml por lavado), y los aminoácidos individuales se acoplaron con la resina. Por cada acoplamiento se usaron 3 equivalentes (0,3 mmol) del aminoácido, HOAt, y DIC, con 10 min de preactivación en NMP. Todos los acoplamientos se realizaron durante 1 h y se monitorizaron hasta la finalización por o la prueba de Kaiser o la prueba de clorano. Si era necesario, el grupo N-terminal se acetiló con 20 equivalentes de anhídrido acético y 2 equivalentes de DIPEA en 5 ml de DCM durante 30 min.

Ciclación, modificación y escisión de péptidos. Se ciclaron péptidos lineales que contenían residuos de Cyc(Acm) en resina usando 1,2 equivalentes de trifluoroacetato de talio en DMF/anisol (19:1) a temperatura ambiente durante 3 horas. Para sintetizar el azido-péptido 17, el grupo protector Mmt de la cadena lateral de la Lys N-terminal se acopló con la cadena lateral usando Py-BOP/HOAt/DIPEA en NMP. El péptido 17-ABM se sintetizó de manera similar. Para sintetizar alquino-ABP, se acopló ácido propiónico con la N-terminal de ABP usando DIC/HOAt en NMP/DCM (1:1). La resina se lavó concienzudamente con DCM, DCM/dietiléter (1:1) y se secó bajo vacío alto durante 4 horas antes de que los péptidos se escindiesen en una mezcla de 95% de TFA, 2,5% de agua, y 2,5% de TIPS durante 2 horas. Tras la evaporación del TFA bajo vacío, los péptidos se precipitaron y se lavaron tres veces con 30 ml de dietil éter frío por lavado. El líquido se separó del sólido por centrifugación y se decantó. Los péptidos brutos se secaron en aire y se disolvieron en acetonitrilo y 0,1% de TFA en agua (1:3) para purificación por HPLC.

Cicloadición de Huisgen de azida-alquino mediada de Cupper(I) para la síntesis del péptido 17-ABP. Se disolvieron 50 mg (22 50 mg (22 µmol) de cada péptido de azida y alquino purificado en 5 ml de t-BuOH/H₂O (2:1). Se añadieron 10 equivalentes (220 µmol) de TERA para hacer la solución básica. Luego se añadieron 5% (1,1 µmol) de CuSO₄, 25% de ácido ascórbico de sodio, y 1% de TBTA a la mezcla. La mezcla se agitó durante la noche, se monitorizó por HPLC-MS. Luego se concentró al vacío y se purificó por HPLC de fase inversa.

Purificación de péptidos. Los péptidos se inyectaron en una columna de RP-HPLC preparatoria (Xbridge™ BEH130 Prep C₁₈ 5µm 19x150mm, PN# 186003945, Waters, Milford, MA) y se eluyeron con un gradiente lineal de 15-50% de acetonitrilo en 0,1% de TFA durante 15 min a un caudal de 20 ml/min. Las fracciones que contenían los productos deseados se recolectaron baseD en masa y se liofilizaron. Los péptidos purificados eran >95% puros como se determinó por RP-HPLC analítica (Xbridge™ BEH130 C₁₈ 5µm, 4.6x150mm, PN# 186003580, Waters, Milford, MA). La masa de cada péptido se confirmó usando instrumentos Waters MALDI micro MX o SYNAPT HDMS.

Inhibición de la activación del complemento. Se evaluó la capacidad de los análogos de compstatina de inhibir la activación de la vía clásica del complemento por ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Cada conjugado se ensayó al menos tres veces.

