

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 379**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/GB2014/053199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14796237 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3062823**

54 Título: **Novedosos polipéptidos**

30 Prioridad:

28.10.2013 GB 201318941
10.06.2014 GB 201410265

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

04.06.2019

73 Titular/es:

BICYCLERD LIMITED (100.0%)
B900, Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

72 Inventor/es:

TEUFEL, DANIEL;
STACE, CATHERINE y
WALKER, EDWARD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 715 379 T3

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

DESCRIPCIÓN

Novedosos polipéptidos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos que se unen covalentemente a armazones moleculares de modo que dos o más bucles peptídicos están subtendidos entre puntos de unión al armazón. En particular, la invención describe péptidos que son específicos para la calicreína plasmática de proteasa humana y de rata y se modifican en uno o dos bucles de péptidos para mejorar la potencia y/o la resistencia a la proteasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los péptidos cíclicos son capaces de unirse con una alta afinidad y especificidad de diana a las dianas proteicas y, por lo tanto, son una clase de molécula atractiva para el desarrollo de productos terapéuticos. De hecho, varios péptidos cíclicos ya se han usado con éxito en la clínica, como por ejemplo el péptido antibacteriano vancomicina, el fármaco inmunosupresor ciclosporina o el ocreótid del fármaco contra el cáncer (Driggers y col. (2008), Nat Rev Drug Discov 7(7), 608-24). Las buenas propiedades de unión resultan de una superficie de interacción relativamente grande formada entre el péptido y la diana, así como la flexibilidad conformacional reducida de las estructuras cíclicas. Típicamente, los macrociclos se unen a superficies de varios cientos de angstrom cuadrados, como por ejemplo el antagonista CXCR4 del péptido cíclico CVX15(400 Å²; Wu y col.(2007), Science 330, 1066-71), un péptido cíclico con el motivo Arg-Gly-Asp que se une a la integrina αVβ3 (355 Å²)(Xiong y col.(2002), Science 296 (5565), 151-5) o el inhibidor del péptido cíclico upain-1 que se une al activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (603 Å²; Zhao y col. (2007), J Struct Biol 160(1), 1-10).

Debido a su configuración cíclica, los macrociclos peptídicos son menos flexibles que los péptidos lineales, lo que conduce a una menor pérdida de entropía al unirse a las dianas y da como resultado una mayor afinidad de enlace. La flexibilidad reducida también conduce a bloquear las conformaciones específicas de la diana, aumentando la especificidad de unión en comparación con los péptidos lineales. Este efecto ha sido ejemplificado por un inhibidor potente y selectivo de la matriz metaloproteínasa 8, MMP-8), que perdió su selectividad sobre otras MMP cuando se abrió su anillo (Cherney y col. (1998), J Med Chem 41(11), 1749-51). Las propiedades de unión favorables logradas a través de la macrociclización son incluso más pronunciadas en péptidos multicíclicos que tienen más de un anillo peptídico como, por ejemplo, en la vancomicina, la nisina y la actinomicina.

Diferentes equipos de investigación han fijado previamente polipéptidos con restos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp y McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman y col. (2005), ChemBioChem). Meloen y sus colaboradores habían usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos en armazones sintéticos para el mimetismo estructural de superficies de proteínas (Timmerman y col. (2005), ChemBioChem). Los métodos para la generación de compuestos farmacológicos candidatos donde dichos compuestos se generan mediante la unión de polipéptidos que contienen cisteína a un armazón molecular como por ejemplo el tris(bromometil)benceno se divulgan en el documento WO 2004/077062 y el documento WO 2006/078161.

Se han desarrollado enfoques combinatorios basados en la presentación de fagos para generar y seleccionar grandes bibliotecas de péptidos bicíclicos para dianas de interés (Heinis y col. (2009), Nat Chem Biol 5(7), 502-7 y el documento WO2009/098450). En resumen, las bibliotecas combinatorias de péptidos lineales que contienen tres restos de cisteína y dos regiones de seis aminoácidos aleatorios (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) (SEQ ID NO: 97) se mostraron en el fago y se ciclaron uniendo covalentemente las cadenas laterales de cisteína a una pequeña molécula (tris-(bromometil)benceno). Los péptidos bicíclicos aislados en selecciones de afinidad a las proteasas humanas cathepsina G y calicreína plasmática (PK) demostraron constantes inhibitorias nanomolares. El documento WO 2013/050615, el documento WO 2013/050616 y el documento WO 2014/167122 divulgan otros ligandos peptídicos bicíclicos específicos para la calicreína plasmática humana. El documento WO 2013/050617 divulga ligandos polipeptídicos que comprenden un polímero de aminoácido que comprende al menos dos monómeros de sarcosina. El documento WO 2010/089115 divulga un método para proporcionar un ligando peptídico multiespecífico. El documento WO 2014/140342 divulga un método para conjugar un péptido mostrado en un sistema de visualización genético a un armazón molecular realizado en una resina de intercambio iónico.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un ligando peptídico específico para la calicreína

plasmática que comprende un polipéptido que comprende al menos tres restos de cisteína, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un armazón molecular, seleccionado de entre TBMB o un derivado del mismo, que forma enlaces covalentes con los restos de cisteína del polipéptido de modo que al menos dos bucles polipeptídicos se forman en el armazón molecular, donde el ligando peptídico comprende una secuencia peptídica de:

- 5
 (a) -C_i-N-X-W-N-P-W-C_{ii}-O/U-X-X-X-O/J-X-C_{iii}- (SEQ ID NO:1)
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

donde:

- 10
 C_i, C_{ii} y C_{iii} representan el primero, el segundo y el tercer resto de cisteína, respectivamente;
 el subíndice "a" representa un número entero seleccionado de entre 0 o 1;
 X representa cualquier resto de aminoácido;
 O representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V;
 15 J representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y; y
 U representa un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T.

Los novedosos ligandos peptídicos bicíclicos de unión a la calicreína de la invención se identificaron siguiendo las selecciones biológicas como se describe en este documento en los ejemplos. Al cambiar el cebo diana entre la calicreína humana y de rata durante las selecciones biológicas, se identificaron secuencias candidatas con una buena reactividad cruzada entre las especies. Se introdujeron modificaciones de solubilización en las moléculas con el fin de mejorar la capacidad de formular los candidatos peptídicos bicíclicos, y los análisis farmacocinéticos en ratas pusieron de manifiesto secuencias con alta estabilidad metabólica *in vivo*.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando peptídico como se define en este documento en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ligando peptídico como se define en este documento para su uso en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1:** Estabilidad comparativa en plasma de rata del control 06-34-18 contra los novedosos candidatos de biciclo de unión a calicreína con reactividad cruzada.

Figura 2: Estabilidad comparativa en plasma humano del control 06-34-18 contra los novedosos candidatos de biciclo de unión a calicreína con reactividad cruzada.

40 **Figura 3:** Estabilidad comparativa de un derivado 06-550 en plasma humano (A) y de rata (B). Se tomaron muestras de las mezclas de plasma y de péptidos a las 0 (arriba), 21 (medio) y 46 (abajo) horas. El máximo principal del péptido está en 2481,9 MH⁺. Se observa poca degradación en el transcurso del tiempo de 46 horas, ya que la abundancia relativa del máximo principal permanece alta.

Figura 4: Perfil farmacocinético *in vivo* de dos péptidos seleccionados en ratas. El derivado 06-259-02, en particular, muestra una marcada estabilidad en la circulación de la rata, ya que su eliminación se debe principalmente a la filtración renal.

Figura 5: Análisis farmacocinético *in vivo* después de la inyección intravítrea en conejos de dos péptidos seleccionados. Ambos péptidos, incluido el derivado 06-550, se eliminaron lentamente del humor vítreo, con una semivida de eliminación de 20-30 h.

50 **Figura 6:** Efecto de dos péptidos seleccionados sobre el edema de la pata inducido por carragenina. Ambos péptidos, incluido el derivado 06-259-02, inhibieron la hinchazón de la pata inducida por la carragenina en todos los puntos de tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la materia, tales como en las técnicas de la química de péptidos, el cultivo de células y la presentación de fagos, la química de ácidos nucleicos y la bioquímica. Las técnicas convencionales se usan para la biología molecular, los métodos genéticos y bioquímicos (véase Sambrook y col.,
 60 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY;

Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc.).

Ligandos peptídicos

5 Un ligando peptídico, como se menciona en este documento, se refiere a un péptido unido covalentemente a un armazón molecular. Típicamente, dichos péptidos comprenden dos o más grupos reactivos (es decir, restos de cisteína) que son capaces de formar enlaces covalentes al armazón, y una secuencia subtendida entre dichos grupos reactivos que se conoce como la secuencia de bucle, ya que forma un bucle cuando el péptido está unido al armazón. En el presente caso, los péptidos comprenden al menos tres restos de cisteína (denominados en este documento C_i, C_{ii} y C_{iii}), y forman al menos dos bucles en el armazón.

La secuencia de consenso de fórmula (a) contiene motivos del péptido inicial de biciclo candidato 06-259 así como de cada una de las secuencias peptídicas más prometedoras identificadas por la maduración por afinidad del candidato inicial como se describe en el ejemplo 1 y en las tablas 2 y 4.

15 En una realización adicional, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre -C_i-N-X-W-N-P-W-C_{ii}-O/U-X-X-X-O-X-C_{iii}- (SEQ ID NO:7).

En una realización adicional más, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre -C_i-N-T/H/Y-W-N-P-W-C_{ii}-G/S/P-A/V/W/D/S-D/E/V/T/P-A/G/P/I/R/D-G/P/Y/I-F/I/L/V/R/G/D-C_{iii}- (SEQ ID NO:8).

20 En una realización adicional más, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre -C_i-N-T/H/Y-W-N-P-W-C_{ii}-G/S/P-A/V/W/D/E/V-A/G/P-G/P-F/I/L/V-C_{iii}- (SEQ ID NO:9).

25 En una realización adicional más, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre:

- C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-G-W-V-G-G-F-C_{iii}- (06-259) (SEQ ID NO:10);
- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-V-E-P-P-V-C_{iii}- (06-259-01) (SEQ ID NO:11);
- C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}- (06-259-02) (SEQ ID NO:12);
- 30 • C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-I-C_{iii}- (06-259-03) (SEQ ID NO:13);
- C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}- (06-259-04) (SEQ ID NO:14);
- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-R-C_{iii}- (06-259-F1) (SEQ ID NO: 15);
- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-P-A-D-I-P-V-C_{iii}- (06-259-E2) (SEQ ID NO:16);
- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-D-D-P-Y-I-C_{iii}- (06-259-H3) (SEQ ID NO:17)
- 35 • C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-S-D-P-P-V-C_{iii}- (06-259-H4) (SEQ ID NO:18)
- C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-S-D-T-R-I-G-C_{iii}- (06-259-A6) (SEQ ID NO:19); y
- C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-S-W-P-D-I-D-C_{iii}- (06-259-F2) (SEQ ID NO:20).

40 En aún una realización adicional más, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre:

- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-V-E-P-P-V-C_{iii}- (06-259-01) (SEQ ID NO:11);
- C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}- (06-259-02) (SEQ ID NO:12);
- C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-I-C_{iii}- (06-259-03) (SEQ ID NO:13); y
- 45 • C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}- (06-259-04) (SEQ ID NO:14).

Los péptidos de esta realización se identificaron como unos de los candidatos más potentes después de la maduración por afinidad (véase el ejemplo 1 y la tabla 4). Además, cada uno de los péptidos de esta realización se identificó para demostrar tanto altas potencias como buena reactividad cruzada entre la calicreína de rata y humana (véase la tabla 5).

En aún una realización más, el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre -C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}- (06-259-02) (SEQ ID NO:12). El péptido de esta realización se identificó como el miembro más potente, de reactividad cruzada y estable de la familia de ligandos peptídicos dentro de la fórmula (a) (véase los ejemplos 1 y 2). Por ejemplo, la selección inicial usando el método n.º 1 descrito en este documento indicó que 06-259-02 es más estable que la mayoría de los candidatos de biciclo restantes, según lo determinado por una ventana de detección de hasta 10 días (datos no mostrados). Además, la estabilidad *ex vivo* también fue reproducible *in vivo*, específicamente en la rata, donde el metabolismo del péptido estaba prácticamente ausente según lo determinado por la eliminación y la comparación con la tasa de filtración glomerular conocida (ejemplo 4).

60

En una realización, determinados ligandos peptídicos de la invención son específicos para la calicreína plasmática humana, de rata y/o de conejo. En una realización adicional, determinados ligandos peptídicos de la invención son específicos para la calicreína plasmática humana y/o de rata. En una realización adicional más, determinados ligandos peptídicos de la invención son específicos para la calicreína plasmática humana.

5

Ventajas de los ligandos peptídicos

Determinados péptidos bicíclicos de la presente invención tienen varias propiedades ventajosas que les permiten ser considerados como moléculas de tipo fármaco adecuadas para la administración por inyección, inhalación, nasal, ocular, oral o tópica. Dichas propiedades ventajosas incluyen:

- Reactividad cruzada de especies. Este es un requisito típico para la farmacodinámica preclínica y la evaluación farmacocinética;
- Estabilidad de la proteasa. Los ligandos peptídicos candidatos principales a péptidos bicíclicos deberían demostrar idealmente estabilidad frente a las proteasas plasmáticas, proteasas epiteliales (ancladas a la membrana), proteasas gástricas e intestinales, proteasas de la superficie pulmonar, proteasas intracelulares y similares. La estabilidad de la proteasa se debe mantener entre diferentes especies, de modo que un candidato a biciclo principal pueda desarrollarse en modelos animales y administrarse con confianza a los seres humanos;
- Perfil de solubilidad deseable. Esta es una función de la proporción de restos cargados e hidrófilos frente a hidrófobos y enlaces H/intra-intermoleculares, que es importante para fines de formulación y absorción; y
- Una semivida plasmática óptima en la circulación. Dependiendo de la indicación clínica y el régimen de tratamiento, puede requerirse desarrollar un péptido bicíclico para una exposición corta en un entorno de manejo de enfermedades agudas, o desarrollar un péptido bicíclico con retención mejorada en la circulación, y por lo tanto sea óptimo para el manejo de patologías más crónicas.

25

Sales farmacéuticamente aceptables

Se apreciará que las formas de sal están dentro del alcance de esta invención, y las referencias a compuestos de fórmula (I) incluyen las formas de sal de dichos compuestos.

30

Las sales de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales, tales como los que se describen en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con la base o el ácido adecuado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos.

35

Las sales de adición de ácido (mono- o di-sales) pueden formarse con una amplia diversidad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen mono- o di-sales formadas con un ácido seleccionado de entre el grupo que consiste en acético, 2,2-dicloroacético, adipico, alginico, ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspártico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+)alcanfórico, alcanforsulfónico, (+)-(1S)-camfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, fórmico, fumárico, galacárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, ácidos hidrohálidos (por ejemplo, bromhídrico, clorhídrico, hidriódico), isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico, (\pm)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, (\pm)-DL-mandélico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, pirúvico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiociánico, p-toluenosulfónico, undecilénico y ácidos valéricos, así como aminoácidos acilados y resinas de intercambio catiónico.

50

Un grupo particular de sales consiste en sales formadas a partir de ácidos acético, clorhídrico, hidriódico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, sulfúrico, metanosulfónico (mesilato), etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. Una sal particular es la sal de clorhidrato. Otra sal particular es la sal de acetato.

55

Derivados modificados

En una realización, el ligando peptídico comprende adicionalmente una o más modificaciones seleccionadas de entre: modificaciones N-terminales y/o C-terminales; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con uno o más restos

60

de aminoácidos no naturales (tales como el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos polares con uno o más aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos hidrófobos con otros aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos no naturales); adición de un grupo espaciador; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación con uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación; 5 reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con una alanina, reemplazo de uno o más restos de L-aminoácidos con uno o más restos de D-aminoácidos; N-alkilación de uno o más enlaces amida dentro del ligando péptido bicíclico; reemplazo de uno o más enlaces peptídicos con un enlace sustituto; modificación de la longitud de la estructura peptídica; sustitución del hidrógeno en el carbono α de uno o más restos de aminoácidos con otro grupo químico, y modificación post-sintética de aminoácidos tales como cisteína, lisina, glutamato/aspartato y tirosina con amina, tiol, 10 ácido carboxílico y reactivos al fenol adecuados.

En una realización, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal y/o C-terminal.

En una realización adicional, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal. En una realización 15 adicional, la modificación N-terminal comprende un grupo acetilo N-terminal. En esta realización, el grupo cisteína N-terminal (el grupo denominado en este documento C_i) está cubierto con anhídrido acético u otros reactivos adecuados durante la síntesis de péptidos que conduce a una molécula que está acetilada en el extremo N-terminal. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar un punto de reconocimiento potencial para la aminopeptidasa y evita el potencial de degradación del péptido bicíclico. 20

En una realización adicional, el derivado modificado comprende una modificación C-terminal. En una realización adicional, la modificación C-terminal comprende un grupo amida. En esta realización, el grupo cisteína C-terminal (el grupo denominado en este documento C_{iii}) se sintetiza como una amida durante la síntesis de péptidos que conduce a una molécula que está amidada en el extremo C-terminal. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar un 25 punto de reconocimiento potencial para la carboxipeptidasa y evita el potencial de degradación del péptido bicíclico.

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con uno o más restos de aminoácidos no naturales. En esta realización, pueden seleccionarse aminoácidos no naturales que tienen cadenas laterales isostéricas/isoelectrónicas que ya no son reconocidas por las proteasas degradantes ni tienen 30 ningún efecto sobre la potencia diana.

Como alternativa, se pueden usar aminoácidos no naturales que tienen cadenas laterales de aminoácidos restringidas, de modo que la hidrólisis proteolítica del enlace peptídico cercano esté obstaculizada conformacionalmente y estéricamente. En particular, estos se refieren a análogos de prolina, cadenas laterales voluminosas, derivados 35 disustituidos en C_α (por ejemplo, ácido aminoisobutírico, Aib) y cicloaminoácidos, un derivado simple que es el ácido amino-ciclopropilcarboxílico.

En una realización adicional, un resto de prolina puede reemplazarse con un resto de ácido L-azetidina carboxílico y/o un resto de arginina puede reemplazarse con un resto de N- α -metil arginina o L-homoarginina. En este documento se 40 presentan datos que demuestran que la presencia de dichos aminoácidos no naturales mejora la estabilidad proteolítica y al mismo tiempo mantiene o mejora la afinidad diana de los ligandos peptídicos bicíclicos.

En una realización, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador. En una realización adicional, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador a la cisteína N-terminal (C_i) y/o la cisteína C- 45 terminal (C_{iii}). En una realización adicional más, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador a la cisteína C-terminal (C_{iii}). En aún una realización adicional más, el grupo espaciador comprende uno o más grupos sarcosina (convenientemente 3 grupos sarcosina) unidos a dos o más restos de D-arginina (convenientemente 2 restos de D-arginina). En este documento se presentan datos que demuestran que la presencia de dicho espaciador aumenta la solubilidad acuosa de los ligandos peptídicos bicíclicos. 50

En una realización, la invención proporciona un derivado modificado de fórmula (a) que comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada de entre $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-A-Sar_3-(D-Arg)_2$ ((06-259-02 (Sar_3- 55 ($D-Arg)_2$) (SEQ ID NO: 61); donde Sar_3 representa 3 espaciadores de sarcosina y $(D-Arg)_2$ representa 2 restos de D-arginina.

