

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 816**

(51) Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)**C07K 7/64** (2006.01)**A61K 38/08** (2006.01)**C07K 7/56** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98930536 .2**(86) Fecha de presentación : **25.06.1998**(87) Número de publicación de la solicitud: **1017713**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2000**(54) Título: **Antagonistas cíclicos de receptores de C5a y receptores acoplados a proteínas G.**(30) Prioridad: **25.06.1997 AU PO7550**(73) Titular/es: **The University of Queensland  
St. Lucia  
Brisbane, QLD 4072, AU**(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2008**(72) Inventor/es: **Fairlie, David;  
Taylor, Stephen, Maxwell;  
Finch, Angela, Monique y  
Wong, Allan**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2008**(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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**

Antagonistas cílicos de receptores de C5a y receptores acoplados a proteínas G.

5 Esta invención se refiere a compuestos cílicos novedosos que tienen la capacidad de modular la actividad de receptores acoplados a proteínas G, agonistas y antagonistas. En particular, la invención proporciona antagonistas no peptídicos cílicos y peptídicos cílicos de C5a. Los compuestos de la invención son tanto potentes como selectivos, y son útiles en el tratamiento de una variedad de estados inflamatorios.

10 **Antecedentes de la invención**

La activación del complemento humano, un sistema de proteínas plasmáticas implicadas en la defensa inmunológica contra la infección y lesión, contribuye significativamente a la patogénesis de numerosas enfermedades agudas y crónicas. En particular, se ha investigado exhaustivamente la proteína C5a del complemento. Para revisiones generales, 15 véase Whaley (1987), y Sim (1993). La tabla 1 proporciona un resumen de papeles conocidos de C5a en la enfermedad.

Durante la defensa del huésped, el sistema del complemento de las proteínas plasmáticas inicia respuestas inmunitarias celulares e inflamatorias frente a estímulos tales como organismos infecciosos (bacterias, virus, parásitos), lesión química o física, radiación o neoplasia. El complemento se activa a través de una cascada compleja de acontecimientos proteolíticos interrelacionados que producen múltiples péptidos bioactivos, algunos de los cuales (por ejemplo, las anafilotoxinas C3a y C5a) interactúan con componentes celulares para propagar los procesos inflamatorios. La activación del complemento, o bien mediante la ruta clásica, tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag/Ac), o bien mediante la ruta alternativa independiente de anticuerpos, finaliza con una secuencia terminal en la que la proteína C5 se escinde proteolíticamente mediante la C5 convertasa para dar C5a y C5b. Ésta última facilita el ensamblaje de un "complejo de ataque a la membrana" que perfora orificios en las membranas de células diana tales como bacterias, 20 conduciendo a la fuga, lisis y muerte celular. Las etapas de la cascada están estrechamente reguladas para evitar la amplificación progresiva de la proteólisis mediante proteasas formadas secuencialmente. Si estos mecanismos reguladores se vuelven ineficaces, puede dar como resultado una activación prolongada del complemento, produciendo respuestas inflamatorias potenciadas como en enfermedades autoinmunitarias.

25 Aunque se conocen las amplias características del sistema del complemento y su activación, los detalles mecanísticos siguen sin entenderse bien. Un mediador principal y muy potente de las respuestas inflamatorias es la glicoproteína plasmática C5a, que interacciona con receptores de superficie específicos (C5aR) sobre mastocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células no mieloides y células endoteliales vasculares (Gerard y Gerard, 1994). C5aR es un receptor acoplado proteína G con siete hélices transmembrana (Gerard y Gerard, 1991). Este receptor es uno de la superfamilia 30 de la rodopsina de las proteínas de unión ligadas a GTP, pero se diferencia de los receptores de rodopsina porque el receptor y la proteína G están ligados antes de la activación.

35 Los receptores acoplados a proteínas G son frecuentes en todo el cuerpo humano, comprendiendo aproximadamente el 80% de los tipos de receptores celulares conocidos, y median la transducción de señal a través de la membrana celular para una gama muy amplia de ligandos endógenos. Participan en una serie diversa de procesos fisiológicos y patofisiológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, los asociados con trastornos cardiovasculares, del sistema nervioso central y periférico, de la función reproductora, metabólicos, digestivos, inmunoinflamatorios y del crecimiento, así como otros trastornos proliferativos y reguladores celulares. Los agentes, tanto agonistas como antagonistas, que modulan selectivamente las funciones de los receptores acoplados a proteínas G, tienen importantes aplicaciones terapéuticas.

40 C5a es uno de los más potentes agentes quimiotácticos conocidos, y atrae neutrófilos y macrófagos en sitios de lesión, modifica su morfología; induce la desgranulación; aumenta la movilización del calcio, la permeabilidad vascular (edema) y la adhesividad de los neutrófilos; contrae el músculo liso; estimula la liberación de mediadores inflamatorios (incluyendo histamina, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, prostaglandinas, leucotrienos) y enzimas lisosomales; fomenta la formación de radicales de oxígeno; y potencia la producción de anticuerpos (Gerard y Gerard, 1994). La sobreexpresión o regulación disminuida de C5a está implicada en la patogénesis de estados inmunoinflamatorios tales como artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), lupus eritematoso sistémico, rechazo del injerto de tejidos, enfermedad cardíaca isquémica, lesión por reperfusión, choque séptico, psoriasis, gingivitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, lesión pulmonar y síndrome extracorporeal tras la diálisis, y en una variedad de otros estados, tal como se resume en la tabla 1.

TABLA 1

*El papel de C5a en la enfermedad*

<b>Estado/enfermedad</b>	<b>niveles de C5a</b>	<b>expresión de C5aR</b>	<b>Detalles</b>
alergia	++		la exposición al alérgeno conduce a síntomas nasales y aumento de los niveles

# ES 2 294 816 T3

				de C5a
5	enfermedad de Alzheimer	++	++	regulación incrementada del receptor en astrocitos reactivos, microglia y células endoteliales en el SNC, sistema del complemento activado por el $\beta$ -amiloide
10				
15				
	dificultad respi- ratoria / SDRA	++		
20				
	enfermedad de Behcet	++		los mayores niveles justo antes del ataque ocular
25				
	asma bronquial	++		
30				
	síndrome de fuga capilar	++		
35	enfermedad pulmonar crónica	++	niveles aumentados en el líquido efluente pulmonar de lactantes con ventilación mecánica con enfermedad pulmonar crónica	de C5a
40				
45	Churg-Strauss		hipersensibilidad de granulocitos a C5a	
50				
	fibrosis quística		generación de C5a/efectos sobre PMN	
55	estrés por descompresión	++	niveles aumentados durante el buceo de saturación	de C5a
60				
	diabetes tipo I	++	C5a generada durante la aparición; los monocitos circulantes	
65				

ES 2 294 816 T3

5			en pacientes con diabetes tipo 1 recién diagnosticada están activados	
10	fiebre		falta de inactivador de	
	mediterránea		C5a	
15	familiar			
	Guillain-Barre	++	niveles de LCR elevados	
20	estados patológicos / isquémicos / infarto de miocardio		migración de monocitos en el miocardio tras la reperfusión. Daño evitado con sCR1	
25	enfermedad de Kimura		el factor humoral regula por incremento la respuesta de PMN a C5a	
30	esclerosis múltiple	++	aumento de la expresión del receptor en macrófagos espumosos en EM aguda y crónica y astrocitos fibrosos en EM crónica	
35	Meningitis		C5a induce meningitis experimental; acumulación de PMN observada en el LCR	
40				
45	pancreatitis	++		
50	síndrome tras la diálisis	++	-	C5a generada mediante activación del complemento por material de tubo, niveles de C5aR reducidos en PMN y monocitos en estado
55				
60				

# ES 2 294 816 T3

		crónico
5	preeclampsia / HELLP	niveles de C5a elevados en la administración
10	psoriasis	niveles de C5a altos en las escamas
15	lesión por reperfusión	inhibida mediante anticuerpo frente a C5
20	retinitis	C5a detectada en el humor vítreo
25	artritis reumatoide	concentración elevada de C5a encontrada en el líquido sinovial (5 veces) y plasma (3 veces)
30	neutropenia congénita grave	-
35	rechazo de injerto / trasplantes	los anticuerpos monoclonales bloquean el daño observado con trasplante xenogénico; aumento de los niveles de C5a observados en el plasma y orina de pacientes con rechazo de injerto renal

50 Los nuevos agentes que limitan las acciones proinflamatorias de C5a tienen potencial para inhibir la inflamación crónica, y su dolor y daño tisular acompañantes. Por estas razones, las moléculas que impiden la unión de C5a a sus receptores son útiles para tratar trastornos inflamatorios crónicos producidos por activación del complemento. De manera importante, tales compuestos proporcionan nuevos conocimientos valiosos de los mecanismos de la inmunidad mediada por el complemento.