Análisis SPR. Se analizaron las cinéticas de la interacción entre C3b y cada análogo de compstatina por SPR en un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare Corp., Piscataway, NJ) a 25° C usando PBS-T (10 mM de fosfato sódico, 150 n; de NaCl, 0,005% de Tween-20, pH 7,4) como el tampón de corrida como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, se inmovilizó C3b biotinilado (30 µg/ml) en un chip de detección recubierto con estreptavidina, y se inyectó una serie de dilución en serie doble (1 µM-500 pM) de cada análogo durante 2 min a 30 µl/min, con una fase de disociación de 5-10 min. El péptido 17 (no conjugado) se incluyó en cada serie experimental como un control interno y referencia. El análisis de datos se realizó usando Scrubber (BioLogic Software, Campbell, Australia). Las señales de una célula del flujo no tratado y un conjunto de inyecciones en blanco de tampón se sustrajeron para corregir los efectos del tampón y los artefactos de inyección. Los datos del biosensor procesados se ajustaron globalmente a un modelo de enlace Langmuir 1:1, y se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_D) a partir de la ecuación $K_D = k_d/k_a$. Las soluciones de péptido se inyectaron por duplicado en cada experimento, y cada ensayo de selección se realizó al menos dos veces.

Extracción de análogos de compstatina de muestras de plasma por SPE. Se empleó para la extracción una placa de 96 pocillos HLB Oasis de 10 mg (Waters, Milford, MA). El material de SPE se acondicionó por la adición de 500 µl de metanol seguido por la adición de 500 µl de agua milli-Q. La muestra se preparó por la adición del estándar interno seguido por dilución 1:1 con 4% de H₃PO₄. Tras cargar la muestra, se realizó lavado con 500 µl de 5% de metanol en 0,1% de ácido fórmico. La mezcla se eluyó con 150 µl de 65% de metanol en 0,1% de ácido fórmico y se recolectó en la placa de recolección. El solvente se evaporó hasta la sequedad en un concentrador speed-vac y se reconstituyó en 5% de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico. Las muestras se mantuvieron a -20° C hasta el análisis.

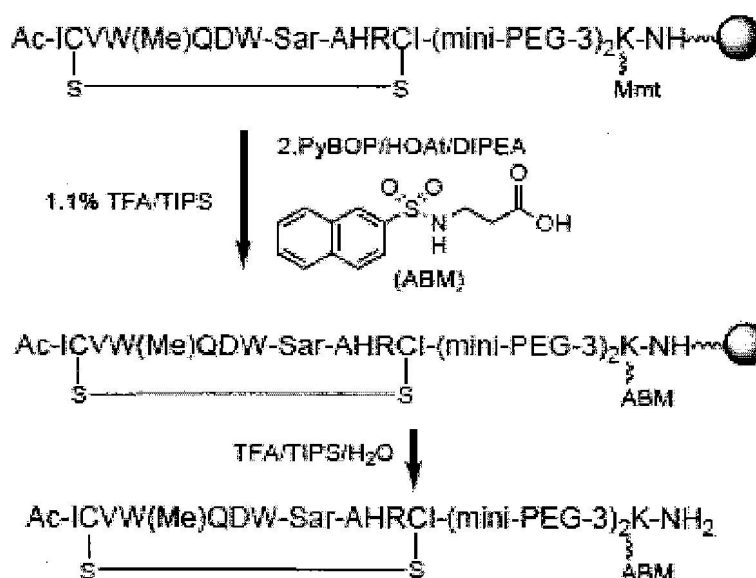
Aislamiento del péptido 17-ABP y el péptido 17-ABM de las muestras de plasma por digestión. Se mezclaron muestras de plasma de babuino, 40 µl, con estándar interno y se disolvieron 1:1 con 40 mM de tampón de carbonato de amonio. Se añadió detergente Rapigest a una concentración final de 0,1%. Se redujeron los puentes de disulfuro en 5 mM de DTT durante 30 min a 60° C. La alquilación de las cisteínas se hizo por la adición de yodoacetamida a una concentración final de 15 mM e incubación durante 30 min a oscuras. La muestra se digirió enzimáticamente por la adición de 16 µl de 1 µg/µl de solución de tripsina y la incubación durante la noche a 37° C. Después de eso, se disminuyó el pH de la muestra con 5% de TFA para inducir la degradación por detergente. Para evitar la adsorción no específica de péptido hidrófobo, se añadió acetonitrilo al 20%. Las muestras se centrifugaron a 6° C y 14000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se diluyó con 0,1% de ácido fórmico para reducir la concentración de acetonitrilo al 10% antes de la filtración con un filtro centrífugo microcon de corte de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA). El filtro se lavó con 50 µl de 10% de ACN en 0,1% de ácido fórmico y la muestra recolectada se evaporó hasta la sequedad y se reconstituyó con 10% de ACN en 0,1% de ácido fórmico.