El péptido de esta realización demostró un perfil farmacocinético *in vivo* favorable como se describe en el ejemplo 4. En particular, el péptido demostró una marcada estabilidad en la circulación de la rata, ya que su eliminación se debe principalmente a la filtración renal. Además, el péptido de esta realización también demostró una inhibición altamente significativa de la hinchazón de la pata inducida por carragenina como se describe en el ejemplo 6, que era comparable 60 al patrón oro (indometacina) para dicho modelo.

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación con uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación. En una realización adicional, el derivado modificado comprende el reemplazo de un resto de triptófano con un resto de fenilalanina. Esta realización proporciona la ventaja de mejorar el perfil de estabilidad farmacéutica del ligando peptídico bicíclico resultante.

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos cargados con uno o más residuos de aminoácidos hidrófobos. En una realización alternativa, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos hidrófobos con uno o más restos de aminoácidos cargados. El correcto equilibrio de los restos de aminoácidos cargados frente a hidrófobos es una característica importante de los ligandos peptídicos bicíclicos. Por ejemplo, los restos de aminoácidos hidrófobos influyen en el grado de unión a proteínas plasmáticas y, por lo tanto, en la concentración de la fracción disponible libre en plasma, mientras que los restos de aminoácidos cargados (en particular la arginina) pueden influir en la interacción del péptido con las membranas de fosfolípidos en las superficies celulares. Los dos en combinación pueden influir en la semivida, el volumen de distribución y la exposición del fármaco peptídico, y se puede adaptar de acuerdo con el criterio de valoración clínico. Además, la combinación correcta y el número de restos de aminoácidos cargados frente a los hidrófobos pueden reducir la irritación en el sitio de la inyección (si el fármaco peptídico se administra por vía subcutánea).

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de L-aminoácidos con uno o más restos de D-aminoácidos. Se cree que esta realización aumenta la estabilidad proteolítica por el impedimento estérico y por la propensión de los D-aminoácidos a estabilizar las conformaciones de giro β (Tugyi y col (2005) PNAS, 102 (2), 413-418).

En una realización, el derivado modificado comprende un derivado N-alquilado de uno o más enlaces amida dentro del ligando peptídico bicíclico. Se cree que esta realización transmite protección proteolítica por modificación directa del enlace amida escindible (Fiacco y col, Chembiochem. (2008); 9(14):2200-3). También se cree que la N-metilación tiene un fuerte efecto en los ángulos torsionales del enlace peptídico, y se cree que ayuda en la penetración celular y la disponibilidad oral (Biron y col (2008), Angew. Chem. Int. Ed., 47, 2595-99)

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más enlaces peptídicos con un enlace sustituto seleccionado de entre uno o más de un derivado N-alquilado (por ejemplo, -CO-NR), un enlace peptídico reducido (por ejemplo, -CH₂-NH-), un enlace peptidoide (por ejemplo, -NR-CH₂-CO-), un enlace tioamida (por ejemplo, -CS-NH-), un enlace azapéptido (por ejemplo, -CO-NH-NR-), un enlace trans-alqueno (por ejemplo, -RHC = C-), un enlace retroinverso (por ejemplo, -NH-CO-) y un enlace sustituto de urea (por ejemplo, -NH-CO-NHR-).

En una realización, el derivado modificado comprende la eliminación de cualquier resto de aminoácido alanina. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar el(los) sitio(s) de ataque proteolíticos potenciales.

En una realización, el derivado modificado comprende la modificación de la longitud de la estructura del péptido. En una realización adicional, la modificación de la longitud de la estructura del péptido comprende el uso de uno o más restos de aminoácidos $\beta^{2/3}$ (tales como -NH-CR-CH₂-CO o -NH-CH₂-CHR-CO-).

En una realización, el derivado modificado comprende la sustitución en el carbono α de uno o más restos de aminoácidos. Esta realización proporciona la ventaja de restringir las conformaciones de la estructura. En una realización adicional, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con el ácido 2-aminoisobutírico (también conocido como ácido α -aminoisobutírico (AIB), α -metilalanina o 2-metilalanina).

Cabe señalar que cada una de las modificaciones mencionadas anteriormente sirve para mejorar deliberadamente la potencia del péptido contra la diana. Se pueden lograr mejoras de potencia adicionales basadas en modificaciones a través de los siguientes mecanismos:

- La incorporación de restos hidrófobos que aprovechan el efecto hidrófobo y conducen a menores relaciones de desconexión, de modo que se logran afinidades más altas;
- La incorporación de grupos cargados que aprovechan las interacciones iónicas de largo alcance, lo que conduce a velocidades más rápidas y afinidades más altas (véase, por ejemplo, Schreiber y col, Rapid, electrostatic assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); y
- la incorporación de una restricción adicional en el péptido, por ejemplo, restringiendo correctamente las cadenas laterales de los aminoácidos de modo que la pérdida en la entropía sea mínima en la unión a la diana, restringiendo los ángulos torsionales de la estructura de modo que la pérdida en la entropía sea mínima en la unión a la diana e

introduciendo ciclaciones adicionales en la molécula por razones idénticas.

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

5

Actividad de unión

La especificidad, en el contexto de este documento, se refiere a la capacidad de un ligando para unirse o interactuar de otro modo con su diana afín con la exclusión de entidades que son similares a la diana. Por ejemplo, la especificidad
10 puede referirse a la capacidad de un ligando para inhibir la interacción de una enzima humana, pero no una enzima homóloga de una especie diferente. Usando el enfoque descrito en este documento, la especificidad puede ser modulada, es decir se aumentarse o disminuirse, para hacer que los ligandos sean más o menos capaces de interactuar con homólogos o parálogos de la diana deseada. La especificidad no pretende ser sinónimo de actividad, afinidad o avidez, y la potencia de la acción de un ligando en su diana (tal como, por ejemplo, afinidad de unión o nivel
15 de inhibición) no está necesariamente relacionada con su especificidad.

La actividad de unión, como se usa en este documento, se refiere a mediciones de unión cuantitativas tomadas de ensayos de unión, por ejemplo, como se describe en este documento. Por lo tanto, la actividad de unión se refiere a la cantidad de ligando peptídico que se une a una concentración diana determinada.

20

La multiespecificidad es la capacidad de unirse a dos o más dianas. Típicamente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una sola diana, tal como un epítipo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades conformacionales. Sin embargo, se pueden desarrollar péptidos que pueden unirse a dos o más dianas; anticuerpos específicos duales, por ejemplo, como se conoce en la técnica como se menciona anteriormente. En la presente
25 invención, los ligandos peptídicos pueden ser capaces de unirse a dos o más dianas y, por lo tanto, son multiespecíficos. Convenientemente, se unen a dos dianas, y son duales específicos. La unión puede ser independiente, lo que significaría que los sitios de unión para las dianas en el péptido no están estructuralmente impedidos por la unión de una u otra de las dianas. En este caso, ambas dianas se pueden unir de forma independiente. Más generalmente, se espera que la unión de una diana obstaculizará, al menos parcialmente, la unión
30 de la otra.

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

En el contexto de la presente invención, es posible que un ligando que tenga actividad con respecto a, por ejemplo, una diana y un ortólogo, pueda ser un ligando biespecífico. Sin embargo, en una realización, el ligando no es
40 biespecífico, sino que tiene una especificidad menos precisa de modo que se une tanto a la diana como a uno o más ortólogos. En general, es menos probable que un ligando que no se haya seleccionado contra una diana y su ortólogo sea biespecífico debido a la ausencia de presión selectiva hacia la biespecificidad. La longitud del bucle en el péptido bicíclico puede ser decisiva para proporcionar una superficie de unión adaptada de modo que se pueda obtener una buena reactividad cruzada de la diana y el ortólogo, mientras se mantiene una alta selectividad hacia homólogos
45 menos relacionados.

Si los ligandos son realmente biespecíficos, en una realización, al menos una de las especificidades diana de los ligandos será común entre los ligandos seleccionados, y el nivel de esa especificidad se puede modular mediante los métodos divulgados en este documento. La segunda o más especificidades no necesitan ser compartidas y no deben
50 ser objeto de los procedimientos establecidos en este documento.

Una diana es una molécula o parte de la misma a la que los ligandos peptídicos se unen o interactúan de otra manera. Aunque la unión es vista como un requisito previo para la actividad de la mayoría de los tipos, y puede ser una actividad en sí misma, se prevén otras actividades. Por lo tanto, la presente invención no requiere la medición de la unión directa
55 o indirectamente.

El armazón molecular es cualquier molécula que sea capaz de conectar el péptido en múltiples puntos para transmitir una o más características estructurales al péptido. Preferentemente, el armazón molecular comprende al menos tres puntos de unión para el péptido, denominados grupos reactivos del armazón. Estos grupos son capaces de reaccionar
60 con los restos de cisteína (C_i, C_{ii} y C_{iii}) en el péptido para formar un enlace covalente. No se limitan a formar un enlace

disulfuro, que está sujeto a escisión reductora y desintegración conjunta de la molécula, sino que forman enlaces tioéteres covalentes estables. Las estructuras preferidas para los armazones moleculares se describen a continuación.

Armazón molecular

5

En una realización, el armazón molecular consiste en tris(bromometil)benceno.

Grupos efectores y funcionales

10 Los grupos efectores y/o funcionales pueden unirse, por ejemplo, a los extremos N o C del polipéptido, o al armazón molecular.

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

20 En una realización adicional de este aspecto de la invención, un grupo efector de acuerdo con la presente invención es una región Fc de una molécula de IgG. Ventajosamente, un grupo de ligando peptídico efector de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión Fc de ligando peptídico que tiene una semivida t_{β} de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más o 7 días o más. Más ventajosamente, el ligando peptídico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión Fc del ligando peptídico que tiene una semivida t_{β} de un día o más.

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

30 La capacidad de los péptidos para penetrar en las células permitirá que los péptidos contra las dianas intracelulares sean efectivos. Las dianas a las que pueden acceder los péptidos con la capacidad de penetrar en las células incluyen factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular tales como las tirosina-quinasa y las moléculas de la vía apoptótica. Los grupos funcionales que permiten la penetración de las células incluyen péptidos o grupos químicos que se han añadido al péptido o al armazón molecular. Péptidos tales como los derivados de VP22, HIV-Tat, una proteína homeobox de *Drosophila* (Antennapedia), por ejemplo, como se describe en Chen y Harrison, Biochemical Society Transactions (2007), volumen 35, parte 4, pág 821; Gupta y col. en Advanced Drug Discovery Reviews (2004), volumen 57 9637. Ejemplos de péptidos cortos que han demostrado ser eficientes en la translocación a través de membranas plasmáticas incluyen el péptido penetratina de 16 aminoácidos de la proteína de *Drosophila* Antennapedia (Derossi y col (1994) J. Biol. Chem. volumen 269 pág 10444), el 'modelo de péptido anfipático' de 18 aminoácidos (Oehlke y col (1998) Biochim Biophys Acts, volumen 1414, pág 127) y regiones ricas en arginina de la proteína TAT del VIH. Los enfoques no peptídicos incluyen el uso de imitadores de moléculas pequeñas o SMOC que se pueden unir fácilmente a las biomoléculas (Okuyama y col (2007) Nature Methods volumen 4, pág 153). Otras estrategias químicas para añadir grupos de guanidinio a las moléculas también mejoran la penetración celular (Elson-Scwab y col (2007) J Biol Chem, volumen 282, pág 13585). Las moléculas de pequeño peso molecular, tales como los esteroides, pueden añadirse al armazón molecular para mejorar la captación en las células.

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

50

También se pueden incorporar péptidos RGD, que se unen a integrinas que están presentes en muchas células.

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

60

Los grupos funcionales incluyen fármacos tales como los agentes citotóxicos para la terapia del cáncer. Estos incluyen: Agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, ifosfamida; Los antimetabolitos que incluyen los análogos de la purina azatioprina y la mercaptopurina o los análogos de la pirimidina; alcaloides y terpenoides de plantas que incluyen alcaloides de la vinca tales como

- 5 Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine y Vindesine; Podofilotoxina y sus derivados etopósido y tenipósido; Taxanos, que incluyen paclitaxel, originalmente conocido como Taxol; Inhibidores de la topoisomerasa, que incluyen las camptotecinas: irinotecán y topotecán, e inhibidores de tipo II que incluyen amsacrina, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido. Otros agentes pueden incluir antibióticos antitumorales que incluyen el inmunosupresor dactinomicina (que se usa en transplantes de riñón), doxorubicina, epirubicina, bleomicina y otros.
- 10 Los posibles grupos efectores también incluyen enzimas, por ejemplo, tales como carboxipeptidasa G2 para su uso en terapia de enzima/profármaco, donde el ligando peptídico reemplaza los anticuerpos en ADEPT.

Síntesis

- 15 Los péptidos de la presente invención pueden fabricarse sintéticamente mediante técnicas convencionales seguidas de reacción con un armazón molecular *in vitro*. Cuando se realiza esto, se puede usar la química convencional. Esto permite la preparación rápida a gran escala de material soluble para experimentos posteriores cadena abajo o la validación. Dichos métodos podrían lograrse usando una química convencional tal como la descrita en Timmerman y
- 20 col (mencionada anteriormente).

Por lo tanto, la invención también se refiere a la fabricación de polipéptidos o conjugados seleccionados como se establece en este documento, donde la fabricación comprende etapas adicionales opcionales como se explica a continuación. En una realización, estas etapas se llevan a cabo en el polipéptido/conjugado de producto final producido

25 por síntesis química.

Opcionalmente, los restos de aminoácidos en el polipéptido de interés pueden sustituirse cuando se fabrica un conjugado o complejo.

- 30 Los péptidos también pueden extenderse, para incorporar, por ejemplo, otro bucle y, por lo tanto, introducir múltiples especificidades.

Para extender el péptido, simplemente puede extenderse químicamente en su extremo N o su extremo C o dentro de los bucles usando lisinas (y análogos) ortogonalmente protegidas usando química convencional en fase sólida o en

35 fase de solución. La química de proteínas convencional se puede usar para introducir un extremo N o C activable. Como alternativa, se pueden hacer adiciones por condensación de fragmentos o ligadura química nativa, por ejemplo, como se describe en (Dawson y col. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779), o por enzimas, por ejemplo, usando subtiligasa como se describe en (Chang y col, Proc Natl Acad Sci, EE. UU., 20 de diciembre de 1994, 91(26):12544-8 o en Hikari y col, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, volumen 18, número

40 22, 15 de noviembre de 2008, páginas 6000-6003).

Como alternativa, los péptidos pueden extenderse o modificarse por conjugación adicional a través de enlaces disulfuro. Esto tiene la ventaja adicional de permitir que el primer y segundo péptido se disocien entre sí una vez dentro del entorno reductor de la célula. En este caso, el armazón molecular (por ejemplo, TBMB) podría añadirse durante la

45 síntesis química del primer péptido para reaccionar con los tres grupos de cisteína; luego podría añadirse una cisteína adicional al extremo N del primer péptido, de modo que esta cisteína solo reaccionara con una cisteína libre del segundo péptido.

Técnicas similares se aplican igualmente a la síntesis/acoplamiento de dos macrociclos bicíclicos y biespecíficos,

50 creando potencialmente una molécula tetraspecífica.

Además, la adición de otros grupos funcionales o grupos efectores se puede realizar de la misma manera, usando la química adecuada, el acoplamiento en los extremos N o C o a través de cadenas laterales. En una realización, el acoplamiento se realiza de modo que no bloquee la actividad de ninguna de las entidades.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando peptídico como se define en este documento en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente

60 aceptables.

- En general, los presentes ligandos peptídicos se utilizarán en forma purificada junto con excipientes o portadores farmacológicamente adecuados. Típicamente, estos excipientes o portadores incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, que incluyen medios salinos y/o tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer con lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden elegirse entre espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.
- 5
- 10 Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición).
- 15 Los ligandos peptídicos de la presente invención se pueden usar como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos citotóxicos u otros agentes junto con los ligandos de proteínas de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la
- 20 presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos diana, ya sea o no que se agrupan antes de la administración.
- La vía de administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de las que conocen comúnmente los expertos en la materia. Para la terapia, incluyendo sin limitación la inmunoterapia, los
- 25 ligandos peptídicos de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas convencionales. La administración puede ser de cualquier modo adecuado, incluyendo la vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, la vía pulmonar, o también, adecuadamente, por infusión directa con un catéter. La dosificación y la frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y el estado del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, las contraindicaciones y otros parámetros que debe tener en cuenta el
- 30 médico.
- Se apreciará que cuando los ligandos peptídicos de la invención se formulan como composiciones oftálmicas para el tratamiento de trastornos oftálmicos, la vía de administración típicamente estará directamente en el sitio del trastorno oftálmico, tal como la administración por vía ocular, tal como implantes tópicos, subconjuntivales, subtenón,
- 35 intraoculares, oculares, etc. En una realización, la vía de administración es por inyección intraocular. En una realización alternativa, la composición oftálmica se administra por vía tópica (por ejemplo, aplicación extraocular) o sistémica (por ejemplo, vía oral u otra vía parenteral tal como, por ejemplo, la administración subcutánea) siempre que una cantidad suficiente del péptido dentro de las células o el tejido ubicado en un ojo o adyacente a un ojo logra contacto con el sitio de la condición oftálmica. En una realización alternativa, la composición oftálmica se administra por vía parenteral.
- 40 La vía precisa de administración será inmediatamente evidente para la persona experta cuando aborde el trastorno oftálmico a tratar de acuerdo con el conocimiento general y metodología comunes descritos en el documento WO 2007/104541.
- Los ligandos peptídicos de esta invención pueden liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un portador
- 45 adecuado antes de su uso. Esta técnica ha demostrado ser efectiva y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad y que los niveles deben ajustarse hacia arriba para compensar.
- 50 Las composiciones que contienen los presentes ligandos peptídicos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En determinadas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr al menos una inhibición parcial, supresión, modulación, destrucción o algún otro parámetro medible de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades necesarias para lograr esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema
- 55 inmunitario del paciente, pero generalmente varían de 0,005 a 5,0 mg de ligando peptídico seleccionado por kilogramo de peso corporal, siendo las dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis más comúnmente usadas. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los ligandos peptídicos presentes o cócteles de los mismos también pueden administrarse en dosificaciones similares o ligeramente inferiores.
- 60 Una composición que contiene un ligando peptídico de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en entornos

profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los ligandos peptídicos descritos en este documento se pueden usar de forma extracorpórea o *in vitro* de forma selectiva para matar, agotar o eliminar de otro modo eficazmente una población de células diana de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero se puede combinar de forma extracorpórea con los ligandos peptídicos seleccionados, por lo que las células no deseadas se destruyen o se eliminan de otro modo de la sangre para devolverlas al mamífero de acuerdo con las técnicas convencionales.

Usos terapéuticos

- 10 Los ligandos polipeptídicos seleccionados de acuerdo con el método de la presente invención pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico, *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayo y reactivos *in vitro*, y similares. Los ligandos que tienen niveles de especificidad seleccionados son útiles en aplicaciones que involucran pruebas en animales no humanos, donde la reactividad cruzada es deseable, o en aplicaciones de diagnóstico, donde la reactividad cruzada con homólogos o parálogos debe controlarse cuidadosamente. En algunas aplicaciones, tales como las aplicaciones de vacunas, la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a intervalos predeterminados de antígenos puede ser aprovechada para adaptar una vacuna a enfermedades y patógenos específicos. Se prefieren ligandos peptídicos sustancialmente puros de al menos 90 a 95 % de homogeneidad para la administración a un mamífero, y 98 a 99 % o más de homogeneidad son los más preferidos para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificado, parcialmente o hasta homogeneidad como se desee, los polipéptidos seleccionados se pueden usar de forma diagnóstica o terapéutica (incluyendo la extracorpórea) o para desarrollar y realizar procedimientos de ensayo, tinciones de inmunofluorescencia y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, volúmenes I y II, Academic Press, NY).
- 25 Los ligandos peptídicos de la presente invención encontrarán típicamente uso en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunes (que incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia gravis).
- 30 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ligando peptídico como se define en este documento para su uso en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunes.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para evitar suprimir o tratar estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica, trastornos oftálmicos y trastornos autoinmunes que comprenden administrar a un paciente que lo necesite un ligando peptídico como se define en este documento.

