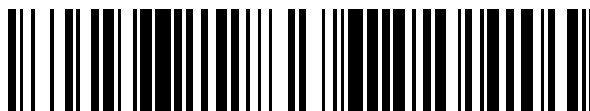


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 755**

51 Int. Cl.:

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/US2012/054180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12761855 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2753636**

54 Título: **Análogos de compstatina con propiedades farmacocinéticas mejoradas**

30 Prioridad:

07.09.2011 US 201161531919 P
24.05.2012 US 201261651204 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LAMBRIS, JOHN, D.;
QU, HONGCHANG y
RICKLIN, DANIEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 766 755 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de compstatina con propiedades farmacocinéticas mejoradas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la activación de la cascada del complemento en el cuerpo. En particular, esta invención proporciona péptidos que se unen a la proteína C3 con afinidad nanomolar e inhiben la activación del complemento, muestran una fuerte solubilidad acuosa, estabilidad plasmática y retención *in vivo* y están biodisponibles en una multitud de vías de administración.

Antecedentes de la invención

10 El sistema del complemento humano juega un potente papel en la defensa frente a organismos patógenos y en la mediación de respuestas inmunológicas. El complemento se puede activar a través de tres rutas diferentes: la ruta clásica, la ruta de lectina, y la ruta alternativa. El principal evento de activación que se comparte por las tres rutas es la separación proteolítica de la proteína central del sistema del complemento, C3, en su activación se produce C3a y C3b mediante las C3 convertasas. La generación de estos fragmentos conduce a la opsonización de células patógenas mediante C3b y iC3b, un proceso que les vuelve susceptibles a la fagocitosis o el aclaramiento, y a la
15 activación de células inmunológicas a través de una interacción con receptores del complemento (Markiewsky y Lambris, 2007, *Am J Pathol* 171:715-727). El depósito de C3b sobre células diana induce también a la formación de nuevos complejos de convertasa e inicia de ese modo un bucle de amplificación propio.

Una unión del plasma y de proteínas que se unen a la superficie celular regula cuidadosamente la activación del complemento para prevenir que las células hospedadoras se ataquen a sí mismas por la cascada del complemento.
20 Sin embargo, una activación excesiva o una regulación inapropiada del complemento puede conducir a varias condiciones patológicas, desde enfermedades autoinmunes hasta enfermedades inflamatorias (Holers, 2003, *Clin Immunol* 107:140-51, Markiewski y Lambris, 2007, *supra*; Ricklin y Lambris, 2007; *Nat Biotechnol* 25:1265-75; Sahu *et al.*, 2000, *J Immunol* 165:2491-9). Por lo tanto, es muy deseable el desarrollo de inhibidores del complemento terapéuticos. En este contexto, C3 y C3b han surgido como dianas prometedoras debido a que su papel central en la cascada permite la inhibición simultánea de la iniciación, amplificación, y activación descendente del complemento (Ricklin y Lambris, 2007, *supra*).
25

La compstatina es el primer inhibidor del complemento no derivado del hospedador que presenta la capacidad de bloquear las tres rutas de activación (Sahu *et al.*, 1996, *J Immunol* 157:884-91; Patente U.S. 6.319.897). Este tridecapéptido cíclico se une tanto a C3 como a C3b y previene la separación del C3 nativo por las C3 convertasas.
30 Se confirmó su elevada eficacia inhibitoria mediante una serie de estudios que emplean modelos experimentales que indican su potencial como un agente terapéutico (Fiane *et al.*, 1999a, *Xenotransplantation* 6:52-65; Fiane *et al.*, 1999b, *Transplant Proc* 31:934-935; Nilsson *et al.*, 1998 *Blood* 92:1661-1667; Ricklin y Lambris, 2008, *Adv Exp Med Biol* 632:273-292; Schmidt *et al.*, 2003, *J Biomed Mater Res A* 66:491-499; Soulika *et al.*, 2000, *Clin Immunol* 96:212-221). La optimización progresiva de la compstatina ha producido análogos con actividad mejorada (Ricklin y Lambris, 2008, *supra*; Patentes WO2004/026328; WO2007/062249). Uno de estos análogos se está ensayando actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la principal causa de ceguera en pacientes ancianos en los países industrializados (Coleman *et al.*, 2008, *Lancet* 372:1835-1845; Ricklin y Lambris, 2008, *supra*). En vista de su potencial terapéutico en la DMAE y en otras enfermedades, también es de importancia considerable alcanzar una mayor eficacia en la optimización de la compstatina.
40

Estudios anteriores de la actividad-estructura han identificado la naturaleza cíclica del péptido de compstatina y la presencia tanto de la hélice β como del grupo hidrofóbico como características clave de la molécula (Morikis *et al.*, 1998, *Protein Sci* 7:619-627; Patente WO99/13899; Morikis *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277:14942-14953; Ricklin y Lambris, 2008, *supra*). Los restos hidrofóbicos en las posiciones 4 y 7 se encontraron ser de particular importancia, y su modificación con aminoácidos no naturales generó un análogo con una actividad 264 veces mejor que el péptido de compstatina original (Katragadda *et al.*, 2006, *J Med Chem* 49:4616-4622; Patente WO2007/062249).
45

Aunque las etapas previas de optimización se han basado en estudios de cribado combinatorios, las estructuras de disolución, y los modelos computarizados (Chiu *et al.*, 2008, *Chem Biol Drugs Des* 72:249-256; Mulakala *et al.*, 2007, *Bioorg Med Chem* 15:1638-1644; Ricklin y Lambris, 2008, *supra*), la publicación de una estructura co-cristal del complejo compstatina con el fragmento de complemento C3c (Janssen *et al.*, 2007, *J Biol Chem* 282:29241-29247; Patente WO2008/153963) representa un importante hito en la optimización de la iniciación razonable. La estructura cristal reveló un sitio de unión superficial en la interfaz de los dominios 4 y 5 de la macroglobulina (MG) de C3c y mostró que 9 de los 13 aminoácidos estaban implicados directamente en la unión, bien a través de enlaces de hidrógeno o bien mediante efectos hidrofóbicos. En comparación con la estructura del péptido de compstatina en disolución (Morikis *et al.*, 1998, *supra*), la forma compuesta de la compstatina experimenta un cambio conformacional, con un cambio en la localización de los restos 5-8 a 8-11 de la hélice- β (Janssen *et al.*, 2007, *supra*; Patente WO2008/153963).
50
55

Los inventores de la presente memoria desarrollaron recientemente una serie de análogos de compstatina con potencia mejorada basada en la N-metilación de la estructura peptídica, particularmente en la posición 8 del péptido, y en sustituciones que flanquean la posición 13 (*Qu et al.*, 2011, *Molec Immunol* 48:481-489, Patente WO2010/127336). Estas modificaciones se presentaron por producir un análogo de compstatina con afinidad de unión mejorada sobre la mayoría de los análogos más activos citados hasta la fecha.

Compstatina y sus análogos tienen un potencial significativo para aplicaciones clínicas. Ejemplos recientes incluyen la reducción de efectos adversos inducidos por el filtro durante hemodiálisis y la preservación del órgano ante la sepsis. De manera importante, el uso intravítreo de los análogos de compstatina han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), tanto en estudios con primates (NHP, de sus siglas en inglés) como en ensayos clínicos en fase I. El menor peso molecular de compstatina y de sus análogos, su mayor especificidad y eficacia, y su capacidad para inhibir simultáneamente todas las rutas de activación y amplificación del complemento contribuyen a un perfil farmacológico beneficioso. Sin embargo, aplicaciones clínicas prolongadas (por ejemplo, administración sistémica mediante varias rutas), adquieren demandas adicionales en las propiedades de los derivados de compstatina. Por ejemplo, perfiles farmacocinéticos desfavorecidos debido a la rápida eliminación desde el plasma imponen una mayor limitación del uso clínico de los fármacos peptídicos. Además, aunque el suministro oral es la vía de administración farmacológica más conveniente y la más popular, la mayoría de los fármacos peptídicos muestran poca o ninguna actividad oral. Se cree que esto es debido principalmente a la degradación en el tracto gastrointestinal por las enzimas y a las condiciones extremas, así como a una escasa permeabilidad de la mucosa intestinal. Por consiguiente, la mayoría de los productos terapéuticos basados en proteínas se administran mediante frecuentes inyecciones a través de vías parenterales tales como mediante inyección intravenosa, intramuscular y subcutánea. Estas formas de administración son costosas y pueden requerir de un profesional médico, lo que puede dar como resultado una escasa aceptación y cumplimiento del paciente. En vista de lo anterior, está claro que el desarrollo de péptidos de compstatina modificados o miméticos con una mayor actividad, mayor estabilidad *in vivo*, y mayor biodisponibilidad y tiempo de permanencia plasmática constituirán un avance significativo en la técnica.

La Patente WO 2010/135717 divulga análogos de compstatina con un aminoácido adicional de glicina, o una fracción de acetilo en el extremo N-terminal y opcionalmente otras mutaciones peptídicas en la cadena peptídica.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona análogos del péptido que inhibe el complemento, compstatina, que mantienen una mejor actividad que inhibe el complemento en comparación con compstatina, y que poseen también una mejor solubilidad y estabilidad y propiedades farmacocinéticas, que incluyen la biodisponibilidad a través de múltiples vías de administración.

Un aspecto de la invención caracteriza un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado (ICVVQDWGHRCT (C2-C12 cíclico; SEQ ID NO:1), en donde la modificación comprende un componente N-terminal adicional o sustituido que mejora (1) la afinidad de unión de C3, C3b o C3c del péptido, (2) la solubilidad del péptido en líquidos acuosos, y/o (3) la estabilidad plasmática del péptido y/o tiempo de permanencia en el plasma, en comparación con un péptido de compstatina sin modificar bajo condiciones equivalentes, en donde el componente adicional es D-Tyr, D-Phe, Tyr(Me), D-Trp, D-Cha, Phe, N-metil Gly (Sar), Arg, mPhe, mVal, o Tyr, y en donde el componente N-terminal sustituido que comprende Ile en la posición 1 se sustituye por Ac-Trp; el compuesto comprende además uno o más de: (1) reemplazo de His en posición 9 por Ala; (2) reemplazo de Val en posición 4 por Trp o un análogo de Trp, en donde el análogo de Trp es opcionalmente 1-metil Trp p Trp 1-formil; (3) reemplazo de Trp en posición 7 por un análogo de Trp, en donde opcionalmente el análogo de Trp es un Trp halogenado; (4) modificación de Gly en posición 8 para reducir la conformación estructural en esta localización, en donde la estructura se reduce opcionalmente mediante el reemplazo de Gly en posición 8 (Gly8) con N-alfa-metil Gly; (5) reemplazo del Thr en posición 13 por Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile; y (6) reemplazo del enlace disulfuro entre C2 y C12 por un enlace tioéter para formar una cistationina o una lantitionina.

En realizaciones en particular, el análogo de compstatina comprende un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO:29, que es:

Xaa1 – Xaa2 – Cys – Val – Xaa3 – Gln – Xaa4 – Xaa5 – Gly – Xaa6 – His – Xaa7 – Cys – Xaa8, en el que Gly entre Xaa5 y Xaa6 (posición 8 de compstatina) se modifica opcionalmente para reducir la conformación estructural, y en donde: Xaa1 es Tyr, D-Tyr, D-Phe, Tyr(Me), D-Trp, D-Cha, Phe, N-metil Gly (Sar), Arg, mPhe, mVal, o Tyr; Xaa2 es Ile; Xaa3 es Trp o un análogo de Trp, en donde el análogo de Trp comprende un alquilo bajo o un sustituyente alcanoilo bajo, Xaa4 es Asp; Xaa5 es Trp o un análogo de Trp que comprende un Trp halogenado; Xaa6 es His, Ala, Phe o Trp; Xaa7 es Arg; y Xaa8 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile, en donde un carboxilo terminal –OH de cualquiera de Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile se reemplaza opcionalmente por –NH₂, y en donde el péptido se cicla a través de un Cys-Cys o enlace tioéter.

Realizaciones particulares del análogo incluyen las siguientes características: la Gly en posición 8 está N-metilado; Xaa1 es D-Tyr o Sar; Xaa2 es Ile; Xaa3 es Trp, 1-metil-Trp o 1-formil-Trp; Xaa5 es Trp; Xaa6 es Ala; y Xaa8 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile con reemplazo opcional del carboxilo terminal –OH con –NH₂. Más

específicamente, Xaa8 puede ser Ile, N-metil Thr o N-metil Ile con el reemplazo opcional del carboxilo terminal –OH por –NH₂. Ejemplos de análogos incluyen SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:18. Se describen también en la presente memoria un compuesto que inhibe la activación del complemento, que comprende un mimético no peptídico o parcialmente peptídico en SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:18, en donde el compuesto se une a C3 e inhibe la activación del complemento con una actividad al menos 500 veces mayor que la de un péptido que comprende SEQ ID NO:1 bajo condiciones de ensayo equivalentes.

Otro aspecto de la invención caracteriza un compuesto como se describe anteriormente, que incluye un componente adicional que prolonga la retención *in vivo* (es decir, el tiempo de permanencia) del compuesto. En una realización, el componente adicional es polietilenglicol (PEG). En otras realizaciones, el componente adicional es una molécula pequeña que se une a una albúmina o un péptido que se une a albúmina. En realizaciones particulares, la molécula pequeña que se une a albúmina o el péptido que se une a albúmina se une al péptido en el N- o C- terminal. La unión puede ser directa o a través de un enlazador o espaciador.

Otro aspecto de la invención caracteriza una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos descritos anteriormente y un vehículo aceptable farmacéuticamente. En una realización, la composición farmacéutica se formula para administración oral. En otra realización, se formula para administración tópica. En otra realización se formula para administración pulmonar. En otra realización, la composición farmacéutica se formula para inyección subcutánea o intramuscular. En otra realización, se formula para inyección o infusión intravenosa.

Otro aspecto de la invención proporciona cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente para emplear en la inhibición de la activación del complemento *in vivo*, *ex vivo*, *in situ* o *in vitro*.

Varias de las características y de las ventajas de la presente invención se entenderán por referencia a la descripción detallada, dibujos y ejemplos de a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Interacción de análogos de compstatina con C3b. (A) Perfiles cinéticos de compstatina conduce a compuestos 4(1MeW), (conjunto de picos menores, más estrechos), Cp20 (SEQ ID NO:3) (conjunto de picos intermedios), y péptido 14 (Cp40 (SEQ ID NO:18)) (conjunto de picos mayores, más amplios) como se determinó mediante análisis cinético cíclico único empleando resonancia de plasmones de superficie (SPR, de sus siglas en inglés). (B) Gráfica de tasa de péptidos 1-20 así como los compuestos de referencia 4(1MeW) y Cp20 (SEQ ID NO:3) con líneas de isoafinidad mostradas como líneas discontinuas. Se muestran las líneas de referencia para la tasa constante y la afinidad de Cp20 (SEQ ID NO:3).

Fig. 2. Correlación entre los valores de energía libres (ΔG) como un cálculo a partir de un experimento de acoplamiento computacional entre análogos de compstatina y C3c (eje y) y a partir de valores de afinidad determinados experimentalmente de los mismos análogos para C3b (eje x). Próximos a cada marca de la gráfica se muestran los números de los péptidos. La correlación entre el conjunto entero de datos se muestra como una línea continua mientras que la línea discontinua representa la correlación después de la exclusión de los péptidos 1, 5 y 7.

Fig. 3. Acoplamiento de análogos de compstatina en el sitio de unión de C3c. (A) Conformación acoplada del péptido 14 (Cp40 (SEQ ID NO:18), cian en la figura de color) y el péptido 4 (gris en la figura de color) (señalar en la figura sin color, el anillo aromático en la cadena lateral dY (CP40 (SEQ ID NO:18)) está superpuesta en frente del anillo de Y (péptido 4) y se puede distinguir de esta manera). Otros aminoácidos D tienen una conformación similar al péptido 14 en los modelos de acoplamiento. Las cadenas laterales de otros restos en el péptido 4 se omitieron para mayor claridad. (B) Conformación de acoplamiento para el péptido 19.

Fig. 4. Estabilidad del péptido 3 (Cp30 (SEQ ID NO:7)) y del péptido 14 (Cp40 (SEQ ID NO:18)) en el plasma humano a 37°C. Cp30 (SEQ ID NO:7), Cp40 (SEQ ID NO:18) y un control positivo del péptido 2B se mezclaron en el plasma humano para alcanzar una concentración final de 20 μ M. El plasma se incubó a 37°C y se tomaron 100 μ L de la mezcla en varios puntos de tiempo. Los péptidos se extrajeron del plasma empleando la extracción en fase sólida y se analizaron empleando UPLC-MS (cromatografía de alto rendimiento de masas en tándem, des sus siglas en inglés). 3A: se trazó el área de cada muestra en diferentes puntos de tiempo a lo largo del tiempo (cuadrado: Cp40 (SEQ ID NO:18), círculo: Cp30 (SEQ ID NO:7), triángulo: péptido control 2B). 3B: Cromatografía de las muestras a partir del tiempo 0 (arriba), 24 horas (mitad) y 120 horas (abajo).

Fig. 5. Ensayo farmacocinético de análogos de compstatina en primates no humanos. (A) Gráfica lineal del nivel del péptido a lo largo del tiempo después de la inyección en bolo i.v de 2 mg/kg en monos cynomolgus, mostrando un modelo bifásico con una fase de eliminación inicial rápida seguido de una fase terminal log-lineal lenta. Cp20 (SEQ ID NO:3) – dos líneas inferiores, Cp30 (SEQ ID NO:7) (Péptido 3) – dos líneas intermedias; Cp40 (SEQ ID NO:18) (Péptido 14) – dos líneas superiores. (B) Cálculo de la vida media de eliminación plasmática ($t_{1/2}$) a partir de la fase terminal (1-24 horas). Cp20 (SEQ ID NO:3) –dos líneas inferiores; Cp30 (SEQ ID NO:7) (Péptido 3) –dos líneas intermedias; Cp40 (SEQ ID NO:18) (Péptido 14) – dos líneas superiores. Las líneas discontinuas marcan el intervalo de niveles plasmáticos medidos de la proteína diana C3 en ambos paneles A y B. (C) Superposición de perfiles cinéticos del análogo Cp20 (SEQ ID NO:3) para movilizar C3 de seres humanos, babuinos, monos cynomolgus y macacos Rhesus como se ensayó mediante SPR.

Fig. 6. Concentraciones plasmáticas del análogo de compstatina Cp40 (SEQ ID NO:18) después de una administración única del análogo mediante dos vías diferentes en monos cynomolgus. Se midieron las concentraciones plasmáticas mediante espectrometría de masas en puntos de tiempo después de la inyección subcutánea (panel superior) o después de la administración oral (panel inferior).