Análisis LC-MS/MS. El análisis LC-MS/MS se realizó en un SYNAPT HDMS (Waters, Milford, MA) controlado por software MassLynx 4.1 (Waters) y equipado con una fuente nanoESI. Cada muestra se inyectó por triplicado. Se usó un sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) para la separación de péptidos por cromatografía líquida en fase inversa. Tras la inyección, los analitos se atraparon durante 3 min con 3% de fase móvil A (0,1% de ácido fórmico en agua) a 5 µl/min en una columna de C₁₈ Symmetry de 5 µm (180 µm x 20 mm, Waters) y se separaron adicionalmente en una columna BEH130 C18 de 1,7 µm (75 µm x 150 mm, Waters). La temperatura de la columna analítica se mantuvo a 35° C. Los péptidos se separaron a un caudal de 0,33 µl/min. el gradiente era lineal 3-40% B (0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo), o 50 min de largo, o 60 min para las muestras digeridas. El voltaje de la capilaridad era 3,2 kV, el voltaje del cono era 35 V y la temperatura de la fuente era 100° C. Se usó péptido de [Glu]-fibrinógeno para la corrección de bloqueo en masa con una velocidad de la muestra de 30 s. Se adquirieron los espectros de masa en modo positivo sobre un intervalo m/z de 400-2000 Da a una velocidad de escaneo de 0,6 s. La ventana temporal usada para la función MS/MS era de ±3 min del tiempo de retención del péptido seleccionado. La presencia del analito se confirmó por MS/MS. Se estudio la selectividad por análisis de las muestras en blanco para determinar la presencia de cualquier interferencia coeluyendo con el analito.

Retención *in vivo*. Se usaron babuinos juveniles (*P. Anubis*, Baboon Research Resources, University of Oklahoma) de 5-8 kg de peso. Se usaron tres babuinos para el estudio; uno para cada compuesto. Todos los animales recibieron una dosis de bolo de péptidos (10 mg) por inyección a través de la vena periférica. Las muestras de sangre para el ensayo LC-MS/MS se recolectaron en tubos de plástico de 1 ml que contenían 50 µg de lepirudina y se centrifugaron a 2000g durante 20 min a 4°C para la separación del plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -70° C. Las muestras de sangre se recogieron al de 20, 40, 60, 90, 120 min tras la inyección del péptido 17; y 1 min, 30 min luego 1, 6, 24, y 48 horas tras la inyección del péptido 17-ABP y el péptido 17-ABM.