55 En otro contexto, también puede encontrarse que los agonistas de receptores de C5a u otros receptores acoplados a proteínas G tienen propiedades terapéuticas en estados o bien en los que el receptor acoplado a proteínas G puede usarse como sitio de reconocimiento para la administración de fármacos, o bien en los que la activación de tales receptores puede usarse para estimular algún aspecto del sistema inmunitario humano, por ejemplo en el tratamiento de cánceres, infecciones víricas o parásitarias.

60 Un enfoque para el desarrollo de agonistas o antagonistas de C5a es a través del diseño basado en el receptor, usando el conocimiento de las estructuras tridimensionales de C5a, su receptor C5aR y las interacciones entre ellos. No se conoce la estructura del receptor. Se ha determinado la estructura en disolución de C5a humano, un péptido de 74 aminoácidos que es sumamente catiónico y está N-glicosilado con un hidrato de carbono de 3 kDa en Asn64, y es esencialmente un haz de 4 hélices. Se halló que el extremo C-terminal (residuos 65-74, C5a65-74) no estaba estructurado (Zuiderweg *et al.*, 1989) y esta flexibilidad conformacional en el extremo C-terminal ha hecho que los estudios de estructura-función sean extremadamente difíciles de interpretar.

C5a tiene un dominio central N-terminal sumamente ordenado (residuos 1-64; C5a1-64), que consiste en un haz de 4 hélices antiparalelas compactas (residuos 4-12, 18-26, 32-39, 46-63) conectadas por bucles (13-17, 27-31, 40-45), y estabilizadas además mediante 3 puentes disulfuro (C21-Cys47, Cys22-Cys54, Cys34-Cys55).

5 Aunque no se conoce la estructura del receptor de C5a, C5aR, se ha clonado e identificado la subunidad de unión a C5a de C5aR derivado de monocitos humanos como un receptor acoplado a proteínas G con hélices transmembrana (Gerard y Gerard, 1991). Las interacciones entre C5a y C5aR han sido objeto de muchas investigaciones que, en resumen, sugieren que C5a se une mediante un mecanismo de dos sitios en el que el dominio central N-terminal de C5a está implicado en el reconocimiento y unión al receptor, mientras que el extremo C-terminal es responsable de la activación del receptor. Se ilustra este mecanismo esquemáticamente en la figura 1. La región “efectora” C-terminal presenta sola toda la información necesaria para la transducción de señal, y se piensa que se une en la región interhelicoidal del receptor (Siciliano *et al.*, 1994; deMartino *et al.*, 1995).

10 15 Una región interhelicoidal N-terminal cargada positivamente de C5a es responsable del reconocimiento y unión al receptor, y se une a un dominio extracelular cargado negativamente de C5aR (sitio 1), mientras que se piensa que la región “efectora” C-terminal de C5a se une a la región interhelicoidal del receptor (sitio 2), y es responsable de la activación del receptor que conduce a la transducción de señal (Siciliano *et al.*, 1994).

20 25 Se ha hallado que numerosos derivados peptídicos cortos del extremo C-terminal de C5a son agonistas de C5a (Kawai *et al.*, 1991; Kawai *et al.*, 1992; Kohl *et al.*, 1993; Drapeau *et al.*, 1993; Ember *et al.*, 1992; Sanderson *et al.*, 1994; Sanderson *et al.*, 1995; Finch *et al.*, 1997; Tempero *et al.*, 1997; Konteatis *et al.*, 1994; DeMartino *et al.*, 1995). Se muestran las estructuras de algunos de estos agonistas en la tabla 2 más adelante (compuestos 1-6). También se conocen inhibidores polipeptídicos de alto peso molecular de la acción de C5a en su receptor, tales como anticuerpos monoclonales frente al receptor de C5a (Morgan *et al.*, 1992).

30 35 Una molécula pequeña, N-metilfenilalanina-lisina-prolina-D-ciclohexilalanina-triptófano-D-arginina (7, MeFK-P-dCha-W-r), es un antagonista total del receptor de C5a, sin actividad agonista cuando se somete a prueba sobre membranas celulares aisladas (Konteatis *et al.*, 1994) o células completas intactas. Este hexapéptido se desarrolló mediante modificaciones del agonista NMe-F-K-P-dCha-L-r, en el que se sustituyó progresivamente la molécula en los residuos de leucina por sustituyentes de tamaño creciente (Cha, F, Nph y W). Esto tuvo el efecto de reducir la actividad agonista. Los ensayos de unión a receptor, realizados sobre membranas aisladas de neutrófilos humanos, mostraron que el antagonista tenía sólo un 0,04% de afinidad relativa de C5a por el receptor (Konteatis *et al.*, 1994). Una característica clave de estos informes es la definición de la unión de 7 al receptor de C5a. Estos autores declaran que la arginina C-terminal es esencial para la unión al receptor y la actividad antagonista. Éste es también el caso en todos los informes de actividad agonista mediante análogos peptídicos pequeños del extremo C-terminal de C5a. Sin embargo, para el antagonista 7, los autores van más allá y declaran que “el carboxilato C-terminal es un requisito esencial para la actividad antagonista y la unión al receptor”.

40 45 Proponen que el requisito del carboxilato es probablemente el resultado de su interacción específica con una arginina (Arg 206) en el receptor (De Martino *et al.*, 1995). Esta idea estaba apoyada por una gran reducción en la afinidad por el receptor para un análogo de 7 en el que se sustituyó la D-arginina ( $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{-}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(:\text{NH})\text{NH}_2$ ) por agmatina ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(:\text{NH})\text{NH}_2$ ). En resumen, De Martino *et al.* aseguran que la D-arginina interacciona mediante su cadena lateral de guanidinio con una cadena lateral de aminoácido cargada negativamente en el receptor. También se piensa que se produce una segunda interacción entre el carboxilato C-terminal cargado negativamente de 7 y un residuo de cadena lateral cargado positivamente en el receptor.

50 55 Se ha determinado ahora la estructura en disolución de este hexapéptido 7 y varios análogos, y se ha hallado sorprendentemente que, de hecho, no se requiere un grupo carboxilato terminal para la unión a C5aR o para la actividad antagonista, y que en su lugar una característica estructural poco corriente no reconocida hasta la fecha, una conformación de giro, es responsable de la unión y actividad de antagonista o agonista de C5a. Se han examinado el hexapéptido y varios antagonistas nuevos relacionados estructuralmente para determinar tanto sus afinidades de unión al receptor como su actividad antagonista, usando células polimorfonucleares (PMN) intactas. Los resultados muestran el requisito estructural específico desconocido hasta la fecha para la unión de antagonista o agonistas de C5a al receptor de C5a, que se cree que es común para ligandos de la familia de receptores acoplados a proteínas G. El establecimiento de este requisito estructural específico nos ha permitido diseñar y desarrollar sondas moleculares mejoradas del sistema del complemento y de fármacos basados en C5a, y diseñar moléculas pequeñas que seleccionan como diana otros receptores acoplados a proteínas G, que se están reconociendo cada vez más como dianas farmacológicas importantes debido a sus papeles cruciales en la transducción de señales (G protein-coupled Receptors, IBC Biomedical Library Series, 1996).