En una realización, los trastornos oftálmicos de la invención son trastornos relacionados con la permeabilidad e/o integridad de los vasos retinianos alterados. En una realización adicional, los trastornos oftálmicos de la invención son trastornos relacionados con la rotura del microvaso retiniano que conduce a hemorragias focales. En una realización adicional, los trastornos oftálmicos de la presente invención son enfermedades de la parte posterior del ojo, en particular enfermedades de la retina. En una realización adicional, los trastornos oftálmicos de la invención son enfermedades de la parte frontal del ojo. En una realización adicional, los trastornos oftálmicos de la invención son trastornos asociados con la excesiva permeabilidad vascular y/o edema en el ojo.

Ejemplos de "trastornos oftálmicos" adecuados (incluyendo los trastornos oftálmicos exudativos e/o inflamatorios, trastornos relacionados con la permeabilidad e/o integridad de los vasos retinianos alterados, trastornos relacionados con la rotura del microvaso retiniano que conduce a hemorragias focales, enfermedades de la parte posterior del ojo, enfermedades de la retina y enfermedades de la parte frontal del ojo) incluyen pero no se limitan a: degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), degeneración macular exudativa (también conocida como húmeda o degeneración macular relacionada con la edad (AMD húmeda), edema macular, degeneración macular disciforme de la edad, edema macular cistoide, edema palpebral, edema en la retina, retinopatía diabética, neuroretinopatía macular aguda, coriorretinopatía serosa central, coriorretinopatía, neovascularización coroidea, maculopatía neovascular, glaucoma neovascular, retinopatías arteriales y venosas obstructivas (por ejemplo, oclusión venosa retiniana u oclusión arterial retiniana), oclusión de la vena retiniana central, coagulopatía intravascular diseminada, oclusión de la vena retiniana de la rama, cambios en el fondo de la hipertensión, síndrome isquémico ocular, microaneurismas retinianos arteriales, enfermedad de Coat, telangiectasia parafoveal, oclusión venosa hemiretiniana, papiloflebitis, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana de la rama, enfermedad de la arteria carótida (CAD), angitis de la rama helada, retinopatía de células falciformes y otras hemoglobinopatías, estrías angioideas,

edema macular que se produce como resultado de etiologías tales como la enfermedad (por ejemplo edema macular diabético), lesión ocular o cirugía ocular; isquemia o degeneración de la retina producida, por ejemplo, por lesión, traumatismo o tumores, uveítis, iritis, vasculitis de la retina, endoftalmitis, panoftalmitis, oftalmia metastásica, coroiditis, pigmento retiniano, epitelitis, conjuntivitis, ciclitis, escleritis, episcleritis, neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar, queratitis, blefaritis, desprendimiento de retina exudativo, úlcera corneal, úlcera conjuntival, queratitis numular crónica, queratitis de Thygeson, úlcera de Mooren progresiva, una enfermedad inflamatoria ocular causada por una infección bacteriana o vírica, y por una operación oftálmica, una enfermedad inflamatoria ocular causada por una lesión física en el ojo, un síntoma causado por una enfermedad inflamatoria ocular que incluye, picor, quemazón, edema y úlcera, eritema, eritema exudativo multiforme, eritema nodoso, eritema anular, escleredema, dermatitis, edema angioneurótico, edema laríngeo, edema de la glotis, laringitis subglótica, bronquitis, rinitis, faringitis, sinusitis, laringitis u otitis media.

Las referencias en este documento a "enfermedades de la parte posterior del ojo" incluyen enfermedades que afectan, entre otras, a la retina, la fovea macular en la región posterior del ojo. Ejemplos de "enfermedades de la parte posterior del ojo" adecuadas incluyen, pero no se limitan a, edema macular tal como edema macular clínico o edema macular cistoide angiográfico que surge de diversas etiologías tales como diabetes, degeneración macular exudativa y edema macular que surge del tratamiento con láser de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro (también conocida como fibroplasia retrolental), isquemia retiniana y neovascularización coroidea, enfermedades de la retina (retinopatía diabética, edema retiniano diabético, desprendimiento de retina, degeneración macular senil debida a neovascularización sub-retinal, retinopatía miope); enfermedades inflamatorias; uveítis asociada con neoplasias, tales como retinoblastoma o pseudoglioma; neovascularización después de vitrectomía; enfermedades vasculares (isquemia retiniana, insuficiencia vascular coroidea, trombosis coroidea, retinopatías resultantes de isquemia de la arteria carótida); y neovascularización del nervio óptico.

La bibliografía en este documento a "enfermedades de la parte frontal del ojo" se refieren a enfermedades que afectan predominantemente a los tejidos de la parte frontal del ojo, tales como la córnea, el iris, el cuerpo ciliar, la conjuntiva etc. Ejemplos adecuados de "enfermedades de la parte frontal del ojo" adecuados incluyen, pero no se limitan a, neovascularización corneal (debida a la inflamación, trasplante, hipoplasia evolutiva del iris, enfermedades de la córnea u opacificaciones con un componente exudativo o inflamatorio, neovascularización debido a la penetración del ojo o lesión ocular contusiva; uveítis crónica; uveítis anterior; afecciones inflamatorias resultantes de cirugías tales como LASIK, LASEK, cirugía refractiva, implantación de IOL, edema corneal irreversible como una complicación de la cirugía de cataratas; edema como resultado de lesión o trauma (físico, químico, farmacológico, etc.); inflamación; conjuntivitis (por ejemplo, alérgica persistente, papilar gigante, alérgica intermitente estacional, alérgica perenne, tóxica, conjuntivitis causada por infección por bacterias, virus o Clamidia); queratoconjuntivitis (vernal, atópica, sicca); iridociclitis; iritis; escleritis, episcleritis; queratitis infecciosa; queratitis punteada superficial; queratocono; distrofia polimorfa posterior; distrofias de Fuch (corneal y endotelial); queratopatía bullosa afáquica y pseudofáquica; edema corneal; enfermedad escleral; penfigoide cicatricial ocular; pars planitis; síndrome de Posner Schlossman; enfermedad de Behcet; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada; reacciones hipersensibles; trastornos de la superficie ocular; edema conjuntival; corioretinitis por toxoplasmosis; pseudotumor inflamatorio de la órbita; quemosis; congestión venosa conjuntival; celulitis periorbitaria; dacriocistitis aguda; vasculitis inespecífica; sarcoidosis; y la infección por citomegalovirus.

Ejemplos de "trastornos asociados con la "excesiva permeabilidad vascular y/o edema en el ojo", por ejemplo, en la retina o el vítreo, incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), edema retiniano, hemorragia retiniana, hemorragia vítrea, edema macular (ME), edema macular diabético (DME), retinopatía diabética proliferativa (PDR) y retinopatía diabética no proliferativa (DR), retinopatía por radiación, telangiectasia, retinopatía central serosa y oclusiones de la vena retiniana. El edema retiniano es la acumulación de líquido en el espacio intrarretiniano. DME es el resultado de los cambios microvasculares de la retina que se producen en pacientes con diabetes. Este compromiso de la barrera hemato-retiniana conduce a la fuga de los constituyentes del plasma hacia la retina circundante, lo que resulta en un edema retiniano. Otros trastornos de la retina incluyen las oclusiones venosas retinianas (por ejemplo, oclusiones venosas centrales o de rama), retinopatía por radiación, retinopatía de células falciformes, retinopatía del prematuro, enfermedad de Von Hippie Lindau, uveítis posterior, desprendimiento de retina crónico, síndrome de Irvine Gass, enfermedad de Eals, retinitis y/o coroiditis.

La bibliografía en el presente documento al término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se manifiestan.

Se dispone de sistemas de modelos animales que pueden usarse para evaluar la efectividad de los ligandos peptídicos

en la protección contra o el tratamiento de la enfermedad. El uso de sistemas de modelos animales se ve facilitado por la presente invención, que permite el desarrollo de ligandos polipeptídicos que pueden reaccionar de forma cruzada con dianas humanas y animales, para permitir el uso de modelos animales.

- 5 Los métodos para la prueba del lupus eritematoso sistémico (SLE) en ratones susceptibles son conocidos en la técnica (Knight y col. (1978) J Exp. Med., 147: 1653; Reinersten y col. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). La miastenia gravis (MG) se prueba en ratones hembra SJL/J mediante la inducción de la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom y col. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). La artritis se induce en una cepa susceptible de ratones mediante la inyección de colágeno tipo II (Stuart y col. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo
10 mediante el cual se induce artritis adyuvante en ratas susceptibles mediante inyección de proteína de choque térmico micobacteriano (Van Eden y col. (1988) Nature, 331: 171). La tiroiditis se induce en ratones mediante la administración de tiroglobulina como se describe (Maron y col. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) se produce de forma natural o puede inducirse en determinadas cepas de ratones, tales como las descritas por Kanasawa y col. (1984) Diabetologia, 27: 113. EAE en ratón y rata sirve como modelo para MS en seres
15 humanos. En este modelo, la enfermedad desmielinizante se induce mediante la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer y col., Eds., Grune y Stratton, Nueva York, paginas 179-213; McFarlin y col. (1973) Science, 179: 478; y Satoh y col. (1987) J; Immunol., 138: 179).

La invención se describe adicionalmente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

20

EJEMPLOS

Materiales y métodos

25 Clonación de bibliotecas de fagos

Las bibliotecas de fagos se generaron de acuerdo con Heinis y col., Nat Chem Biol 2009, 5(7), 502-7.

Selecciones de fagos

30

Las reservas de glicerol de las bibliotecas de fagos se diluyeron a una $DO_{600}=0,1$ en 500 ml de cultivos de 2YT/cloranfenicol (30 mg/ml) y los fagos se produjeron a 30 °C durante la noche (15-16 horas). Los fagos se purificaron y se modificaron químicamente como se describe en Heinis, y col., Nat Chem Biol 2009, 5(7), 502-7 se incubó hPK biotinilada (3 mg) (IHPKA, de plasma humano, Innovative Research, Novi, MI, EE. UU.) con 50 ml de perlas de estreptavidina magnéticas prelavadas (Dynal, M-280 de Invitrogen, Paisley, Reino Unido) durante 10 minutos a TA.
35 Las perlas se lavaron 3 veces antes del bloqueo con 0,5 ml de tampón de lavado (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, NaCl, 150 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $CaCl_2$ 1mM) que contenía BSA al 1 % y Tween 20 al 0,1 % durante 30 minutos a TA con rotación. El fago químicamente modificado (típicamente 10^{10} - 10^{11} u.t disuelto en 2 ml de tampón de lavado) fue conjuntamente bloqueado por adición de 1 ml de tampón de lavado que contenía BSA al 3 % y Tween 20 al 0,3 %. Las perlas
40 bloqueadas se mezclan luego con el fago modificado químicamente bloqueado y se incubaron durante 30 minutos en una rueda giratoria a TA. Las perlas se lavaron 8 veces con tampón de lavado que contenía Tween 20 al 0,1 % y dos veces con tampón de lavado antes de la incubación con 100 ml de glicina 50 mM, pH 2,2 durante 5 minutos. Los fagos eluidos se transfirieron a 50 ml de Tris-Cl 1 M, pH 8 para la neutralización, se incubaron con 30 ml de células TG1 a una $DO_{600}=0,4$ durante 90 minutos a 37 °C y las células se colocaron en placas grandes de 2YT/cloranfenicol. Se
45 realizaron una o dos rondas adicionales de selección usando los mismos procedimientos. En la segunda ronda de selección, se usaron perlas magnéticas recubiertas con neutravidina para evitar el enriquecimiento de péptidos específicos de estreptavidina. Las perlas de neutravidina se prepararon haciendo reaccionar 0,8 mg de neutravidina (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.) con 0,5 ml de perlas magnéticas activadas con tosilo (Dynal, M-280 de Invitrogen, Paisley, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

50

El procedimiento de selección convencional se usó con las bibliotecas 5x5 y 6x6 usando concentraciones decrecientes de calicreína humana biotinilada para las rondas uno y dos y luego calicreína biotinilada humana o de rata en las rondas tres y cuatro. La calicreína humana no es recombinante y, por lo tanto, la cadena pesada está presente, la calicreína de rata es recombinante, carece de la cadena pesada y posiblemente tenga una actividad menor de la esperada (basada en la actividad de la proteína humana). Como posiblemente haya menos actividad, la concentración
55 de la diana de rata no se redujo en lo que respecta a la proteína humana.

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

- 60 El dominio catalítico de la PK humana, de mono y de rata se expresó en células de mamífero como un precursor

- inactivo que tiene un propéptido conectado en el extremo N a través de un sitio de escisión proTEV al dominio catalítico. El vector de expresión se clonó y la proteína se expresó, activó y purificó como se describe a continuación. Los genes sintéticos que codifican una secuencia de señal PK, una etiqueta de polihistidina, un sitio de escisión proTEV, el dominio catalítico maduro de PK y un codón de parada se adquirieron en Geneart (Regensburg, Alemania)
- 5 (materiales complementarios). Se preparó ADN plásmido que contenía los genes sintéticos para la PK humana, de mono (*Macaca mulatta*) y de rata y el gen se transfirió al vector de expresión de mamíferos pEXPR-IBA42 (IBA Biotechnology, Göttingen, Alemania) usando el par de enzimas de restricción XhoI y HindIII. (Fermentas, Vilnius, Letonia) y ADN ligasa T4 (Fermentas). Los plásmidos ligados se transformaron en células electrocompetentes azules XL-1 (Stratagene, Santa Clara, EE. UU.) y se colocaron en placas de agar 2YT que contenían ampicilina (10 µg/ml).
- 10 Se produjo ADN de los tres vectores de expresión (denominados mPK, rPK y hPK) y las secuencias correctas se confirmaron mediante secuenciación de ADN (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

- Las tres calicreínas de plasma ortólogas se expresaron en células de mamífero de la siguiente manera. Se cultivaron 50 ml de células HEK-293 adaptadas a la suspensión en medio ExCell 293 libre de suero (SAFC Biosciences, St. Louis, MO) en presencia de glutamina 4 mM y el inhibidor de histona desacetilasa ácido valproico (3,75 mM) en forma orbital, se agitó el matraz de 100 ml a 180 rpm en una incubadora ISF-4-W (Kühner AG, Birsfelden, Suiza) a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂. Las células renales embrionarias (HEK-293) con una densidad celular alta (20 x 10⁶ células/ml) (Backlival, y col. Biotechnol Bioeng 2008, 99(3), 721-7) se transfectaron con los tres plásmidos (300 mg/ml) usando polietilenimina lineal (PEI, Polysciences, Eppenheim, Alemania). Al final de la fase de producción de 7 días,
- 20 las células se recogieron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Cualquier residuo de células adicionales se eliminó del medio mediante filtración a través de membranas de PES de 0,45 µm (250 ml de filtro superior de unión a baja proteína TPP). La proteína etiquetada con polihistidina se purificó mediante cromatografía de afinidad con Ni usando resina de Ni-NTA, tampón de lavado (NaCl 500 mM, Na₂HPO₄ 25mM, pH 7,4) y tampón de elución (NaCl 500 mM, Na₂HPO₄ 25mM, pH 7,4, imidazol 500 mM). La proteína se activó parcialmente con proTEV
- 25 (50 unidades) (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de afinidad con Ni y filtración en gel (columna PD10, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7).

Desarrollo de polipéptidos con actividad de unión mejorada

30 **Asignación al azar de posiciones individuales**

- Construcción de bibliotecas:* Con el fin de cartografiar los aminoácidos en los péptidos bicíclicos de unión a la calicreína, se construyó un conjunto de bibliotecas pequeñas. Para un biciclo compuesto por 2 bucles de 5 restos, se generaron 10 bibliotecas separadas, cada una con asignación al azar en un codón particular en la secuencia peptídica.
- 35 Los oligonucleótidos se diseñaron para cada biblioteca con el fin de mutar el ADN del genoma del fago mediante mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis incorporó la asignación al azar del codón de interés (cambio a NNS) y la eliminación de un sitio de restricción ApaL1 único de la secuencia del genoma del molde. El producto de mutagénesis se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAGEN QIAquick con elución en agua ultrapura. Cada biblioteca se usó para transformar por separado TG1 *E. coli* por electroporación con una máquina BioRad Micropulser (programa
- 40 Ec1) y una cubeta BioRad de 1 mm. Después de 1 hora de recuperación a 37 °C en 1 ml de medio SOC, los transformantes de la biblioteca se cultivaron durante la noche en 25 ml de caldo 2TY que contenía antibiótico para hacer crecer selectivamente solo los transformantes de la biblioteca. Las bacterias se recogieron por centrifugación y el ADN del fago de la biblioteca se purificó a partir de *E. coli* usando un kit QIAGEN Plasmid Plus Midi y se eluyó en agua destilada. El ADN purificado se digirió con ApaL1 durante 2 horas en el tampón 4 de New England Biolabs para
- 45 eliminar el material original. Después de la digestión, el ADN se volvió a purificar usando el kit de purificación de PCR QIAGEN (como anteriormente) y se usó para transformar TG1 (electroporación; como se describió anteriormente). Tras la recuperación de 1 hora en SOC, los transformantes se colocaron en placas de agar LB que contenían antibióticos selectivos y las colonias se dejaron crecer durante la noche a 37 °C.
- 50 *Ensayo de unión de clones individuales:* Las colonias transformantes de la biblioteca se seleccionaron al azar y se cultivaron como cultivos individuales en caldo 2TY que contenía antibiótico selectivo. Las colonias recogidas se secuenciaron con el ADN usando un secuenciador de ADN QIAGEN PyroMark Q96 para poner de manifiesto la sustitución de aminoácidos presente en cada clon. Cuando se aisló, se ensayó un clon de cada sustitución única para determinar la unión a la calicreína plasmática humana de la siguiente manera. El sobrenadante que contenía fagos se
- 55 recogió del cultivo y los fagos se ciclaron con tris bromometilbenceno (TBMB) basándose en los métodos de Heinis y col (Nature Chemical Biology, volumen 5, páginas 502-507 (2009)). Los fagos purificados de este procedimiento se ensayaron para determinar su unión a la calicreína plasmática humana biotinilada usando un ensayo de unión homogéneo basado en placa; la lectura de ensayo se midió en un lector de placa BMG Labtech Pherastar FS. Los datos de unión cuantitativa de muestras de ensayo por triplicado se promediaron (media) y se expresaron como
- 60 señal:fondo (donde el fondo era una muestra ensayada sin material diana). La señal:fondo se expresó como un % de

la muestra original paralela. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los ensayos que se muestran son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Los datos del ensayo se correlacionaron con las secuencias peptídicas. Las sustituciones marcadas en gris no se probaron (no se aisló un clon del muestreo aleatorio de la biblioteca). Se ensayó una muestra de un biciclo de no unión (arbitraria) en paralelo para ilustrar el valor inicial del ensayo.

Asignación al azar de dominios peptídicos

10 *Construcción de bibliotecas:* Las bibliotecas de fagos pequeñas se generaron de acuerdo con los métodos de Heinis y col, como se describe en 'Clonación de bibliotecas de fagos' anteriormente. El cebador sficx3ba se modificó de modo que la porción que codifica el biciclo se basó en una secuencia de ADN original de biciclo 5x5 o 6x6 (5x5: dos bucles de 5 restos, 6x6: dos bucles de 6 restos) con solo 4-6 codones asignados al azar a NNS. Los codones asignados al azar fueron los que codifican el dominio peptídico/motivo de interés.