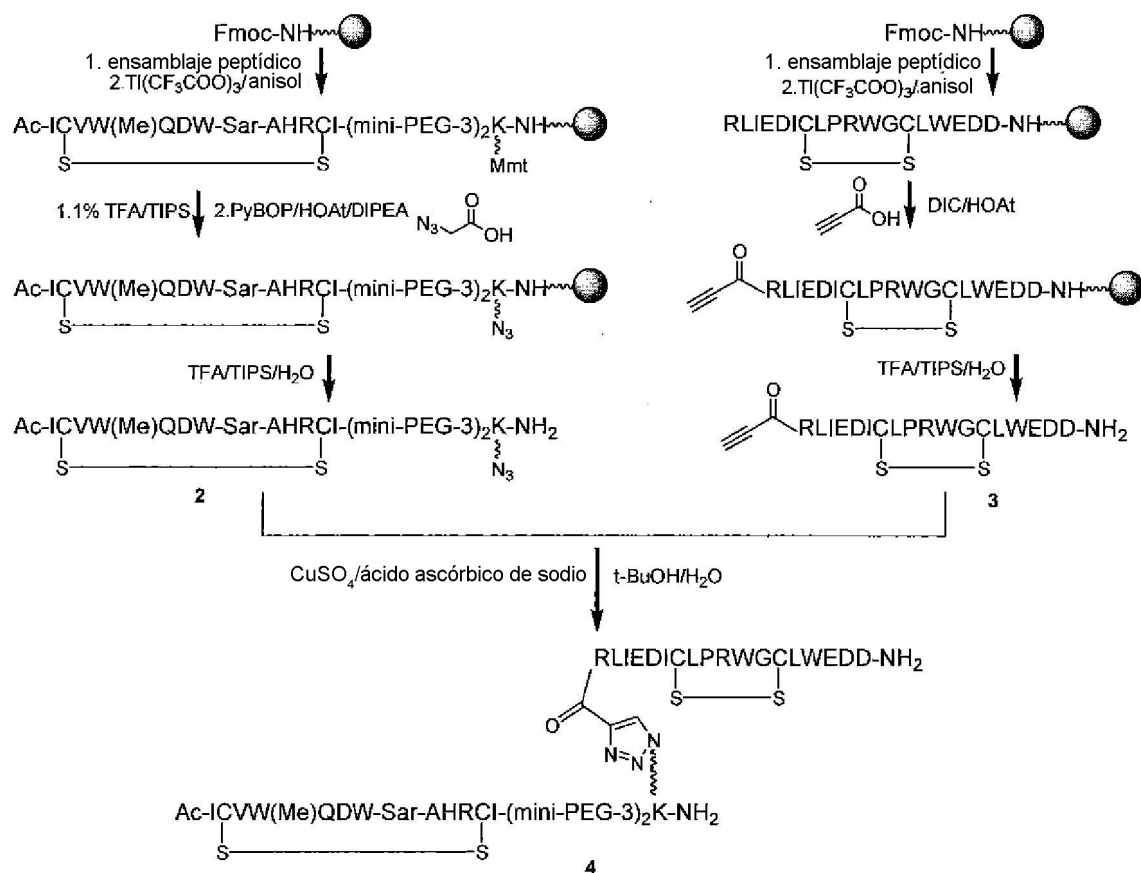
Resultados:

Síntesis del péptido 17-ABM. El péptido 17-ABM se obtuvo tras síntesis de péptidos en fase sólida y purificación por HPLC, como se resume en el esquema de reacción siguiente. El péptido lineal se sintetizó con un único acoplamiento de cada aminoácido. Se evaluaron tanto el trifluoroacetato de talio como el yodo para la formación de enlaces de disulfuro. El primer produjo reacciones más limpias y se usó posteriormente para todas las ciclaciones. La masa del péptido 17-ABM se confirmó por HPLC-MS y ESI-TOF ([MH]²⁺ calculado 1211.06, encontrado 1211.05).



Péptido 17-ABM

Síntesis del péptido 17-ABP. Se usó cicloadición de Huisgen de azida-alquino en solución para las conjugaciones, de acuerdo con el esquema de reacción siguiente. El ácido 2-azidoacético se sintetizó a partir de ácido 2-bromoacético y azida de sodio. Se acopló luego con la cadena lateral de Lys C-terminal tras la formación del enlace de disulfuro en resina. Los intermediarios 2 y 3 se obtuvieron en un rendimiento del 12,7% y 12,3%, respectivamente, tras escisión y purificación por HPLC.



Péptido 17-ABP ("4" en el esquema anterior)

Se compararon tres sistemas de solventes diferentes para la cicloadición de Huisgen de azida-alquino. El mejor resultado se observó con el sistema t-BuOH/H₂O, seguido por el sistema ACN/H₂O. No se observó producto cuando se usó como solvente DMF sólo. También se evaluó la importancia de la base terciaria. No se detectó producto tras 2 horas sin la adición de TEA en exceso. Bajo condiciones optimizadas, la reacción era limpia y el péptido 17-ABP se aisló en rendimiento del 50% tras purificación por HPLC. La masa del producto se confirmó adicionalmente por ESI-TOF ([MH]⁴⁺ calculado 1131.78, encontrado 1131.52).