5 Fig. 7. Concentraciones plasmáticas y actividad inhibitoria del complemento del análogo de compstatina Cp40 (SEQ ID NO:18) después de la administración única del análogo de compstatina mediante inyección intramuscular en un babuino. Las concentraciones plasmáticas se midieron mediante espectrometría de masas en los puntos de tiempo después de la inyección intramuscular (círculos). La inhibición de la activación del complemento a través de rutas alternativas se midió mediante un ensayo hemolítico eritrocitario (triángulos).

10 Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Definiciones:

A lo largo de la memoria y de las reivindicaciones se emplean varios términos que se refieren a los métodos y a otros aspectos de la presente invención. Tales términos se proporcionan por su significado habitual en la técnica a menos que se indique lo contrario de otra manera. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de una manera consecuente con la definición proporcionada en la presente memoria.

Las siguientes abreviaturas se pueden emplear en la presente memoria: Ac, grupo acetilo; DCM, diclorometano; DIC, 1,3-diisopropilcarbodiimida; DIPEA; N,N-diisopropiletilamina; DPBS, solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco; ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; ESI, ionización por electrospray; Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; HOAt, 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol; ITC, calorimetría isotérmica de titulación; MALDI, ionización/desorción láser asistida por matriz; MBHA, 4-metilbenzihidrilamina; NMP, N-metilpirrolidinona; Sar, N-metil glicina; SPR, resonancia de plasmones de superficie; TIPS, triisopropilsilano; Trt, tritilo; WFI, agua para inyección.

El término “aproximadamente”, como se emplea en la presente memoria cuando se hace referencia a un valor mensurable como es una cantidad, una duración temporal, y similar, pretende englobar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ con respecto al valor especificado, según dichas variaciones sean apropiadas para realizar y usar los compuestos y composiciones divulgadas.

El término “compstatina” como se emplea en la presente memoria se refiere a un péptido que comprende SEQ ID NO:1, ICVVQDWGHRCT (C2-C12 cíclico a modo de enlace disulfuro). El término “análogo de compstatina” se refiere a una compstatina modificada que comprende sustituciones de aminoácidos naturales y/o no naturales, o aminoácidos análogos, así como modificaciones dentro o entre varios aminoácidos, como se describe en mayor detalle en la presente memoria, y como es conocido en la técnica. Cuando se refiere a la localización de aminoácidos o análogos en particular dentro de la compstatina o de análogos de compstatina, las localizaciones se refieren a veces como “posiciones” dentro del péptido, con las posiciones numeradas del 1 (Ile en compstatina) al 13 (Thr en compstatina). Por ejemplo, el resto Gly ocupa la “posición 8”.

Los términos “activo farmacéuticamente” y “activo biológicamente” se refieren a la capacidad de los compuestos de la invención para unirse a C3 o a fragmentos del mismo e inhibir la activación del complemento. Esta actividad biológica puede medirse mediante uno o más de los diversos ensayos reconocidos en la técnica, tal y como se describe en mayor detalle en la presente memoria.

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

Como se emplea en la presente memoria, “halo” se refiere a F, Cl, Br, o I.

Como se emplea en la presente memoria el término “alcanoilo”, que se puede emplear de manera intercambiable con “acilo”, se refiere a un resto acíclico alifático lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono. Grupos alcanoilo incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, isopentanoilo, 2-metil-butirilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, y similares. El término “alcanoilo inferior” se refiere a un resto acíclico alifático lineal o ramificado que tiene de

aproximadamente 1 a aproximadamente 5 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo). Grupos alcanoilos inferiores incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, n-propionilo, iso-propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, iso-pentanoilo, y similares.

5 Como se emplea en la presente memoria, "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático mono o bicíclico opcionalmente sustituido que tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, fenilo y naftilo.

10 Como se emplea en la presente memoria, "aralquilo" se refiere a alquilo como se define anteriormente, portadores de un sustituyente arilo y que tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos aralquilo se pueden sustituir opcionalmente. Ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, bencilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo.

15 Como se emplea en la presente memoria, los términos "alcoxi" y "alcoxilo" se refieren a un grupo O-alquilo opcionalmente sustituido en donde el alquilo es como se define anteriormente. Ejemplos de grupos alcoxi o alcoxilo incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, y heptoxi, entre otros.

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

20 Como se emplea en la presente memoria, "alcoxicarbonilo" se refiere a un grupo alquilo $-C(=O)O-$, en el que el alquilo es como se define anteriormente.

Como se emplea en la presente memoria, "aroiilo" se refiere a un grupo $-C(=O)$ -arilo, en el que el arilo es como se define anteriormente. Entre los grupos aroiilo de ejemplo se incluyen benzoilo y naftoilo.

25 Normalmente, restos químicos sustituidos incluyen uno o más sustituyentes que sustituyen al hidrógeno en localizaciones seleccionadas en la molécula. Ejemplos de sustituyentes incluyen, por ejemplo, halo, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, sulfhidrilo, hidroxilo ($-OH$), alcoxilo, ciano ($-CN$), carboxilo ($-COOH$), acilo (alcanoilo: $-C(=O)R$); $-C(=O)O$ -alquilo, aminocarbonilo ($-C(=O)NH_2$), aminocarbonilo N-sustituido ($-C(=O)NHR$), CF_3 , CF_2CF_3 , y similares. En relación a los sustituyentes mencionados anteriormente, cada resto "R" puede ser, de forma independiente, cualquiera de H, alquilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo, por ejemplo.

30 Como se emplea en la presente memoria, "L-aminoácido" se refiere a cualquiera de los alfa-aminoácidos levógiros que aparecen de manera natural presentes normalmente en las proteínas o los ésteres de alquilo de dichos alfa-aminoácidos. El término "D-aminoácido" se refiere a los alfa-aminoácidos dextrógiros. A menos que se especifique lo contrario, todos los aminoácidos a los que se hace referencia en la presente memoria son L-aminoácidos.

Hidrofóbico" o "no polar" se emplean en la presente memoria como sinónimos, y hacen referencia a cualquier interacción inter- o intra-molecular no caracterizada por un dipolo.

35 "PEGilación" se refiere a la reacción en la que al menos una parte de la molécula de polietilenglicol (PEG), independientemente del tamaño, se une químicamente a una proteína o péptido para formar un conjugado péptido-PEG. "PEGilado" significa que al menos una parte de la molécula de PEG, independientemente del tamaño, está unida químicamente a un péptido o proteína. El término PEG va generalmente acompañado por un sufijo numérico que indica el peso molecular medio aproximado de los polímeros de PEG; por ejemplo, PEG-8.000 se refiere a un polietilenglicol que posee un peso molecular medio de aproximadamente 8.000 Daltons (o g/mol).

40 Como se emplea en la presente memoria, "sales aceptables farmacéuticamente" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto precursor es modificado fabricando sales base o ácidas del mismo. Ejemplos de sales aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no se limitan a, sales ácidas orgánicas o minerales de residuos básicos tales como aminas; sales orgánicas o alcalinas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Por tanto, el término "sal de adición ácida" se refiere al derivado de sal correspondiente de un compuesto precursor que ha sido elaborado mediante la adición de un ácido. Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen las sales convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos. Por ejemplo, dichas sales convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos tales como los clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos, sulfámicos, fosfóricos, nítricos, y similares; y las sales elaboradas a partir de ácidos orgánicos tales como los acéticos, propiónicos, succínicos, glicólicos, esteáricos, lácticos, málicos, tartáricos, cítricos, ascórbicos, pamoicos, maleicos, hidroximaleicos, fenilacéticos, glutámicos, benzoicos, salicílicos, sulfanílicos, 2-acetoxibenzoicos, fumáricos, toluensulfónicos, metanosulfónicos, etanodisulfónicos, oxálicos, isetiónicos, y similares. Ciertos compuestos básicos o ácidos de la presente invención pueden existir como zwitteriones. Todas las formas de los compuestos, incluyendo el ácido libre, la base libre, y los zwitteriones, se considera que están dentro del alcance de la presente invención.

Descripción:

La presente invención nace en parte a partir del desarrollo de los inventores de análogos de compstatina que muestran mejoras tanto en la potencia inhibitoria como en los parámetros farmacocinéticos. La modificación selectiva del N-terminal de compstatina con aminoácidos no patogénicos y/o otras entidades moleculares dan como resultado determinados análogos con afinidad de unión subnanomolar ($K_D = 0,5 \text{ nM}$) y otros derivados potentes similares con solubilidad mejorada en disolventes relevantes clínicamente. La evaluación farmacocinética en primates no humanos reveló valores de vida media plasmática que exceden las expectativas para los fármacos peptídicos. La evaluación de la biodisponibilidad en dos modelos de primates no humanos demostraron biodisponibilidad subcutánea, intramuscular y oral de determinados análogos.

Una modificación de acuerdo con la presente invención comprende la adición de un componente al extremo N-terminal de compstatina (Ile-[Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys]-Thr; SEQ ID NO:1) que mejora la solubilidad y la estabilidad plasmática del péptido, mientras que se mantiene o se mejora la afinidad de unión a C3 y la actividad inhibitoria del complemento. En realizaciones particulares, el componente adicional es un resto aminoácido, particularmente un resto que resiste la escisión proteolítica, tal como un aminoácido N-metilado (*por ejemplo*, N-metil Gly (Sar), o un D-aminoácido (*por ejemplo*, D-tirosina). También, como se discute en mayor detalle a continuación, la configuración D del resto N-terminal puede configurar mejor el grupo amino libre para la interacción polar con C3. Adicionalmente, aminoácidos o análogos que comprenden una cadena hidrofóbica (*por ejemplo*, que incluyen un anillo aromático) en el extremo N-terminal facilita la unión a C3, probablemente a través de la interacción con un bolsillo hidrofóbico en el sitio de unión a C3 de compstatina.

A continuación se hace referencia a ejemplos de análogos, que muestran una actividad mejorada significativamente sobre la compstatina e incluso al análogo potente, Ac-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys]-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:2) (Katragadda *et al.*, 2006, *supra*, Patente WO2007/062249); a veces referido en la presente memoria como "4(1MeW)", así como a varias de otras características discutidas en detalle a continuación.

"Compstatina 30" (Cp30):

Sar-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂ (SEQ ID NO:7, también referido en los Ejemplos como el "péptido 3")

"Compstatina 40" (Cp40)

dTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂ (SEQ ID NO:18, también referido en los Ejemplos como el "péptido 14")

Sin entenderse por estar vinculado o limitado por ninguna teoría, se cree que la afinidad de unión a C3 mejorada de los análogos descritos en la presente memoria es debido al menos en parte a una mayor afinidad de las interacciones mediadas por el N-terminal. Por ejemplo, datos SPR y ELISA indican que D-aminoácidos, o aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas mejoran la unión a C3, mientras que la combinación de características, es *decir*, D-aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, D-Tyr), eran las más ventajosas. En general, D-aminoácidos con cadenas laterales aromáticas mostraban ser favorecidos sobre los aminoácidos con cadenas laterales más cortas bien en configuración D o L. Además, estudios de acoplamiento indican que los sistemas de afinidad mejorados a partir de interacciones polares y no polares adicionales implican el posicionamiento del grupo amino libre, y la naturaleza y el posicionamiento de la cadena lateral en el resto N-terminal. Por ejemplo, el aumento de afinidad de Cp40 (SEQ ID NO:18) se determinó por deberse al menos en parte a partir de una combinación de interacciones con C3 en el extremo N-terminal del análogo; (1) la configuración D del extremo N-terminal de Tyr muestra mejor el grupo amino libre para la interacción polar con C3, una característica que explica también la ventaja de la configuración D general; y (2) la cadena lateral hidrofóbica voluminosa era capaz de adaptarse al bolsillo hidrofóbico de C3c y presenta también un grupo hidroxilo para la unión de hidrógeno con C3c. Además, estudios de acoplamiento predicen un análogo que comprende Ac-Trp en el N-terminal (Ejemplo 2) para unirse a C3 con mayor afinidad. Un análisis SPR del péptido 1 muestra de hecho una mayor afinidad de unión, en comparación con Cp40 (SEQ ID NO:18) (péptido 14). Se determinó que ambos péptidos utilizan el bolsillo de unión hidrofóbico en C3, C3b o C3c, próximo al N-terminal de compstatina.

La N-metilación puede afectar a un péptido de varias formas. Primero, un donante de un enlace de hidrógeno potencial se reemplaza por un grupo metilo, que no puede formar un enlace de hidrógeno. Segundo, el grupo N-metilo es un donador de electrones más débil lo que significa que puede incrementar ligeramente la basicidad del grupo carbonilo vecino. Tercero, el tamaño del grupo N-metilo puede causar una limitación estérica, dependiendo de la naturaleza de los restos colindantes. Finalmente, la N-metilación puede cambiar la población trans/cis del enlace amida cambiando, por tanto, la conformación del péptido local de una manera similar a una prolina. En el caso de Cp30 (SEQ ID NO:7), los datos SPR indican una tasa de asociación ligeramente más rápida y una tasa de disociación más lenta que Cp20 (SEQ ID NO:3), lo que sugiere que Cp30 (SEQ ID NO:7) tiene una conformación en disolución más favorable para la unión a C3/C3b/C3c y la unión es más fuerte. Considerando la ausencia de un grupo Ac y la presencia de un grupo metilo en la posición N-terminal, es razonable suponer que la modificación permite al N-terminal tomar parte en una interacción polar más fuerte con restos S388/S437/D349 de C3c. Esto es

posible mediante el posicionamiento del N-terminal libre a una posición favorable a través de N-metilación de manera que mejoran las interacciones polares con el sitio de unión en C3/C3c.

Además de proporcionar una afinidad de unión a C3 mejorada, los análogos de la presente invención poseen características de solubilidad mejoradas en comparación con los análogos disponibles anteriormente, tal como Cp20 (SEQ ID NO:3). Para la administración farmacológica sistémica, son deseables análogos con alta solubilidad tanto en agua para inyección (WFI) como en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) para minimizar el volumen de inyección requerido. En comparación, los análogos con una alta solubilidad en WFI y menor solubilidad en PBS pueden producir un gel, precipitado o suspensión de duración más prolongada para aplicación tópica o inyección local, tal como inyección intraocular, *por ejemplo*, para el tratamiento de DMAE. Se determinó que Cp30 (SEQ ID NO:7) era soluble tanto en WFI como en PBS, mientras que Cp40 (SEQ ID NO:18) era menos soluble en PBS que en WFI.

Los análogos peptídicos de la invención presentan además características de estabilidad plasmática favorables, se cree que debido al menos en parte a la presencia de uno o más componentes N-terminales que resisten al ataque de proteasas, *por ejemplo*, un resto D-aminoácido o un grupo N-metilo, o moléculas que se unen a albúmina. Además, los análogos se unen de forma específica y robusta a C3, C3b y C3c en plasma. De manera importante, la estabilidad proporcionada mediante el N-terminal y/o otras modificaciones descritas en la presente memoria contribuyen a la biodisponibilidad mejorada de la administración oral, subcutánea o intramuscular, como se demostró en ratones y en dos sistemas modelo de primates no humanos, así como mejoró (*es decir*, más lento) los valores de semivida de eliminación de los análogos *in vivo*, como se demostró en sistemas modelo de primates.

Las modificaciones N-terminales descritas anteriormente se pueden combinar con otras modificaciones de compstatina mostradas anteriormente para mejorar la actividad, produciendo de este modo péptidos con actividad inhibitoria del complemento mejorada significativamente. Por ejemplo, la acetilación del N-terminal incrementa normalmente la actividad inhibitoria del complemento de compstatina y de sus análogos. Por consiguiente, la adición de un grupo acilo en el amino terminal del péptido, que incluye pero no se limita a N-acetilación, es una de las realizaciones de la invención, aunque puede no ser necesario si el N-terminal del péptido es ya estable, o si la solubilidad es un problema.

Otro ejemplo, es conocido que la sustitución de Ala por His en posición 9 mejora la actividad de compstatina así como que es una modificación preferida de los péptidos de la presente invención. Se ha determinado también que la sustitución de Tyr por Val en posición 4 puede dar como resultado una modesta mejora en la actividad (Klepeis *et al.*, 2003, *J Am Chem Soc* 125:8422-8423).

En las Patentes WO2004/026328 y WO2007/0622249 se divulga que Trp y determinados análogos de Trp en posición 4, así como en determinados análogos Trp en posición 7, especialmente combinados con Ala en posición 9, producen una actividad mucho mayor que la de compstatina. Estas modificaciones se emplean también de manera ventajosa en la presente invención.

En particular, los péptidos que comprenden bien 5-flúor-triptófano o bien 5-metoxi-, 5-metil- o 1-,etil-triptófano, o 1-formil-triptófano o en posición 4 han demostrado poseer una actividad 31-264 veces mayor que compstatina. Son particularmente preferidos 1-metil y 1-formil triptófano. Se cree que el enlace de hidrógeno con mediación de un 'N' de indol no es necesario en la posición 4 para la unión y la actividad de compstatina. La ausencia de este enlace de hidrógeno o reducción del carácter polar mediante el reemplazo del hidrógeno por un alquilo inferior, alcanilo o nitrógeno de indol en la posición 4 mejora la unión y la actividad de compstatina. Sin pretender estar limitado a ninguna teoría o mecanismo de acción, se cree que una interacción o efecto hidrofóbico en la posición 4 fortalece la interacción de compstatina con C3. Por consiguiente, en la presente invención modificaciones de Trp en posición 4 (*por ejemplo*, alterar la estructura de la cadena lateral según métodos bien conocidos en la técnica), o sustituciones de análogos de triptófano en la posición 4 o en la posición 7 que mantienen o mejoran la interacción hidrofóbica anteriormente mencionada se contemplan como una modificación ventajosa en combinación con las modificaciones en las posiciones 8 y 13 como se describen anteriormente. Tales análogos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los análogos ejemplificados de la presente memoria, así como derivados de los mismos no sustituidos o sustituidos de forma alternativa. Ejemplos de análogos adecuados se pueden encontrar por referencia en las siguientes publicaciones, y muchas otras: Beene, *et al.* (2002) *Biochemistry* 41:10262-10269 (que describe, entre otros, análogos de Trp halogenados en solitario o en multitud); Babitzky y Yanofsky, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:12452-12456 (que describen, entre otros, Trp metilado y halogenado y otros análogos de Trp y de indol); y las Patentes U.S. 6.214.790, 6.169.057, 5.776.970, 4.870.097, 4.576.750 y 4.299.838. Los análogos de Trp pueden introducirse en el péptido compstatina mediante expresión *in vitro* o *in vivo*, o mediante síntesis peptídica, tal y como se conoce en la técnica.

En determinadas realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina se sustituye por un análogo que comprende un sustituyente 1-alquilo, más en particular un sustituyente alquilo inferior (*por ejemplo*, de C₁-C₅) como se define anteriormente. Estos incluyen, pero no se limitan a N(α) metiltriptófano y 5-metiltriptófano. En otras realizaciones, Trp en la posición 4 de la compstatina se sustituye por un análogo que comprende un sustituyente 1-alcanilo, más en particular un sustituyente alcanilo inferior (*por ejemplo*, C₁-C₅) tal y como se define anteriormente, *por ejemplo*, N(α) formil triptófano, 1-acetil-L-triptófano y L-β-homotriptófano.