60 65 Por tanto, estos resultados nos han permitido diseñar moldes estructurales limitados que permiten que se ensamblen grupos hidrófobos en una seria hidrófoba para su interacción con un receptor acoplado a proteínas G, por ejemplo en el sitio 2 del receptor de C5a ilustrado en la figura 1. Hasta ahora, no se ha sugerido que tales moldes o armazones, que pueden ser cíclicos o acíclicos, sean moduladores de la actividad de los receptores de C5a u otros receptores acoplados a proteínas G.

El documento US-A-5.386.011 da a conocer agonistas de C5a cílicos y su uso en el tratamiento de estados patológicos inflamatorios.

El documento WO-A95/25957 se refiere a un ensayo para identificar compuestos útiles como antagonistas de C5a y antagonistas de C5a lineales y su uso como agentes antiinflamatorios e inmunorreguladores.

### Sumario de la invención

La invención proporciona moduladores cíclicos de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G.

Los compuestos de la presente invención tienen actividad antagonista contra C5aR, no tienen actividad agonista de C5a y tienen la fórmula general:

10

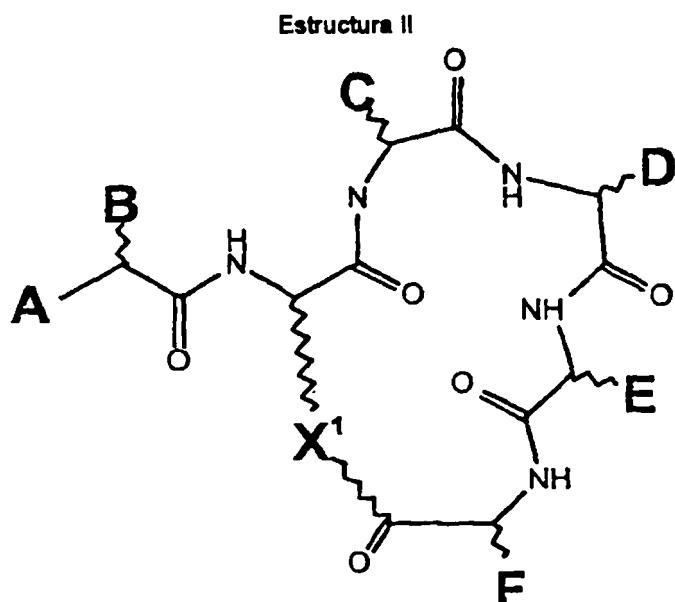
15

20

25

30

35 en la que



A es H; alquilo; arilo; NH<sub>2</sub>, NH-alquilo, N(alquilo)<sub>2</sub>, NH-arilo o NH-acilo; OH, O-alquilo, O-arilo.

B es un grupo alquilo, arilo, fenilo, bencilo, naftilo o indol, o la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado de fenilalanina, homofenilalanina, triptófano, homotriptófano, tirosina y homotirosina;

C es la cadena lateral de un D-, L- u homoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en prolina, alanina, leucina, isoleucina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, glutamina, asparagina, lisina, tirosina, fenilalanina, ciclohexilalanina, norleucina, triptófano, cisteína y metionina;

D es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ciclohexilalanina, homociclohexilalanina, leucina, norleucina, homoleucina, homonorleucina y triptófano;

E es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano y homotriptófano;

F es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, homoarginina, lisina y homolisina; y

X<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-, en el que n es un número entero desde 1 hasta 4, preferiblemente 2 ó 3, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- o -CH<sub>2</sub>COCHRNH-, en el que R es la cadena lateral de cualquier aminoácido común o no común.

Para los fines de esta memoria descriptiva, el término "alquilo" debe entenderse que significa una cadena de alquilo sustituido o no sustituido, lineal, ramificado o cíclico de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4 carbonos. Lo más preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo metilo. El término "acilo" debe entenderse que significa un acilo sustituido o no sustituido de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Lo más preferiblemente, el grupo acilo es acetilo. El término "arilo" debe entenderse que significa un grupo arilo homocíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido, en el que el anillo tiene preferiblemente 5 ó 6 miembros.

Un aminoácido "común" es un L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, metionina, arginina, lisina, prolina, serina, treonina e histidina.

Un aminoácido “no común” incluye, pero no se limita a, D-aminoácidos, homoaminoácidos, N-alquil-aminoácidos, deshidroaminoácidos, aminoácidos aromáticos (diferentes de fenilalanina, tirosina y triptófano), ácido orto-, meta- y para-aminobenzoico, ornitina, citrulina, norleucina, ácido  $\gamma$ -glutámico, ácido aminobutírico y aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos.

5 Para los fines de esta memoria descriptiva, se entenderá claramente que las palabras “que comprende” significan “que incluye pero sin limitarse a”, y que la palabra “comprende” tiene un significado correspondiente.

10 Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición, que comprende un compuesto según la invención junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Las composiciones de la invención pueden formularse para su uso oral o parenteral, pero se prefieren las formulaciones orales. Se espera que la mayoría si no todos los compuestos de la invención sean estables en presencia de enzimas digestivas. Tal estabilidad puede someterse a prueba fácilmente mediante métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica.

20 Pueden prepararse formulaciones adecuadas para su administración por cualquier vía deseada mediante métodos convencionales, por ejemplo en referencia a libros de texto bien conocidos tales como Remington; The Science and Practice of Pharmacy, volumen II, 1995 (19<sup>a</sup> edición), A.R. Gennaro (ed), Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, o Australian Prescription Products Guide, volumen 1, 1995 (24<sup>a</sup> edición) J. Thomas (ed), Australian Pharmaceutical Publishing Company Ltd, Victoria, Australia.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de los compuestos según la invención en la fabricación de un medicamento que va a usarse en un método de tratamiento de un estado patológico mediado por un receptor acoplado a proteínas G, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un mamífero que necesita tal tratamiento.

30 Preferiblemente, el estado mediado por un receptor acoplado a proteínas G es un estado mediado por un receptor de C5a, y más preferiblemente, implica la sobreexpresión o regulación disminuida de C5a. Tales estados incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), lupus eritematoso sistémico, rechazo del injerto de tejidos, enfermedad cardíaca isquémica, lesión por reperfusión, choque séptico, psoriasis, gingivitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, lesión pulmonar y síndrome extracorporeal tras la diálisis.

35 Aunque la invención no está limitada de ningún modo al tratamiento de cualquier animal o especie particular, se contempla particularmente que los compuestos de la invención serán útiles en el tratamiento médico de seres humanos, y también serán útiles en tratamiento veterinario, particularmente de animales de compañía tales como gatos y perros, ganado tal como reses, caballos y ovejas, y animales de zoológicos, incluyendo grandes bóvidos, félidos, ungulados y cánidos.

40 Los compuestos pueden administrarse a cualquier dosis adecuada y por cualquier vía adecuada. Se prefiere la administración oral debido a su mayor conveniencia y aceptabilidad. La dosis eficaz dependerá de la naturaleza del estado que ha de tratarse, y la edad, peso y estado de salud subyacente del tratamiento individual. Esto será según criterio del médico o veterinario encargado. Pueden determinarse fácilmente los niveles de dosificación adecuados mediante experimentación de ensayo y error, usando métodos que se conocen bien en la técnica.