15 *Ensayo de unión de clones individuales:* Se recogieron colonias transformantes de biblioteca, o colonias de salida de selección, y se cultivaron como cultivos individuales en caldo 2TY que contenía antibiótico selectivo. Las colonias recogidas se secuenciaron con el ADN usando un secuenciador de ADN QIAGEN PyroMark Q96 para poner de manifiesto la sustitución de aminoácidos presente en cada clon, y se ensayaron para determinar la unión a la calicreína plasmática humana de la siguiente manera. El sobrenadante que contenía fagos se recogió del cultivo y los fagos se ciclaron con tris-bromometilbenceno (TBMB) basado en los métodos de Heinis y col. (Nature Chemical Biology, volumen 5, páginas 502-507 (2009)). Los fagos purificados de este procedimiento se ensayaron para determinar su unión a la calicreína plasmática humana biotinilada usando un ensayo de unión homogéneo basado en placa; la lectura de ensayo se midió en un lector de placa BMG Labtech Pherostar FS. Los datos de unión cuantitativa de muestras de ensayo duplicadas se promediaron (media) y se expresaron como señal:fondo. Los datos de ensayo mostrados son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Los datos del ensayo se correlacionaron con las secuencias peptídicas.

Síntesis de péptidos

30 La síntesis de péptidos se basó en la química de Fmoc, usando un sintetizador de péptidos Symphony fabricado por Peptide Instruments. Se emplearon aminoácidos Fmoc convencionales (Sigma, Merck), con los siguientes grupos protectores de la cadena lateral: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Gln(Trt); His(Trt); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc); Tyr(tBu) (Sigma). El reactivo de acoplamiento fue HCTU (Pepceuticals), se empleó diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma) como base y se logró la desprotección con piperidina al 20 % en DMF (AGTC).

35 Las síntesis se realizaron a una escala de 100 μ moles usando 0,37 mmol/g de resina de amida de Fmoc-Rink AM (AGTC), se utilizaron aminoácidos Fmoc en un exceso de cuatro veces y la base fue de un exceso de cuatro veces con respecto a los aminoácidos. Los aminoácidos se disolvieron a 0,2 M en DMF, HCTU a 0,4 M en DMF y DIPEA a 1,6 M en N-metilpirrolidona (Alfa Aesar). Los tiempos de acoplamiento fueron generalmente de 30 minutos y los tiempos de desprotección 2 x 2,5 minutos. Fmoc-N-metilglicina (Fmoc-Sar-OH, Merck) se acopló durante 1 hora, y los tiempos de desprotección y acoplamiento para el siguiente resto fueron 20 minutos y 1 hora, respectivamente.

40 Después de la síntesis, la resina se lavó con diclorometano y se secó. La escisión de los grupos protectores de la cadena lateral y del soporte se realizó usando 10 ml de TFA/H₂O/iPr₃SiH/ditiotreitol 95:2,5:2,5:2,5 v/v/v/w durante 3 horas. Después de la escisión, la resina gastada se eliminó por filtración, y el filtrado se añadió a 35 ml de dietiléter que se había enfriado a -80 °C. El sedimento de péptidos se centrifugó, el sobrenadante etérico se desechó y el sedimento de péptidos se lavó con éter frío dos veces más. Los péptidos se resolubilizaron luego en 5-10 ml de acetonitrilo-agua y se liofilizaron. Se retiró una pequeña muestra para el análisis de la pureza del producto bruto mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF, Voyager DE Applied Biosystems). Después de la liofilización, los polvos de péptido se recogieron en 10 ml de hidrócloruro de guanidinio 6 M en H₂O, complementado con 0,5 ml de ditiotreitol 1 M, y se cargaron en una columna de HPLC preparativa C8 Luna (Phenomenex). Los disolventes (H₂O, acetonitrilo) se acidificaron con ácido heptafluorobutírico al 0,1 %. El gradiente varió entre 30-70 % de acetonitrilo en 15 minutos, a un caudal de 15/20 ml/minuto, usando un sistema de HPLC preparativa Gilson. Las fracciones que contenían material peptídico lineal puro (como se identificó por MALDI) se combinaron y se modificaron con trisbromometilbenceno (TBMB, Sigma). Para esto, el péptido lineal se diluyó con H₂O hasta ~35 ml, se añadieron ~500 μ l de TBMB 100 mM en acetonitrilo y la reacción se inició con 5 ml de NH₄HCO₃ 1 M en H₂O. La reacción se dejó transcurrir durante -30-60 minutos a TA y se liofilizó una vez que la reacción se había completado (determinado por MALDI). Después de la liofilización, el péptido modificado se purificó como anteriormente, mientras se reemplazaba la Luna C8 con una columna Gemini C18 (Phenomenex) y se cambiaba el ácido a ácido trifluoroacético al 0,1 %. Las fracciones puras que contenían el material correcto modificado con TMB se agruparon, se liofilizaron y se mantuvieron a -20 °C para su almacenamiento.

60

Todos los aminoácidos, a menos que se indique otra cosa, se usaron en las configuraciones L.

Los péptidos bicíclicos identificados directamente a partir de las selecciones de fagos generalmente contenían dos alaninas invariantes en los extremos N/C. Para los péptidos perseguidos en la estabilidad del plasma y los estudios farmacocinéticos, los péptidos se volvieron a sintetizar como se indica, carentes de las alaninas terminales, y se acetilaron en el extremo N como se indica.

Los péptidos usados para los estudios farmacocinéticos en el ejemplo 4 se liofilizaron a partir de HCl 10 mM en agua 3 veces para proporcionar las sales de clorhidrato de los compuestos. Las soluciones se dosificaron mediante bolo intravenoso a 1 mg/ml en Hepes 50 mM, pH 7,0, glicerol al 5 %, DMSO al 1,9 % para dos compuestos (Ac-(06-550) Aze3 HArg5 Sar₃-(D-Arg2)) y (06-259-02)-Sar₃-(D-Arg2)) a 5mg/kg en ratas Spraguely Dawely. Se tomaron muestras de sangre en serie (~0,2 ml) en tubos de EDTA en los puntos de tiempo indicados, y el plasma se separó por centrifugación y se congeló a -20 C para el análisis. Empleando técnicas bioanalíticas convencionales, las muestras de plasma se analizaron luego y se cuantificaron para determinar el compuesto remanente original usando un Waters, Xevo TQS LC-MS. Los parámetros de PK se determinaron usando el paquete de software PK Solutions 2.0 de Summit Research Services.

Los péptidos usados para los estudios en los ejemplos 5 y 6 se obtuvieron a partir de fracciones puras (>95 %) recogidas de las purificaciones en fase inversa ejecutadas en presencia de ácido acético al 0,5 %, que, después de la liofilización, proporcionó las sales de acetato de los péptidos.

Ensayos de enzimas

Los ensayos de enzimas funcionales se realizaron en Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 1mM y 1mg/ml de BSA (todo de Sigma UK) pH 7,4 a 25 °C en placas de negro sólido de 96 o 384 pocillos. En resumen, se incubaron calicreínas plasmáticas humanas 26,5 pM (adquiridas en Stratech, Reino Unido) o calicreínas plasmáticas de rata 13,25 pM (expresadas y purificadas de forma interna) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de péptido de prueba durante 15 minutos antes de la adición del sustrato fluorogénico Z PheArg-AMC (Enzo Lifesciences Reino Unido) hasta una concentración final de ensayo de 100 µM en DMSO al 4 %. La liberación de AMC se midió usando un Pherastar FS (BMG Labtech), excitación 360 nm, emisión 460 nm. La velocidad de la fase lineal de la reacción, típicamente de 5 a 45 minutos, se calculó en el software de análisis de datos MARS (BMG labtech). Luego se usó la velocidad para calcular la Cl₅₀ y la K_i en Prisma (GraphPad). Se usó una ecuación de regresión no lineal de inhibición de cuatro parámetros para calcular la Cl₅₀. La ecuación de K_i de ajuste de sitio único se usa para calcular la K_i, que restringe la K_i a la K_m para el sustrato que es de 150 µM para la enzima humana y de 200 µM para el ortólogo de rata. Todos los valores K_i/Cl₅₀ son la media de al menos dos experimentos independientes, y al menos tres para péptidos con valores de K_i inferiores a 1 nM. Para la calicreína de conejo se empleó entre 7 y 14 pM de enzima con sustrato 33 µM con una K_m de 50 µM.

Los péptidos se disolvieron como las sales de TFA en su forma de polvo, y las soluciones madre se prepararon generalmente en agua. Todas las soluciones se centrifugaron y filtraron (filtros de jeringa de 20 µm) antes de medir la absorción a 280 nm. Los coeficientes de extinción se calcularon basándose en el contenido de Trp/Tyr del péptido y el de TMB (el núcleo de TMB, cuando está contenido en un péptido, tiene un coeficiente de extinción de ~300 M⁻¹cm⁻¹).

Perfil de estabilidad en plasma

Método n.º 1:

Se desarrolló un ensayo rápido del perfil de estabilidad en plasma que empleó la detección espectrométrica de masas (MALDI-TOF, Voyager DE, Applied Biosystems) de la masa original, hasta el momento en que la masa del péptido original ya no era observable. Específicamente, se incubaron 200 µM de péptido en presencia de plasma de rata o humano al 35 % (Sera labs, usando citrato como anticoagulante) a 37 °C, que se complementó con 1 x PBS (derivado de una reserva de 10 x PBS, Sigma). En diversos puntos de tiempo (es decir, t = 0, 3, 24 horas, después diariamente hasta 10 días), se añadió 2 µl de muestra a 18 µl de bicarbonato de amonio 30 mM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo:H₂O. Se congelaron muestras a -80 °C hasta el momento del análisis. Para el análisis espectrométrico de masas que determina la ventana de detección aproximada del péptido, la muestra diluida en acetonitrilo:H₂O de un punto de tiempo dado, se manchó directamente (0,7µl) en la placa MALDI. La matriz (ácido alfa cianocinámico, Sigma, preparada como una solución saturada en acetonitrilo: agua 1:1 que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %) se colocó en capas sobre la muestra (1 µl). Con un ajuste de intensidad de láser similar en el MALDI TOF, el tiempo podría luego determinarse hasta que el péptido original ya no fuera detectable. Cabe señalar que este es un ensayo cualitativo que

sirve para detectar cambios relativos en la estabilidad del plasma.

Método n.º2

5 Para obtener datos de estabilidad más rápidamente, los péptidos también se evaluaron en plasma al 95 %. En este caso, se omitió PBS y se diluyó directamente una reserva de péptidos de 1-5 mM (en DMSO) en plasma (es decir, una reserva de 2,5 µl en plasma de 47,5 µl), proporcionando una concentración final de 50 µM. Se tomaron muestras de 5 µl en puntos de tiempo adecuados y se congelaron a -80 °C. Para el análisis, las muestras se descongelaron, se mezclaron con 25 µl de acetonitrilo:metanol:agua 3:3:1 y se centrifugaron a 13 k durante 5 minutos. Se aspiraron 5 µl del sobrenadante que contenía péptidos y se mezclaron con bicarbonato de amonio 30 mM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo:H₂O. Luego se manchó 1µl de esto en la placa MALDI y se analizó como se describe anteriormente. Como se mencionó anteriormente, se debe tener en cuenta que este es un ensayo cualitativo que sirve para detectar cambios relativos en la estabilidad del plasma.

15 Método n.º3

Para obtener la estabilidad del plasma cuantitativamente, se enviaron soluciones peptídicas madre (1 mM en DMSO) a Biofocus, Reino Unido, quien realizó el análisis. Los péptidos se diluyeron a 100 µM con agua y se diluyeron 1:20 en plasma (concentración final de 5 µM, con el plasma al 95 %), se tomaron muestras según correspondía, se precipitaron como antes y se cuantificaron por LC-MS usando un Waters Xevo TQ-MS.

Ejemplo 1: Identificación de péptidos bicíclicos de unión a la calicreína con selectividad de homólogo favorable y reactividad cruzada de especies

25 (a) Identificación de secuencias candidatas humanas y de rata novedosas, potentes y de reactividad cruzada

Para cualquier péptido bicíclico terapéutico dado, sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas deben evaluarse en especies animales preclínicas. Las especies preclínicas comunes incluyen ratas, ratones, conejos, perros, cerdos enanos y monos cynomolgus.

30 Debido a la alta selectividad general de los péptidos bicíclicos, que en parte se ve facilitada por su gran área de contacto con la proteína diana, los péptidos bicíclicos de alta afinidad con una proteína diana humana no pueden reaccionar de forma cruzada con la misma proteína diana derivada de una especie preclínica dada, lo que dificulta la evaluación preclínica de dicho candidato. Un ejemplo incluye PK15 (como se divulga en el documento WO 35 2009/098450) que es un potente péptido bicíclico (tamaño de bucle 6x6) con una K_i de ~1,2 nM para la calicreína humana. La potencia de la calicreína de rata se reduce notablemente, a una K_i de ~500 nM, lo que hace que este candidato no sea adecuado para la evaluación clínica.

40 Con el fin de identificar péptidos bicíclicos candidatos 5x5 y 6x6 con alta potencia a la calicreína humana, mientras que conservan una potencia apreciable a la calicreína de rata, se realizaron selecciones de fagos donde las calicreínas de rata y humana se alternaron como cebos durante cada ronda de selección. Al ajustar las concentraciones de cebo durante las rondas de selección, se pudieron identificar diferentes secuencias candidatas con reactividad cruzada. Se seleccionó una muestra de cada salida de selección para determinar su unión a la calicreína humana, y posteriormente se secuenció.

45 Específicamente, las dos primeras rondas de selección se realizaron con calicreína humana, a concentraciones diana que varían entre 3 y 100 nM, seguidas de dos rondas de selección con calicreína de rata, a concentraciones diana de 30 nM.

50 La detección de clones de fagos individuales para la unión a la calicreína en el ensayo de detección homogéneo puso de manifiesto varias secuencias únicas con un aumento de hasta 50 veces la señal sobre el fondo. Estos se prepararon como péptidos sintéticos y se evaluó para determinar la inhibición de las calicreínas humanas, de rata y de conejo (tabla 1).

55 Tabla 1: Resumen de novedosos candidatos de biciclo con reactividad cruzada

Nombre del péptido bicíclico	SEQ ID No	Humana (K _i , nM)	Rata (K _i , nM)	Conejo (K _i , nM)	Secuencia	Formato
06-254	68	5,3	42,5	280		6x6

					<u>ACKNYWNP</u> CDLVTISCA	
06-255	69	3,4	18,9	342	ACRNYWNPCTLINITGA	6x6
06-256	70	6,6	2781,4	1457	ACQKFESRCRVDTRYCA	6x6
06-257	71	36,1	159,1	nd	ACPLSDTLCYRRMPPCA	6x6
06-258	72	4,3	5,2	331,3	ACPYPFRCLHENLCA	5x5
06-259	73	20,1	6,2	nd	ACNTWNPWCGWVGGFCA	6x6
06-261	74	0,4	4,0	1037	ACNNFPFRCVYYPDICA	6x6
<i>Las cisteínas invariantes están sombreadas en gris y los restos conservados para cada candidato están subrayados.</i>						

Varios de los candidatos muestran una buena reactividad cruzada entre las calicreínas de rata y humana: 06-254, 06-255, 06-258 y 06-261 (tabla 1). Al evaluar los resultados de la secuencia para cada familia de candidatos, los restos semiconservados podrían identificarse y subrayarse (tabla 1).

5

06-254 y 06-255 comparten un primer bucle casi idéntico, pero sus segundos bucles difieren. 06-258 es la única secuencia candidata con reactividad cruzada que se identificó que contiene 5 aminoácidos tanto en el bucle 1 como en el bucle 2 (5x5).

10 **(b) Maduración por afinidad de secuencias de péptidos bicíclicos con reactividad cruzada a la calicreína de rata-humana**

Se seleccionaron candidatos peptídicos bicíclicos (tabla 1) para la maduración por afinidad. Los restos de consenso se extrapolaron de los resultados de la selección inicial. Para las maduraciones por afinidad, los restos que parecían

15 estar fuera de la región de consenso se asignaron al azar, de acuerdo con la información de la tabla 2.

Tabla 2: Maduración por afinidad de bibliotecas para cada candidato péptido bicíclico de unión a la calicreína

06-254															
Finalidad	Fijar el motivo previsto (subrayado); asignar al azar la secuencia circundante ("X")														
Secuencia original	C	<u>K</u>	<u>N</u>	Y	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	C	D	<u>L</u>	V	T	I	S	C
Biblioteca	C	<u>K</u>	<u>N</u>	X	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	C	D	<u>L</u>	X	X	X	X	C
06-256															
Finalidad	Fijar el motivo previsto (subrayado); asignar al azar la secuencia circundante ("X")														
Secuencia original	C	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	C	R	V	D	T	R	Y	C
Biblioteca	C	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	C	X	X	X	X	X	X	C
06-258															
Finalidad	Fijar el motivo previsto (subrayado); asignar al azar la secuencia circundante ("X")														
Secuencia original	C	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	C	L	H	E	N	L	C		
Biblioteca	C	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	X	<u>R</u>	C	X	X	X	X	X	C		
06-259															
Finalidad	Fijar el motivo previsto (subrayado); asignar al azar la secuencia circundante ("X")														
Secuencia original	C	<u>N</u>	T	<u>W</u>	<u>N</u>	P	<u>W</u>	C	G	W	V	G	G	F	C
Biblioteca	C	<u>N</u>	X	<u>W</u>	<u>N</u>	P	<u>W</u>	C	X	X	X	X	X	X	C
06-261															
Finalidad	Asignar al azar el motivo previsto (subrayado, ("X")); fijar la secuencia circundante														
Secuencia original	C	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	C	V	Y	Y	P	D	I	C
Biblioteca	C	<u>N</u>	<u>N</u>	X	X	X	X	C	V	Y	Y	P	D	I	C

Números de ID de secuencia: 06-254 original (SEQ ID NO:23), biblioteca (SEQ ID NO:64); 06-256 original (SEQ ID NO:49), biblioteca (SEQ ID NO:65); 06-258 original (SEQ ID NO:52), biblioteca (SEQ ID NO:66); 06-259 original (SEQ ID NO:10), biblioteca (SEQ ID NO:67); 06-261 original (SEQ ID NO:54), biblioteca (SEQ ID NO:99).

Los restos fuera del motivo de unión más conservado fueron asignados al azar ("X"). En el caso de 06-261, su motivo FPFPR similar a 06-34-18 (SEQ ID NO:100) fue asignado al azar, mientras que los restos circundantes se fijaron.

5

El resultado de las secuencias de las bibliotecas maduras por afinidad se muestra en dos ejemplos, 06-254 y 06-259:

Resultado de la secuencia 06-254:

10

La tabla 3 muestra las variantes 06-254 más potentes identificadas por el ensayo de detección.