En la Patente WO2007/0622249 se describió que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 7 de la compstatina incrementaba la entalpía de la interacción entre el análogo de compstatina resultante y C3, en relación a compstatina, mientras que la incorporación de 5-fluoro-triptófano en la posición 4 disminuía la entalpía de esta interacción. Por consiguiente, las modificaciones de Trp en la posición 7, como se describe en la Patente WO2007/0622249, se contemplan como modificaciones útiles en combinación con las modificaciones N-terminales descritas anteriormente.

Otras modificaciones se describen en la Patente WO2010/127336. Una modificación descrita en esta patente comprende reducir la estructura peptídica en posición 8 del péptido. En una realización particular, la estructura se reduce mediante el reemplazo de glicina en posición 8 (Gly⁸) con N-metil glicina. Otra modificación descrita en esta patente comprende el reemplazo de Thr en posición 13 con Ile, Leu, Nle (norleucina), N-metil Thr o N-metil Ile.

Otras modificaciones se describen en la solicitud en tramitación con la presente N° 61/385.711. Una de tales modificaciones comprende el reemplazo del puente disulfuro C2-C12 con la adición de un CH₂ a partir de una homocisteína en C2 o C12, y la introducción de un enlace tioéter, para formar una cistationina, tal como una gamma-cistationina o una delta-cistationina. Otra modificación comprende el reemplazo del enlace disulfuro C2-C12 con un enlace tioéter sin la adición de CH₂, formando de este modo una lantionina. Los análogos que comprenden el enlace tioéter demuestran una actividad que es sustancialmente igual a la de ciertos análogos de enlace disulfuro y poseen también características de estabilidad mejoradas o equivalentes.

En la presente solicitud se describen otras modificaciones internas. Por ejemplo, sustituir ornitina por arginina en posición 11, y/o sustituir asparragina por ácido aspártico en posición 6 de determinados análogos de compstatina (por ejemplo, Cp20, SEQ ID NO:3, Cp40, SEQ ID NO:18), dando como resultado en análogos con una unión y actividad inhibitoria del complemento similares al de los compuestos parenteral. Además, una o ambas de estas sustituciones se espera que hagan a los análogos menos susceptibles al metabolismo por determinadas enzimas fisiológicas que se encuentran en el tracto intestinal, hígado o plasma.

Los péptidos de compstatina modificados de la presente invención se pueden preparar mediante varios métodos sintéticos de síntesis peptídica a través de la condensación de uno o más restos de aminoácidos, de acuerdo con los métodos de síntesis peptídica convencionales. Por ejemplo, los péptidos se sintetizan según metodologías de fase sólida estándar. Otros métodos de síntesis peptídica o de peptidomiméticos, bien mediante metodologías de fase sólida o bien en fase líquida, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Durante el transcurso de la síntesis peptídica, los aminoácidos de cadena ramificada y los grupos carboxilo se pueden proteger/desproteger según se necesite, empleando grupos protectores conocidos normalmente. En el Ejemplo 1 se expone un ejemplo de un método sintético adecuado. La modificación que emplea grupos de protección para péptidos y derivados peptídicos alternativos serán evidentes por los expertos en la técnica.

Alternativamente, se pueden producir determinados péptidos de la invención mediante la expresión en un sistema procariótico o eucariótico adecuado. Por ejemplo, se puede insertar un constructo de ADN en un vector plasmídico adaptado a la expresión en una célula bacteriana (tal como *E.coli*) o una célula de levadura (tal como *Saccharomyces cerevisiae*), o en un vector baculovirus para la expresión en una célula de insecto o un vector viral para la expresión en una célula de mamífero. Tales vectores comprenden los elementos regulatorios necesarios para la expresión del ADN en la célula hospedadora, posicionada de tal manera como para permitir la expresión del ADN en la célula hospedadora. Tales elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción y, opcionalmente, secuencias potenciadoras.

Los péptidos se pueden producir también mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico *in vitro* o *in vivo*. Se puede introducir en un sistema de expresión *in vivo* un constructo de ADN que codifica un concatémero de los péptidos, siendo el límite superior del concatémero dependiente del sistema de expresión empleado. Después de producirse el concatémero, se produce la separación entre el C-terminal de Asn y el N-terminal de G de a continuación mediante la exposición del polipéptido a hidracina.

Los péptidos producidos mediante la expresión genética en un sistema procariótico o eucariótico recombinante se pueden purificar según métodos conocidos en la técnica. Para producir análogos de compstatina se puede emplear también una combinación de expresión genética y métodos sintéticos. Por ejemplo, se puede producir un análogo mediante expresión genética y después someterse a uno o más procesos sintéticos de post-traducción, por ejemplo, para modificar el N- o el C-terminal o para ciclar la molécula.

De manera ventajosa, los péptidos que incorporan aminoácidos no naturales, por ejemplo, aminoácidos metilados, se pueden producir mediante expresión *in vivo* en un sistema procariótico o eucariótico adecuado. Por ejemplo, se pueden emplear métodos tales como los descritos por Katagradra y Lambris (2006, *Protein Expression and Purification* 47:289-295) para introducir análogos de Trp no naturales en compstatina a través de la expresión en auxótrofos de *E. coli*, para introducir aminoácidos N-metilados u otros aminoácidos no naturales en posiciones seleccionadas de compstatina.

La estructura de compstatina es conocida en la técnica, y las estructuras de los análogos anteriores se determinan mediante medios similares. Una vez se ha determinado la conformación deseada de un péptido corto, los métodos

para diseñar un péptido o peptidomimético para ajustar esta conformación son bien conocidos en la técnica. De particular relevancia para la presente invención, el diseño de péptidos análogos se puede ajustar también considerando la contribución de varias cadenas laterales de los restos aminoácidos, como se discute anteriormente (es decir, para el efecto de grupos funcionales o por consideraciones estéricas).

- 5 Será evidente para los expertos en la técnica que un mimético peptídico puede servir igual que un péptido para proporcionar la conformación estructural específica y las funcionalidades de la cadena lateral necesarias para unirse a C3 y para inhibir la activación del complemento. Los compuestos que inhiben la unión a C3, y el complemento, se pueden producir a través del empleo de o bien aminoácidos que aparecen de manera natural, de derivados de aminoácidos, análogos o moléculas no aminoácidas capaces de unirse para formar la conformación estructural adecuada. Un análogo no peptídico, o un análogo que comprende péptidos y componentes no peptídicos, se refiere a veces en la presente memoria como un "peptidomimético" o "mimético isostérico", para designar sustituciones o derivaciones de los péptidos de la invención, que poseen las mismas características conformacionales estructurales y/u otras funcionalidades, de modo que sea suficientemente similar a los péptidos ejemplificados como para inhibir la activación del complemento.
- 10
- 15 El empleo de peptidomiméticos para el desarrollo de análogos peptídicos de alta afinidad es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Vagner *et al.*, 2008, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12:292-296; Robinson *et al.*, 2008, *Drug Disc. Today* 13:944-951). Suponiendo restricciones rotacionales similares a las de los restos de aminoácidos dentro de un péptido, se pueden analizar los análogos que comprenden partes de moléculas no aminoácidas y pueden verificarse sus motivos conformacionales, mediante cualquiera de las técnicas computacionales que son bien conocidas en la técnica.
- 20

Los péptidos de compstatina modificados de la presente invención pueden modificarse mediante la adición de componentes de polietilenglicol (PEG) al péptido. Tal y como se conoce bien en la técnica, la PEGilación puede incrementar la vida media de las proteínas y péptidos terapéuticos *in vivo*. En una realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000. En otra realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000. En otra realización, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000. En una realización ejemplo, el PEG posee un peso molecular medio de aproximadamente 5.000. El polietilenglicol puede ser una cadena ramificada o lineal, y preferentemente es una cadena lineal.

25

Los análogos de la compstatina de la presente invención pueden unirse de forma covalente a PEG mediante un grupo de enlace. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. (Revisados en Kozlowski A. *et al.* 2001, *BioDrugs* 15:419-29; véase también, Harris JM y Zalipsky S, eds. Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series 680 (1997)). Entre los ejemplos no restrictivos de grupos de unión aceptables se incluyen un grupo éster, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un carbohidrato, un grupo succinimida (incluyendo, sin limitación, succinato de succinimidilo (SS), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinamida de succinimidilo (SSA) y N-hidroxisuccinimida (NHS)), un grupo epóxido, un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, pero sin limitación, carbonilimidazol (CDI)), un grupo nitrofenilo (incluyendo, pero sin limitación, nitrofenil carbonato (NPC) o triclorofenil carbonato (TPC)), un grupo trisilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina o una amina primaria. En determinadas realizaciones, el grupo de unión es un grupo succinimida. En una realización, el grupo de unión es NHS.

30

35

40

Los análogos de la compstatina de la presente invención pueden acoplarse de forma alternativa directamente al PEG (es decir, sin grupo de unión) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo. En una realización, el PEG se acopla a un resto de lisina añadido al extremo C-terminal de la compstatina.

Como una alternativa a la PEGilación, el aclaramiento *in vivo* de péptidos puede también reducirse uniendo los péptidos a determinados otros péptidos o moléculas. Por ejemplo, determinados péptidos de unión a albúmina (ABP) muestran una vida media inusualmente larga de 2,3 horas cuando se inyectan mediante bolo intravenoso a conejos (Dennis *et al.*, 2002, *J Biol Chem.* 277:35035-35043). Un péptido de este tipo, fusionado con el factor antitislular Fab de D3H44, permitió que Fab se uniese a la albúmina a la vez que mantenía la capacidad de Fab para unirse al factor tislular (Nguyen *et al.*, 2006, *Protein Eng Des Sel.* 19:291-297). Esta interacción con la albúmina dio como resultado un aclaramiento *in vivo* reducido significativamente y una vida media extendida en ratones y conejos, en comparación con el Fab de D3H44 de tipo salvaje, comparable con lo observado para las moléculas de Fab PEGiladas, las inmunoadhesinas y fusiones de albúmina. La Patente WO2010/127336 expone estrategias de síntesis adecuadas que utilizan ABP así como una molécula pequeña que se une a albúmina (ABM, de sus siglas en inglés), y que emplean opcionalmente un espaciador o enlazador entre los componentes. Estos procedimientos dan como resultado la producción de conjugados de ABP y de análogos de compstatina-ABM capaces de inhibir la activación del complemento y que muestran también una supervivencia *in vivo* prolongada. El Ejemplo 1 de la presente memoria describe el empleo de estos y otros procedimientos con una mayor afinidad por la molécula pequeña que se une a albúmina, ABM2, para generar un análogo de compstatina-ABM2 conjugado al C-terminal que utiliza una molécula enlazadora. El Ejemplo 1 describe además la producción de conjugados en N-terminal de determinados análogos de compstatina con tres moléculas pequeñas que se unen a albúmina diferentes, ABM, ABM0 y ABM2 empleando la unión directa sin un enlazador. Tales conjugados, ya sea C-terminal, N-terminal directo

45

50

55

60

o a través de un espaciador o enlazador, muestran una unión por C3 y una actividad que inhibe el complemento comparables o que superan a los de los análogos sin conjugar, así como una retención favorable *in vivo*.

La actividad de inhibición de la activación del complemento de los análogos de la compstatina, los peptidomiméticos y conjugados puede analizarse mediante una diversidad de ensayos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, se emplean los ensayos descritos en los Ejemplos. Se expone un listado no exhaustivo de otros ensayos en las Patentes U.S. 6.319.897, WO99/13899, WO 2004/026328, WO2007/062249 y WO2010/127336, que incluyen, pero no se limitan a, (1) la unión del péptido a C3 y a fragmentos de C3; (2) diferentes ensayos hemolíticos; (3) medición de la división de C3 mediada por la convertasa C3; y (4) medición de la división del Factor B mediante el Factor D.

Los péptidos y peptidomiméticos descritos en la presente memoria son de utilidad práctica para cualquier fin para el que se use la compstatina en sí misma, tal y como se conoce en la técnica. Entre tales usos se incluyen, pero no se limitan a: (1) inhibición de la activación del complemento en el suero, y en células, tejidos u órganos de un paciente (ser humano o animal), lo que puede facilitar el tratamiento de ciertas enfermedades o condiciones, que incluyen pero no se limitan a, la degeneración macular asociada a la edad, la artritis reumatoide, la lesión de la médula espinal, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, cáncer, sepsis, hemoglobinuria paroxística nocturna, psoriasis y trastornos respiratorios tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), inflamación alérgica, enfisema, bronquitis, bronquiectasias, fibrosis quística, tuberculosis, neumonía, síndrome de distrés respiratorio (SDR – neonatal y adulto), rinitis y sinusitis; (2) inhibición de la activación del complemento que se produce durante el trasplante de células u órganos, o durante el empleo de implantes u órganos artificiales (*por ejemplo*, antes de la administración sistémica restringida en el tiempo, durante y/o después del procedimiento o recubriendo o tratando de otro modo las células, órganos, órganos o implantes artificiales con un péptido de la invención); (3) inhibición de la activación del complemento que se produce durante la circulación extracorpórea de fluidos fisiológicos (sangre, orina) (*por ejemplo*, antes de la administración sistémica restringida en el tiempo, durante y/o después del procedimiento o recubriendo con un péptido de la invención los tubos a través de los que se hacen circular los fluidos); y (4) en el cribado de bibliotecas de moléculas pequeñas para identificar a otros inhibidores de la activación de la compstatina (por ejemplo, ensayos de alto rendimiento de fase líquida o sólida diseñados para medir la capacidad de un compuesto de prueba para competir con un análogo de compstatina para unirse con C3 o un fragmento de C3).

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

Se puede seleccionar un análogo de compstatina particular de la invención para una formulación determinada en base a sus características de solubilidad. Como se mencionó anteriormente, los análogos que son altamente solubles en agua o en suero tamponado pueden ser adecuados particularmente para inyección sistémica ya que el volumen de inyección se puede minimizar. En comparación, los análogos de compstatina con alta solubilidad en agua y baja solubilidad en suero tamponado puede producir un gel, suspensión o precipitado de duración más prolongada para aplicación tópica o inyección local, tal como para inyección intraocular. Por tanto, con fines ilustrativos y sin intención de limitación, Cp30 (SEQ ID NO:7) se podría seleccionar para formulaciones farmacéuticas a administrar mediante inyección sistémica, mientras que Cp40 (SEQ ID NO:18) se puede seleccionar para formulaciones para inyección intravítrea. De manera notable, Cp40 (SEQ ID NO:18) ha demostrado estar disponible de manera oral y por vía subcutánea o inyección intramuscular, que proporciona importantes medios adicionales para el suministro, como se discute a continuación.

Las formulaciones o las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado a continuación en la técnica de tecnología farmacéutica. En general, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de poner el ingrediente activo en asociación con un vehículo o uno o más ingredientes auxiliares, y después, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en unidades de dosificación unitarias o múltiples.

Como se emplea en la presente memoria, el término “vehículo aceptable farmacéuticamente” significa una composición química con el que se puede combinar el análogo de compstatina y que, después de la combinación, se puede emplear para administrar el análogo de compstatina a un individuo.

Como se emplea en la presente memoria, el término éster o sal “aceptable fisiológicamente” significa una forma éster o sal del ingrediente activo que es compatible con cualquiera de los demás ingredientes de la composición farmacéutica, que no sea perjudicial para el sujeto para el que se va administrar la composición.