#### 45 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una representación esquemática del modelo de dos sitios para la unión de C5a a su receptor acoplado a proteínas G, C5aR. Las barras negras representan regiones de hélice  $\alpha$ , y los cilindros en blanco representan las hélices transmembrana. Los sitios 1 y 2 están indicados en la figura.

50 La figura 2 muestra gráficos apilados de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, que muestran la caída dependiente del tiempo de las resonancias de NH de amida para los residuos de Trp (8,10 ppm) y D-Cha (7,90 ppm) de 7 en  $d_6$ -DMSO que contiene  $\text{D}_2\text{O}$  tras 10 minutos (gráfico inferior) y luego 25, 40, 55, 70, 130, 190, 250, 385 y 520 minutos.

55 La figura 3 muestra los átomos de C, N y O de la estructura principal de veinte estructuras de 7 de RMN minimizadas con las energías más bajas en  $d_6$ -DMSO a 24°C.

60 La figura 4 muestra una representación esquemática de los puentes de H en las estructura de 7 a partir de los espectros de RMN de protón en  $d_6$ -DMSO.

La figura 5a muestra (a) la unión al receptor, tal como se indica mediante la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -C5a a PMN humanos por 7 (●); 8( $\Delta$ ); 9 ( $\blacktriangle$ ); 12 ( $\circ$ ).

65 La figura 5b muestra la potencia del antagonista de C5a como inhibición de la liberación de mieloperoxidasa (MPO) a partir de PMN humanos por: 7 (■, n=9) y 12 (▲, n=4). La figura 5c muestra la unión a C5aR y las potencias de antagonista de 7, 15 y 17.

# ES 2 294 816 T3

A-C muestra el efecto de concentraciones crecientes (de la parte superior a la inferior) de antagonistas de C5a que inhiben la liberación de mieloperoxidasa en PMN humanos (n = 3 en A-C).

5 A: 7 a 0, 0,1, 0,3, 1,0  $\mu$ M (de la parte superior a la inferior)

B: 15 a 0, 0,1, 0,03, 0,1  $\mu$ M (de la parte superior a la inferior)

C: 17 a 0, 0,01, 0,03, 0,1  $\mu$ M (de la parte superior a la inferior)

10 D: Afinidades comparativas para el receptor C5qR de PMN. Inhibición de la unión de  $^{125}$ I-C5a a PMN humanos por 7 (parte superior), 15 (parte central), 17 (parte inferior). Todos los datos son medias  $\pm$  EEM.

15 La figura 6 muestra la unión al receptor de antagonistas de C5a cílicos, tal como se muestra mediante la inhibición de la unión de  $^{125}$ I-C5a a PMN humanos (n = 5).

15 La figura 7 muestra estructuras superpuestas de 7 (clara, estructura de RMN) y 12 (oscura, estructura modelada por ordenador). Se omiten las cadenas laterales de Phe y Trp de 12 para claridad.

20 La figura 8 muestra la inhibición de la neutropenia inducida por C5a en ratas Wistar mediante el antagonista cíclico F-[OPdChaWR] administrado i.v. a 1 mg/kg. Resultados mostrados a partir de n = 3 en cada grupo \*P<0,05 en comparación sólo con el grupo tratado con C5a. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

25 La figura 9 muestra la inhibición de la neutropenia inducida por LPS y los cambios del hematocrito inducidos por el antagonista cíclico F-[OPdChaWr] (0,03-10 mg/kg, i.v., 10 min antes del lipopolisacárido [LPS]) en ratas Wistar. Abscisa: tiempo tras el LPS (inyección i.v de 1 mg/kg). Ordenada: cambio en porcentaje del valor del hematocrito (A) o nivel de leucocitos polimorfonucleares (PMN) circulantes (B) en comparación con el tiempo cero.

30 La figura 10 muestra la inhibición del edema en la pata de ratas (Wistar) inducido por carragenanos mediante el antagonista (3D35) AcF-[OPdChaWr] (dosis única i.p. de 1 mg/kg administrada 30 min. antes de los carragenanos). Resultados mostrados a partir de 4 ratas/grupo, media  $\pm$  EEM. Ordenada: cambio en porcentaje del volumen de la pata. Abscisa: tiempo (min.) tras la inyección de carragenanos.

## Descripción detallada de la invención

35 La invención se describirá ahora a modo de referencia sólo a los siguientes métodos generales y ejemplos experimentales, y a las figuras. Las abreviaturas usadas en el presente documento son las siguientes:

BOP hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio

40 D-Cha D-ciclohexilamina

DIPEA diisopropiletilamina

DMF dimetilformamida

45 DMSO dimetilsulfóxido

HBTU hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N',N',N',N'-tetrametiluronio;

50 LPS lipopolisacárido

PMN granulocito polimorfonuclear

RMSD desviación cuadrática media

55 RP-HPLC cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa

TFA ácido trifluoroacético.

60 A lo largo de toda la memoria descriptiva, se usan los códigos de una única letra y de tres letras convencionales para representar los aminoácidos.

## Métodos generales

65 Se obtuvieron resinas y aminoácidos protegidos de Novabiochem. Se adquirieron TFA, DIPEA y DMF (de calidad para síntesis de péptidos) de Auspep. Todos los demás materiales eran de calidad para reactivo a menos que se indique lo contrario. Las separaciones mediante HPLC en fase inversa a escala preparativa se realizaron en una columna de

## ES 2 294 816 T3

fase inversa Vydac C18 (2,2 x 25 cm), y las separaciones mediante HPLC en fase inversa analítica se realizaron en una columna de fase inversa Waters Delta-Pak PrepPak C18 (0,8 x 10 cm), usando mezclas en gradiente de disolvente A = agua/0,1% de TFA y disolvente B = 10% de agua/90% de acetonitrilo, 0,09% de TFA. Se determinó el peso molecular de los péptidos mediante espectrometría de masas por electroespray registrada en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (PE SCIEX API III), tal como se describe en otra parte (Haviland *et al*, 1995). Se registraron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN o bien en un espectrómetro Bruker ARX a 500 MHz o bien en un espectrómetro Varian Unity 400. Se determinaron las asignaciones de protón mediante experimentos de RMN 2D (DFCOSY, TOCSY, NOESY).

Se sintetizaron compuestos no peptídicos usando métodos de química orgánica convencionales. Se analizaron los compuestos mediante espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN y mediante espectrometría de masas.

### Síntesis de péptidos

Se facilitan ahora algunas síntesis de péptidos representativos. Se ensamblaron secuencias de péptidos lineales mediante síntesis de péptidos en fase sólida progresiva manual con activación por HBTU y neutralización *in situ* con DIEA. Se empleó química de Boc para la N<sup>α</sup>-protección temporal de aminoácidos con dos tratamientos de 1 min con TFA para la eliminación del grupo Boc. Se desprotegieron totalmente los péptidos y se escindieron mediante tratamiento con HF líquido (10 ml; p-cresol (1 ml); -5°C; 1-2 h). HPLC analítica (gradiente; del 0% de B al 50% de B a lo largo de 40 min): 7, Tr = 32,0 min, [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 900,5, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 900,7; 8, Tr = 32,2 min, [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 899,6, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 899,7; 9, Tr = 30,0 min, [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 900,5, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 900,7; 10, Tr = 23,8 min, [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 860,5, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 860,5.

Las estructuras para los péptidos se muestran en la tabla 4 más adelante.