Tabla 3: Resultado de la secuencia de la biblioteca madurada por afinidad 06-254

	PK15	SEQ ID No	Control	S:F
	06-254 original	23	CKNYWNPCLVTISC	14,05
Las 23 06-254 superiores	06-254-01	24	CKNYWNPCLVITTC	61,90
	06-254-02	25	CKNYWNPCLVPGPC	46,65
	06-254-03	26	CKNYWNPCLVMDTC	56,70
	06-254-F4	27	CKNYWNPCLVQDAC	46,42
	06-254-B3	28	CKNYWNPCLVSIKC	61,60
	06-254-G3	29	CKNYWNPCLVPTGC	37,55
	06-254-H4	30	CKNYWNPCLVQIHC	38,86
	06-254-G2	31	CKNYWNPCLVIGTC	46,33
	06-254-A4	32	CKNYWNPCLVDTFC	32,38
	06-254-G4	33	CKNYWNPCLVDAQC	33,15
	06-254-D3	34	CKNFWNPCLVPIISC	20,27
	06-254-E2	35	CKNYWNPCLVIWDC	31,45
	06-254-F5	36	CKNYWNPCLVPLDC	38,67
	06-254-E5	37	CKNYWNPCLVLESTC	29,71
	06-254-D1	38	CKNYWNPCLVRPPC	33,64
	06-254-B9	39	CKNYWNPCLVLLGIAC	37,98
	06-254-E3	40	CKNYWNPCLVVDIC	30,17
	06-254-D6	41	CKNYWNPCLVPLDMC	24,36
	06-254-H3	42	CKNYWNPCLVIADLC	25,21
	06-254-A7	43	CKNYWNPCLVLLHVRC	26,12
06-254-C1	44	CKNYWNPCLVIAPYC	27,41	
06-254-E6	45	CKNYWNPCLVLYSTC	23,47	
06-254-B1	46	CKNYWNPCLVPLDLC	9,99	

S:F se refiere a la señal:fondo. Los aglutinantes potentes se identificaron mediante el ensayo de detección homogéneo, y se compararon a su secuencia original (06-254) y el aglutinante de la calicreína 6x6 PK15 (documento WO 2009/098450).

Los candidatos más potentes (06-254-01, 06-254-02 y 06-254-03) se seleccionaron para la síntesis de péptidos y se evaluaron para determinar la inhibición de la calicreína de ratas y humanos.

5

Resultado de la secuencia 06-259:

La tabla 4 muestra las variantes 06-259 más potentes identificadas por el ensayo de detección.

Tabla 4: Resultado de la secuencia de la biblioteca madurada por afinidad 06-259

	PK-15	SEQ ID No	Control	S:F
Las 10 06-259 superiores	06-259 (original)	10	CNTWNPWCGWVGGFC	1,17
	06-259-01	11	CNHWNPWCSVEPPVC	51,67
	06-259-02	12	CNTWNPWCPWDAPLC	43,49
	06-259-03	13	CNHWNPWCSADPPIC	49,82
	06-259-04	14	CNYWNPWCPWDAPLC	-
	06-259-F1	15	CNHWNPWCSADPPRC	38,05
	06-259-E2	16	CNHWNPWCPADIPVC	37,69
	06-259-H3	17	CNHWNPWCSDDPYIC	38,73
	06-259-H4	18	CNHWNPWCSDDPPVC	33,62
	06-259-A6	19	CNYWNPWCS DTRIGC	22,58
	06-259-F2	20	CNTWNPWCSWPDIDC	22,71

S:F se refiere a la señal:fondo. Los aglutinantes potentes se identificaron mediante el ensayo de detección homogéneo, y se compararon a su secuencia original (06-259) y el aglutinante de la calicreína 6x6 PK15 (documento WO 2009/098450).

Los candidatos más potentes (06-259-01, 06-259-02, 06-259-03 y 06-259-04) fueron seleccionados para la síntesis de péptidos y la medición de la afinidad a la calicreína de ratas y humanos.

5

Las potencias *in vitro* y la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Resumen de las constantes de inhibición (K_i) hacia la calicreína humana, de rata y de conejo

Nombre del biciclo	SEQ ID No	Humana (K _i , nM)	Rata (K _i , nM)	Conejo (K _i , nM)	Secuencia	Formato
06-254	68	5,3	42,5	280	ACKNYWNPGLVTISCA	6x6
06-254-01	75	1,0	15,9	nd	ACKNYWNPGLIETTCA	6x6
06-254-02	76	0,5	7,6	nd	ACKNYWNPGLIPGPCA	6x6
06-254-03	77	1,4	10,1	nd	ACKNYWNPGLVMDTCA	6x6
06-255	69	3,4	18,9	342	ACRNYWNPCTLINITCA	6x6
06-256	70	6,6	2780	1457	ACQKFESRCRVDTRYCA	6x6
06-257	71	36,1	159,1	nd	ACPLSDTLCYRRMPPCA	6x6
06-258	72	4,3	5,2	331	ACPYPFRCLHENLCA	5x5

06-259	73	20,1	6,2	nd	ACNTWNPWCGWVGGFCA	6x6
06-259-01	78	2,4	10,4	nd	ACNHWNPWCSVEPPVCA	6x6
06-259-02	79	2,3	0,2	1448	ACNTWNPWCPWDAPLCA	6x6
06-259-03	80	1,4	8,2	nd	ACNHWNPWCSADPPICA	6x6
06-259-04	81	3,4	6,7	nd	ACNYWNPWCPWDAPLCA	6x6
06-261	74	0,4	4,0	1037	ACNNFPFRVCVYYPDICA	6x6
Los candidatos de péptidos bicíclicos con velocidades de disociación inferiores a 10/20 nM hacia la calicreína humana/de rata, respectivamente, se indican en negrita.						

En total, hay varios candidatos que muestran altas potencias y buena reactividad cruzada entre la calicreína de rata y humana, tales como 06-254-01, 06-254-02, 06-254-03, 06-255, 06-258, 06-259-01, 06-259-02, 06-259-03, 06-259-04 y 06-261 (en negrita, véase la tabla 5).

5

Ejemplo 2: El análisis de estabilidad en plasma de péptidos bicíclicos que se unen a la calicreína pone de manifiesto candidatos principales prometedores

En el ejemplo 1, se identificaron varias secuencias candidatas bicíclicas novedosas con altas potencias hacia las ratas y seres humanos. Se seleccionó el miembro más potente de cada familia para la comparación de las estabildades en plasma de ratas y seres humanos. Estos fueron 06-254-02, 06-255, 06-259-02 y 06-261. La selección inicial usando el método n.º 1 indicó que 06-255 y 06-259-02 son más estables que los péptidos bicíclicos restantes, según lo determinado por una ventana más larga de detección de estos dos péptidos (hasta 10 días, cifras no mostradas). Los péptidos restantes no fueron más detectables después de 2-3 días, mostrando una estabilidad baja similar a la secuencia no modificada de 06-34-18. 06-255 y 06-259-02, ambos sufrieron un perfil de solubilidad deficiente y, por lo tanto, se volvieron a sintetizar con una extensión C-terminal solubilizante (Sar₃-(D-Arg)₂(SEQ ID NO:98)). Sarcosinas (Sar₃) por la presente sirve como un espaciador molecular, mientras que las D-argininas transmiten mayor solubilidad acuosa a la molécula debido a su naturaleza fuertemente iónica y en complejo con agua a pH fisiológico.

20 La extensión de solubilización no impidió significativamente las constantes de inhibición de la enzima, como se indica en la tabla 6.

Tabla 6: Resumen de las constantes de inhibición (K_i) hacia la calicreína humana, de rata y de conejo con extensión solubilizante

Nombre del biciclo	SEQ ID No	Humana	Rata	Conejo	Secuencia	Peso molecular
Ac-(06-255)	82	3,7	7,7	342	Ac-CRNYWNPCTLINITC	1969,32
Ac-(06-255)-Sar3-(DArg2)	83	1,2	7,4	251	Ac-CRNYWNPCTLINITCA-Sar3-DArg2	2566,01
Ac-(06-259-02)	84	5,9	3,8	nd	Ac-CNTWNPWCPWDAPLC	1961,26
Ac-(06-259-02)-Sar3-(DArg2)	85	0,8	2,1	1448	Ac-CNTWNPWCPWDAPLCA-Sar3-DArg2	2557,95

25

Los péptidos se ensayaron en plasma humano y de rata en las condiciones descritas en el método n.º 2. Las estabildades se evaluaron comparativamente frente a 06-34-18, que tiene un t_{1/2} cuantitativo de 2,3 horas en plasma

de rata, y de 2 horas en plasma humano (documento WO 2013/050616). Las figuras 1 y 2 demuestran que el candidato de péptido bicíclico 06-259-02 tiene un perfil de estabilidad en plasma particularmente favorable, ya que es significativamente más estable tanto para el plasma humano como para el de rata en comparación con el 06-255 y el 06-34-18.

5

Ejemplo de referencia 3: El injerto de bucles peptídicos entre diferentes candidatos de péptidos bicíclicos genera novedosas construcciones quiméricas con propiedades favorables

El primer bucle de la secuencia 06-34-18 previamente divulgada (documento WO 2013/050616, secuencia: CSWPARCLHQDLC (SEQ ID NO: 86)) comparte un motivo FPR similar (SEQ ID NO: 100, subrayado) con el

- 10 péptido 06-261 identificado en este documento (secuencia: CNNFPFRVCVYYPDIC (SEQ ID NO: 54)). Sin embargo, se describe que 06-34-18 contiene dos sitios de reconocimiento proteolítico que hacen que el péptido sea lábil frente a las proteasas del plasma sanguíneo y, por lo tanto, no es adecuado como agente terapéutico inhibidor de la calicreína. Estos sitios incluyen restos Arg5 e His7 de 06-34-18 (CSWPARCLHQDLC (SEQ ID NO: 86)) (subrayado y en negrita). En la secuencia 06-261 actualmente divulgada (ejemplo 1), el sitio de reconocimiento proteolítico de
15 histidina equivalente en el bucle 2 está ausente.

Debido a la falta de His7 en el segundo bucle de 06-261 (secuencia: VYYPDI (SEQ ID NO: 87)), los inventores de la presente invención reemplazaron el segundo bucle proteolíticamente lábil, que contiene histidina, de 06-34-18 con el
20 segundo bucle de 06-261 con la esperanza de producir un péptido quimérico completamente potente con estabilidad proteolítica mejorada en el bucle 2. Específicamente, esta secuencia comprende el primer bucle de 06-34-18 (secuencia: SFPYR (SEQ ID NO: 88)) y el segundo bucle de 06-261 (secuencia: VYYPDI (SEQ ID NO: 87)), que produce la secuencia completa quimérica CSFPYR CVYYPDIC (SEQ ID NO: 55) (o el equivalente a WPAR, es decir, CSWPARCVYYPDIC (SEQ ID NO: 89)). Este péptido quimérico se denomina 06-550 y tiene 5 restos en el bucle 1 y 6 restos en el bucle 2.

25

Había sido previamente divulgado (documento WO2013/050616) que la inestabilidad proteolítica inducida por Arg5 en 06-34-18 puede eliminarse o reducirse reemplazando Arg5 con N- α -metil arginina (NMe-Arg) u Homoarginina (HArg). Además, se puede introducir una sustitución conjunta que mejora la afinidad del ácido L-azetidina carboxílico (Aze) en la posición 3, reemplazando a la prolina 3 original.

30

Como el péptido de biciclo quimérico 06-550 conserva el primer bucle de 06-34-18, se implementaron modificaciones idénticas en Arg5/Pro3 a HArg5/Aze3, y este péptido se denomina 06-550 Aze3 HArg5.

- 35 Sin embargo, debido a la ausencia de una histidina 7 que mejora la solubilidad en la secuencia, 06-550 (o 06-550 Aze3 HArg5) mostraron una solubilidad acuosa significativamente reducida en comparación con 06-34-18. Para mejorar la solubilidad acuosa de estas moléculas, se sintetizaron derivados que contenían extensiones C-terminales que comprenden espaciadores de sarcosinas₃ seguidos de dos D-argininas. La inclusión de las D-argininas condujo a una solubilidad acuosa más favorable de estos péptidos.

- 40 Las constantes de inhibición de la calicreína de estos péptidos se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Constantes de inhibición de péptidos 06-550 hacia la calicreína humana, de rata y de conejo

Nombre del biciclo	SEQ ID No	Humana (Ki, nM)	Rata (Ki, nM)	Conejo (Ki, M)	Secuencia	Formato
Ac-(06-550)	90	0,9	9,3	610	Ac-CSFPYRCVYYPDIC	5x6
Ac-(06-550) HArg5	91	1,8	25	nd	Ac-CSFPY[HArg]CVYYPDIC	5x6
Ac-(06-550) Aze3 HArg5	92	0,5	5,6	nd	Ac-CSF[Aze]Y[HArg]CVYYPDIC	5x6
Ac-(06-550) NMe-Arg5	93	2,66	nd	nd	Ac-CSFPY[Nme-Arg]CVYYPDIC	5x6
Ac-(06-550) Aze3 NMe-Arg5	94	53	nd	nd	Ac-CSF[Aze]Y[NMe-Arg]CVYYPDIC	5x6

Ac-(06-550)-Sar ₃ -(DArg ₂)	95	2,1	24	207	Ac-CSFPYRCVYYPDICA-Sar ₃ -(DArg) ₂	5x6
Ac-(06-550)-Sar ₃ -(DArg ₂) Aze3HArg5	96	0,4	8,2	2650	Ac-CSF[Aze]Y[HArg]CVYYPDICA-Sar ₃ -(DArg) ₂	5x6

De los datos queda claro que la modificación de Aze3-HArg5 es bien tolerada, ya que tanto las afinidades humanas como las de rata son altas. La modificación N-metil es menos adecuada. Igualmente, la extensión de solubilización de Sar₃-(D-Arg₂) (SEQ ID NO:98) es bien tolerada, ya que las potencias permanecen sin cambios en comparación con los péptidos que carecen de esta extensión.

Perfil comparativo de estabilidad en plasma de derivados 06-550

La estabilidad del péptido bicíclico "Ac-(06-550)-Sar₃-(DArg₂) Aze3 HArg5" (tabla 7) se evaluó para determinar la estabilidad relativa en plasma humano y de rata de acuerdo con el método n.º 2 (figura 3) y en comparación con el 06-34-18 inestable (figuras 1 y 2).

En el plasma de ambas especies, el péptido muestra una alta estabilidad, ya que se observan pocos productos de degradación. En comparación, la masa original del 06-34-18 inestable ha desaparecido en gran medida durante el mismo curso de tiempo (los datos se muestran en el ejemplo 2). Por lo tanto, el concepto de combinar bucles derivados de secuencias originales separadas (06-261 y 06-34-18) ha dado como resultado una molécula novedosa, quimérica, potente y proteolíticamente estable.

Ejemplo 4: Comportamiento farmacocinético *in vivo* de péptidos bicíclicos inhibidores de la calicreína seleccionados

El péptido Ac-(06-550)-Sar₃-(D-Arg)₂ Aze3 HArg5 (que contiene las modificaciones de estabilización y afinidad que mejoran Aze3 y HArg5, y una extensión C-terminal solubilizante Sar₃-(D-Arg)₂) (SEQ ID NO: 98) y Ac-(06-259-02)-Sar₃-(D-Arg)₂ se seleccionaron para la evaluación farmacocinética en ratas. Los péptidos se inyectaron por vía intravenosa en una solución tamponada a 1 mg/ml a 5 mg/kg de ratas Sprague Dawley, y se tomaron muestras de la sangre y se analizaron para determinar las concentraciones de péptidos en varios puntos de tiempo posteriores a la inyección.

Ambos péptidos mostraron una eliminación entre 17 (06-550) y 7 ml/min/kg (06-259-02) (tabla 8, figura 4), que está cerca de la tasa de filtración renal publicada en ratas (~8-9 ml/min/kg) [Jobin J, Bonjour JP, (1985) Am J Physiol.; 248 (5 Pt 2): F734-8].

Esto subraya la estabilidad proteolítica mejorada de Ac-(06-550)-Sar₃-(D-Arg)₂ Aze3 HArg5, que contiene las dos modificaciones estabilizadoras Aze3 y HArg5 y una secuencia en el bucle dos que es inherentemente proteolíticamente estable.

En el caso de Ac-(06-259-02)-Sar₃-(D-Arg)₂, la secuencia natural es suficientemente proteolíticamente estable en la rata, de modo que su eliminación se debe principalmente a la excreción renal.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos de Ac-(06-550)-Sar₃-(D-Arg)₂Aze3 HArg5 y Ac-(06-259-02)-Sar₃-(D-Arg)₂ en ratas

Nomenclatura del péptido bicíclico	Eliminación (ml/min/kg)	Vss (l/kg)	t _{1/2} eliminación (min)
Ac-(06-550)-Sar ₃ -(D-Arg) ₂ Aze3 HArg5	17	0,4	136
Ac-(06-259-02)-Sar ₃ -(D-Arg) ₂	7,2	0,8	78

Ejemplo de referencia 5: Análisis farmacocinético *in vivo* después de la inyección intravítrea de péptidos bicíclicos inhibidores de la calicreína seleccionados

En este análisis, el péptido Ac-(06-550)-Sar₃-(D-Arg)₂ Aze3 HArg5 (denominado en este estudio biciclo 1 y que contiene las modificaciones de estabilización y afinidad que mejoran Aze3 y HArg5, y una extensión C-terminal solubilizante Sar₃-(D-Arg)₂) (SEQ ID NO: 98); véase los ejemplos 3 y 4 del presente documento) se evaluó comparativamente contra el péptido Ac-(06-34-18) Phe2 Aze3 Tyr4 HArg5 Ala(ψCH₂NH)₆ (denominado en este estudio biciclo 2 y que se divulga en la tabla 26b y la figura 22 del documento PCT/EP2014/057440). Se anestesiaron

conejos blancos de Nueva Zelanda (2-3 kg) y se administraron ambos péptidos mediante inyección intravítrea (100 µg/ojo) de acuerdo con el protocolo descrito en la tabla 9.

Tabla 9: Protocolo de administración para la inyección vítrea

Número de grupo	Material de prueba		Volumen de dosis (µl/ojo)	Concentración/ojo (mg/ml)	Tiempo de finalización diana (posterior a la dosis)	N.º de machos
	OI	OD				
1	Vehículo	Vehículo	50	0	1h	3
2	Biciclo 1	Biciclo 2	50	2	5 min	3
3	Biciclo 1	Biciclo 2	50		15 min	3
4	Biciclo 1	Biciclo 2	50		30 min	3
5	Biciclo 1	Biciclo 2	50		1 h	3
6	Biciclo 1	Biciclo 2	50		4 h	3
7	Biciclo 1	Biciclo 2	50		8 h	3
8	Biciclo 1	Biciclo 2	50		24 h	3
9	Biciclo 1	Biciclo 2	50		48 h	3

OI = ojo izquierdo; OD = ojo derecho;
 Min = minutos; h=horas.
 Vehículo = tampón de acetato de sodio 10 mM pH 5,0 en agua que contiene glicerol al 2,5 %

5

Después de un tiempo adecuado, los conejos se sacrificaron y se tomaron muestras de humor vítreo, humor acuoso, retina y plasma. Las muestras se analizaron mediante LC-MS para determinar la concentración del péptido. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 5 donde se puede observar que ambos péptidos se eliminaron lentamente del humor vítreo, con semividas de eliminación de 20-30 h. Esto es significativamente más lento que la eliminación de moléculas pequeñas tales como el antibiótico ciprofloxacina (semivida informada en vítreo de conejo normal de 2,2 horas; Pearson y col. 1993, Retina 13:326-330).