- Las composiciones farmacéuticas útiles para practicar la invención se pueden administrar para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg y 100 mg/kg por peso corporal como un bolo único, o en un régimen repetido, o en una combinación de los mismos como se determina fácilmente por el experto en la técnica. En determinadas realizaciones, la dosificación comprende al menos 0,1 mg/kg, o al menos 0,2 mg/kg, o al menos 0,3 mg/kg, o al menos 0,4 mg/kg, o al menos 0,5 mg/kg, o al menos 0,6 mg/kg, o al menos 0,7 mg/kg, o al menos 0,8 mg/kg, o al menos 0,9 mg/kg, o al menos 1 mg/kg, o al menos 2 mg/kg, o al menos 3 mg/kg, o al menos 4 mg/kg, o al menos 5 mg/kg, o al menos 6 mg/kg, o al menos 7 mg/kg, o al menos 8 mg/kg, o al menos 9 mg/kg, o al menos 10 mg/kg, o al menos 15 mg/kg, o al menos 20 mg/kg, o al menos 25 mg/kg, o al menos 30 mg/kg, o al menos 35 mg/kg, o al menos 40 mg/kg, o al menos 45 mg/kg, o al menos 50 mg/kg, o al menos 55 mg/kg, o al menos 60 mg/kg, o al menos 65 mg/kg, o al menos 70 mg/kg, o al menos 75 mg/kg, o al menos 80 mg/kg, o al menos 85 mg/kg, o al menos 90 mg/kg, o al menos 95 mg/kg, o al menos 100 mg/kg, con una frecuencia diaria o en otro régimen periódico adecuado. En una realización particular, la dosificación está entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, o entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, o entre aproximadamente 2 mg/kg y aproximadamente 6 mg/kg.
- En una realización, la invención contempla la administración de una dosis que da como resultado una concentración sérica del análogo de compstatina de entre aproximadamente 0,01 μM y aproximadamente 30 μM en un individuo. En determinadas realizaciones, la dosis y el régimen combinado dará como resultado una concentración sérica, o una concentración sérica media a lo largo del tiempo, del análogo de compstatina de al menos aproximadamente 0,01 μM , o al menos aproximadamente 0,02 μM , o al menos aproximadamente 0,03 μM , o al menos aproximadamente 0,04 μM , o al menos aproximadamente 0,05 μM , o al menos aproximadamente 0,06 μM , o al menos aproximadamente 0,07 μM , o al menos aproximadamente 0,08 μM , o al menos aproximadamente 0,09 μM , o al menos aproximadamente 0,1 μM , o al menos aproximadamente 0,11 μM , o al menos aproximadamente 0,12 μM , o al menos aproximadamente 0,13 μM , o al menos aproximadamente 0,14 μM , o al menos aproximadamente 0,15 μM , o al menos aproximadamente 0,16 μM , o al menos aproximadamente 0,17 μM , o al menos aproximadamente 0,18 μM , o al menos aproximadamente 0,19 μM , o al menos aproximadamente 0,2 μM , o al menos aproximadamente 0,3 μM , o al menos aproximadamente 0,4 μM , o al menos aproximadamente 0,5 μM , o al menos aproximadamente 0,6 μM , o al menos aproximadamente 0,7 μM , o al menos aproximadamente 0,8 μM , o al menos aproximadamente 0,9 μM , o al menos aproximadamente 1 μM , o al menos aproximadamente 1,5 μM , o al menos aproximadamente 2 μM , o al menos aproximadamente 2,5 μM , o al menos aproximadamente 3 μM , o al menos aproximadamente 3,5 μM , o al menos aproximadamente 4 μM , o al menos aproximadamente 4,5 μM , o al menos aproximadamente 5 μM , o al menos aproximadamente 5,5 μM , o al menos aproximadamente 6 μM , o al menos aproximadamente 6,5 μM , o al menos aproximadamente 7 μM , o al menos aproximadamente 7,5 μM , o al menos aproximadamente 8 μM , o al menos aproximadamente 8,5 μM , o al menos aproximadamente 9 μM , o al menos aproximadamente 9,5 μM , o al menos aproximadamente 10 μM , o al menos aproximadamente 10,5 μM , o al menos aproximadamente 11 μM , o al menos aproximadamente 11,5 μM , o al menos aproximadamente 12 μM , o al menos aproximadamente 12,5 μM , o al menos aproximadamente 13 μM , o al menos aproximadamente 13,5 μM , o al menos aproximadamente 14 μM , o al menos aproximadamente 14,5 μM , o al menos aproximadamente 15 μM , o al menos aproximadamente 15,5 μM , o al menos aproximadamente 16 μM , o al menos aproximadamente 16,5 μM , o al menos aproximadamente 17 μM , o al menos aproximadamente 17,5 μM , o al menos aproximadamente 18 μM , o al menos aproximadamente 18,5 μM , o al menos aproximadamente 19 μM , o al menos aproximadamente 19,5 μM , o al menos aproximadamente 20 μM , o al menos aproximadamente 20,5 μM , o al menos aproximadamente 21 μM , o al menos aproximadamente 21,5 μM , o al menos aproximadamente 22 μM , o al menos aproximadamente 22,5 μM , o al menos aproximadamente 23 μM , o al menos aproximadamente 23,5 μM , o al menos aproximadamente 24 μM , o al menos aproximadamente 24,5 μM , o al menos aproximadamente 25 μM , o al menos aproximadamente 25,5 μM , o al menos aproximadamente 26 μM , o al menos aproximadamente 26,5 μM , o al menos aproximadamente 27 μM , o al menos aproximadamente 27,5 μM , o al menos aproximadamente 28 μM , o al menos aproximadamente 28,5 μM , o al menos aproximadamente 29 μM , o al menos aproximadamente 29,5 μM , o al menos aproximadamente 30 μM . En determinadas realizaciones, la dosis y régimen combinados darán como resultado una concentración sérica, o una concentración sérica media a lo largo del tiempo, del análogo de compstatina hasta aproximadamente 0,1 μM , o hasta aproximadamente 0,11 μM , o hasta aproximadamente 0,12 μM , o hasta aproximadamente 0,13 μM , o hasta aproximadamente 0,14 μM , o hasta aproximadamente 0,15 μM , o hasta aproximadamente 0,16 μM , o hasta aproximadamente 0,17 μM , o hasta aproximadamente 0,18 μM , o hasta aproximadamente 0,19 μM , o hasta aproximadamente 0,2 μM , o hasta aproximadamente 0,3 μM , o hasta aproximadamente 0,4 μM , o hasta aproximadamente 0,5 μM , o hasta aproximadamente 0,6 μM , o hasta aproximadamente 0,7 μM , o hasta aproximadamente 0,8 μM , o hasta aproximadamente 0,9 μM , o hasta aproximadamente 1 μM , o hasta aproximadamente 1,5 μM , o hasta aproximadamente 2 μM , o hasta aproximadamente 2,5 μM , o hasta aproximadamente 3 μM , o hasta aproximadamente 3,5 μM , o hasta aproximadamente 4 μM , o hasta aproximadamente 4,5 μM , o hasta aproximadamente 5 μM , o hasta aproximadamente 5,5 μM , o hasta aproximadamente 6 μM , o hasta aproximadamente 6,5 μM , o hasta aproximadamente 7 μM , o hasta aproximadamente 7,5 μM , o hasta aproximadamente 8 μM , o hasta aproximadamente 8,5 μM , o hasta aproximadamente 9 μM , o hasta aproximadamente 9,5 μM , o hasta aproximadamente 10 μM , o hasta aproximadamente 10,5 μM , o hasta aproximadamente 11 μM , o hasta aproximadamente 11,5 μM , o hasta aproximadamente 12 μM , o hasta aproximadamente 12,5 μM , o hasta aproximadamente 13 μM , o hasta aproximadamente 13,5 μM , o hasta aproximadamente 14 μM , o hasta aproximadamente 14,5 μM , o hasta aproximadamente 15 μM , o hasta aproximadamente 15,5 μM , o hasta aproximadamente 16 μM , o hasta

aproximadamente 16,5 μM , o hasta aproximadamente 17 μM , o hasta aproximadamente 17,5 μM , o hasta aproximadamente 18 μM , o hasta aproximadamente 18,5 μM , o hasta aproximadamente 19 μM , o hasta aproximadamente 19,5 μM , o hasta aproximadamente 20 μM , o hasta aproximadamente 20,5 μM , o hasta aproximadamente 21 μM , o hasta aproximadamente 21,5 μM , o hasta aproximadamente 22 μM , o hasta aproximadamente 22,5 μM , o hasta aproximadamente 23 μM , o hasta aproximadamente 23,5 μM , o hasta aproximadamente 24 μM , o hasta aproximadamente 24,5 μM , o hasta aproximadamente 25 μM , o hasta aproximadamente 25,5 μM , o hasta aproximadamente 26 μM , o hasta aproximadamente 26,5 μM , o hasta aproximadamente 27 μM , o hasta aproximadamente 27,5 μM , o hasta aproximadamente 28 μM , o hasta aproximadamente 28,5 μM , o hasta aproximadamente 29 μM , o hasta aproximadamente 29,5 μM , o hasta aproximadamente 30 μM .

Intervalos adecuados incluyen aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 30 μM , o aproximadamente 1 a aproximadamente 29 μM , o aproximadamente 2 a aproximadamente 28 μM , o aproximadamente 3 a aproximadamente 27 μM , o aproximadamente 4 a aproximadamente 26 μM , o aproximadamente 5 a aproximadamente 25 μM , o aproximadamente 6 a aproximadamente 24 μM , o aproximadamente 7 a aproximadamente 23 μM , o aproximadamente 8 a aproximadamente 22 μM , o aproximadamente 9 a aproximadamente 21 μM , o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 μM , o aproximadamente 11 a aproximadamente 19 μM , o aproximadamente 12 a aproximadamente 18 μM , o aproximadamente 13 a aproximadamente 17 μM , o aproximadamente 14 a aproximadamente 16 μM , o aproximadamente 15 a aproximadamente 15 μM , o aproximadamente 16 a aproximadamente 14 μM , o aproximadamente 17 a aproximadamente 13 μM , o aproximadamente 18 a aproximadamente 12 μM , o aproximadamente 19 a aproximadamente 11 μM , o aproximadamente 20 a aproximadamente 10 μM , o aproximadamente 21 a aproximadamente 9 μM , o aproximadamente 22 a aproximadamente 8 μM , o aproximadamente 23 a aproximadamente 7 μM , o aproximadamente 24 a aproximadamente 6 μM , o aproximadamente 25 a aproximadamente 5 μM , o aproximadamente 26 a aproximadamente 4 μM , o aproximadamente 27 a aproximadamente 3 μM , o aproximadamente 28 a aproximadamente 2 μM , o aproximadamente 29 a aproximadamente 1 μM . Aunque la dosis precisa administrada variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a, el tipo de paciente y el tipo de enfermedad que se está tratando, la edad del paciente y la vía de administración, dicha dosis se determina fácilmente por el experto en la técnica.

La composición farmacéutica se puede administrar al paciente tan frecuentemente como varias veces al día, o se puede administrar con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso menos frecuentemente, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosificación será evidente por el experto en la técnica y dependerá de una variedad de factores, tales como, pero no se limitan a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, el tipo y la edad del paciente, como se describe anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de manera sistémica en formulaciones orales, parenterales, oftálmicas (que incluye la intravítrea), supositorios, aerosoles, tópicas, transdérmicas u otras formulaciones similares. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden contener vehículos y otros ingredientes aceptables farmacéuticamente conocidos por mejorar y facilitar la administración farmacológica. Otras formulaciones, tales como nanopartículas, liposomas, eritrocitos, y sistemas de base inmunológica se pueden emplear también para administrar un análogo de compstatina según los métodos de la invención.

Como se emplea en la presente memoria, "administración oral" o "administración enteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la introducción en el tracto gastrointestinal. Tal administración incluye la alimentación por vía oral así como por sonda orogástrica o intragástrica. Tal administración puede incluir también la administración sublingual, bucal, intranasal, pulmonar o rectal, entre otras vías de administración conocidas en la técnica.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración oral comprenden el ingrediente activo combinado con un vehículo aceptable farmacéuticamente, en una variedad de formas de dosificación, que incluyen, pero no se limitan a, píldoras, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, dispersiones, suspensiones, disoluciones, emulsiones, microemulsiones, geles y películas, por nombrar algunas. Tales formas de dosificación incluyen normalmente vehículos y excipientes para facilitar la formulación y el reparto de los ingredientes activos.

Los vehículos aceptables farmacéuticamente se seleccionan de proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas e inorgánicas, y combinaciones de las mismas. Los ingredientes activos se pueden combinar con el vehículo en un diluyente adecuado para formar una disolución o una suspensión. Tales formulaciones líquidas pueden ser viscosas o no viscosas dependiendo de la cantidad y del vehículo utilizado. Las formulaciones líquidas se pueden emplear directamente o se pueden formular dentro de una cápsula, cápsula en gel o sólido adecuado mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, las formulaciones sólidas se pueden preparar mediante combinación de componentes sólidos. Tales formulaciones sólidas se pueden emplear como un polvo o se pueden formular en gránulos, cápsulas, comprimidos o películas cualquiera de las cuales se puede fabricar como una formulación de liberación sostenida.

Proteínas adecuadas para usar como vehículos en formas de dosificación oral incluyen proteínas de la leche, tales como, caseína, caseinato sódico, lactosuero, suero de lactosa reducido, concentrado de proteína de la leche, gelatina, proteína de soja (aislado), proteína de alga parda, proteína de alga roja, extracto y albúminas de levadura del pan. Carbohidratos adecuados incluyen celulosas tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato de celulosa y etilcelulosa, almidones tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidón de tapioca, almidón de trigo, almidón modificado ácido,

almidón pregelatinizado y almidones sin modificar, alginatos tales como alginato de amonio, alginato sódico, y alginato cálcico, glútenes tales como gluten de maíz y gluten de trigo, gomas tales como la acacia (goma arábiga), goma ghatti, goma guar, goma karaya (goma esterculia) y goma (tragacanto), preparaciones enzimáticas de isomerasa de glucosa insoluble, azúcares tales como azúcar de maíz, azúcar invertido, sirope de maíz, almíbar de maíz de alta fructosa, y gluconato de sodio. Lípidos adecuados incluyen tocoferoles tales como acetato a-tocoferol, ácidos grasos de cadena corta, media y larga y ésteres de los mismos, alcoholes grasos y éteres de los mismos, aceites tales como aceite de coco (refinado), aceite de soja (hidrogenado) y aceite de colza, palmitato de aluminio, dilauril tiodipropionato, lecitina modificada enzimática, estearato cálcico, grasas modificadas enzimáticas, palmitoestearato de glicerilo, lecitina, mono y diglicéridos, glicerina y ceras tales como cera de abejas (amarilla y blanca), cera de candelilla y cera de carnauba y aceite vegetal. Sustancias orgánicas e inorgánicas adecuadas incluyen metil y vinil pirrolidinas tales como polivinilpirrolidona, metilsulfonil metano, dimetilsulfóxido y compuestos relacionados, hidro y polihidroxi ácidos tales como ácido poliláctico, entre muchos otros.

En algunas realizaciones, se pueden preparar formas de liberación controlada para conseguir una liberación sostenida o de localización específica del análogo de compstatina en el tracto digestivo para mejorar la absorción y prevenir determinadas formas de metabolismo. Por ejemplo, se pueden emplear materiales de recubrimiento de comprimidos resistentes al ácido o materiales de cápsulas resistentes al ácido para prevenir una liberación de los análogos de compstatina en el estómago y proteger al compuesto del metabolismo por enzimas gástricas. Materiales y recubrimientos adecuados para conseguir la liberación controlada después del paso del estómago se componen principalmente de ácidos grasos, ceras, goma laca, plásticos y fibras vegetales e incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de ácido metacrílico-acrilato de metilo, succinato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa succinato acetato), ftalato acetato de polivinilo, alginato sódico o ácido esteárico. La liberación sostenida en el tracto gastrointestinal se puede conseguir, por ejemplo, embebiendo los análogos de compstatina en una matriz de sustancias insolubles, tales como diferentes acrílicos, quitina y otros. Los métodos para preparar tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica.

La compstatina se puede formular en supositorios o enemas para administración rectal, vaginal o uretral. Para este propósito, los análogos de compstatina se pueden disolver o suspender en un vehículo de base grasa tal como la manteca de coco que es sólida o semi-sólida a temperatura ambiente pero que se funde a la temperatura corporal o en una base sólida soluble en agua, tal como polietilenglicol o glicerina (fabricada a partir de glicerol y gelatina). Se pueden añadir otros excipientes para mejorar la formulación, y los supositorios se moldearán en una forma que faciliten la administración. En otras realizaciones, se pueden usar supositorios líquidos que consisten en análogos de compstatina disueltos o suspendidos en un vehículo líquido adecuado para el suministro rectal a aplicar con una cánula pequeña.

Para el tratamiento de afecciones pulmonares agudas o crónicas en las que está implicado la activación del complemento, una vía preferida de administración de una composición farmacéutica es la administración pulmonar. Por consiguiente, una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, o comercializar en una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad oral. Tal formulación puede comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7 nanómetros, y preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nanómetros. Tales composiciones están de manera conveniente en la forma de polvos secos para la administración empleando un dispositivo que comprende un reservorio de polvo seco en el que se puede dirigir un flujo de propelente para dispersar el polvo o emplear un disolvente de auto-propelente/recipiente dispensador de polvo, tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo disuelto o suspendido en un propelente con bajo punto de ebullición en un envase cerrado. Preferiblemente, tales polvos comprenden partículas en las que al menos 98% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 0,5 nanómetros y al menos 95% de las partículas en número tienen un diámetro menor de 7 nanómetros. Más preferiblemente, al menos 95% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 1 nanómetro y al menos 90% de las partículas por número tienen un diámetro menor de 6 nanómetros. Composiciones de polvo seco incluyen preferiblemente un diluyente en polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan de manera adecuada en una forma de dosificación unitaria.

Propelentes de baja ebullición incluyen generalmente propelentes líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 65°F a presión atmosférica. Generalmente el propelente puede constituir del 50 al 99,9% (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir del 0,1 al 20% (p/p) de la composición. El propelente puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo líquido no iónico o un tensioactivo aniónico sólido o un diluyente sólido (que tiene preferiblemente un tamaño de partícula del mismo orden que el de las partículas que comprenden el ingrediente activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para el suministro pulmonar pueden proporcionar también el ingrediente activo en la forma de gotas de una suspensión o disolución. Tales formulaciones se pueden preparar, envasar o comercializar como disoluciones o suspensiones acuosas o alcohólicas diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el ingrediente activo, y que se pueden administrar de manera adecuada empleando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, un agente saborizante, tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente regulador, un agente activo de superficie, que incluye tensioactivo pulmonar de reemplazo, o

un conservador, tal como metilhidroxibenzoato. Las gotas proporcionadas mediante esta vía de administración tienen preferiblemente un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros.

5 Las formulaciones descritas en la presente memoria son útiles para el suministro pulmonar y también son útiles para el suministro intranasal de una composición farmacéutica de la invención.

Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula media de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Tal formulación se administra de manera en la que se fuma el tabaco, es decir, mediante una inhalación rápida a través del conducto nasal a partir de un envase del polvo cercano a las fosas nasales.

10 Formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden comprender, por ejemplo, desde aproximadamente tan poco como 0,1% (p/p) hasta tanto como 100% (p/p) del ingrediente activo, y puede comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente memoria.

15 Como se emplea en la presente memoria, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la alteración física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. La administración parenteral incluye, por tanto, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una escisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra el tejido, y similares. En particular, la administración parenteral se contempla por incluir, pero no se limita a, técnicas de administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intravítrea, inyección intraesternal e infusión dialítica renal.

25 Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para la administración parenteral comprenden el ingrediente activo combinado con un vehículo aceptable farmacéuticamente, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones se pueden preparar, envasar, o comercializar en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Se pueden preparar, envasar o comercializar formulaciones inyectables en forma de dosificación unitaria, tales como ampollas, o en envases multidosis que contienen un conservador. Formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, y formulaciones biodegradables o implantes de liberación sostenida. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes, o dispersantes. En una realización de la formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o gránulo) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril apirógena) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

35 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar, o comercializar en forma de un inyectable estéril acuoso o en forma de suspensión o disolución oleosa. Esta suspensión o disolución se puede formular según la técnica conocida, y puede comprender, además del ingrediente activo, ingredientes adicionales, tales como agentes dispersantes, agentes humectantes, o agentes de suspensión descritos en la presente memoria. Tales formulaciones inyectables estériles se pueden preparar empleando un diluyente o disolvente no tóxico aceptable parenteralmente, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, disolución de Ringer, disolución de cloruro sódico isotónico, y aceites de fijación, tales como mono- o di-glicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables de manera parenteral que son útiles incluyen a las que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, en microburbujas para suministro de liberación ultrasónica o como un componente de un sistema polimérico biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrofóbicos aceptables farmacéuticamente, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero soluble de manera limitada, o una sal soluble de manera limitada.

45 Como se emplea en la presente memoria, "ingredientes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes activos superficiales que incluyen tensioactivos pulmonares de reemplazo; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes de unión; agentes de lubricación; agentes edulcorantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservadores; composiciones degradables fisiológicamente, tales como gelatina; disolventes y vehículos acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes; emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; rellenos; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales hidrofóbicos o poliméricos aceptables farmacéuticamente. Otros "ingredientes adicionales" que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Métodos:

En la presente memoria se describen métodos de regulación de la activación del complemento. En general, los métodos comprenden la puesta en contacto con un medio en el que se desea la activación del complemento con un análogo de compstatina de la presente invención, en donde la puesta en contacto da como resultado la regulación de la activación del complemento en el medio. El medio puede ser cualquier medio en el que se desea la regulación de la activación del complemento. En determinadas realizaciones, el medio incluye células o tejidos de un organismo, que incluye (1) células o tejidos cultivados (2) células o tejidos dentro del cuerpo de un sujeto o paciente, y (3) células o tejidos que se han eliminado de un cuerpo de un sujeto y que se reemplazan en el cuerpo del mismo paciente (*por ejemplo*, desviación de sangre extracorpórea o trasplante autólogo) o se transfieren a otro paciente. En relación con la última realización, el medio puede comprender además un biomaterial, tal como tubos, filtros o membranas que conectan las células o los tejidos durante la desviación extracorpórea. Alternativamente, el medio puede comprender biomateriales que se implantan en un sujeto.