#### a) Síntesis del ciclo 11

Este es un método general usado para la síntesis de una amplia gama de antagonistas cíclicos cubiertos por esta patente. Por ejemplo, en el caso del ciclo 11, se sintetizó su péptido precursor lineal mediante química de Fmoc usando activación con HBTU/DIEA sobre una resina Fmoc-D-Arg(Mtr)-Wang. Se realizó la eliminación del grupo Fmoc usando dos tratamientos de 1 min. con piperidina al 50%/DMF. La escisión y desprotección usando el 95% de TFA/2,5% de TIPS/2,5% de H<sub>2</sub>O dio el péptido protegido con Mtr, que se purificó mediante RP-HPLC. La ciclación del péptido protegido, purificado usando 3 equivalentes de BOP y 10 equivalentes de DIEA a una concentración de 1 mM en DMF con agitación durante 15 h, dio el producto ciclado, que se desprotegió totalmente usando TMSBr 1 M en TFA. Una purificación final mediante RP-HPLC dio el péptido deseado con rendimientos del 50% para la ciclación. Tr = 37,7 min. [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 910,5, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 910,7.

#### b) Síntesis del ciclo 12

Se logró la ciclación del péptido escindido y totalmente desprotegido agitando una disolución 1 mM en DMF con 3 equivalentes de BOP y 10 equivalentes de piridina como base durante 15 h. Una purificación final mediante RP-HPLC dio el péptido deseado con rendimientos del 22% para la ciclación. Tr = 37,3 min, [M+H]<sup>+</sup> (calc.) = 896,5, [M+H]<sup>+</sup> (exper.) = 896,5.

### Determinación de la estructura de RMN

Se registraron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN para el compuesto 7 (3 mg en 750  $\mu$ l de d<sub>6</sub>-DMSO,  $\delta$  2,50) usando como referencia el disolvente en un espectrómetro Varian Unity 400 a 24°C. Se adquirieron experimentos bidimensionales <sup>1</sup>H-RMN NOESY (retraso de relajación 2,0 s, tiempo de mezclado 50-300 ms), DFQ-COSY y TOCSY (tiempo de mezclado 75 ms) y se registraron en modo sensible a la fase. Tiempos de adquisición = 0,186 s, ancho del espectro = 5500 Hz, número de puntos complejos (dimensión t<sub>1</sub>) = 1024 para todos los experimentos. Los datos se completaron con ceros y se realizó la transformación de Fourier hasta 1024 puntos reales en ambas dimensiones.

Se procesaron los datos de RMN usando el programa TRIAD (Tripos Assox.) en una estación de trabajo Silicon Graphics Indy. Se integraron los picos cruzados de NOE de 2D y se caracterizaron como fuertes (1,8-2,5 Å), medios (2,3-3,5 Å) y débiles (3,3-5,0 Å). Se calcularon las estructuras tridimensionales preliminares a partir de los archivos de límite de distancia superior e inferior usando el programa Diana 2.8 (69 limitaciones de distancia, incluyendo 27 para residuos adyacentes y 6 más lejanos) con la estrategia de limitaciones de ángulos diedros redundantes (REDAc). Se calcularon con precisión las limitaciones de distancia superior e inferior usando el programa MARDIGRAS. En esta fase, se examinó el péptido para detectar posibles puentes de hidrógeno, y se añadieron como limitaciones de distancia. Se sometieron las 50 estructuras de Diana de menor energía a dinámica molecular restringida (RMD) y minimización de energía (REM). Inicialmente, la REM consistió en una minimización descendente muy brusca de 50 etapas seguida por una en gradiente de conjugado de 100 etapas. Se realizó la RMD mediante calentamiento simulado de las estructuras hasta 300 K durante 1 ps, seguido por 500 K durante 1 ps. Se redujo gradualmente la temperatura hasta 300 K a lo largo de 2 ps y finalmente durante 2 ps a 200 K. Se realizó de nuevo la REM con una minimización descendente muy brusca de 50 etapas, minimización en gradiente de conjugado de 200 etapas seguido

# ES 2 294 816 T3

por una minimización Powell de 300 etapas. Se examinaron las estructuras finales para obtener una diferencia de rms por parejas media sobre los átomos pesados de la estructura principal (N, Ca y C). Veinte de las 50 estructuras tenían una rmsd media < 0,5 Å para todos los átomos de la estructura principal (O, N, C).

5

## *Modelización molecular*

Se creó un modelo del ciclo 12, mostrado en la figura 7, a partir de la estructura de RMN de 7 mediante la eliminación de todas las restricciones de RMN, fusionando la amina de la cadena lateral de la ornitina al carboxilato C-terminal de d-Arg para formar una amida, y mediante minimización usando un campo de fuerza Powell (1000 iteraciones). Se superpuso entonces la estructura modelada sobre la estructura de RMN con una rmsd de 10 0,224 Å.

## 15 *Ensayo de unión a receptor*

Se realizaron los ensayos con PMN humanos recientes, aislados tal como se describió anteriormente (Sanderson *et al*, 1995), usando un tampón de HEPES 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, albúmina bovina sérica al 0,5%, bacitracina al 0,1% y fluoruro de fenilmetsulfonilo 100 μM (PMSF). En ensayos realizados a 4°C, se añadieron 20 secuencialmente tampón, C5a recombinante humana no marcada (Sigma) o péptido, <sup>125</sup>I-C5a marcada con reactivos de Hunter/Bolton (~ 20 pM) (New England Nuclear, MA) y los PMN (0,2 x 10<sup>6</sup>) a una placa de ensayo Multiscreen de Millipore (HV 0,45) que tiene un volumen final de 200 μl/pocillo. Tras la incubación durante 60 min a 4°C, se filtraron las muestras y se lavó la placa una vez con tampón. Se secaron los filtros, se perforaron y se contaron en un contador gamma LKB. Se evaluó la unión no específica mediante la inclusión de péptido 1 mM o C5a 100 nM que normalmente 25 dio como resultando una unión total del 10-15%.

Se analizaron los datos usando regresión no lineal y estadísticos con la prueba posterior de Dunnet.

## 30 *Liberación de mieloperoxidasa*

Se aislaron las células tal como se describió anteriormente (Sanderson *et al*, 1995) y se incubaron con citocalasina B (5 μg/ml, 15 min, 37°C). Se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía gelatina al 0,15% y péptido sobre una placa de 96 pocillos (volumen total de 100 μl/pocillo), seguido por 25 μl de células (4 x 10<sup>6</sup>/ml). Para 35 evaluar la capacidad de cada péptido para antagonizar con C5a, se incubaron las células durante 5 min a 37°C con cada péptido, seguido por la adición de C5a (100 nM) e incubación adicional durante 5 min. Luego, se añadieron 50 μl de fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,8) a cada pocillo, se enfrió la placa hasta temperatura ambiente, y se añadieron 25 μl de una mezcla reciente de volúmenes iguales de dimetoxibencidina (5,7 mg/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,51%) a cada pocillo. Se paró la reacción a los 10 min mediante la adición de azida de sodio al 2%. Se midieron las absorbancias a 45 min en 40 un lector de placas Bioscan 450, corregido para los valores control (sin péptido), y se analizaron mediante regresión no lineal.

## 45 *Ensayos *in vivo* de la actividad antiinflamatoria*

Pueden usarse los siguientes sistema de ensayo *in vivo* bien conocidos para evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos de la invención. Todos los datos del ensayo se analizan usando análisis de regresión no lineal y prueba de la t de Student, análisis de varianza, con p<0,05 como el nivel umbral de significación.