10

Ejemplo 6: Efecto de péptidos bicíclicos inhibidores de la calicreína seleccionados sobre el edema de la pata inducido por carragenina

15

En este análisis, el péptido Ac-(06-259-02)-Sar₃-(D-Arg)₂ (denominado en este estudio biciclo 3; véase el ejemplo 2 de este documento) se evaluó comparativamente contra el péptido Ac-(06-34-18) Phe₂ Aze₃ Tyr₄ HArg₅ Ala(ψCH₂NH)₆ (denominado en este estudio biciclo 2 y que se divulga en la tabla 26b y la figura 22 del documento PCT/EP2014/057440). Se indujo la inflamación en ratas Sprague-Dawley macho (n = 10 por grupo) mediante la inyección de 100 µl de solución de carragenina al 1 % en la región subplantar de la pata trasera derecha. Los animales recibieron tratamiento con los péptidos e indometacina de acuerdo con la tabla 10:

20

Tabla 10: Pauta posológica para el análisis inducido por la carragenina

Grupo	Tratamiento	Dosis [mg/kg]	Vía de la dosis	Tiempo*
1	Vehículo	N/A	ip	-15min, 2h45min
2	Indometacina	5	ip	-15min,
3	Biciclo 2	15	ip	-15min, 2h45min
4	Biciclo 3	15	ip	-15min, 2h45min

* tiempos de dosificación en relación con la administración de carragenina
 ip =intraperitoneal
 Vehículo = tampón de acetato de sodio 50 mM pH 5,0, PEG400 al 20 % y Kolliphor EL al 10 %

25

A las 1, 2, 4 y 6 horas posteriores a la administración de carragenina, se midió el volumen de la pata mediante el método de desplazamiento de agua. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de 2 vías con medidas repetidas (GraphPad Prism).

Los resultados de este estudio se muestran en la figura 6 donde se puede observar que ambos péptidos inhibieron la hinchazón de la pata inducida por la carragenina en todos los puntos de tiempo. El tratamiento con péptido o con el control positivo, indometacina, dio como resultado una reducción altamente significativa en la hinchazón de la pata (p <0,001). Es importante destacar que el grado de inhibición era comparable entre los dos péptidos y la indometacina, este último considerado como el resto terapéutico convencional de oro en este modelo.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bicycle Therapeutics Limited
- <120> NOVEDOSOS POLIPÉPTIDOS
- 5 <130> BIC-C-P1645PCT
- <150> GB1318941.0
- <151> 28/10/2013
- <150> GB1410265.1
- <151> 10/06/2014
- 10 <160> 100
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- 15 <213> Artificial
- <220>
- <223> Ligando peptídico sintético
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 20 <222> (3)..(3)
- <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (9) .. 9)
- 25 <223> Xaa representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V o un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)..(12)
- 30 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> Xaa representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V o un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (14)..(14)
- <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
- 40 <400> 1
- Cys Asn Xaa Trp Asn Pro Trp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
- 1 5 10 15
- <210> 2
- <211> 15
- <212> PRT
- 45 <213> Artificial
- <220>
- <223> Ligando peptídico sintético
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 50 <222> (2) .. 2)
- <223> Xaa representa un resto de aminoácido polar, cargado positivamente, seleccionado de entre R, H y K
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- 55 <223> Xaa representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (9)..9)
- <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido

ES 2 715 379 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 2

	Cys	Xaa	Asn	Xaa	Trp	Asn	Pro	Cys	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
10	1				5					10					15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(14)

20 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 3

	Cys	Gln	Lys	Phe	Glu	Ser	Arg	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
	1				5					10					15

<210> 4
 <211> 15

25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 4

	Cys	Pro	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Cys	Tyr	Arg	Arg	Met	Pro	Pro	Cys
30	1				5					10					15

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)

40 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(12)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido

45 <400> 5

	Cys	Pro	Tyr	Pro	Phe	Arg	Cys	Xaa	His	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
	1				5					10			

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT

50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

55 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa no representa ningún resto de aminoácido o un resto de N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y
 <400> 6

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
1				5					10					15

 15 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V o un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(12)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 7

Cys	Asn	Xaa	Trp	Asn	Pro	Trp	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
1				5						10				15

 <210> 8
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa T, H o Y
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa G, S o P
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa representa A, V, W, D o S
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa representa D, E, V, T o P
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa representa A, G, P, I, R o D
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 15 <223> Xaa representa G, P, Y o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa representa F, I, L, V, R, G o D
 20 <400> 8

	Cys	Asn	Xaa	Trp	Asn	Pro	Trp	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
	1				5				10						15

 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa T, H o Y
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. 9)
 35 <223> Xaa representa G, S o P
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa representa A, V o W
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa representa D, E o V
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa representa A, G o P
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa representa G o P
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 55 <223> Xaa representa F, I, L o V
 <400> 9

	Cys	Asn	Xaa	Trp	Asn	Pro	Trp	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
	1				5				10						15

 <210> 10

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 10
 Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Gly Trp Val Gly Gly Phe Cys
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 11
 Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Val Glu Pro Pro Val Cys
 1 5 10 15
 15 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 12
 Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys
 1 5 10 15
 <210> 13
 25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 30 <400> 13
 Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Ala Asp Pro Pro Ile Cys
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 14
 Cys Asn Tyr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys
 1 5 10 15
 40 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 15
 Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Ala Asp Pro Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 16

ES 2 715 379 T3

Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Pro Ala Asp Ile Pro Val Cys
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 17

Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Asp Asp Pro Tyr Ile Cys
 1 5 10 15
 10 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 18

Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Ser Asp Pro Pro Val Cys
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 19

Cys Asn Tyr Trp Asn Pro Trp Cys Ser Asp Thr Arg Ile Gly Cys
 1 5 10 15
 25 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 20

Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Ser Trp Pro Asp Ile Asp Cys
 1 5 10 15
 <210> 21
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa representa K o R
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa D, T o G
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa representa I, V o L
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 55 <223> Xaa representa E, M, N, P, T, Q, S, Y, G, D, W, R, H o A
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa representa D, G, I, T, A, S, P o V
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa representa P, S, T, A, K, G, H, F, Q, D, L, I, M, R o Y
 <400> 21
 Cys Xaa Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15
 10 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2).. 2)
 <223> Xaa representa K o R
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9).. 9)
 <223> Xaa representa D o T
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa representa I o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa representa E, M, N, P o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 35 <223> Xaa representa D, G, I o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa representa P, S o T
 40 <400> 22
 Cys Xaa Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 23
 Cys Lys Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Asp Leu Val Thr Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 50 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 24

ES 2 715 379 T3

		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Glu	Thr	Thr	Cys	
		1				5					10					15	
	<210>	25															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
5	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Ligando peptídico sintético															
	<400>	25															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Gly	Pro	Cys	
		1				5					10					15	
10	<210>	26															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
15	<223>	Ligando peptídico sintético															
	<400>	26															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	Met	Asp	Thr	Cys	
		1				5					10					15	
	<210>	27															
	<211>	15															
20	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Ligando peptídico sintético															
	<400>	27															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Gln	Asp	Ala	Cys	
		1				5					10					15	
25	<210>	28															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
30	<220>																
	<223>	Ligando peptídico sintético															
	<400>	28															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Ser	Ile	Lys	Cys	
		1				5					10					15	
	<210>	29															
35	<211>	15															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Ligando peptídico sintético															
40	<400>	29															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Thr	Gly	Cys	
		1				5					10					15	
	<210>	30															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
45	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Ligando peptídico sintético															
	<400>	30															
		Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	Gln	Ile	His	Cys	
		1				5					10					15	
50	<210>	31															
	<211>	15															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																

<223> Ligando peptídico sintético
 <400> 31

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Gly	Ile	Thr	Cys
	1				5					10					15

<210> 32
 5 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

10 <400> 32

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	Asp	Thr	Phe	Cys
	1				5					10					15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT

15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

<400> 33

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	Glu	Ala	Gln	Cys
	1				5					10					15

20 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

25 <223> Ligando peptídico sintético

<400> 34

	Cys	Lys	Asn	Phe	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ser	Cys
	1				5					10					15

<210> 35
 <211> 15

30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

<400> 35

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Trp	Thr	Asp	Cys
	1				5					10					15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

<400> 36

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Asp	Leu	Cys
	1				5					10					15

<210> 37

45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

50 <400> 37

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys
	1				5					10					15

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 715 379 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 38

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Arg	Pro	Pro	Cys
5	1				5					10					15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 39

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Ala	Cys
	1				5					10					15

<210> 40

15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

20 <400> 40

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	His	Asp	Ile	Cys
	1				5					10					15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT

25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 41

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Asp	Met	Cys
	1				5					10					15

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

35 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 42

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Ala	Asp	Leu	Cys
	1				5					10					15

<210> 43
 <211> 15

40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 43

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Leu	His	Val	Arg	Cys
	1				5					10					15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 44

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Ile	Ala	Pro	Tyr	Cys
	1				5					10					15

<210> 45

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 45

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Gly	Leu	Val	Tyr	Ser	Thr	Cys
	1				5					10					15

<210> 46
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 46

	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Leu	Cys
	1				5					10					15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 47

	Cys	Arg	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Thr	Leu	Ile	Asn	Ile	Thr	Cys
	1				5					10					15

<210> 48
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 30 <400> 48

	Gln	Lys	Phe	Glu	Ser	Arg
	1				5	

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 49

	Cys	Gln	Lys	Phe	Glu	Ser	Arg	Cys	Arg	Val	Asp	Thr	Arg	Tyr	Cys
	1				5					10					15

<210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 50

	Pro	Tyr	Pro	Phe	Arg
	1				5

<210> 51
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa no representa ningún resto de aminoácido o un resto de N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

5 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)

10 <223> Xaa representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y
 <400> 51

	Cys	Xaa	Xaa	Phe	Pro	Xaa	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5					10					15

<210> 52
 <211> 13

15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 52

	Cys	Pro	Tyr	Pro	Phe	Arg	Cys	Leu	His	Glu	Asn	Leu	Cys
	1				5					10			

20 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)

30 <223> Xaa no representa ningún resto de aminoácido o un resto de N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa N o S

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa F o Y
 <400> 53

	Cys	Xaa	Xaa	Phe	Pro	Xaa	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5					10					15

40 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 54

	Cys	Asn	Asn	Phe	Pro	Phe	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5					10					15

<210> 55
 50 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético

55 <400> 55

	Cys	Ser	Phe	Pro	Tyr	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5				10					

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 10 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <400> 56
 Cys Ser Phe Pro Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10

 <210> 57
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 <400> 57
 Cys Ser Phe Xaa Tyr Arg Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10

 25 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <400> 58
 Cys Ser Phe Xaa Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10

 40 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 50 <223> Xaa representa un resto de N-alfa-metil arginina
 <400> 59
 Cys Ser Phe Pro Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10

 <210> 60
 <211> 14
 55 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 10 <223> Xaa representa un resto de N-alfa-metil arginina
 <400> 60
 Cys Ser Phe Xaa Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 20
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(18)
 <223> MeGly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 61
 Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Xaa Xaa
 20
 <210> 62
 30 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(17)
 <223> MeGly
 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(19)
 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 62
 Cys Ser Phe Pro Tyr Arg Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Xaa Xaa
 45 <210> 63
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (15)..(17)
 <223> MeGly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(19)
 15 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 63
 Cys Ser Phe Xaa Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys Gly Gly
 1 5 10 15

 Gly Xaa Xaa
 <210> 64
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (11)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 64
 Cys Lys Asn Xaa Trp Asn Pro Cys Asp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15

 <210> 65
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 65
 Cys Gln Lys Phe Glu Ser Arg Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15

 <210> 66
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

<223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(12)
 5 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 66

Cys	Pro	Tyr	Pro	Xaa	Arg	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
1				5							10	

<210> 67
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (9)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 67

Cys	Asn	Xaa	Trp	Asn	Pro	Trp	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
1				5						10				15

<210> 68
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 30 <400> 68

Ala	Cys	Lys	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Asp	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Cys
1				5					10					15	

Ala

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 69

Ala	Cys	Arg	Asn	Tyr	Trp	Asn	Pro	Cys	Thr	Leu	Ile	Asn	Ile	Thr	Cys
1				5					10					15	

Ala

40 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 70

Ala	Cys	Gln	Lys	Phe	Glu	Ser	Arg	Cys	Arg	Val	Asp	Thr	Arg	Tyr	Cys
1				5					10					15	

Ala

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 71
 Ala Cys Pro Leu Ser Asp Thr Leu Cys Tyr Arg Arg Met Pro Pro Cys
 1 5 10 15

 Ala
 <210> 72
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 15 <400> 72
 Ala Cys Pro Tyr Pro Phe Arg Cys Leu His Glu Asn Leu Cys Ala
 1 5 10 15

 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 73
 Ala Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Gly Trp Val Gly Gly Phe Cys
 1 5 10 15

 Ala
 25 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 74
 Ala Cys Asn Asn Phe Pro Phe Arg Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10 15

 Ala
 <210> 75
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 75
 Ala Cys Lys Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Asp Leu Ile Glu Thr Thr Cys
 1 5 10 15

 40 <210> 76
 Ala
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>

ES 2 715 379 T3

<223> Ligando peptídico sintético

<400> 76

Ala Cys Lys Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Asp Leu Ile Pro Gly Pro Cys
1 5 10 15

Ala

<210> 77

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ligando peptídico sintético

10 <400> 77

Ala Cys Lys Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Asp Leu Val Met Asp Thr Cys
1 5 10 15

Ala

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Ligando peptídico sintético

<400> 78

Ala Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Val Glu Pro Pro Val Cys
1 5 10 15

20

Ala

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Ligando peptídico sintético

<400> 79

Ala Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys
1 5 10 15

Ala

30 <210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Ligando peptídico sintético

<400> 80

Ala Cys Asn His Trp Asn Pro Trp Cys Ser Ala Asp Pro Pro Ile Cys
1 5 10 15

Ala

<210> 81

<211> 17

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 715 379 T3

<223> Ligando peptídico sintético

<400> 81

Ala Cys Asn Tyr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys
1 5 10 15

Ala

<210> 82

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ligando peptídico sintético

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PRT

<400> 82

Cys Arg Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Thr Leu Ile Asn Ile Thr Cys
1 5 10 15

<210> 83

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Ligando peptídico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

25 <223> PRT

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(19)

<223> MeGly

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(21)

<223> Xaa representa un resto de D-arginina

<400> 83

Cys Arg Asn Tyr Trp Asn Pro Cys Thr Leu Ile Asn Ile Thr Cys Ala
1 5 10 15

Gly Gly Gly Xaa Xaa
20

35 <210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Ligando peptídico sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

45 <223> PRT

<400> 84

Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys
1 5 10 15

<210> 85

<211> 21

50 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (17)..(19)
 <223> MeGly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(21)
 15 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 85

Cys Asn Thr Trp Asn Pro Trp Cys Pro Trp Asp Ala Pro Leu Cys Ala
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Xaa Xaa
 20

<210> 86
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 86

Cys Ser Trp Pro Ala Arg Cys Leu His Gln Asp Leu Cys
 1 5 10

25 <210> 87
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 87

Val Tyr Tyr Pro Asp Ile
 1 5

<210> 88
 35 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 40 <400> 88

Ser Phe Pro Tyr Arg
 1 5

<210> 89
 <211> 14
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <400> 89

Cys Ser Trp Pro Ala Arg Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10

50 <210> 90
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT
 <400> 90
 Cys Ser Phe Pro Tyr Arg Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10
 10 <210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <400> 91
 Cys Ser Phe Pro Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10
 25 <210> 92
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <400> 92
 Cys Ser Phe Xaa Tyr Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10
 45 <210> 93
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 55 <223> PRT
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de N-alfa-metil arginina
 <400> 93

	Cys	Ser	Phe	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5					10				

5 <210> 94
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 <220>

20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de N-alfa-metil arginina
 <400> 94

	Cys	Ser	Phe	Xaa	Tyr	Xaa	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys
	1				5					10				

25 <210> 95
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

30 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(18)
 <223> MeGly
 <220>

40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 95

	Cys	Ser	Phe	Pro	Tyr	Arg	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys	Ala	Gly
	1				5					10					15	

	Gly	Gly	Xaa	Xaa
			20	

45 <210> 96
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

50 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PRT

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa un resto de ácido L-azetidina carboxílico
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa representa un resto de L-homoarginina
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(18)
 <223> MeGly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (19)..(20)
 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 96

	Cys	Ser	Phe	Xaa	Tyr	Xaa	Cys	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ile	Cys	Ala	Gly
	1				5					10						15

	Gly	Gly	Xaa	Xaa												
				20												

<210> 97
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligando peptídico sintético
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(7)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(14)
 <223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
 <400> 97

	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
	1				5					10					15

35 <210> 98
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Ligando peptídico sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(3)
 <223> MeGly
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa representa un resto de D-arginina
 <400> 98

	Gly	Gly	Gly	Xaa	Xaa										
	1				5										

50 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 715 379 T3

<220>
<223> Ligando peptídico sintético
<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (4)..(7)
<223> Xaa representa cualquier resto de aminoácido
<400> 99
 Cys Asn Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Val Tyr Tyr Pro Asp Ile Cys
 1 5 10 15
<210> 100
10 <211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Motivo peptídico sintético
15 <400> 100
 Phe Pro Phe Arg
 1

REIVINDICACIONES

1. Un ligando peptídico específico para la calicreína plasmática que comprende un polipéptido que comprende al menos tres restos de cisteína, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un armazón molecular, que es TBMB y forma enlaces covalentes con los restos de cisteína del polipéptido de modo que al menos dos bucles de polipéptidos se forman en el armazón molecular, donde el ligando peptídico comprende una secuencia peptídica de:
- 5 (a) $-C_i-N-X-W-N-P-W-C_{ii}-O/U-X-X-X-O/J-X-C_{iii}-$ (SEQ ID NO:1)
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 10 donde:
 C_i , C_{ii} y C_{iii} representan el primero, el segundo y el tercer resto de cisteína, respectivamente;
X representa cualquier resto de aminoácido;
O representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de entre G, A, I, L, P y V;
J representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de entre F, W e Y; y
- 15 U representa un resto de aminoácido polar no cargado seleccionado de entre N, C, Q, M, S y T.
2. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 1, donde el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre $-C_i-N-X-W-N-P-W-C_{ii}-O/U-X-X-X-O-X-C_{iii}-$ (SEQ ID NO: 7), tal como $-C_i-N-T/H/Y-W-N-P-W-C_{ii}-G/S/P-A/V/W/D/S-D/E/V/T/P-A/G/P/I/R/D-G/P/Y/I-F/I/L/V/R/G/D-C_{iii}-$ (SEQ ID NO: 8), en particular $-C_i-N-$
20 $T/H/Y-W-N-P-W-C_{ii}-G/S/P-A/V/W-D/E/V-A/G/P-G/P-F/I/L/V -C_{iii}-$ (SEQ ID NO: 9).
3. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre:
- 25 $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-G-W-V-G-G-F-C_{iii}-$ (06-259) (SEQ ID NO: 10);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-V-E-P-P-V-C_{iii}-$ (06-259-01) (SEQ ID NO: 11);
 $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-$ (06-259-02) (SEQ ID NO: 12);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-I-C_{iii}-$ (06-259-03) (SEQ ID NO: 13);
 $-C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-$ (06-259-04) (SEQ ID NO: 14);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-R-C_{iii}-$ (06-259-F1) (SEQ ID NO: 15);
30 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-P-A-D-I-P-V-C_{iii}-$ (06-259-E2) (SEQ ID NO: 16);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-D-D-P-Y-I-C_{iii}-$ (06-259-H3) (SEQ ID NO: 17);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-S-D-P-P-V-C_{iii}-$ (06-259-H4) (SEQ ID NO: 18);
 $-C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-S-D-T-R-I-G-C_{iii}-$ (06-259-A6) (SEQ ID NO: 19); y
 $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-S-W-P-D-I-D-C_{iii}-$ (06-259-F2) (SEQ ID NO: 20);
35 tal como- $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-V-E-P-P-V-C_{iii}-$ (06-259-01) (SEQ ID NO: 11);
 $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-$ (06-259-02) (SEQ ID NO: 12);
 $-C_i-N-H-W-N-P-W-C_{ii}-S-A-D-P-P-I-C_{iii}-$ (06-259-03) (SEQ ID NO: 13); y
 $-C_i-N-Y-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-$ (06-259-04) (SEQ ID NO: 14).
- 40 4. El ligando peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el péptido de fórmula (a) comprende una secuencia seleccionada de entre $-C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-$ (06-259-02) (SEQ ID NO:12).
5. El ligando peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende
45 adicionalmente una o más modificaciones seleccionadas de entre: modificaciones N-terminales y/o C-terminales; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con uno o más restos de aminoácidos no naturales (tal como el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos polares con uno o más aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos hidrófobos con otros aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos no naturales); adición de un grupo espaciador; reemplazo de uno o más restos de L-aminoácidos con uno o más restos
50 de D-aminoácidos; N-alkilación de uno o más enlaces amida dentro del ligando peptídico bicíclico; reemplazo de uno o más enlaces peptídicos con un enlace sustituto; modificación de la longitud de la estructura peptídica; sustitución del hidrógeno en el carbono α de uno o más restos de aminoácidos con otro grupo químico, y modificación post-sintética bioortogonal de aminoácidos tales como cisteína, lisina, glutamato y tirosina con amina, tiol, ácido carboxílico y reactivos al fenol adecuados.
- 55 6. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 5, donde la una o más modificaciones comprenden una modificación N-terminal, tal como un grupo acetilo N-terminal, en particular, donde el grupo de cisteína N-terminal (C_i) está cubierto con anhídrido acético.
- 60 7. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 5, donde la una o más modificaciones

comprenden una modificación C-terminal, tal como un grupo amida C-terminal, en particular, la amidación del grupo de cisteína C-terminal (C_{iii}).

8. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 5, donde la una o más modificaciones
5 comprenden el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos con uno o más restos de aminoácidos no naturales, tal como el reemplazo de un resto de prolina con un resto de ácido L-azetidina carboxílico y/o el reemplazo de un resto de arginina con un resto de N- α -metil arginina o L-homoarginina.

9. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 5, donde la una o más modificaciones
10 comprenden la adición de un grupo espaciador, tal como la adición de un grupo espaciador a la cisteína N-terminal (C_i) y/o la cisteína C-terminal (C_{iii}).

10. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 9, donde el grupo espaciador comprende uno o
15 más grupos sarcosina (convenientemente 3 grupos sarcosina) unidos a dos o más restos de D-arginina (convenientemente 2 restos de D-arginina).

11. El ligando peptídico como se define en la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que es un péptido que
tiene una secuencia seleccionada de -C_i-N-T-W-N-P-W-C_{ii}-P-W-D-A-P-L-C_{iii}-A-Sar₃-(D-Arg)₂ ((06-259-02 (Sar₃-(D-Arg)₂) (SEQ ID NO: 61); donde Sar₃ representa 3 espaciadores de sarcosina y (D-Arg)₂ representa 2 restos de D-
20 arginina.

12. El ligando peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la sal
farmacéuticamente aceptable se selecciona de entre una sal de clorhidrato o acetato.

25 13. El ligando peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es específico para la caliceína plasmática humana, de rata y/o de conejo, tal como la caliceína plasmática humana y/o de rata, en particular, la caliceína plasmática humana.

14. Una composición farmacéutica que comprende un ligando peptídico como se define en una cualquiera
30 de las reivindicaciones 1 a 13 en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15. El ligando peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en la
prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica, trastornos oftálmicos y trastornos autoinmunes.

35

06-34-18

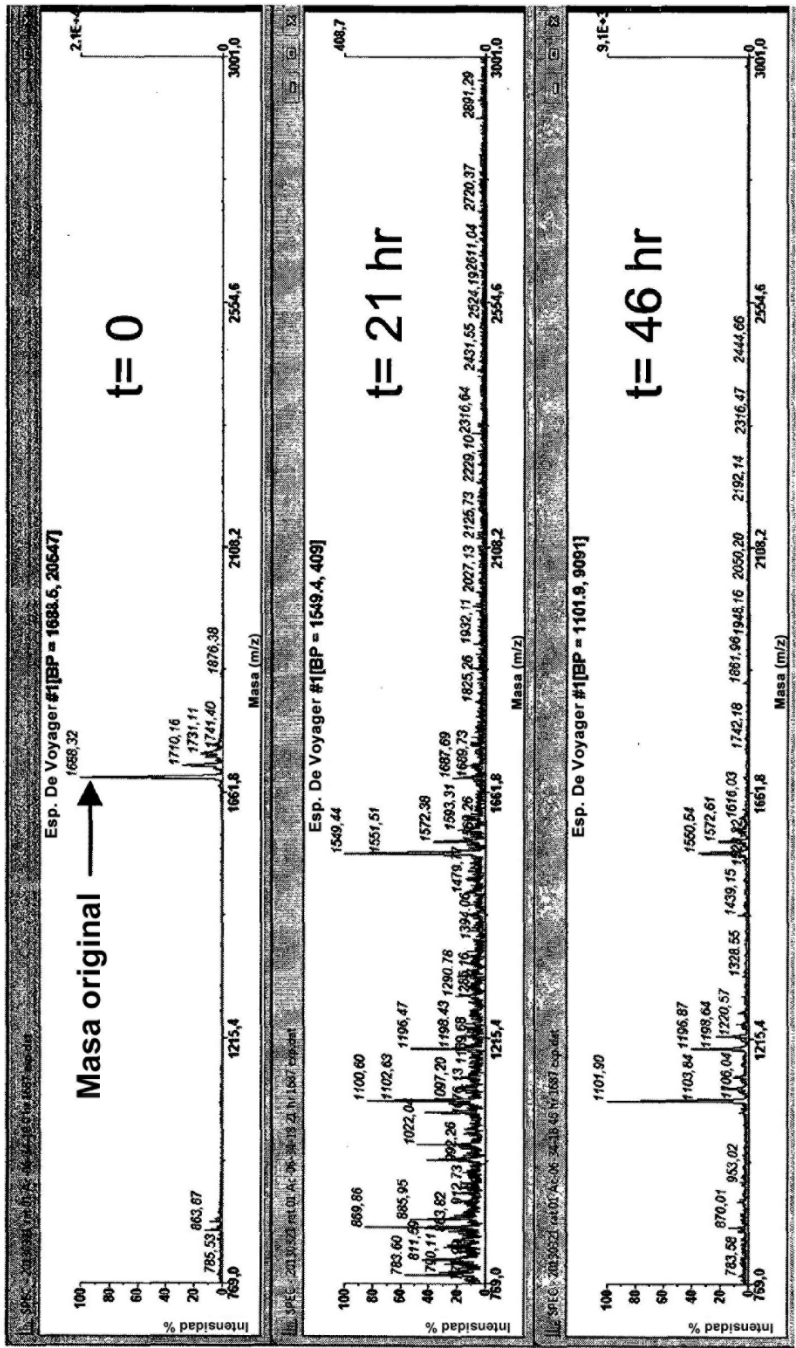


FIGURA 1

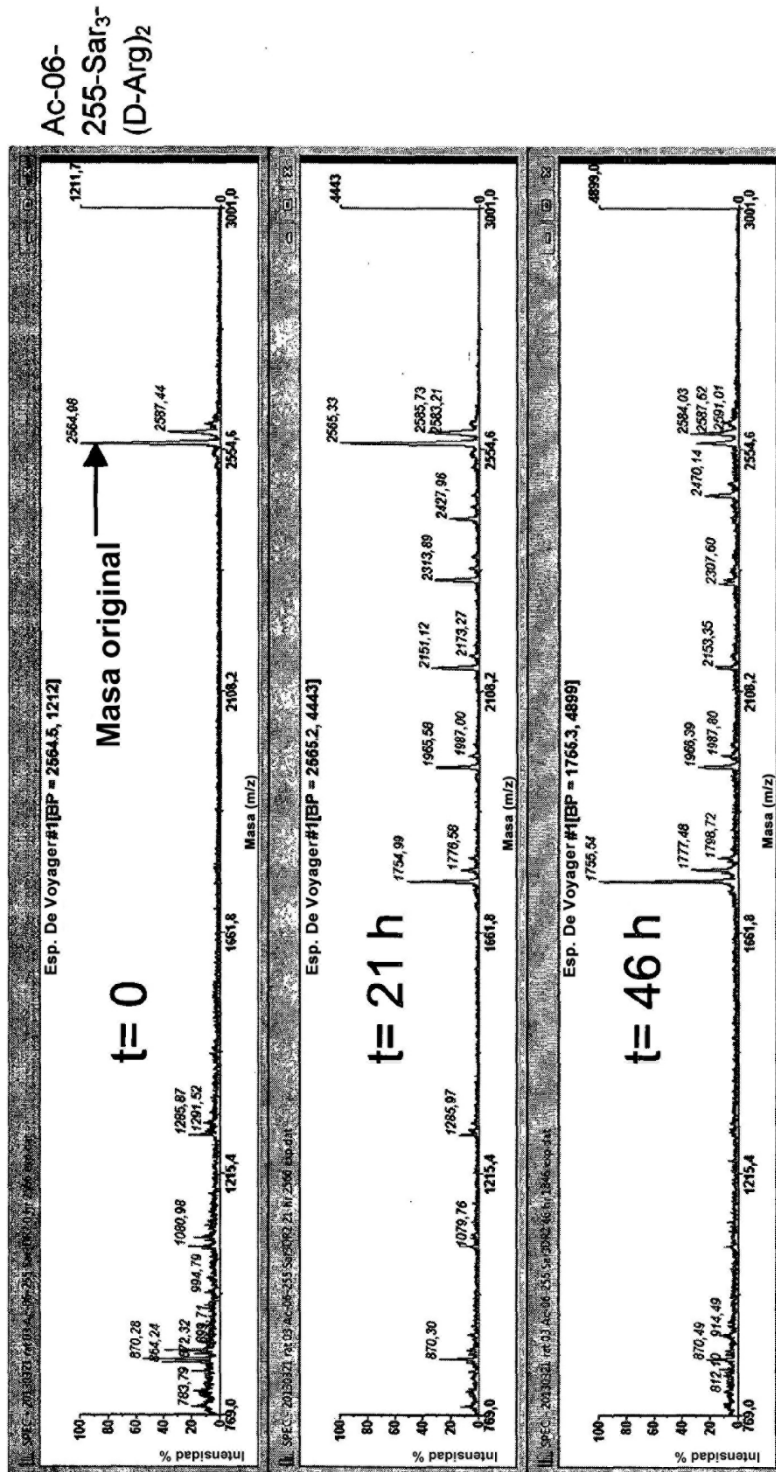


FIGURA 1 (continuación)

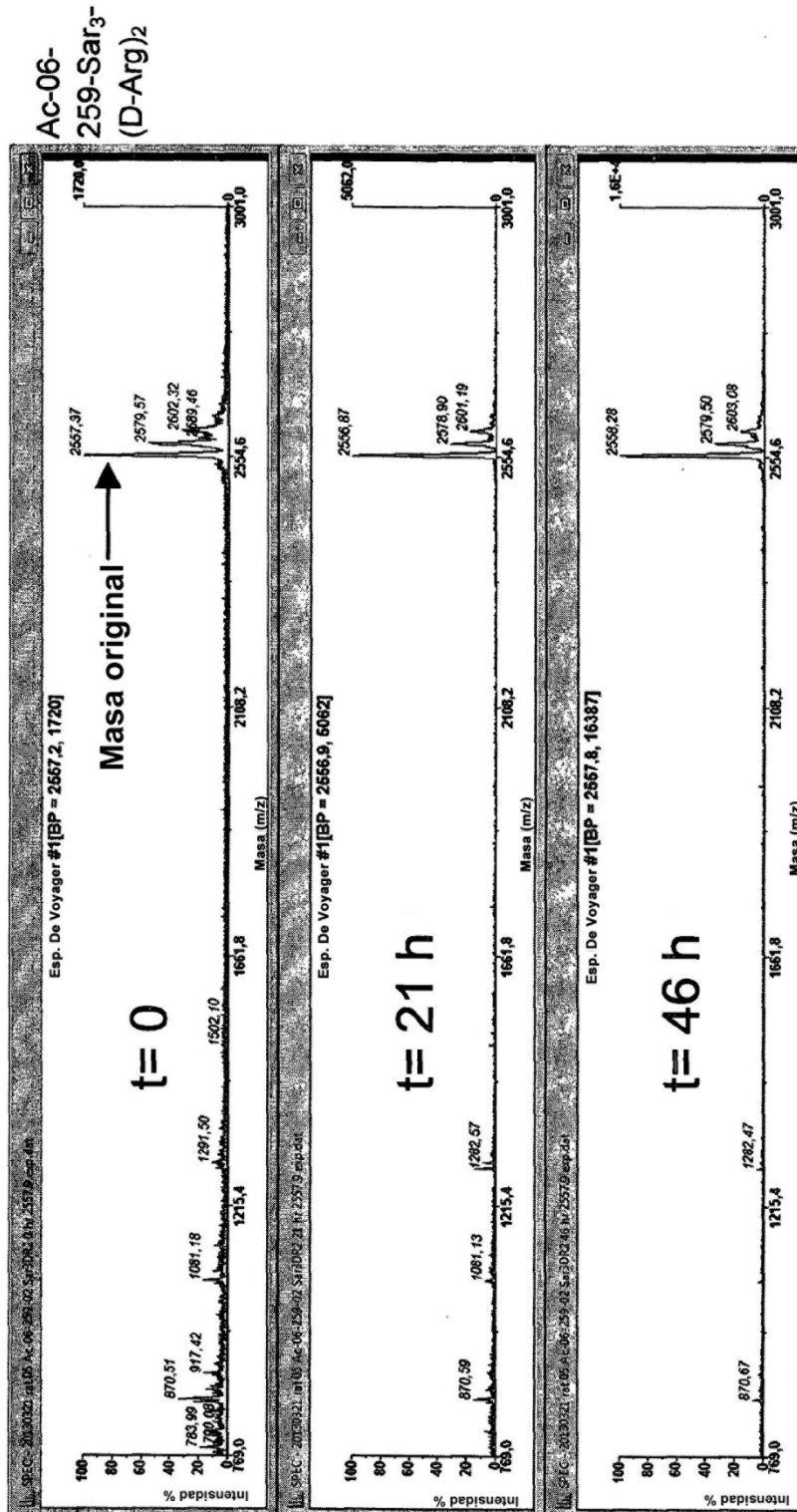


FIGURA 1 (continuación)

06-34-18

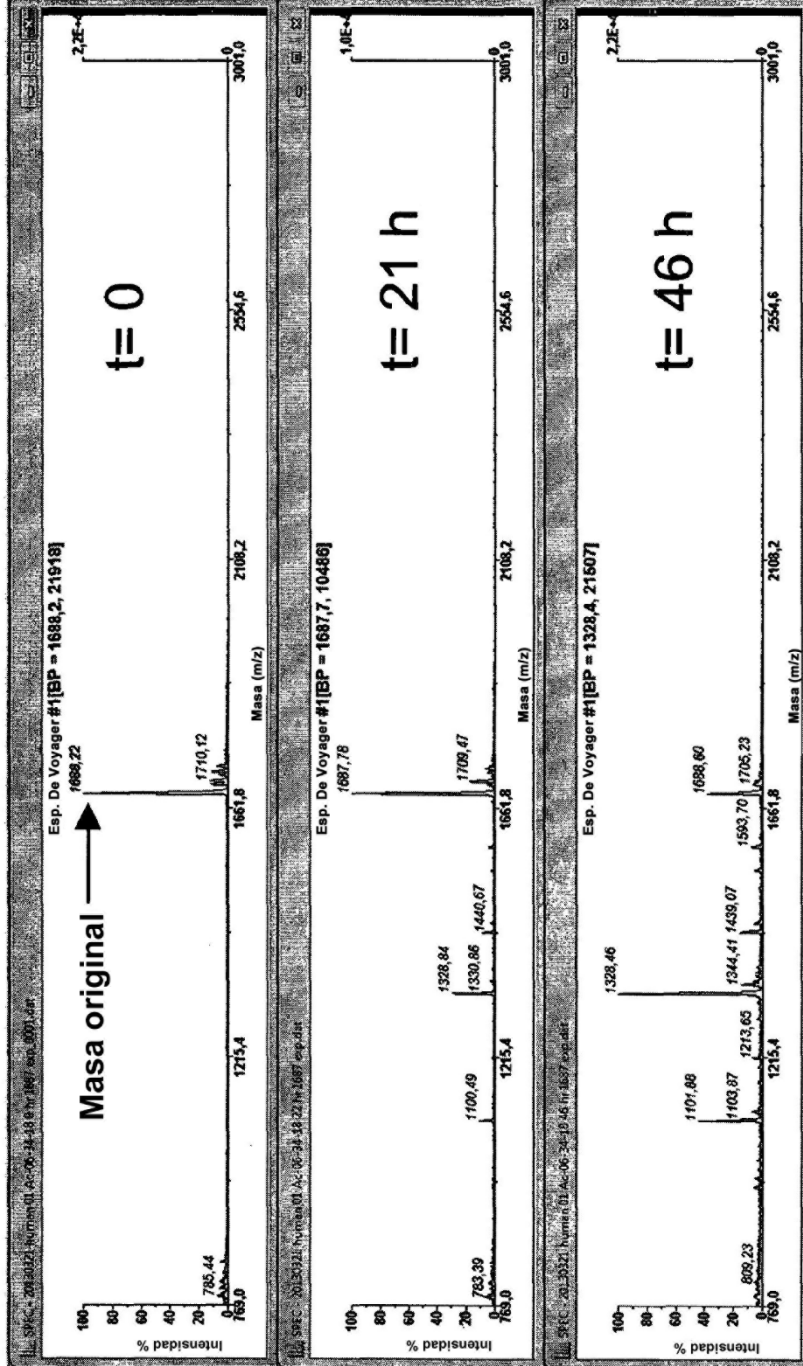


FIGURA 2

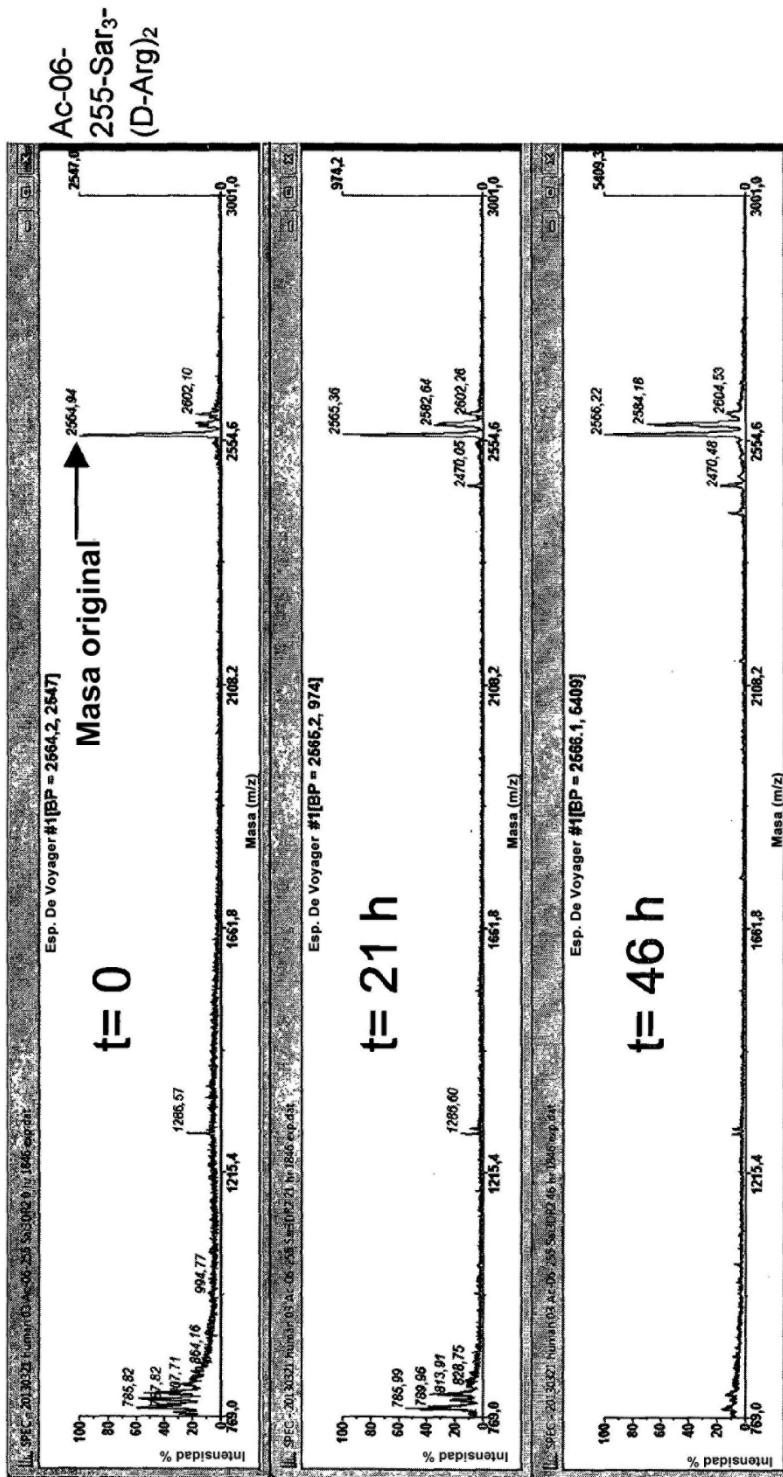


FIGURA 2 (continuación)