Los métodos de regulación de la activación del complemento descritos en la presente memoria se aplican a pacientes o sujetos vivos y comprenden parte o todo el método para tratar al paciente de una afección patológica asociada con la activación del complemento, en particular la activación del complemento mediado por AP. Muchas de dichas afecciones patológicas son conocidas en la técnica (*véase, por ejemplo*, Holers, 2008, *supra*) e incluyen, pero no se limitan a, el síndrome urémico hemolítico atípico (SHUa), enfermedad de depósitos densos (EDD), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), enfermedad de aglutininas frías (CAD, de sus siglas en inglés), artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), diferentes enfermedades renales autoinflamatorias y autoinmunes, miocarditis autoinmune, esclerosis múltiple, lesión de médula espinal y lesión cerebral traumática, daño por isquemia-reperfusion (IR) renal e intestinal, pérdida del embarazo espontánea y recurrente, síndrome anti-fosfolípido (SAF), enfermedad de Alzheimer, asma, vasculitis pauci-inmune asociada al antígeno citoplasmático antinuclear (síndrome de Wegener), enfermedades cutáneas autoinmunes diferentes al lupus, tales como pénfigo, pénfigoide bulloso, y epidermólisis bullosa, shock post-traumático, determinadas formas de cáncer, y aterosclerosis. En realizaciones en particular, la afección patológica se ha asociado con mutaciones y polimorfismos en el gen que codifica FH y/o CD46, que incluyen, pero no se limitan a: DMAE, SHUa y glomerulonefritis membrano-proliferativa tipo II (MPGN-II, también referida como enfermedad de depósitos densos (EDD)). En otras realizaciones, los análogos de compstatina de la presente invención son adecuados para el empleo como un sustituto de Eculizumab o TT30 en el tratamiento de enfermedades para los que se han prescrito en la actualidad estos agentes, o para los que se están desarrollando estudios pre-clínicos y clínicos. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, SHUa, HPN, CAD y DMAE.

Los métodos de tratamiento comprenden normalmente (1) identificar un sujeto con una enfermedad o afección tratable mediante la regulación de la activación del complemento como se describe anteriormente en la presente memoria, y (2) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un análogo de compstatina de la invención empleando un régimen de tratamiento y una duración adecuadas para la afección que se está tratando. El desarrollo de dosificaciones y regímenes de tratamiento adecuados variará dependiendo de varios factores, que incluyen pero no se limitan a, la edad del paciente y la vía de administración. El experto en la técnica está familiarizado con el diseño de los regímenes de dosificación que tomen en consideración dichas variables. Por ejemplo, será evidente para el experto en la técnica que la administración oral de un análogo de compstatina requerirá una dosis inicial mayor, debido a la menor biodisponibilidad de esta vía en comparación con, *por ejemplo*, la inyección intravenosa.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención en mayor detalle. Tienen la intención de ilustrar, no de limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la síntesis de análogos de compstatina con modificaciones N-terminales, y conjugados de determinados análogos para moléculas pequeñas que se unen a albúmina.

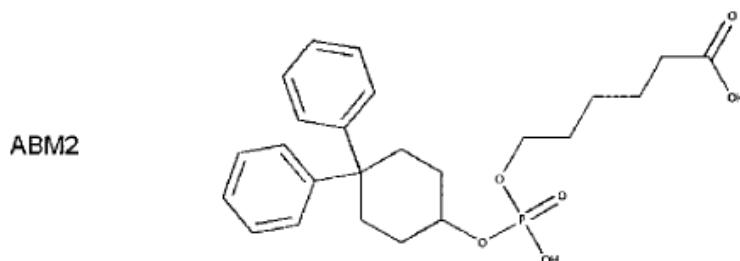
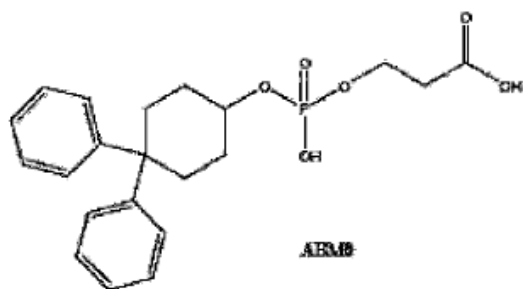
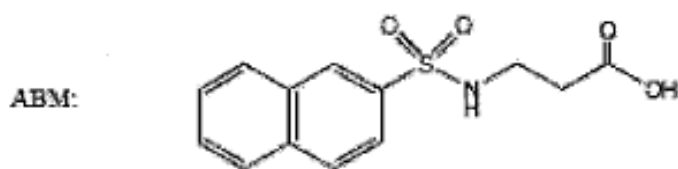
Productos químicos. Resina MBHA de amida de Rink, Oxima y los siguientes aminoácidos Fmoc se obtuvieron en Novabiochem (San Diego, CA): Ile, Cys(Trt), Val, Tyr(tBu), Gln(Trt), Asp(OtBu), Trp(Boc), Gly, Sar, Ala, MeAla, His(Trt), Arg(Pbf), Melle, Phe, MePhe y D-Cha. DIC y Fmoc-Trp(Me)-OH se adquirieron en AnaSpec (San José, CA). HOAt se adquirió en Advanced ChemTech (Louisville, KY). NMP y DCM se obtuvieron en Fisher Scientific (Pittsburg, PA). Los demás reactivos químicos para la síntesis se adquirieron en Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y se emplearon sin purificación adicional.

Síntesis peptídica y purificación. Todos los péptidos se sintetizaron manualmente mediante metodología en fase sólida Fmoc empleando DIC y Oxima como reactivos de acoplamiento. Se emplearon los siguientes procedimientos para la síntesis de los péptidos lineales: resina MBHA de amida de Rink (0,59 mmol/g) se colocó en un vaso de vidrio de síntesis peptídica equipado con fritas en el fondo y expandido en DCM durante 30 minutos. Después de eliminar el grupo de protección Fmoc (25% de piperidina en NMP, 5 y 10 minutos), la resina se lavó 7 veces con NMP y dos veces con DCM, y los aminoácidos individuales se acoplaron a la resina. Para cada acoplamiento se emplearon 3 equivalentes del ácido, HOAt, y DIC, con 10 minutos de preactivación en NMP. Todos los acoplamientos se realizaron durante 1 hora y se monitorearon bien mediante la prueba de Kaiser o bien mediante la

prueba de cloranilo. En caso de un resultado positivo de la prueba, el acoplamiento se repitió hasta que se observó un resultado negativo de la prueba. La síntesis se paró después del acoplamiento de Cys en posición 1. Después la resina se divide en una jeringa de polipropileno con fritas en el fondo (Torviq, Niles, MI) y el acoplamiento de adición de aminoácidos se realiza empleando el método enunciado previamente.

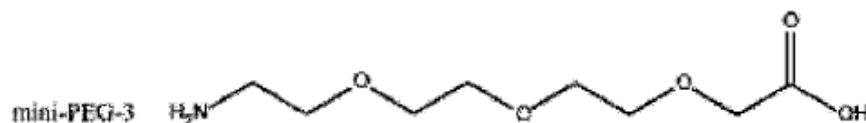
- 5 Después de la finalización de la síntesis en fase sólida, la resina se lavó cuatro veces con NMP, DCM, y DCM/dietiléter (1:1), y reaccionó bajo vacío durante 4 horas. Los péptidos se separaron de la columna con una mezcla de 94% TFA, 2,5% de agua, y 2,5% de EDR y 1% TIPS durante 2 horas. Después de la evaporación del TFA bajo vacío, los péptidos se precipitaron y se lavaron tres veces con éter dietilo frío. El líquido se separó del sólido mediante centrifugación y se decantó. Los péptidos en bruto se secaron a vacío y se disolvieron en acetonitrilo 30%.
- 10 El pH de la disolución se ajustó a 8-9 empleando hidróxido de amonio concentrado. A la disolución se añadió peróxido de hidrógeno diluido (1:100, 2 eq.) con agitación vigorosa. La ciclación se monitoreó mediante el empleo de MALDI-TOF. Una vez se contempló la reacción, la disolución se enriqueció con TFA hasta reducir el pH a 2. Y la disolución se liofilizó. El péptido en bruto se purificó con RP-HPLC como se describe previamente (Qu et al., 2011, *supra*). Los péptidos purificados fueron >95% de pureza como se determinó mediante RP-HPLC analítico (columna Phenomenex 00G-4041-E0 Luna 5 μ C18 100A, 250x4,60 mm; Phenomenex, Torrance, CA). La masa de cada péptido se confirmó empleando Waters MALDI micro MX instruments o Synapt HDMS.
- 15

Ciertos de los análogos de compstatina se conjugaron a una molécula pequeña que se une a albúmina, ejemplos de los cuales se muestran a continuación.



20

En un constructo, ABM2 se acopló al C-terminal del péptido Cp30 (SEQ ID NO:7; Tabla 1 de a continuación) a través de un espaciador mini-PEG-3 de acuerdo con los métodos descritos en la Patente WO2010/127336.



En otros constructos, ABM, ABM0 o ABM2 se acoplaron al N-terminal de CP20 (SEQ ID NO:3) o CP40 (SEQ ID NO:18) sin un espaciador.

Ejemplo 2

- 5 Los análogos de compstatina sintetizados mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1 se midieron por su unión a C3 y por su actividad inhibitora del complemento.

Materiales y Métodos:

10 Inhibición de la activación del complemento. Se midió la capacidad de los análogos de compstatina para inhibir la activación de la ruta clásica del complemento mediante ELISA como se describe en otros lugares (Katragadda *et al.*, 2006, *supra*; Mallik *et al.*, 2005, *supra*). El porcentaje de inhibición se trazó frente a la concentración peptídica, y el conjunto de datos resultantes se ajustó a la función de la dosis logística-respuesta empleando el programa informático Origin 8.0. Se obtuvieron los valores CI_{50} a partir de los parámetros que produjeron el valor χ^2 más bajo. Cada análogo se ensayó al menos tres veces.

15 Análisis SPR. Se caracterizó la interacción de los análogos de compstatina con C3b empleando un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare, Corp., Piscataway, NJ). El tampón de migración era PBS, pH 7,4 (fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM) con Tween-20 0,005%. El C3b biotinilado se capturó en el sitio de manera específica en un chip de estreptavidina en aproximadamente 3000 y 5000 densidad RU; se emplearon dos células de flujo sin tratar como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se inyectaron grupos de cinco que incrementan las concentraciones de un compuesto particular sobre la superficie de un chip uno después de otro en un ciclo único. Se inyectaron series de dilución de tres veces (0,49-40 nM) a 30ul/min; cada inyección se realizó durante 2 minutos, permitiendo cada vez al péptido disociarse durante 5 minutos antes de iniciar la siguiente inyección. Después de la finalización de la última inyección, se dejó un tiempo de 40 minutos de disociación. El péptido 4(1MeW) se incluyó en cada serie experimental como referencia y control interno. El análisis de los datos se realizó empleando Scrubber (Programa informático BioLogic, Campbell, Australia) y BiaEvaluation (GE Healthcare, Corp., Piscataway, NJ). Las señales de una célula de flujo sin tratar y de un conjunto de inyecciones blanco tampón se restaron para corregir los efectos del tampón y de los aparatos de inyección. Los datos del biosensor procesado se ajustaron finalmente al modelo de unión de Langmuir 1:1 (proporcionado amablemente por GE Healthcare), y se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) a partir de la ecuación $K_D = k_d/k_a$. Cada ensayo se realizó al menos dos veces.

20 Péptidos de acoplamiento a C3c. Para los estudios de acoplamiento se empleó AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010). A excepción de la estructura de la región central cíclica que sólo se puede manejar en forma rígida por Vina, las demás partes del péptido (restos terminales, cadenas laterales) se definieron como flexibles durante las series de acoplamiento. Los restos de C3c cercanos al N-terminal del análogo Cp20 (SEQ ID NO:3) (es decir, Asp349, Lys386, Ser388, Asn390, Ser437, Asn452, Leu454, Asp491 y Leu492) se definieron como flexibles para los experimentos de acoplamiento para permitir más interacciones razonables entre el N-terminal extendido de estos péptidos y C3c. La única excepción fue el péptido 19, en el que el N-terminal no se extiende como en otros péptidos; el área del sitio de unión en C3c, por lo tanto, permanece rígida en el acoplamiento del péptido 19. Se construyeron estructuras iniciales para todos los péptidos de manera manual en PyMol basado en la estructura unida a C3c de 4W9A. Se emplearon las herramientas AutoDockTools para definir el bolsillo de unión y preparar las estructuras iniciales de C3c y todos los péptidos a partir del formato pdb en el formato de entrada de Vina (pdbqt).55. En la comparación gráfica de la energía libre de unión computacional frente a la experimental (ΔG), la ΔG experimental se calculó a partir de los valores de afinidad determinados por SPR como $\Delta G = RT \ln(KD)$, con $R = 1,986 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y $T = 293,15 \text{ K}$.

Resultados:

45 Actividad/Estructura de Extensiones N-terminales. Empleando un planteamiento de modelado molecular, el análogo de compstatina temprano 4W9A se reemplazó por Cp20 (SEQ ID NO:3) en la estructura co-cristal con el fragmento diana C3c. El análisis computacional de este complejo confirmó que el grupo metilo de Sar8 forma un contacto con el átomo de oxígeno de G489 en C3c (distancia $\sim 4,0 \text{ \AA}$). El análisis del sitio de unión reveló también la existencia de un área hidrofóbica en C3c que se puede aprovechar a través de la extensión N-terminal del ligando peptídico. Aunque no participa en la unión al bolsillo de C3c, el N-terminal de compstatina se protege previamente con una fracción de acetilo principalmente para mejorar la estabilidad peptídica; sin embargo, tal protección tiene también un efecto beneficioso sobre la potencia inhibitora. En base al compuesto líder actual Cp20 (SEQ ID NO:3), se evaluó el

efecto de reemplazo de la fracción de acetilo N-terminal en la unión diana (Tabla 1). Para este propósito, los análogos se sometieron a un perfil cinético cuantitativo para su unión a C3b y se comparó con el análogo 4(1MeW) usado clínicamente y para Cp20 (SEQ ID NO:3) (Tabla 1, Fig. 1). De hecho, la sustitución del acetilo terminal por un grupo metilo más corto (péptido 1) produce una disminución en la afinidad de casi un orden de magnitud, inferior a 4(1MeW), confirmando de este modo la ventaja de proteger el N-terminal. Por el contrario, proteger con un resto de glicina (péptido 2) mejora la tasa de disociación (k_d) sin embargo, la tasa de asociación disminuyó ligeramente (k_a), conduciendo sólo a un cambio muy pequeño en la afinidad (en comparación con Cp20 (SEQ ID NO:3)). La N-metilación de Gly a Sar (péptido 3) recuperó las propiedades de asociación mientras que mantiene el valor beneficioso de disociación, lo que produce un compuesto con una afinidad significativamente mejorada ($K_D = 1,6$ nM; Tabla 1).

Para explorar el beneficio de la optimización N-terminal, se cribaron análogos basados en Cp20 (SEQ ID NO:3) con aminoácidos naturales (péptidos 4-8), metilados (péptidos 9-13) y D-aminoácidos (péptidos 14-18) adicionales en posición Xaa0 (Fig. 1B; Tabla 1). El grupo incluía cadenas representativas hidrofóbicas, hidrofílicas y con cadenas laterales cargadas. Todos los compuestos ensayados mostraron una fuerte unión ($K_D < 20$ nM), con valores de k_a ($1-4 \times 10^6$ M⁻¹ s⁻¹) mostrando menos variabilidad que los valores k_d ($1-25 \times 10^{-3}$ s⁻¹) en todo el panel entero (Tabla 1, Fig. 1B). Todos los análogos siguieron el modelo cinético de Langmuir 1:1 cuando se cribaron para la unión a C3b, apoyando de este modo fuertemente la presencia de un sitio de unión único de alta afinidad. En general, los D-aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas parecen favorecer sobre la fracción de acetilo (Ac) de Cp20 (SEQ ID NO:3). Entre estos, el péptido 14 con una DTyr en esta posición era el más potente, con una afinidad subnanomolar ($K_D = 0,5$ nM; Tabla 1) y la tasa de disociación más lenta del panel. La afinidad de los péptidos en los que Ac se reemplazó por otros aminoácidos disminuye entre la de los péptidos 1 y 14, con la mayoría de las agrupaciones alrededor del perfil de Cp20 (SEQ ID NO:3) (Fig. 1B). Parece preferirse generalmente la tirosina ya que todos los péptidos con Tyr en N-terminal, su análogo O-metilo y su isoforma-D se clasifican con afinidades por debajo de 1 nM. Por el contrario, derivados con restos con cadenas laterales más cortas, como Gly, Thr, o Ala parecen menos favorables y no mejoraron la afinidad en comparación con Cp20 (SEQ ID NO:3). Por tanto, el reemplazo de la protección del resto Xaa0 parece ser mejor tolerado para un intervalo amplio de restos aminoácidos con propiedades variables, desde hidrofóbicos a cargados.

Tabla 1. Evaluación de parámetros cinéticos y de la potencia inhibitoria para una serie de análogos de compstatina (Xaa0-Xaaa1-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂) (SEQ ID NO:4) con modificaciones en el N-terminal. K_a : tasa de asociación; k_d : tasa de disociación; K_D : constante de unión a partir de SPR; CI_{50} : concentración peptídica para alcanzar el 50% de inhibición de la ruta clásica de activación del complemento. ND: sin determinar.

Péptido	SEQ ID NO:	Xaa0	Xaa1	k_a (10^6 /Ms)	k_d (10^{-3} /s)	K_D (nM)	CI_{50} (nM)
4(1MeW) ^a	2	-	-	1,1±0,1	11,3±0,9	10,3±1,5	132±7
Cp20 ^b	3	Ac	Ile	1,9	4,0	2,4	
1	5	Me	Ile	1,3±0,3	24,8±7,3	18,6±3,5	180±17
2	6	Gly	Ile	1,2±0,3	2,9±0,2	2,5±0,5	113±16
3 ^c	7	Sar	Ile	1,9±0,5	2,9±0,3	1,6±0,3	82±14
4	8	Tyr	Ile	2,1±0,3	2,5±0,1	1,2±0,1	72±10
5	9	Phe	Ile	2,1±0,4	3,3±0,3	1,6±0,2	ND
6	10	Arg	Ile	1,7±0,2	2,9±0,2	1,7±0,2	ND
7	11	Trp	Ile	1,6±0,1	3,6±0,2	2,2±0,2	ND
8	12	Thr	Ile	1,2±0,1	3,1±0,2	2,6±0,3	ND
9	13	Tyr(Me)	Ile	2,3±0,4	2,6±0,1	1,2±0,2	ND
10	14	mPhe	Ile	1,6±0,2	2,9±0,3	1,8±0,3	ND
11	15	mVal	Ile	1,8±0,3	3,5±0,6	1,9±0,1	ND
12	16	mIle	Ile	1,6±0,2	3,7±0,3	2,4±0,5	ND
13	17	mAla	Ile	1,4±0,2	3,4±0,3	2,5±0,6	ND
14 ^c	18	D-Tyr	Ile	2,8±0,5	1,4±0,1	0,5±0,1	66±8
15	19	D-Phe	Ile	2,3±0,3	2,6±0,0	1,1±0,1	ND
16	20	D-Trp	Ile	2,0±0,2	2,4±0,1	1,2±0,1	ND
17	21	D-Cha ²	Ile	1,8±0,5	2,7±0,4	1,5±0,2	ND
18	22	D-Ala	Ile	1,4±0,3	3,4±0,4	2,5±0,4	ND
19	23	Ac	Trp	3,8±0,3	1,7±0,3	0,5±0,1	ND
20	24	Tyr	Gly	2,1±0,3	7,3±1,4	3,5±0,3	ND

^a Ac-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys]-Thr-NH₂ (Katragadda *et al.*, 2006, *supra*, Patente WO 2007/062249; a menudo referido en la presente memoria como “4(1MeW)”); incluido como un estándar en todos los análisis pero no sigue el modelo Cp20 (SEQ ID NO:3).