### 50 (a) *Edema de pata mediante carragenanos*

A ratas Wistar (150-200 g) o ratones anestesiados (i.p. con ketamina y xilazina) se les inyectó aire esterilizado (20 ml en el día 1, 10 ml en el día 4) en el tejido subcutáneo del lomo. La cavidad puede usarse tras 6 días, sobre la que se inyectaron carragenanos (2 ml, al 1% p/p en solución salina al 0,9%) en la bolsa de aire y se recogió el exudado tras 10 h. Se administraron los compuestos de prueba diariamente tras el día 6 y se sometieron a ensayo sus efectos antiinflamatorios mediante recuento diferencial de células en el exudado de la bolsa de aire. Se sacrificaron los animales a tiempos apropiados tras la inyección y se usaron 2 ml de solución salina al 0,9% para lavar la cavidad, se transfirieron los líquidos de lavado a un tubo heparinizado y se contaron las células con un hemocitómetro y una preparación sometida a citocentrifugación teñida con Diff-Quik.

60 Alternativamente, se desarrolló un edema de pata mediante carragenanos de rutina en ratas Wistar mediante la administración de una inyección de pedal de carragenanos para provocar un edema que es visible en 2 h y se maximiza en 4 h. Se administran los compuestos de prueba 40 min antes del compuesto que provoca la inflamación y se evaluaron mediante mediciones con microcalibrador de las patas tras 2 y 4 h. Véase Fairlie, D.P. *et al* (1987). Véase también 65 Walker y Whitehouse (1978).

(b) *Artritis por adyuvante*

Se indujo artritis por adyuvante en ratas (3 cepas) o bien de manera microbiana (inyección de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor) o química (con avridina) mediante inoculación con el adyuvante artritogénico administrado conjuntamente con vehículos oleosos (adyuvantes de Freund) en la base de la cola (véase Whitehouse, M. W., *Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases*, Eds. Greenwald, R. A.; Diamond, H. S.; volumen 1, pág. 3-16, CRC Press).

En el plazo de 13 días, se manifiesta la artritis por adyuvante mediante inflamación y ulceración local en la cola, hinchazón acusada de las cuatro patas, lesiones inflamatorias en patas y orejas, pérdida de peso y fiebre. Estos síntomas, que son similares a los de la enfermedad inflamatoria en seres humanos (Winter y Nuss, 1966), pueden aliviarse mediante agentes tales como indometacina o ciclosporina que también muestran efectos beneficiosos en el hombre (por ejemplo, Ward y Cloud, 1966). Sin tratamiento farmacológico en el día 14, las ratas artríticas presentaban hipertrofia de las patas, reducción de la albúmina pero elevación de las proteínas de reacción de fase aguda en el suero, y metabolismo hepático deprimido de xenobióticos tal como se indica mediante los prolongados tiempos de sueño inducidos por barbitúricos.

Para evaluar la actividad, se administraron los compuestos durante 4 días por vía oral ( $\leq 10 \text{ mg/kg/día}$ ) o i.p. desde los días 10-13 tras la inoculación con el artrítógeno (día 0). La inflamación o bien no era visible o bien se redujo muy significativamente en las patas traseras o delanteras tal como se evaluó mediante mediciones con microcalibrador del grosor de las patas y el volumen de la cola, así como mediante inspección macroscópica de las lesiones inflamatorias. Se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical en el día 18 a menos que estén ausentes signos de artritis, con lo cual se continúa la duración de las observaciones con permiso especial de los comités éticos. Se escalonaron los experimentos para maximizar el rendimiento y permitir comparaciones tempranas entre los compuestos. Este ensayo de rutina está bien aceptado, dado que identifica agentes antiinflamatorios para su uso en seres humanos.

## Ejemplo 2

30 *Estructura de RMN del antagonista de C5a*

Se usaron dos espectroscopías de resonancia magnética nuclear dimensional para determinar la estructura tridimensional de 7 y se halló que aunque no existe una estructura perceptible en agua, existe evidencia de una estructura de giro gamma estable en dimetilsulfóxido.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN 1D del péptido 7 en  $d_6$ -DMSO a 24°C muestra 4 resonancias distintas para los protones de NH de amida, tal como se resume en la tabla 3. Para establecer su posible implicación en los puentes de hidrógeno intramoleculares, se realizó un experimento de intercambio por deuterio añadiendo un exceso de 10 veces de  $D_2\text{O}$  a la disolución. Dos de los dobletes de NH de amida desaparecieron inmediatamente, junto con resonancias atribuibles a los protones de metilamina N-terminal. Sin embargo, las otras dos resonancias de NH de amida, así como una resonancia ancha a aproximadamente 8,05 ppm, persistieron durante hasta 6,5 horas (figura 2). Estos tres protones que se intercambian lentamente se asignan a los NH de amida de Trp y d-Cha y a la amina de la cadena lateral de Lys, siendo característico el comportamiento de intercambio lento de los puentes de hidrógeno. Se estableció la asignación de la amina a partir del espectro TOCSY en el que se observaron picos cruzados entre la amina protonada y los protones  $\varepsilon$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$   $\text{CH}_2$ . Un estudio de dependencia con la temperatura (20-60°C) del desplazamiento químico de NH de amida ( $\Delta\delta/T = 2,5 \text{ ppb/deg}$ , dCh-NH; 6 ppb/deg, Trp-NH; 6,5 ppb, Lys-NH; 8,7 ppb, d-Arg-NH) confirmó inequívocamente la implicación de dCh-NH sólo en puentes de hidrógeno intramoleculares.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

# ES 2 294 816 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

55

60

65

Tabla 3

Asignaciones<sup>a</sup> de  $^1\text{H}$ -RMN para 7 en  $\text{d}_6$ -DMSO

Residuo	<sup>b</sup> HN	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	Otros
MePhe	—	4,06	3,09, 3,06	—	<sup>c</sup> 7,17, 7,29; <sup>d</sup> 2,46; <sup>f</sup> 8,98
Lys	8,83	4,54	1,74, 1,55	1,32	<sup>e</sup> 1,51; <sup>f</sup> 2,74, <sup>g</sup> 7,76 ( $\text{NH}_2$ )
Pro	—	4,30	2,084, 1,74	1,88, 1,78	<sup>e</sup> 3,61, <sup>f</sup> 3,48
d-Cha	7,91	4,35	1,19, 1,06	0,76	<sup>e</sup> 1,43, 1,08; <sup>f</sup> 1,61, 1,58; 0,73
Trp	8,01	4,65	3,11, 2,94	—	<sup>c</sup> 6,97, 7,06, 7,13, 7,32, 7,65;
d-Arg	8,44	4,20	1,73, 1,58	1,42	<sup>e</sup> 3,08; <sup>g</sup> 7,60

<sup>a</sup> En referencia a  $\text{d}_5$ -DMSO residual a 2,50 ppm.

<sup>b</sup> NH de amida, valores de  $^{3}\text{JNH-CaH}$  (Hz): 7,91 (Lys), 7,77 (d-Arg), 8,34 (Trp), 8,53 (d-Cha),

<sup>c</sup> Compuestos aromáticos

<sup>d</sup> N-Me,

<sup>e</sup> H $\delta$ ,

<sup>f</sup> H $\varepsilon$

<sup>g</sup> NH/ $\text{NH}_2$  amina,

## ES 2 294 816 T3

Se midieron una serie de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN 2D para 7 a 24°C en  $\text{d}_6$ -DMSO para determinar la estructura tridimensional. Se usaron experimentos TOCSY y DFQ-COSY para identificar los tipos de residuo, mientras que se realizaron asignaciones secuenciales a partir del análisis de los datos de NOESY. A partir de una serie de 100 estructuras generadas a partir de los datos de NOESY, cincuenta de las estructuras con la menor energía se sometieron a 5 dinámica molecular restringida (200 K-500 K) y minimización de energía. Se superpone un conjunto de 20 estructuras calculadas con una desviación cuadrática media (rmsd) < 0,5 Å (átomos de la estructura principal) en la figura 3, y representan claramente una conformación de giro.