Inhibición de la activación del complemento. Se evaluó por ELISA la capacidad del péptido 17-ABM y el péptido 17-ABP de inhibir la activación del complemento por la vía clásica, usando suero humano. Los resultados se muestran en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1. Resultados de análisis ELISA y SPR del péptido 17 y conjugados ABP o ABM

Péptido	IC ₅₀ (nM, CP)	IC ₅₀ (veces de cambio*)	K _{on} (10 ⁶ , M ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{off} (10 ⁻³ , s ⁻¹)	K _D (nM)
Péptido 17	92	1	1.0	6.6	4.4
Péptido 17- ABM	137	0.67	1.2	5.6	4.7
Péptido 17-ABP	242	0.38	0.1	3.6	32
*Las veces de cambio son en relación al péptido 17					

Concentración de plasma en babuinos. Se determinaron las concentraciones de plasma del péptido 17 y los conjugados ABP y ABM usando LC--ms/MS tras una inyección de bolo intravenosa en babuinos. El péptido 17 mostró una vida media de aproximadamente 60 min. El péptido 17-ABM mostró una mejora de 5 veces con una vida media de 5 horas. La vida media más larga de 21 horas se observó para el péptido 17-ABP, que era 21 veces mayor que la del péptido 17 no conjugado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Trustees of the University of Pennsylvania Lambris, John D. Qu, Hongchang

<120> Compstatina modifica con esqueleto peptídico y modificaciones C-terminales

<130> 34092-053 (V5126 PCT)

<140> No asignado todavía

<141> 2010-05-03

<150> US 61/174,575

<151> 2009-05-01

<150> US 61/339,458

<151> 2010-03-04

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<220>

<221> DISULFURO

<222> (2)..(12)

<400> 1

Ile Cys Val Val Gln Asp Trp Gly His His Arg Cys Thr
1 5 10

	<210> 2	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<220>	
10	<221> VARIANTE	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Xaa es Gly o falta	
	<220>	
15	<221> VARIANTE	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Xaa es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val o Ac-Leu	
	<220>	
20	<221> DISULFURO	
	<222> (3)..(13)	
	<220>	
25	<221> VARIANTE	
	<222> (5)..(5)	
	<223> Xaa es Trp o un análogo de Trp	
	<220>	
30	<221> VARIANTE	
	<222> (8)..(8)	
	<223> Xaa es Trp o un análogo de Trp	
	<220>	
35	<221> VARIANTE	
	<222> (10)..(10)	
	<223> Xaa es His, Ala, Phe o Trp	
	<220>	
40	<221> VARIANTE	
	<222> (14)..(14)	
	<223> Xaa es L-Thr, D-Thr, Ile, Val o Gly	
	<220>	
45	<221> VARIANTE	
	<222> (15)..(15)	
	<223> Xaa es Asn o Ala, o falta	
	<220>	
50	<221> VARIANTE	
	<222> (16)..(16)	
	<223> Xaa es Asn, o falta	
	<400> 2	
55	Xaa Xaa Cys Val Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa His Arg Cys Xaa Xaa Xaa	
	1 5 10 15	
	<210> 3	
60	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> secuencia sintética	

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 5 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)
 10 <400> 3

 Ile Cys Val Tyr Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
 1 5 10
 15 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia sintética

 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 30 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)

 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 <400> 4

 40 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
 1 5 10

 <210> 5
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> secuencia sintética

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 55 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 <221> DISULFURO
 60 <222> (2)..(12)

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 65 <223> METILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN
 5 <400> 5

	Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
	1				5					10			

10 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> secuencia sintética

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

25 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 <400> 6

	Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Ile
	1				5					10			

35 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> secuencia sintética

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

50 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN

65 <400> 7

	Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Ile
	1				5					10			
5	<210> 8 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
10	<220> <223> secuencia sintética												
15	<220> <221> MOD_RES <222> (1)..(1) <223> ACETILACIÓN												
20	<220> <221> DISULFURO <222> (2)..(12)												
25	<220> <221> MOD_RES <222> (4)..(4) <223> METILACIÓN												
30	<220> <221> MOD_RES <222> (8)..(8) <223> METILACIÓN												
	<400> 8												
	Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Leu
	1				5					10			
35	<210> 9 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
40	<220> <223> secuencia sintética												
45	<220> <221> DISULFURO <222> (2)..(12)												
50	<220> <221> MOD_RES <222> (4)..(4) <223> METILACIÓN												
55	<220> <221> MOD_RES <222> (8)..(8) <223> METILACIÓN												
60	<220> <221> VARIANTE <222> (13)..(13) <223> Xaa es norleucina												
	<400> 9												
65	Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Xaa
	1				5					10			