5 ^b Compuesto base para modificaciones en N-terminal; valores de unión/potencia a partir de una publicación anterior (Patente WO2010/127336).

^c Seleccionado para otros ensayos: péptido 3 – Cp30 (SEQ ID NO:7); péptido 14 – Cp40 (SEQ ID NO:18).

En la Tabla 1, los péptidos de SEQ ID NOs; 2, 3, 5, 6, 11, 12, 16, 17 y 24 se proporcionan con fines comparativos.

10 Análisis computacional. Se realizaron análisis de solapamiento extendido para proporcionar evidencias estructurales para los efectos observados en la afinidad de unión y generar un modelo computacional para predecir nuevos análogos. Inicialmente, la estrategia de solapamiento se validó empleando los datos establecidos en el cribado de los análogos de Cp20 (SEQ ID NO:3) (péptidos 1-18; Tabla 1) modificados en el N-terminal. Para este fin, los análogos se prepararon *in silico*, se solaparon en el bolsillo de unión de compstatina de C3c humano (Janssen *et al.*, 2007, *supra*), y se calculó la energía libre de unión (ΔG) y se comparó con los valores derivados de la afinidad por

15 SPR mediante la determinación del coeficiente de Pearson (R, Fig. 2). La correlación general entre los valores ΔG experimental y calculado era 0,46 en base a cinco estudios de solapamiento independientes sobre el grupo entero de datos (Fig. 2). De los 19 análogos en los grupos de datos, los tres péptidos que tienen o bien una fracción muy corta (metilo; péptido 1) o bien un aminoácido natural aromático (péptidos 5 y 7) muestran una desviación significativamente mayor; cuando estos análogos se excluyeron, la correlación incrementó a 0,69 (Fig. 2).

20 Un análisis más detallado del solapamiento de péptidos indicó que la mayoría de los análogos de compstatina modificados en N-terminal forman contactos adicionales con un área polar y un bolsillo poco profundo en C3c. Por ejemplo, el área polar que implica Asp349, Ser388 y Ser437 de C3c interacciona con el grupo amino N-terminal de DTry en el péptido 14 (Fig. 3A). Por el contrario, dicha interacción polar no está favorecida para péptidos que tienen restos aminoácidos naturales en esta posición, como se ejemplificó para el péptido 4, debido a una orientación diferente del grupo amino (Fig. 2A). Además, la cadena lateral del aminoácido elongado (DTyr) en el péptido 14

25 forma contactos hidrofóbicos adicionales con Leu454 y Leu492 en el bolsillo poco profundo de C3c. Finalmente, el grupo hidroxilo de DTyr forma un enlace de hidrógeno débil con Asn452 de C3c. Una combinación de estos efectos contribuye probablemente a la afinidad de unión subnanomolar observada en el péptido 14.

Para explorar distintas estrategias de direccionamiento del bolsillo N-terminal, se diseñaron dos análogos con un resto aromático localizado en posición Xaa0 o Xaa1 (péptidos 19 y 20; Tabla 1). En base al modelo computacional desarrollado anteriormente, se predijo la cadena lateral del nuevo Trp en el péptido 19 para ajustarlo bien al bolsillo de unión hidrofóbico (Fig. 3B), mientras que en el péptido 20 se eligió un enlazador de Gly corto flexible para permitir una mejor orientación de la cadena lateral de Tyr cuando se comparó con el homólogo, el péptido 4. Aunque el péptido 20 muestra una afinidad de unión tres veces más débil que el péptido 4, el péptido 19 alcanza afinidades de unión sub-nanomolares ($K_D=0,5$ nM; Tabla 1), haciéndole tan potente como el péptido 14. En conjunto, estos resultados demuestran la ventaja de un resto hidrofóbico orientado de manera adecuada adyacente a Cys en posición 2.

Se construyeron análogos adicionales en base a Cp40 (péptido 14, SEQ ID NO:18, Tabla 1). Éstos se muestran en la Tabla 2 de a continuación.

Tabla 2. Evaluación de los parámetros farmacocinéticos y de la potencia inhibitoria para los análogos en base a Cp40 (SEQ ID NO:18) con modificaciones dentro del péptido. El diseño de la numeración dentro del péptido indica la posición relativa para compstatina, K_a : tasa de asociación; k_d : tasa de disociación; K_D : constante de unión a partir de SPR; CI_{50} , concentración peptídica para alcanzar el 50% de inhibición de la ruta clásica de activación del complemento.

Péptido	SEQ ID NO:	K_a (10^6 /Ms)	k_d (10^{-3} /s)	K_D (nM)	CI_{50} (nM)
Cp40 (péptido 14)	18	2,8±0,6	1,3±0,2	0,5±0,1	0,14±0,05
Cp40 (11Orn)	25	2,5±0,1	2,0±0,1	0,8±0,1	0,22
Cp40 (6Asn)	26	0,9±0,1	2,8±0,1	3,0±0,4	0,26
Cp40 (11Orn 6Asn)	27	2,0±0,4	2,8±0,6	1,5±0,4	0,36

^a ornitina sustituida por arginina en posición 11.

^b asparragina sustituida por ácido aspártico en posición 6.

En la Tabla 2, los péptidos de SEQ ID NOs:25, 26 y 27 se proporcionan con fines comparativos.

Como se mencionó anteriormente, ABM, ABM0 o ABM2 se acoplaron sin un espaciador en el N-terminal de CP20 (SEQ ID NO:3) o CP40 (SEQ ID NO:18) y determinadas variantes de las mismas. Estos análogos muestran una unión y una actividad inhibitoria del complemento en el mismo intervalo que el análogo Cp40 y sus derivados expuestos en la Tabla 2.

Ejemplo 3

Se midió la solubilidad en agua para inyección (WFI) y PBS Dulbecco (DPBS) de determinados de los análogos de compstatina sintetizados como se describe en el Ejemplo 1.

Materiales y Métodos:

Se pesaron aproximadamente 5 mg de cada péptido (forma acetato) en tubos Eppendorf LoBind separados y se añadió a cada tubo 50 μ L de agua para inyección (WFI). Cada muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos y se diluyó para medir la densidad óptica (DO) a 280 nm empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, DE). Cada muestra concentrada se diluyó 1:20 en suero salino tamponado con fosfatos de Dulbecco (DPBS, sin potasio ni calcio; Invitrogen, Carlsbad, California). Las muestras se monitorearon para la precipitación, y cada muestra se invirtió durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. Se midió la DO de cada sobrenadante de DPBS para determinar la concentración peptídica en saturación.

Resultados:

Aunque la presencia de los tres restos ácidos o básicos (Asp6, His10, Arg11) en la mayoría de los análogos de compstatina contribuyen a solubilidades generalmente favorables en disoluciones acuosas, su zwitterión natural puede afectar negativamente a la solubilidad en las disoluciones tamponadas. Por consiguiente, se evaluó la solubilidad de compuestos seleccionados en dos disolventes relevantes clínicamente, es decir, agua para inyección (WFI) y PBS de Dulbecco (DPBS). Además, se midió el tiempo de retención de la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) de estos péptidos en una columna C18 para reflejar su hidrofobicidad relativa aparente (Tabla 3).

Tabla 3. Solubilidad de péptidos en WFI (Agua para inyección) y DPBS, y tiempo de retención UPLC (Cromatografía líquida de ultra rendimiento) como una indicación de hidrofobicidad.

Péptido	SEQ ID NO:	Solubilidad (mg/mL) ^a		Hidrofobicidad ^b
		WFI	DPBS pH 7,4	Tiempo de retención (min)
4(1MeW)	2	>50	3,5	5,09
Cp20	3	13	2,7	5,33
Cp30	7	>50	6,9	4,60
Cp40	18	>50	0,8	4,73
Péptido 19 ^c	23	ND	<0,2	ND

^a Medida como DO (280 nm) en saturación; WFI = agua para inyección, DPBS = suero salino tamponado con fosfatos de Dulbecco

^b Medido como tiempo de retención durante análisis UPLC en una columna C18

^c El péptido 19 no se podía solubilizar a 100 µM o por encima en PBS durante estudios ELISA.

5 En la Tabla, 3 los péptidos de SEQ ID NOs:2 y 3 se proporcionan con fines comparativos.

La solubilidad en WFI era excelente, con valores que superan los 50 mg/mL para todos los compuestos a excepción de Cp20 (SEQ ID NO:3). En general, la solubilidad en DPBS era significativamente inferior para todos los análogos. La menor solubilidad de Cp20 (SEQ ID NO:3) en ambos disolventes, en comparación con 4(1MeW), se considera una consecuencia de su hidrofobicidad que presenta de las dos N-metilaciones (posiciones 8 y 13) y la sustitución de Thr por Ile C-terminal. El reemplazo de la fracción acetilo N-terminal 4(1MeW) y Cp20 (SEQ ID NO:3) por restos aminoácidos sin proteger induce una ganancia significativa en la hidrofobicidad para Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18) y recupera su alta solubilidad en WFI (>50 mg/mL). Sin embargo, la incorporación de DTyr hidrofóbico en el N-terminal impactó negativamente en la solubilidad de Cp40 (SEQ ID NO:18) (0,8 mg/mL) en DPBS. Por el contrario, la presencia de una pequeña Sar N-terminal en Cp30 (SEQ ID NO:7) mejora en gran parte su solubilidad en DPBS (6,9 mg/mL), volviendo a este péptido casi dos veces más soluble que el análogo 4(1MeW) empleado clínicamente.

Ejemplo 4

Determinados de los análogos de compstatina sintetizados como se describen en el Ejemplo 1 se midieron por su estabilidad plasmática y unión a proteína plasmática en el plasma humano.

20 Materiales y Métodos:

Estabilidad plasmática. Se incubó plasma humano fresco que contiene lepirudina (3,75 unidades/ml) a 37°C con Cp30 (SEQ ID NO:7), Cp40 (SEQ ID NO:18) o péptido control 2B en una concentración final de 20 µM cada uno. Se tomaron muestras de 100 µL para la extracción en fase sólida. Para la extracción se empleó una placa HLB Oasis 30 µm 10 mg de 96 pocillos (Waters, Milford, MA). El material SPE se acondicionó mediante la adición de 500 µL cada uno de metanol y ACN seguido de la adición de 500 µL de agua mili-Q. La muestra se diluyó 1:1 con H₃PO₄ 4%. Después de cargar la muestra, el lavado se realizó con 500 µL de ACN 10% y ácido fórmico 0,1%. La muestra de diluyó con 200 µL de ACN 65% en ácido fórmico 0,1% y se recogió en una placa de recolección Eppendorf LoBind. La muestra se diluyó 1:10 en agua mili-Q con ácido fórmico 0,1% para UPLC-MS. Se pinchó Cp20 (SEQ ID NO:3) en cada muestra antes de SPE, como estándar interno.

30 Unión a la proteína plasmática. Se pinchó Cp30 (SEQ ID NO:7) en 500 µL de plasma humano fresco que contiene lepirudina (3,75 unidades/ml) para que la concentración peptídica final fuera 20 µM (C3: 1,2mg/mL, 6,4 µM). Se preparó una muestra control de la misma manera empleando Cp30 (SEQ ID NO:7) y agua mili-Q para determinar el área del péptido en UPLC-MS a 1 µM. La muestra plasmática se equilibró a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se añadieron lentamente 500 µL de PEG 30% en agua mili-Q (MW3350) a la muestra de plasma mientras se mezclaba. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 1000 µL de tampón A FPLC y se separó mediante FLPC empleando una columna Mono Q5/5 y se recogieron fracciones de 1mL por tubo. 0,5 mL de cada fracción se mezcló con el mismo volumen de H₃PO₄ 4% para análisis SPE y UPLC-MS.

40 Análisis UPLC-MS. Se realizó un análisis UPLC-MS en un SYNAPT HDMS (Waters, Milford, MA) equipado con una fuente ESI controlada por un programa informático MassLynx 4.1 (Waters). Cada muestra se inyectó por cuadruplicado. Se empleó un sistema en línea ACQUITY UPLC (Waters) para la separación peptídica mediante cromatografía líquida en fase inversa. El voltaje de capilaridad fue de 3,2 kV, el voltaje cónico era 30 V y la temperatura de fuente era 120°C. Para la corrección del bloqueo de masas se empleó el péptido [Glu1]-fibrinógeno con una tasa de muestra de 30 segundos. El espectro de masas se adquirió en modo positivo sobre un intervalo m/z 200-2000 Da a una velocidad de escaneo de 1s. La presencia del analito se confirmó mediante el tiempo de

retención y la masa. La selectividad se estudió mediante el análisis del blanco de la muestra del plasma y los péptidos puros para determinar la presencia de cualquier interferencia que coeluye con el analito. Después de la inyección, los analitos se separaron en una columna de UPLC BEH130 C18 1,7 μ M (Water, 2,1 μ m x 150 mm, número de pieza 186003556). La temperatura de la columna analítica se mantuvo a 40°C. Los péptidos se separaron a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. El gradiente era lineal 10-60% B (ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo) a lo largo de 8 minutos.

Resultados:

Estabilidad plasmática. Para investigar la estabilidad plasmática de los nuevos análogos con el N-terminal libre, se seleccionaron Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18) para la incubación en plasma humano a 37°C (Figura 4A). El péptido lineal 2B control (LRFLNPFSLDGSFW, SEQ ID NO:28) se dividió rápidamente en contacto con el plasma. La muestra en el punto de tiempo cero muestra una separación en la posición Arg. El péptido desapareció completamente dentro de los 30 minutos. Bajo las mismas condiciones, tanto Cp30 (SEQ ID NO:7) como Cp40 (SEQ ID NO:18) muestran una remarcable estabilidad en plasma. Más del 55% de los péptidos permanecen después de 5 días. Las cromatografías por UPLC-MS en los tiempos 0, 24 y 120 horas son bastante similares (Figura 4B). No se observó un producto de separación importante.

Unión a proteína plasmática. Para investigar la especificidad de unión de Cp30 (SEQ ID NO:7), se incubó un exceso de péptido en plasma humano fresco. Las proteínas plasmáticas se precipitaron con PEG3350 y se separaron empleando una columna pequeña Mono Q. Cada fracción de 1 mL se midió por su presencia de Cp30 (SEQ ID NO:7). Se analizaron también cuantitativamente las fracciones que contienen Cp30 (SEQ ID NO:7) empleando UPLC-MS y se ensayó la identidad de co-elución de la proteína. Se encontró que 7,5% de la Cp30 (SEQ ID NO:7) se localizaba a través del flujo mientras que 88,0% y 4,5% co-eluyen con C3 y C3c, respectivamente. La identidad de las proteínas se identificó mediante SDS-PAGE seguido de tinción Comassie y Western Blot. Además, la cantidad total de Cp30 (SEQ ID NO:7) que se detectó era igual a la cantidad de C3 plasmática.

Ejemplo 5

Análogos de compstatina Cp20 (SEQ ID NO:3), Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18), sintetizados como se describe en el Ejemplo 1, se midieron por su retención *in vivo* en un modelo de mono cynomolgus. Los perfiles de unión de los péptidos se compararon en el plasma de cuatro especies de primates: ser humano, mono cynomolgus, macaco Rhesus y babuino, empleando el método SPR descrito anteriormente.

Materiales y Métodos:

Estudios y recolección de muestras en primates. Se realizó la evaluación de la vida media plasmática y generación de los principales metabolitos en el Centro de Investigación y de Conservación de Reproducción de monos (SICONBREC, Ciudad de Makai, Filipinas) en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Para cada análogo (Cp20 (SEQ ID NO:3), Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18)), se sedaron dos animales sanos y se inyectaron por vía intravenosa con 2 mg/kg del compuesto (disuelto en solución salina para inyección). Las muestras de sangre (1-2 mL) se recogieron inmediatamente antes y en varios puntos de tiempo después de la inyección del compuesto (2, 5 y 30 minutos; 1, 2, 4, 6, y 24 horas) en tubos Vacutainer recubiertos con EDTA para prevenir la coagulación y la activación del complemento, y se centrifugaron a ~800 x g durante 10 minutos para obtener el plasma. Las muestras de plasma se congelaron inmediatamente y se almacenaron para otros análisis. Los cuatro estudios NPH se realizaron de acuerdo a las leyes y regulaciones de bienestar animal.

Análisis de muestras plasmáticas. Antes del análisis por UPLC-MS, los análogos de compstatina en las muestras plasmáticas se extrajeron mediante extracción en fase sólida (SPE) en un formato de 96 pocillos (HLB Oasis 30 μ m, 10 mg; Waters, Milford, MA). El material SPE se acondicionó cuidadosamente empleando acetonitrilo y agua. Las muestras plasmáticas se diluyeron 1:1 con ácido fosfórico 4%, y una concentración constante de Cp20 (SEQ ID NO:3) (5 pM) se pinchó en todas las muestras que contienen Cp30 (SEQ ID NO:7) o Cp40 (SEQ ID NO:18) como un estándar interno; en el caso de las muestras que contienen Cp20 (SEQ ID NO:3), se empleó Cp40 (SEQ ID NO:18) como estándar interno. Las muestras se cargaron en una placa SPE y se lavaron con acetonitrilo 10% en ácido fórmico 0,1%. Los péptidos extraídos se eluyeron con 200 μ L de acetonitrilo 65% en ácido fórmico 0,1% y se recogió en un tubo LoBind (Eppendorf) para evitar adsorción peptídica. Finalmente, se diluyeron 5 μ L de cada eluyente con 45 μ L de ácido fórmico 0,1% y se inyectó en el sistema UPLC-MS que consiste en un UPLC ACQUITY en línea acoplado a un instrumento HDMS SYNAPT G2-S equipado con una fuente ESI controlado por el programa informático MassLynx 4.1 (Waters). Cada muestra se inyectó por cuadruplicado. Se empleó la cromatografía líquida en fase inversa para la separación peptídica con una columna UPLC BEH130 C18 1,7 μ m (2,1 μ m x 150 mm; Waters) a una temperatura de columna de 40°C. Los péptidos se separaron a una velocidad de flujo de 0,15 mL/minuto con un gradiente lineal de 10-60% de acetonitrilo en agua que contienen ácido fórmico 0,1% a lo largo de 8 minutos. Los péptidos eluidos se analizaron directamente mediante HDMS; el voltaje de capilaridad de la fuente ESI era de 3,2 kV, el voltaje cónico era 30 V y la temperatura de la fuente a 120°C. Para la corrección del bloqueo de masas se empleó el péptido [Glu1]-fibrinopéptido B (Sigma) con una tasa de muestra de 30 segundos. El espectro de masas se adquirió en modo positivo sobre un intervalo m/z 50-1950 Da a una velocidad de escaneo de 1segundo.