En combinación, los datos de restricción de RMN, los valores de  $^{3\text{J}}$ NH-CaH, el intercambio por deuterio y los 10 datos de dependencia con la temperatura establecen una estructura de giro poco común para el hexapéptido 7 que está restringido por hasta tres puentes de hidrógeno, tal como se muestra en la figura 4. La evidencia es muy fuerte para un puente de hidrógeno intramolecular de dCha-NH....OC-Lys (2,72 Å, N-H...O ángulo de 157°, C=O...H ángulo de 84°), que forma un anillo de 7 miembros que define un giro  $\gamma$  inverso. El ángulo de dChaNH-O-TrpNH es de 56,4°. Los 15 datos de intercambio por deuterio y los datos de restricción de RMN apuntan juntos a un segundo puente de hidrógeno intramolecular Trp-NH....OC-Lys (3,31 Å, N-H...O ángulo de 159°, CO...H ángulo de 137,3°) que forma un anillo de 10 miembros característico de un giro  $\beta$ . Los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  ( $\phi_2=-58,4^\circ$ ,  $\psi_2=62,0^\circ$ ;  $\phi=96,6^\circ$ ,  $\psi_3=16,6^\circ$ ) corresponden lo más estrechamente con un giro  $\beta$  de tipo II (Bandekar, 1993; Hutchinson y Thornton, 1994) que está distorsionado por la presencia del giro  $\gamma$  completamente dentro del giro  $\beta$ .

20 Por lo que se conoce hasta ahora, éste es el primer ejemplo de un puente de hidrógeno intramolecular entre residuos dentro de un giro  $\beta$ , aunque existen muchos ejemplos de puentes de hidrógeno entre un residuo dentro del “anillo de 10 miembros” de un giro  $\beta$  y un residuo fuera de él (Bandekar, 1993). Se sugiere un tercer puente de hidrógeno (2,76 Å, N-H...O ángulo de 160,3°), entre la amina de la cadena lateral de Lys y el carboxilato C-terminal, por los datos de 25 restricción de RMN, por el intercambio NH/ND lento y por la detección de un NOE débil entre Lys-NH...Trp- $\alpha$ CH<sub>2</sub>. Éste puede restringir además la molécula en la conformación de giro observada. Tal apareamiento iónico es común en disolventes apróticos dipolares tales como dimetilsulfóxido y también puede ser relevante en un entorno proteico hidrófobo.

También se han determinado las estructuras de RMN en disolución para varios de los antagonistas cíclicos descritos 30 en los siguientes ejemplos, y muestran que en cada caso el giro  $\beta$  de tipo II está conservado y estabilizado por la estructura cíclica.

Los giros  $\beta$  y  $\gamma$  restringidos propuestos en el péptido 7 lineal tienen paralelismos en péptidos cíclicos. Se han detectado anteriormente giros  $\beta$  y  $\gamma$  solapantes en un octapéptido cíclico a partir de ascidiaciclamilida (Abbenante *et* 35 *al*, 1996). También se han hallado combinaciones de un giro  $\beta$  y un giro  $\gamma$  en las estructuras principales de penta y hexapéptidos cíclicos, particularmente los que contienen D y L aminoácidos alternos (Marraud y Aubry 1996; Fairlie *et* *al*, 1995; Kessler *et* *al*, 1995; Stradley *et* *al*, 1990). Por ejemplo, se han identificado un giro  $\beta$  de tipo II y un giro  $\gamma$  inverso en los antagonistas cíclicos c-(D-Glu-Ala-D-allo-Ile-Leu-D-Trp] (Ihara *et* *al*, 1991; Coles *et* *al*, 1993; Ihara *et* *al*, 1992; Bean *et* *al*, 1994) y c-(D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp) (Bean *et* *al*, 1994) para receptores de endotelina, y 40 en miembros de la familia de la rodopsina de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana (X.-M. Cheng *et* *al*, 1994). En el último caso, como en 7, se forma un giro  $\gamma$  inverso entre los residuos (Asp-CO.....Val-NH, Lys-CO....dCha-NH) que flanquean la prolina.

### Ejemplo 3

#### *Relaciones de estructura-actividad in vitro*

Se examinó también la unión a receptor y la actividad antagonista del hexapéptido 7 para su comparación con los 50 nuevos compuestos. Los informes anteriores de Konteatis *et al* (1994) se referían a la capacidad de 7 por competir con la unión de C5a a receptores en membranas de PMN aislados (CI<sub>50</sub> 70 nM), que no es necesariamente relevante de manera fisiológica. Se examinó la competición entre 7 y C5a usando células PMN intactas y se halló que, en estas condiciones, 7 se une con una afinidad por el receptor mucho menor de CI<sub>50</sub> 1,8  $\mu\text{M}$ . Se confirmó que 7 es un antagonista total sin propiedades agonistas. Estos resultados se resumen en la figura 5a y en la tabla 4. La afinidad relativa (razón) de 7 por el C5aR en PMN intactos en estos ensayos fue similar a la notificada anteriormente para 55 membranas aisladas de PMN.

También se halló que 7 muestra actividad antagonista tanto frente a C5a (figura 5 b) como un análogo 4 del decapéptido agonista de C-terminal (YSFKPMPLaR) (Finch *et* *al*, 1997) del C5a<sub>65-74</sub> del extremo C-terminal, lo que sugiere que actúa sobre el sitio 2 del receptor. Los compuestos 7 y 4 tienen afinidad  $\mu\text{M}$  similar para el receptor C5aR en leucocitos polimorfonucleares intactos, tal como se muestra en la tabla 4.

Un nuevo descubrimiento a partir de los datos en la tabla 4 es la correlación lineal entre el logaritmo de las 65 afinidades de unión y el logaritmo de las potencias de agonista para estos agonistas del sitio 2 (compuestos 7-12, tabla 4). La importancia de esta relación lineal es que dado que la afinidad por el receptor y la actividad antagonista son directamente proporcionales, puede usarse el enfoque experimentalmente más sencillo de medición de la unión al receptor para estimar la actividad antagonista para tales compuestos pequeños, siempre que no exista evidencia de actividad agonista.

# ES 2 294 816 T3

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

Tabla 4

Compuesto	Afinidades <sup>a</sup> de unión a receptor y actividad <sup>b</sup> antagonistas en PMN humanos		Actividad <sup>c</sup> agonista
	Afinidad <sup>a</sup> por el receptor	Potencia <sup>b</sup> del antagonista	
<b>7</b> MeFKP (dChA)Wr	1,8 (15)	0,085 (9)	No
<b>8</b> MeFKP (dChA)Wr-CONH <sub>2</sub>	14 (5)	0,5 (3)	No
<b>9</b> MeFKP (dChA)WR	11 (5)	0,7 (3)	No
<b>10</b> MeFKPLWR	144 (1)	>1000 (3)	nd
<b>11</b> AC-F-[KP (dChA)Wr]	3,2 (40)	0,090 (5)	No
<b>12</b> AC-F-[OP (dChA)Wr]	0,28 (6)	0,012 (4)	No
<b>4</b> YSFKPMPLaR	6,0 <sup>d</sup>	-	Sí
<b>1</b> C5a <sub>65-74</sub> , ISHKDMQLGR	>1000 <sup>e</sup>	-	-
C5a	0,0008 (9)	-	Sí

Número de experimentos entre paréntesis. Corregido para el contenido en aminoácidos. Los corchetes indican la parte cíclica.

nd = no determinado

<sup>a</sup> Reducción del 50% en la unión de <sup>125</sup>I-C5a a PMN humanos intactos

<sup>b</sup> Reducción del 50% en la liberación de mieloperoxidasa a partir de PMN humanos mediada por C5a 100 nM