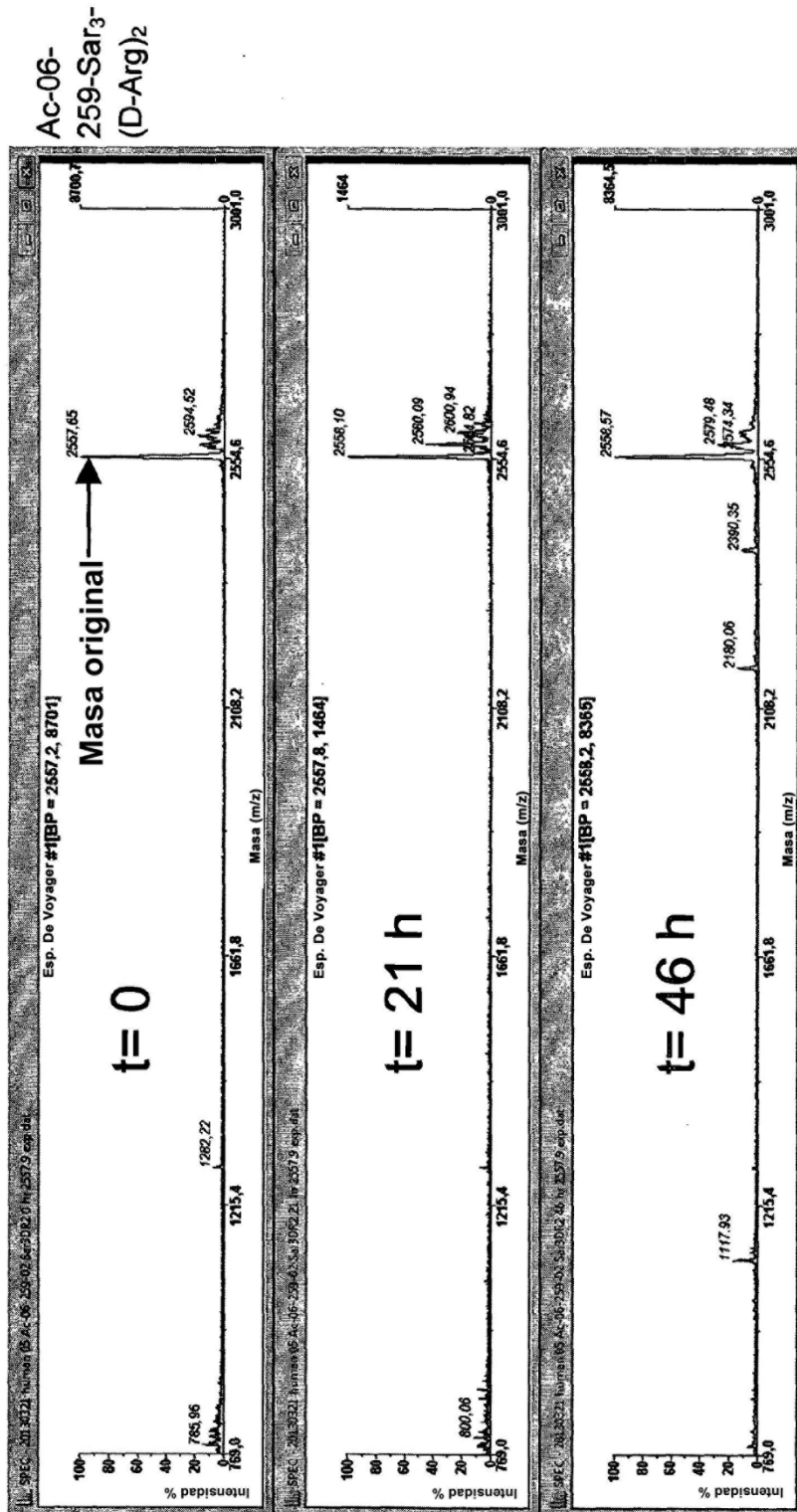


FIGURA 2 (continuación)

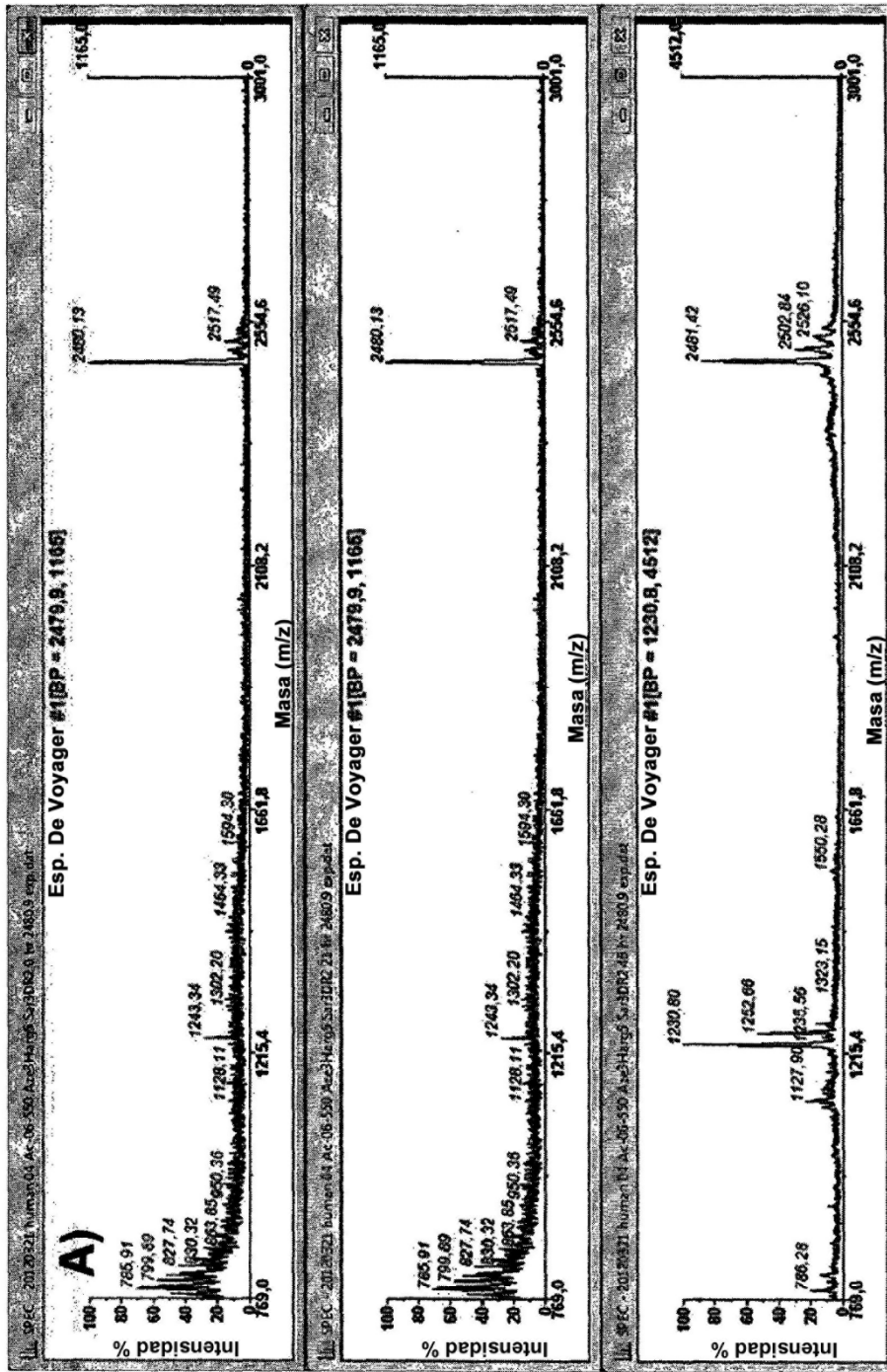


FIGURA 3

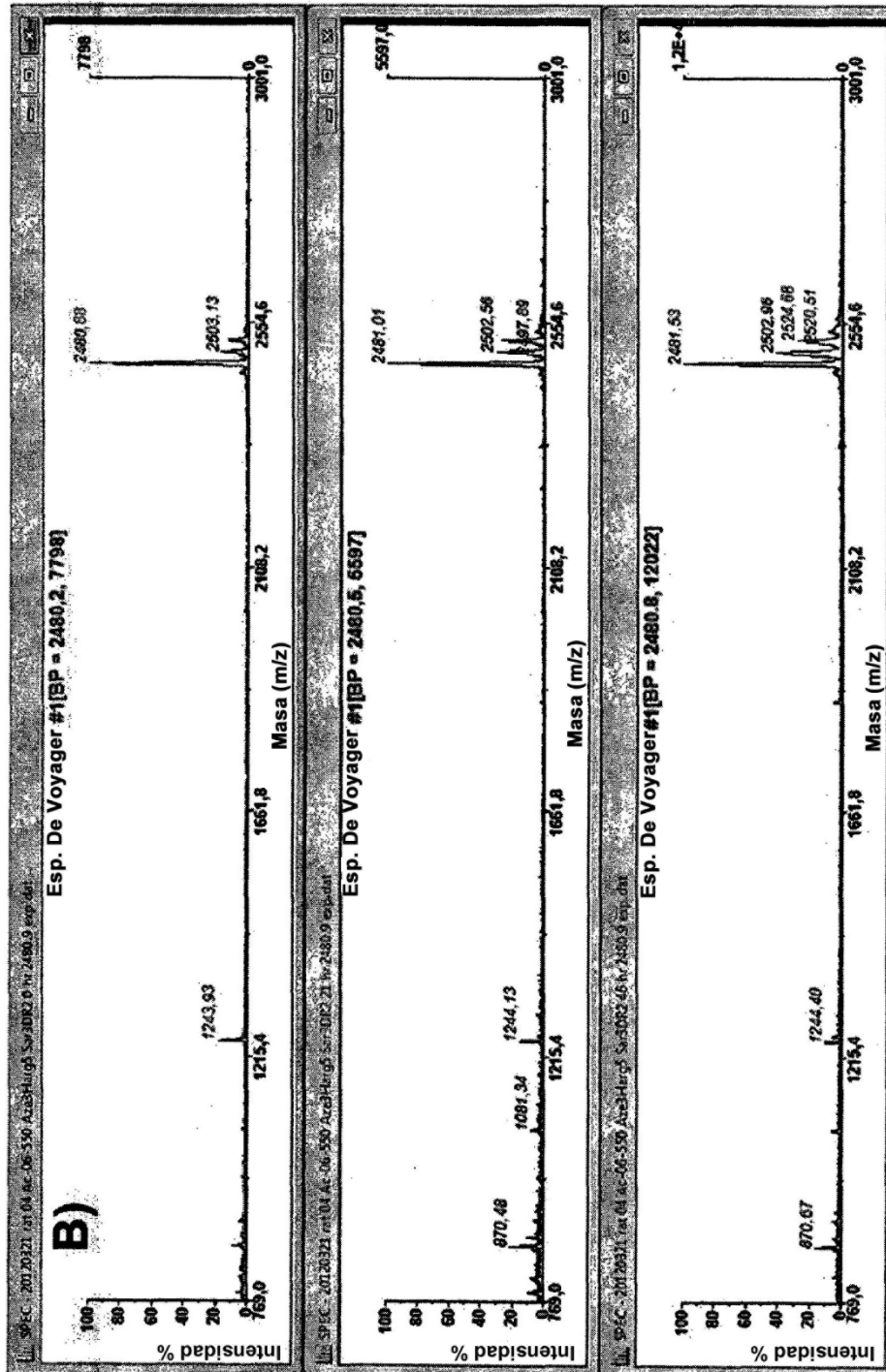


FIGURA 3 (continuación)

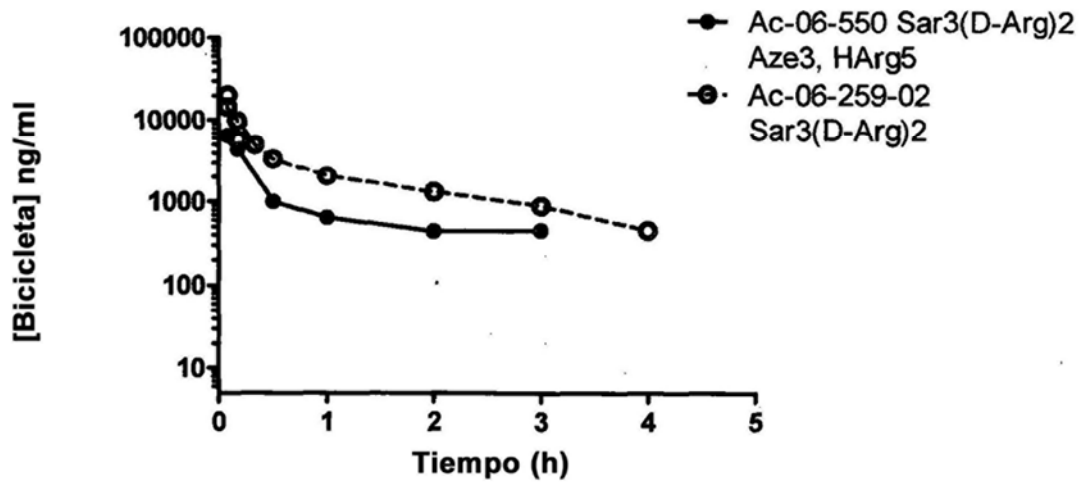


FIGURA 4

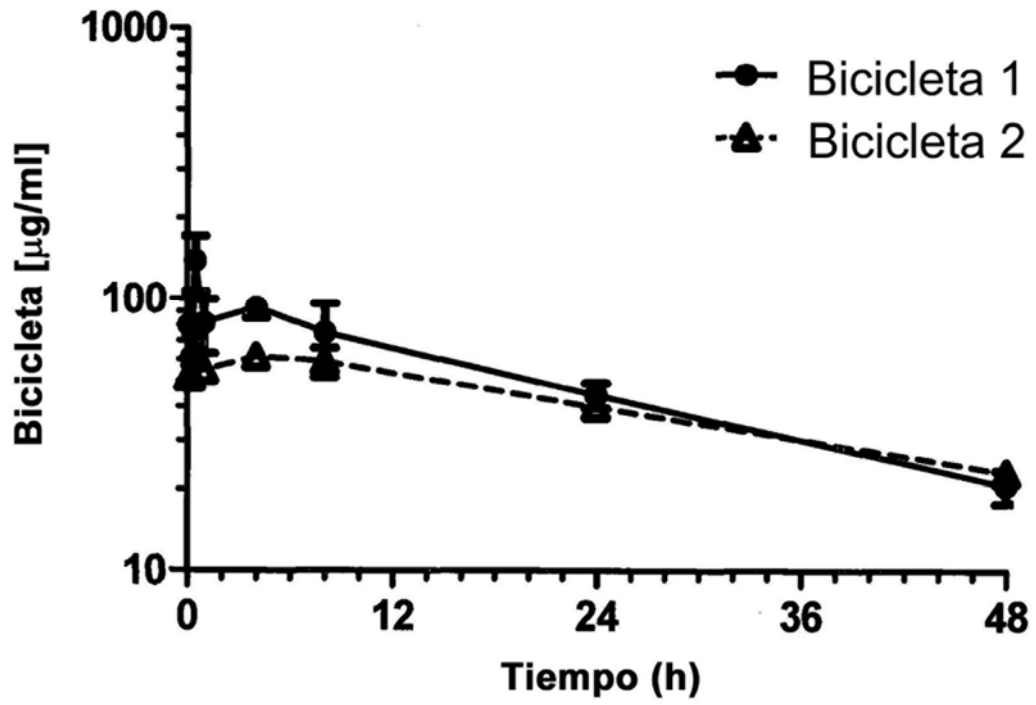


FIGURA 5

Efecto de los inhibidores de la calicreína sobre la hinchazón de la pata en el modelo de carragenina en ratas

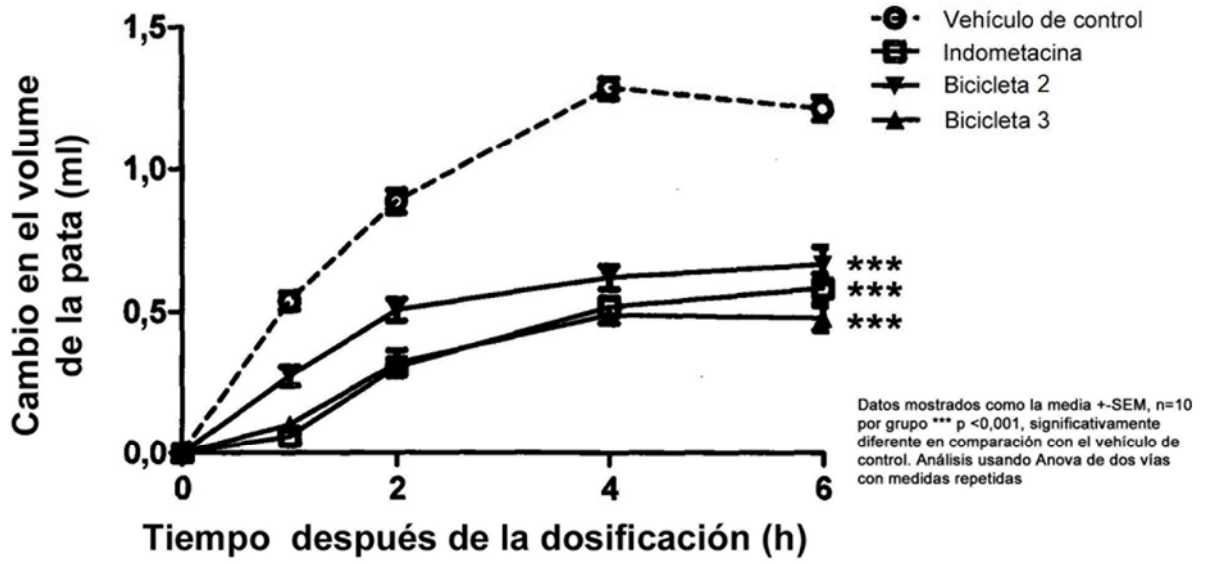


FIGURA 6