Determinación de la vida media plasmática. Se prepararon curvas de calibración en el día del análisis pinchando los análogos de compstatina (Cp20 (SEQ ID NO:3), Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18)) en plasma descongelado-fresco a partir de monos cynomolgus sin tratar a concentraciones finales de 0,5, 1, 2, 4 y 8 μM . Todas las muestras de calibración se sometieron a SPE y se midieron empleando UPLC-MS como se describe anteriormente. El pico MS se determinó mediante la integración y se trazó una gráfica frente al tiempo, dando como resultado curvas de calibración que muestran una buena linealidad con coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,993. Para los análisis farmacocinéticos, se calculó la concentración de plasma en cada punto de tiempo (Cp) a partir del área pico extraído de cada péptido empleando la correspondiente curva estándar. La constante de eliminación (K_e) y la vida media plasmática ($t_{1/2}$) se determinaron a partir de la pendiente de la fase de eliminación terminal (0,5-24 horas) empleando las siguientes ecuaciones: $\ln(\text{Cp}) = \ln(\text{Cp}_0) - K_e \times t$, y $t_{1/2} = 0,693/k_e$.

Determinación de los niveles de C3. Se determinó mediante ELISA la concentración plasmática de C3 en monos cynomolgus individuales empleados en este estudio. En resumen, placas de 96 pocillos (MaxiSorp; Nunc) se recubrieron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-C3 monoclonal (clone 8E11; Tosic *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 120:241-249) en PBS durante la noche a 4,25°C. Los pocillos se lavaron con PBS/Tween 0,05% y se bloquearon con PBS/BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. El plasma (diluido 1:10.000 y 1:20.000 en PBS/BSA) o diluciones seriadas de plasma de mono cynomolgus purificados C3 se incubaron después durante 1 hora a temperatura ambiente seguido del lavado y la incubación con peroxidasa conjugada anti-C3 (MP Biomedicals, Solon, OH) diluido 1:1.000 en PBS/BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló empleando sustrato tetrametilbenzidina (R & D Systems, Minneapolis, MN) según las instrucciones del fabricante y la densidad óptica se determinó empleando un lector de microplacas con una longitud de onda establecida en 450 nm.

Ensayo hemolítico. Se lavaron eritrocitos de conejo con suero salino tamponado con fosfato (PBS) seguido del lavado con suero salino tamponado con Veronal (VBS)^{M9}/EGTA. Se preparó una dilución 1:20 en tampón VBS. Las muestras plasmáticas (1:10 en VBS-100 μl) se incubaron con la disolución de eritrocitos de conejo (50 μl) en una placa de 96 pocillos a 37°C durante 1 hora. Se añadió EDTA (0,2mM- 15 μl) para parar la reacción y la placa se centrifugó (2500 x g 3 minutos). El sobrenadante (100 μl) se transfirió a un nuevo pocillo y se midió la densidad óptica a 405 nm. La incubación de los eritrocitos con agua o tampón se empleó como positivo (lisis 100%) y el control negativo (lisis 0%), respectivamente.

Perfiles de unión. Para los experimentos de especificidad NPH, C3 de plasma de ser humano, mono cynomolgus, macaco Rhesus, y babuino se inmovilizó sobre células de flujo individuales de chips sensor CM5 (GE Healthcare) empleando el acoplamiento de aminas estándar para conseguir densidades diana de 6.000-7.000 RU. Los péptidos Cp20 (SEQ ID NO:3) y Cp40 (SEQ ID NO:18) se evaluaron cuantitativamente empleando un enfoque cinético cíclico único como se describe en el Ejemplo 2. Para comparar visualmente los perfiles cinéticos de manera independiente de las diferencias de densidad o actividad diana, cada curva de unión se normalizó hasta la máxima respuesta y se superpone en Origen.

Resultados:

Los fármacos peptídicos a menudo están obstaculizados por la rápida eliminación plasmática, que puede ser muy restrictiva en aplicaciones clínicas que dependen de niveles farmacológicos constantes (*por ejemplo*, en el caso de inhibidores del complemento de PNH). Se realizó un estudio comparativo que incluye Cp20 (SEQ ID NO:3) y el nuevo Cp30 desarrollado (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18), en el que monos cynomolgus se inyectaron con 2 mg/kg de cada análogo y se midieron los niveles plasmáticos mediante LC-MS a lo largo de un periodo de 24 horas. Todos los análogos ensayados siguieron un perfil de eliminación bifásico similar, en el que los niveles plasmáticos descendieron más rápidamente dentro de la primera hora después de la inyección y después siguió un descenso mucho más lento a través de los últimos puntos de tiempo (Fig. 5A). Las concentraciones peptídicas a las que cambia la cinética ocurre de forma muy similar a la de los niveles plasmáticos fisiológicos esperados de la diana C3 de proteína. De hecho, la medida mediante ELISA (4,9-12,8 μM) de los niveles de C3 en los monos implicados confirmó que el descenso inicial en los niveles de compstatina se ralentiza dentro de un intervalo de C3 determinado (Fig. 5A). Estas observaciones sugieren un modelo de eliminación dirigido a la diana, donde la unión fuerte a C3 diana abundante influye en gran medida en la excreción peptídica. De hecho, cuando la vida media plasmática se calculó en base a la porción lineal logarítmica (1-24 h), se puede observar una correlación directa a la afinidad de unión para C3 con los valores de vida media de 9,3, 10,1 y 11,8 para Cp20 (SEQ ID NO:3), Cp30 (SEQ ID NO:7) y Cp40 (SEQ ID NO:18), respectivamente (Fig. 5B). La vida media del conjugado Cp30-ABM2 se observó que era a las 22 horas (no mostrado).

Las concentraciones de los análogos de compstatina se midieron frente a la inhibición de la activación del complemento a través de la ruta alternativa en las muestras plasmáticas empleando un ensayo hemolítico de eritrocitos. La actividad inhibitoria del complemento se observó que estaba ligada a la concentración del análogo en las muestras en cada punto de tiempo medido.

Dada la fuerte dependencia de la principal fase de eliminación con la afinidad de unión, la interpretación de estos estudios en base a NPH parece estar influida por la afinidad diferencial de estos análogos de compstatina para C3 de seres humanos y NPH. Por tanto, se midieron los perfiles de unión de los péptidos para C3 de seres humanos y de tres NPHs relevantes (mono cynomolgus, macaco Rhesus, babuino), empleando el método SPR descrito

anteriormente. Tanto los perfiles cinéticos como la afinidad de todos los análogos eran altamente comparables (Fig. 5C).

Ejemplo 6

5 El análogo de compstatina Cp40 (SEQ ID NO:18), sintetizado como se describe en el Ejemplo 1, se midió para la biodisponibilidad a partir de la vía subcutánea y de vías de administración oral en un modelo de mono cynomolgus.

Materiales y Métodos:

10 Estudios y recolección de muestras en primates. Se realizó la evaluación de la biodisponibilidad en el Centro de Investigación y de Conservación de Reproducción de monos (SICONBREC, Ciudad de Makai, Filipinas) en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Se emplearon dos animales sanos para cada vía de administración. Los animales se sedaron y se inyectaron por vía subcutánea con 2 mg/kg del compuesto o por vía oral mediante sonda intragástrica con 4 mg/kg del compuesto. Las muestras de sangre (1-2 mL) se recogieron inmediatamente antes y en varios puntos de tiempo después de la inyección del compuesto (2, 5 y 30 minutos; 1, 2, 4, 6, y 24 horas) en tubos Vacutainer recubiertos con EDTA para prevenir la coagulación y la activación del complemento, y se centrifugaron a ~800 x g durante 10 minutos para obtener el plasma. Las muestras de plasma se congelaron inmediatamente y se almacenaron para otros análisis. Los cuatro estudios NPH se realizaron de acuerdo a las leyes y regulaciones de bienestar animal.

15 Análisis: El análisis de las muestras plasmáticas, la determinación de la vida media plasmática y la actividad inhibidora del complemento en plasma, se midieron como se describe en el Ejemplo 5.

Resultados:

20 Los fármacos peptídicos normalmente están muy poco disponibles por cualquier vía excepto por la administración intravenosa, que es cara, no es bien tolerada por los pacientes, y normalmente necesita realizarse por un personal especializado. El análogo de compstatina Cp40 (SEQ ID NO:18) se ensayó por su biodisponibilidad después de un suministro subcutáneo u oral. Monos cynomolgus se inyectaron con 2 mg/kg de manera subcutánea o se inyectaron de manera oral con 4 mg/kg del análogo y se ensayaron los niveles plasmáticos mediante LC-MS a lo largo de un periodo de 24 horas. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 6.

25 La concentración plasmática de Cp40 (SEQ ID NO:18) alcanzó su pico de aproximadamente 12,5 μM dentro de las 4-5 horas después de la administración por inyección subcutánea (Fig. 6, panel superior). La inyección oral del análogo da como resultado una concentración plasmática de aproximadamente 0,023 μM dentro de la primera hora de inyección (Fig. 6, panel inferior; señalar que la inyección oral se llevó con éxito en sólo uno de los dos monos). En comparación, (Fig. 5B), la inyección intravenosa de este análogo dio como resultado un pico de concentraciones plasmáticas de aproximadamente 28 μM inmediatamente después de la inyección.

30 Las concentraciones de Cp40 (SEQ ID NO:18) se midieron frente a la inhibición de la activación a través de la ruta alternativa en las muestras plasmáticas a partir de la inyección subcutánea empleando un ensayo hemolítico eritrocitario. Se observó que la actividad inhibitoria del complemento está ligada a la concentración del análogo en las muestras en cada uno de los puntos de tiempo medidos.

Ejemplo 7

El análogo Cp30 (SEQ ID NO:7) de compstatina y el conjugado Cp-30-ABM2 descritos en el Ejemplo 1, se midieron para retención *in vivo* en un modelo de babuino.

Materiales y Métodos:

40 Se emplearon babuinos juveniles (*P. Anubis*, Baboon Research Resources, Universidad de Oklahoma) de 5-8 kg de peso. Dos babuinos se emplearon para el estudio, uno para cada compuesto. Cada animal recibió una dosificación en bolo de péptido (10 mg) mediante inyección a través de la vena periférica. Se recogieron muestras sanguíneas para el ensayo LC-MS/MS en tubos de plástico de 1 ml que contienen 50 μg de lepirudina, y se centrifugaron a 2000g durante 20 minutos a 4°C para la separación plasmática. Las muestras plasmáticas se almacenaron a -70°C.

45 Las muestras sanguíneas se recogieron a intervalos de tiempo pre-determinados después de la inyección de Cp30 (SEQ ID NO:7) o el Cp30 (SEQ ID NO:7)-conjugado de ABM2. Las muestras se trataron con SPE y se analizaron empleando LC-MS/MS. Se crearon curvas de calibración empleando péptidos estándar a varias concentraciones plasmáticas para determinar la concentración peptídica en cada muestra.

50 Extracción de análogos de compstatina a partir de muestras plasmáticas mediante SPE. Se empleó una placa HLB Oasis 30 μm 10 mg de 96 pocillos (Waters, Milford, MA). El material SPE se acondicionó mediante la adición de 500 μL de metanol y ACN seguido de la adición de 500 μL de agua mili-Q. Las muestras se diluyeron con H_3PO_4 4%. Después de cargar una muestra, el lavado se realizó con 500 μL de agua y ACN 10% con ácido fórmico 0,1%. Las muestras se eluyeron con 200 μL de ACN 65% en ácido fórmico 0,1% y se recogieron en una placa de recogida. Las

muestras se diluyeron para LC-MS 1:2 a 1:11 en agua mili-Q con ACN 10% con ácido fórmico 0,1%. Se pinchó CP20 (SEQ ID NO:3) en cada muestra antes de SPE, como estándar interno.

5 Análisis LC-MS/MS. Se realizó un análisis de LC-MS/MS en un SYNAPT HDMS (Waters, Milford, MA) equipado con una fuente ESI controlada por un programa informático MassLynx 4.1 (Waters). Cada muestra se inyectó por triplicado. Se empleó un sistema en línea ACQUITY UPLC (Waters) para la separación peptídica mediante cromatografía líquida en fase inversa. El voltaje de capilaridad fue de 3,2 kV, el voltaje cónico era 30 V y la temperatura de la fuente era 120°C. Para la corrección del bloqueo de masas se empleó el péptido [Glu1]-fibrinógeno con una tasa de muestra de 30 segundos. El espectro de masas se adquirió en modo positivo sobre un intervalo m/z 500-1800 Da a una velocidad de escaneo de 1s. La presencia del analito se confirmó mediante el tiempo de retención y la masa. Después de la inyección, los analitos se separaron en una columna de UPLC BEH130 C18 1,7 µm (Water, 1,0 µm x 100 mm). La temperatura de la columna analítica se mantuvo a 40°C. Los péptidos se separaron a una velocidad de flujo de 0,15 mL/min. El gradiente era lineal 15-55% B (ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo) a lo largo de 7 minutos.

Resultados:

15 Las concentraciones plasmáticas del péptido Cp30 (SEQ ID NO:7) y el conjugado ABM2 se determinaron empleando LC-MS/MS después de la inyección en bolo a los babuinos. El péptido Cp30 (SEQ ID NO:7) mostró una vida media de 5 horas y Cp30 (SEQ ID NO:7)-ABM2 mostró una vida media de 7,5 horas. En comparación, en el mismo modelo de babuinos, el análogo de compstatina 4(1MeW) y un análogo potente (péptido 3) descritos en la Patente WO2010/127336 se determinaron previamente hasta tener vidas medias de aproximadamente 60-90 minutos.

Ejemplo 8

El análogo de compstatina Cp40 (SEQ ID NO:18), sintetizado como se describe en el Ejemplo 1, se midió para la biodisponibilidad a partir de la administración por vía intramuscular en un modelo de babuinos.

Métodos:

25 Un babuino joven se inyectó por vía intramuscular con 2 mg/kg de Cp40 (SEQ ID NO:18). Se recogieron muestras sanguíneas para el análisis LC-MS/MS en tubos de plástico de 1 ml que contienen 50 µg de lepirudina, y se centrifugaron a 2000g durante 20 minutos a 4°C para la separación plasmática. Las muestras plasmáticas se almacenaron a -70°C. Las muestras sanguíneas se recogieron a intervalos de tiempo pre-determinados después de la inyección del análogo. Las muestras se trataron con SPE y se analizaron empleando LC-MS/MS. Se crearon curvas de calibración empleando péptidos estándar a varias concentraciones plasmáticas para determinar la concentración peptídica en cada muestra.

La extracción del análogo de compstatina a partir de las muestras plasmáticas y el análisis de LC-MS/MS se realizaron como se describe en el Ejemplo 7. Se realizó un ensayo hemolítico como se describe en el Ejemplo 5.

Resultados:

35 Los resultados se muestran en la Figura 7. La concentración plasmática de Cp40 (SEQ ID NO:18) alcanza su pico de aproximadamente 10 µM dentro de aproximadamente 5-6 horas después de la administración mediante inyección intramuscular. La actividad inhibidora del complemento se observó que estaba ligada a la concentración plasmática del análogo en las muestras en cada punto de tiempo medido.

40 La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es capaz de someterse a variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado (ICVVQDWGHRCT (C2-C12 cíclico; SEQ ID NO:1), en donde la modificación comprende un componente N-terminal adicional o sustituido que mejora (1) la afinidad de unión de C3, C3b o C3c del péptido, (2) la solubilidad del péptido en líquidos acuosos, y/o (3) la estabilidad plasmática del péptido y/o tiempo de permanencia en el plasma, en comparación con un péptido de compstatina sin modificar bajo condiciones equivalentes, en donde el componente adicional es D-Tyr, D-Phe, Tyr(Me), D-Trp, D-Cha, Phe, N-metil Gly (Sar), Arg, mPhe, mVal, o Tyr, y en donde el componente N-terminal sustituido que comprende Ile en la posición 1 se sustituye por Ac-Trp; en donde el compuesto comprende además uno o más de: (1) reemplazo de His en posición 9 por Ala; (2) reemplazo de Val en posición 4 por Trp o un análogo de Trp, en donde el análogo de Trp es opcionalmente 1-metil Trp o Trp 1-formil; (3) reemplazo de Trp en posición 7 con un análogo de Trp, en donde opcionalmente el análogo de Trp es un Trp halogenado; (4) modificación de Gly en posición 8 para reducir la conformación estructural en esta localización, en donde opcionalmente la estructura se reduce mediante el reemplazo de Gly en posición 8 (Gly8) con N-alfa-metil Gly; (5) reemplazo del Thr en posición 13 por Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile; y (6) reemplazo del enlace disulfuro entre C2 y C12 por un enlace tioéter para formar una cistationina o una lantitionina.
- 10 2. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende un compuesto adicional seleccionado de N-metil Gly (Sar) y D-Tyr.
- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende el reemplazo de Ile en posición 1 por Ac-Trp.
- 20 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende uno o más de (1) reemplazo de His en posición 9 por Ala; (2) reemplazo de Val en posición 4 por Trp o un análogo de Trp, en donde el análogo de Trp es opcionalmente 1-metil Trp p Trp 1-formil; (3) reemplazo de Trp en posición 7 con un análogo de Trp, en donde opcionalmente el análogo de Trp es un Trp halogenado; (4) modificación de Gly en posición 8 para reducir la conformación estructural en esta localización, en donde opcionalmente la estructura se reduce mediante el reemplazo de Gly en posición 8 (Gly8) con N-alfa-metil Gly; (5) reemplazo del Thr en posición 13 por Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile; y (6) reemplazo del enlace disulfuro entre C2 y C12 por un enlace tioéter para formar una cistationina o una lantitionina.
- 25 5. Un compuesto que comprende un péptido modificado tiene una secuencia de SEQ ID NO:29, que es:
Xaa1 – Xaa2 – Cys – Val – Xaa3 – Gln – Xaa4 – Xaa5 – Gly – Xaa6 – His – Xaa7 – Cys – Xaa8, en el que Gly entre Xaa5 y Xaa6 se modifica opcionalmente para reducir la conformación estructural,
30 en donde:
Xaa1 es Tyr, D-Tyr, D-Phe, Tyr(Me), D-Trp, D-Cha, Phe, N-metil Gly (Sar), Arg, mPhe, mVal, o Tyr;
Xaa2 es Ile;
Xaa3 es Trp o un análogo de Trp, en donde el análogo de Trp comprende un alquilo bajo o un sustituyente
35 alcanilo bajo;
Xaa4 es Asp;
Xaa5 es Trp o un análogo de Trp que comprende un Trp halogenado;
Xaa6 es His, Ala, Phe o Trp;
Xaa7 es Arg; y
40 Xaa8 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile, en donde un carboxilo terminal –OH de cualquiera de Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile se reemplaza opcionalmente por –NH₂; y en donde el péptido se cicla a través de un Cys-Cys o enlace tioéter.
- 45 6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde:
la Gly en posición 8 está N-metilada;
Xaa1 es D-Tyr o Sar;
Xaa2 es Ile;
Xaa3 es Trp, 1-metil-Trp o 1-formil-Trp;
Xaa5 es Trp;

Xaa6 es Ala; y

Xaa8 es Thr, Ile, Leu, Nle, N-metil Thr o N-metil Ile con reemplazo opcional del carboxilo terminal –OH con –NH₂.