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia sintética

 10 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)

 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> METILACIÓN

 30 <400> 10

 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
 1 5 10

 35 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> secuencia sintética

 45 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> METILACIÓN

 65 <400> 11

 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Ile
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia sintética
 <220>
 10 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN
 <400> 12
 25 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys His
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 13
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> secuencia sintética
 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (2)..(12)
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> METILACIÓN
 50 <400> 13
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Phe
 1 5 10
 55 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> secuencia sintética
 <220>
 65 <221> MOD_RES

ES 2 655 389 T3

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<400> 38

5

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

10

Asp Asp

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado que tiene la SEQ ID NO: 1, que es ICVVQDWGHHRCT (C2-C12 cíclico), en el que la Gly en la posición 8 se modifica para restringir la confirmación del esqueleto del péptido en esa localización, en donde el esqueleto se restringe reemplazando la Gly con N-metil Gly.
- 2.** El compuesto de la reivindicación 1, que comprende además el reemplazo de His en la posición 9 con Ala.
- 10 **3.** El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además el reemplazo de Val en la posición 4 con Trp, 1-metil Trp o 1-formil Trp.
- 4.** El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende además el reemplazo de Trp en la posición 7 con Trp halogenado.
- 15 **5.** El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además la acetilación del residuo N-terminal.
- 20 **6.** El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además reemplazar la Thr en la posición 13 con Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile.
- 7.** Un análogo de compstatina que comprende un péptido que tiene la SEQ ID NO:2, que es:
 25 Xaa1 - Cys - Val - Xaa2 - Gln - Asp - Xaa3 - Gly - Xaa4 - His - Arg - Cys - Xaa5 (C2-C12 cíclico) en donde Gly en la posición 8 se modifica para restringir la conformación del esqueleto del péptido en esa localización reemplazando la Gly con N-metil Gly, en donde:
 30 Xaa1 es Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu o un dipéptido que comprende Gly-Ile;
 Xaa2 es Trp, Trp halogenado, Trp que comprende un sustituyente de alcoxi inferior o alquilo inferior en la posición 5, o Trp comprende un sustituyente de alquilo inferior o alcanilo inferior en la posición 1;
 Xaa3 es Trp o Trp halogenado;
 Xaa4 es His, Ala, Phe o Trp; y
 Xaa5 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile, en donde un -OH carboxi terminal de cualquiera de Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile está opcionalmente reemplazado por -NH₂.
 35 **8.** El compuesto de la reivindicación 7, en el que Xaa1 es Ac-Ile, Xaa2 es 1-metil-Trp o 1-formil-Trp, Xaa3 es Trp, Xaa4 es Ala, y Xaa5 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile.
- 40 **9.** El compuesto de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que comprende cualquiera de las SEQ ID NOS: 5, 7, 8, 9, 10 o 11.
- 10.** El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, ligado a un componente adicional que extiende la retención in vivo del compuesto.
- 45 **11.** El compuesto de la reivindicación 10, en el que el componente adicional es polietilenglicol (PEG) o una molécula pequeña de enlace a albúmina.
- 12.** El compuesto de la reivindicación 10, en el que el componente adicional es un péptido de enlace a albúmina; teniendo opcionalmente la SEQ ID NO: 14, que es: RLIEDICLPRWGCLWEDD.
- 50 **13.** El compuesto de la reivindicación 12, en donde el compuesto y el péptido de enlace a albúmina están separados por un espaciador; opcionalmente en donde el espaciador es una molécula de polietilenglicol.
- 14.** Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 **15.** Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la inhibición de la activación del complemento.
- 60 **16.** El uso in vitro de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la inhibición de la activación del complemento.

65