- 5
7. Un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado que tiene una secuencia de SEQ ID NO:18.
8. Un compuesto que comprende un péptido de compstatina modificado que consiste en SEQ ID NO: 18.
9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un componente que incrementa la biodisponibilidad o que prolonga la retención *in vivo* del compuesto.
- 10
10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde el componente que aumenta la biodisponibilidad o que prolonga la retención *in vivo* del compuesto se selecciona de polietilenglicol (PEG), una molécula pequeña que se une a albúmina, un péptido que se une a albúmina, o cualquier combinación de los mismos.
11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde el componente adicional es una molécula pequeña que se une a albúmina, unida opcionalmente al péptido en el N-terminal o en el C-terminal.
- 15
12. El compuesto de la reivindicación 11, que comprende SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:18 con una Molécula de Unión a Albúmina 2 (ABM2) acoplada al extremo N-terminal.
13. El compuesto de la reivindicación 3, que comprende SEQ ID NO:23.
14. El compuesto de la reivindicación 6, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, y SEQ ID NO:21.
- 20
15. El compuesto de la reivindicación 14, que comprende SEQ ID NO:7.
16. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para emplear en la inhibición de la activación del complemento.
- 25
17. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo aceptable farmacéuticamente; formulado opcionalmente para la administración oral, tópica, pulmonar, subcutánea, intramuscular o intravenosa del compuesto.

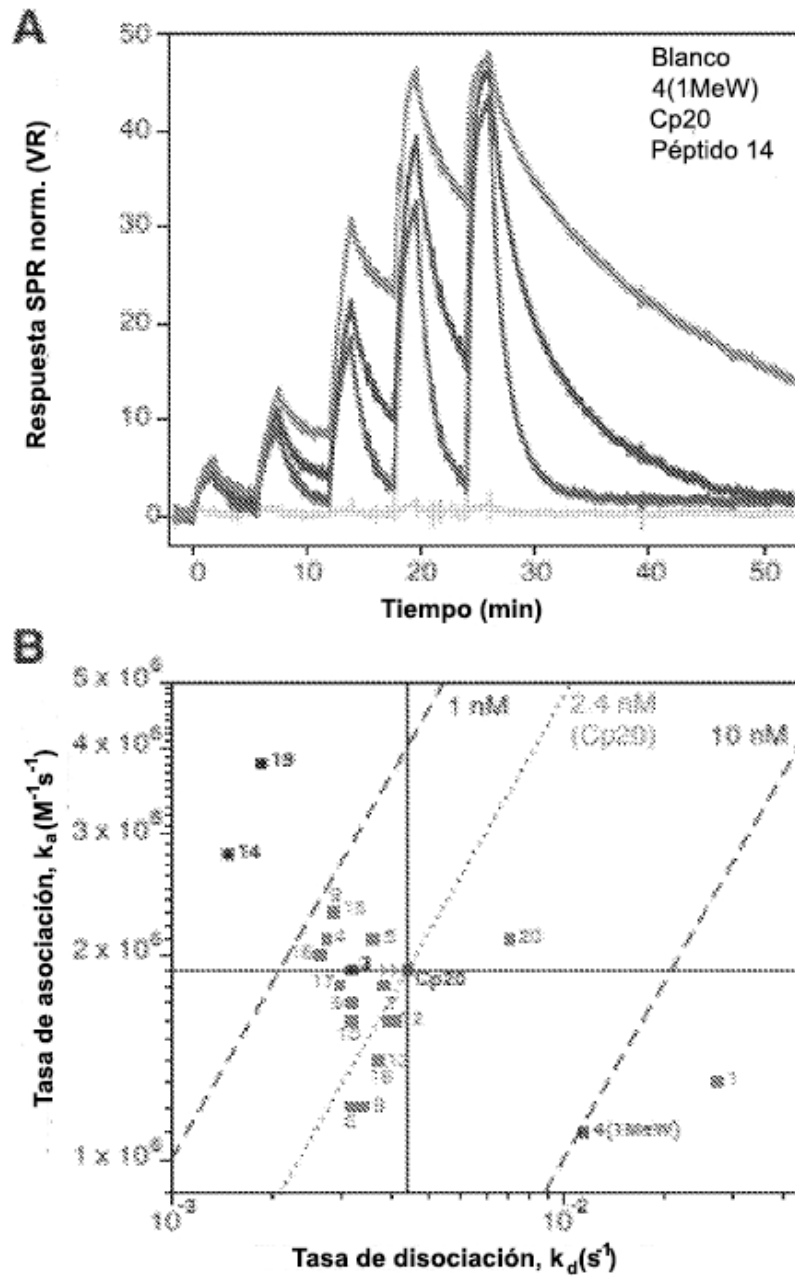


Fig. 1

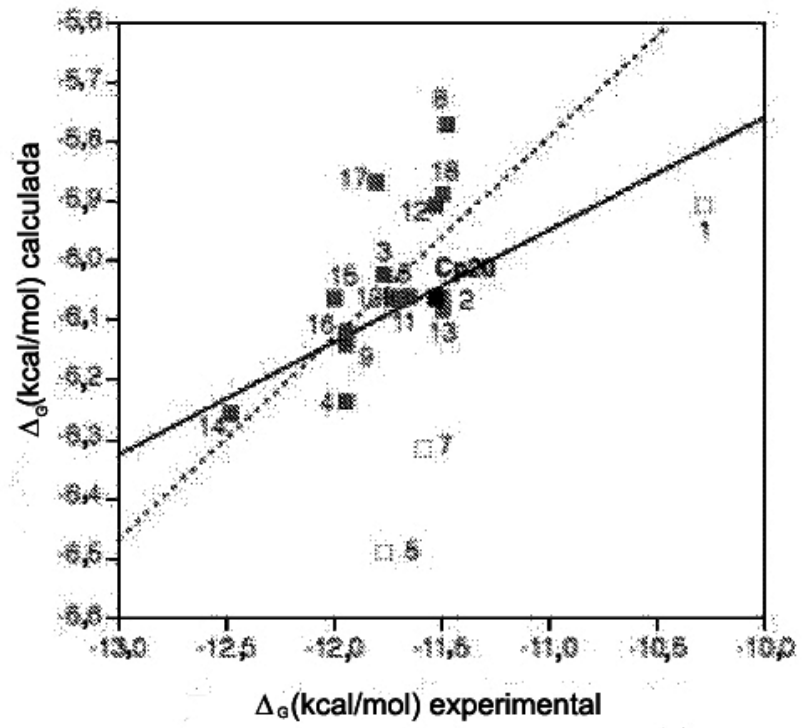


Fig. 2

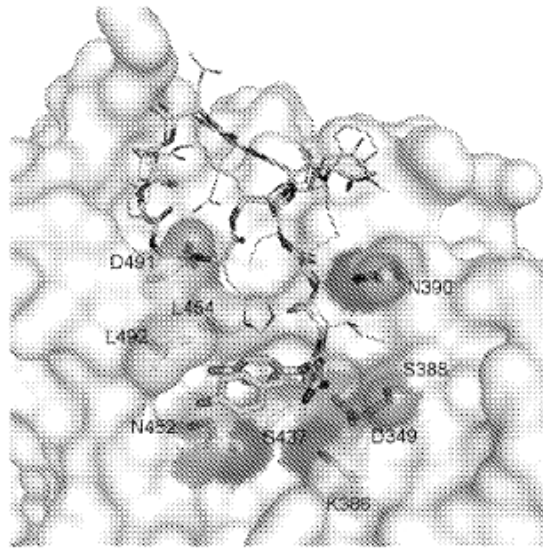


Fig. 3A

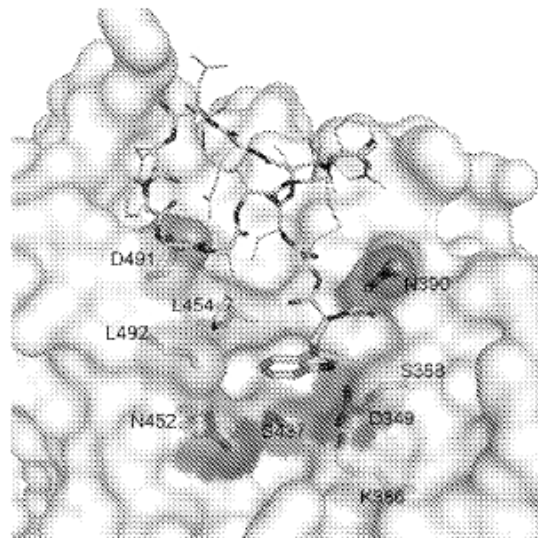


Fig. 3B

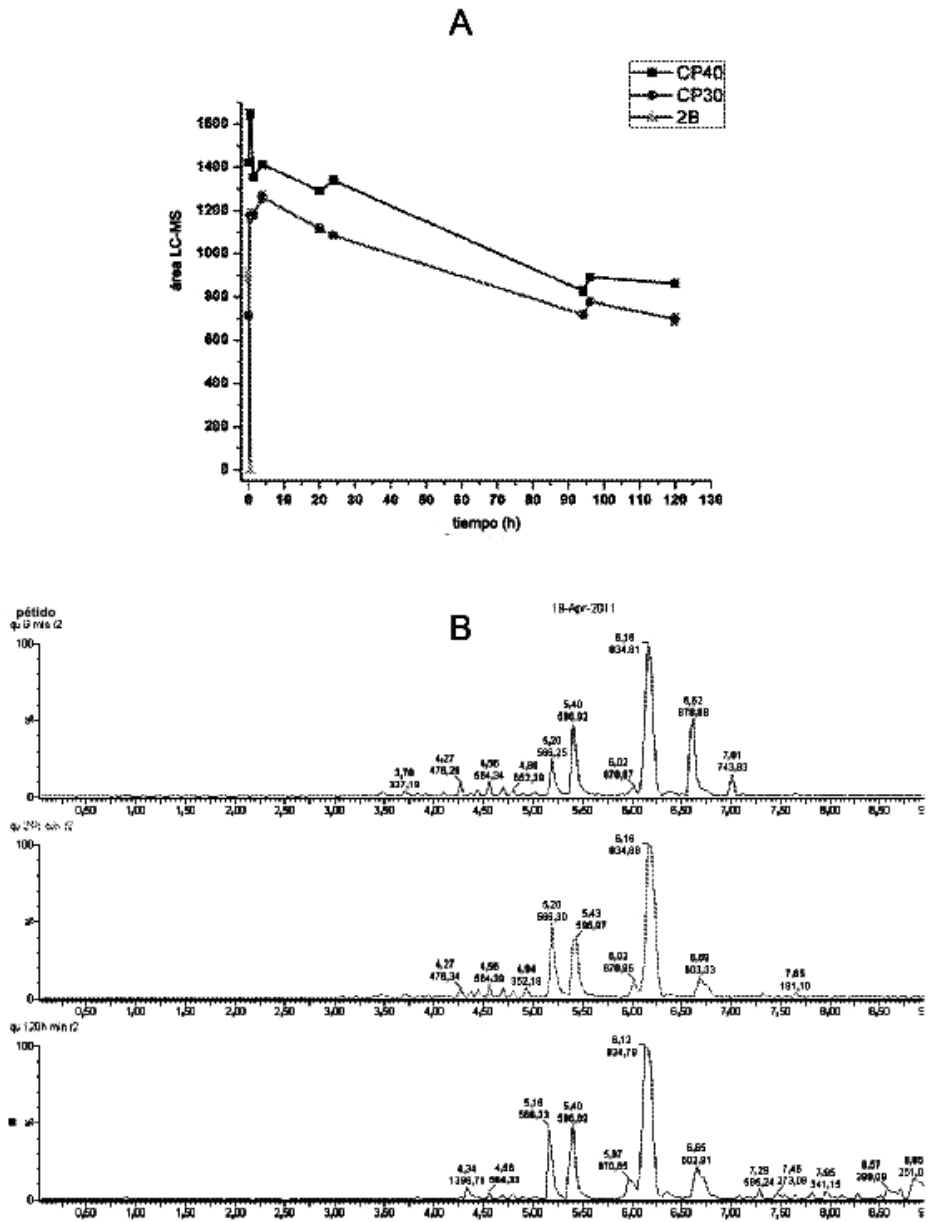


Fig. 4

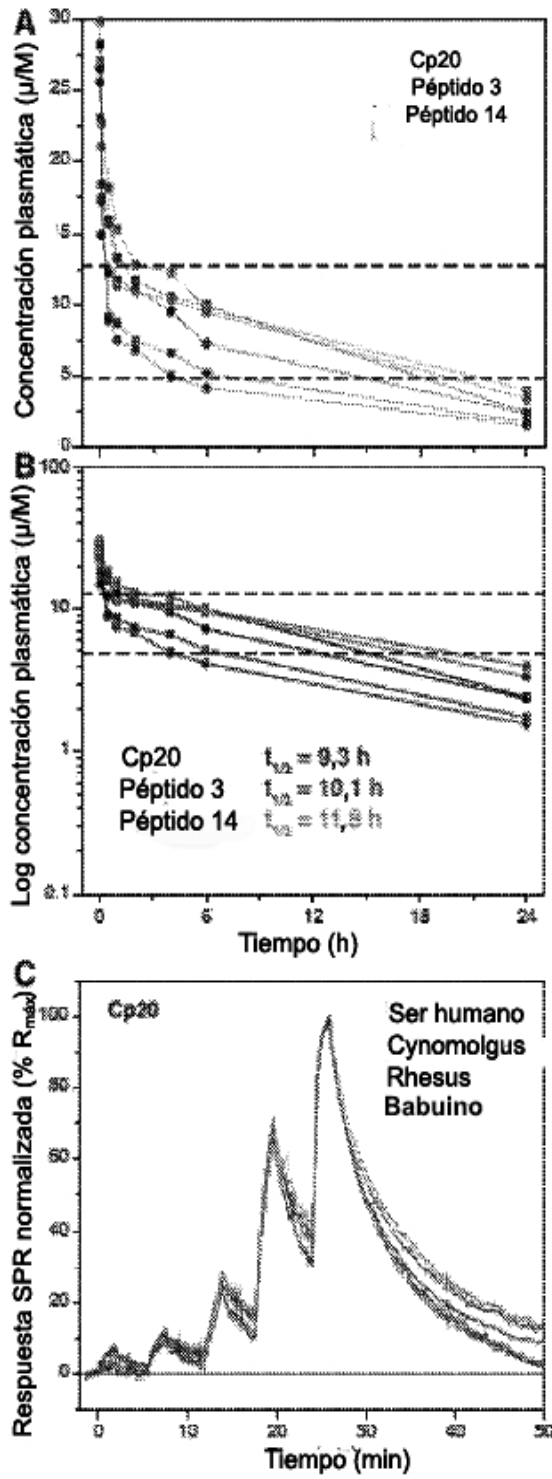


Fig. 5

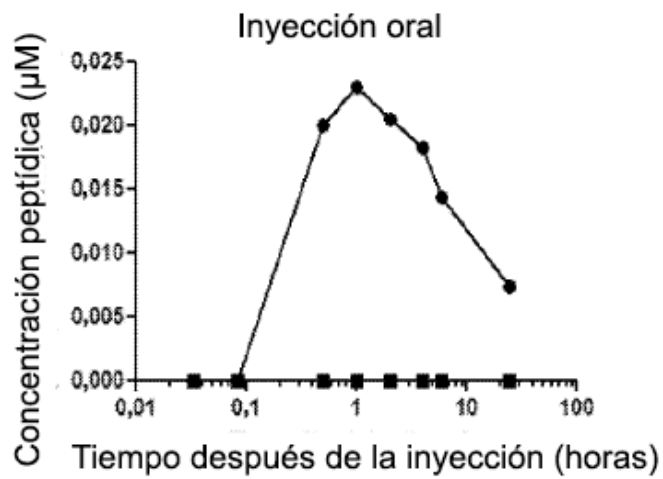
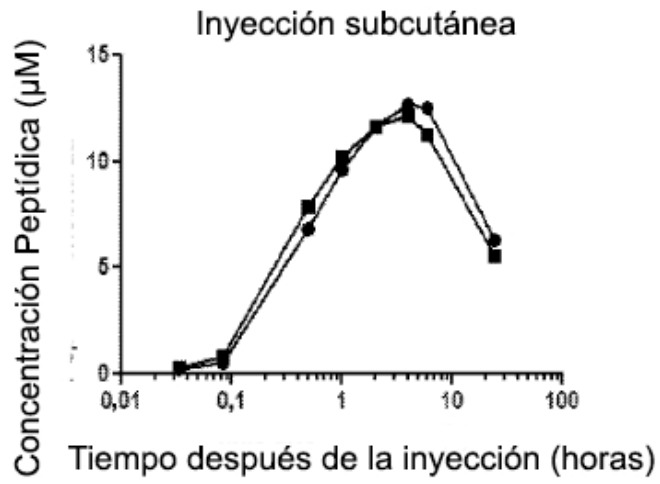


Fig. 6

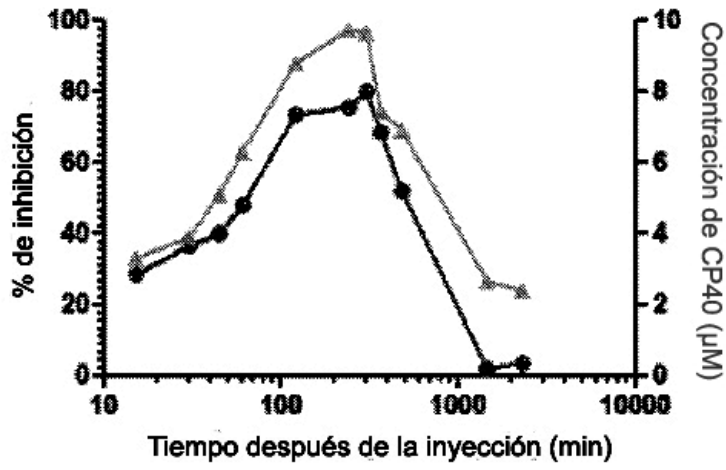


Fig. 7