<sup>c</sup> Actividad agonista en el intervalo de dosis de 0,1 nM-1 mM

<sup>d</sup> Finch *et al.*, 1997; <sup>e</sup> Kawai *et al.*, 1991

Se ha propuesto anteriormente que el extremo C-terminal de C5a y de los péptidos agonistas es esencial para la actividad, debido a su interacción con una Arg206 del receptor cargada positivamente (DeMartino *et al.*, 1995). Se confirma en el presente documento que el carboxilato C-terminal es en efecto importante para la actividad (8 frente a 7), pero hay que preguntarse si el origen de este efecto podría deberse a los puentes de hidrógeno entre el anión 5 carboxilato y la cadena lateral de amina cargada positivamente de Lys. La conversión en la amida (8) reduce por supuesto tanto la afinidad por el receptor como la actividad antagonista, en aproximadamente 5 veces. El cambio de la quiralidad de la Arg-C $\alpha$  (9 frente a 7) produce una reducción similar en la actividad, y la sustitución de dCha por el residuo (10) de Leu menos voluminoso es también perjudicial para la unión al receptor. Sin embargo, se recupera 10 la potencia para los compuestos cíclicos 11 y 12, en los que se tolera un enlace amida en el extremo C-terminal, consecuente con la interpretación estructural anterior de que la ventaja del carboxilato en 7 puede estar asociada con los puentes de hidrógeno intramoleculares. La sustitución de este puente de hidrógeno en 7 con un enlace amida covalente en 11 y 12 estabiliza más eficazmente la conformación de giro.

La figura 5C compara la unión a C5aR y la potencia de antagonista *in vitro* en PMN humanos para los compuestos 15 15 y 17 con las del compuesto 7. Tanto 15 como 17 son inhibidores potentes a concentraciones de nM de la acción de C5a y la unión de  $^{125}\text{I}$ -C5a a su receptor (por ejemplo 4,  $K_b = 1,4 \text{ nM}$ ). Su naturaleza cíclica y la acetilación en la fenilalanina N-terminal protegen ambas frente a la degradación proteolítica encontrada normalmente en los péptidos, 20 haciendo que tales compuestos cíclicos sean más adecuados que los péptidos acíclicos como candidatos a fármaco. Los resultados se muestran en la tabla 5.

20

TABLA 5

*Unión al receptor y actividad antagonista de moléculas cíclicas*

25

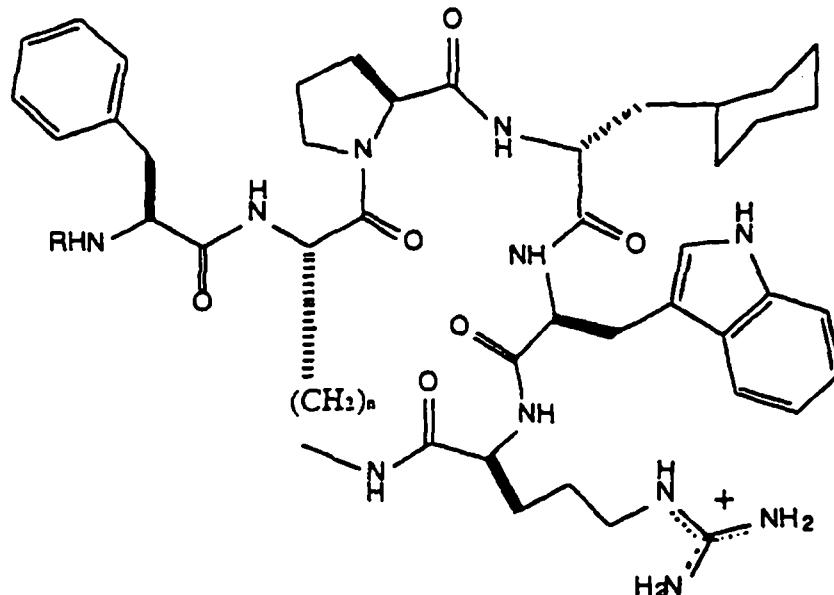
30

35

40

45

50



	Compuesto	n	R	Isómero*	Afinidad por el receptor	Actividad antagonista
					$\mu\text{M}$	
55	<b>13</b>	1	H	S-	9	No
	<b>14</b>			R-	34	No
	<b>15</b>	2	H	S-	0,3	No
	<b>16</b>			R-	3,7	No
60	<b>17</b>	3	Ac	S-	0,3	No
	<b>11</b>		Ac	R-	38	No
	<b>18</b>	4	Ac	S-	3,2	No
65	<b>12</b>		Ac	R-	51	No

\*Se refiere a la estereoquímica de la cadena lateral de Arg

# ES 2 294 816 T3

## Ejemplo 4

### *Antagonistas cílicos de C5a*

5 Se facilitan algunos ejemplos de estos antagonistas cílicos y sus afinidades de unión al receptor y potencias de antagonista aparentes en las tablas 4, 5 y 6 así como en las figuras 5 y 6. En las tablas, se usa el código de una única letra para los aminoácidos.

**Tabla 6**

Efecto de la ciclación sobre la afinidad de unión del antagonista y la potencia del antagonista

PÉPTIDO	pD <sub>2</sub> ± SE <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (mM) <sup>a</sup>	(n)	pD <sub>2</sub> ± SE <sup>b</sup>	CI <sub>50</sub> (mM) <sup>b</sup>	(n)
<b>11</b> ACF-[KPdChawr]	5,49 ± 0,22	3,2	4	7,07 ± 0,29	0,09	5
<b>18</b> ACF-[CPdChawr]	6,44 ± 0,14*	0,4	9	7,30 ± 0,09	0,05	9
<b>19</b> [FWFdChawr]	4,37 ± 0,36*	43	3	nd		
<b>20</b> ACF-[KMDChawr]	4,81 ± 0,06	15	2	nd		
<b>21</b> ACF-[KKdChawr]	3,94 ± 0,4	1116	3	4,88	1,3	1
Efecto de la longitudo del ligador en el ciclo sobre la afinidad de unión del antagonista y la potencia del antagonista						
<b>22</b> ACF-[XPdChawr]	5,02 ± 0,07	9,5	3	4,71 ± 0,23	20	3
<b>23</b> ACF-[X <sup>2</sup> PdChawr]	4,77 ± 0,14*	17	3	6,09 ± 0,08*	3,8	4
<b>12</b> ACF-[OPdChawr]	4,60 ± 0,06*	16	4	6,42 ± 0,10	0,4	4
<b>24</b> ACKF-[OPdChawr]	4,96 ± 0,03	11	3	6,73	0,2	1
<b>14</b> F-[XPdChawr]	4,39 ± 0,10*	41	3	nd		
<b>16</b> F-[X <sup>2</sup> PdChawr]	5,42 ± 0,05	3,8	3	6,70 ± 0,04	0,4	3

# ES 2 294 816 T3

		5	10	15
		20	25	30
<b>25</b>	F-[OPdChaWR]	5,51 ± 0,07	3,1	3 5,79 ± 0,34*
<b>26</b>	F-[KPdChaWR]	5,09 ± 0,08	8,1	3 5,55 ± 0,57*

Efecto de la L-Arg sobre la afinidad de unión del antagonista y la potencia del antagonista

<b>17</b>	AcF-[OPdChaWR]	6,57 ± 0,05*	0,3	3 7,91 ± 0,17*
<b>13</b>	F-[XPdChaWR]	4,98 ± 0,05	10	3 5,63 ± 0,13*
<b>15</b>	F-[X <sup>2</sup> PdChaWR]	6,50 ± 0,04*	0,3	5 7,36 ± 0,13 0,04
<b>27</b>	F-[OPdChaWR]	7,21 ± 0,01*	0,06	3 7,41 ± 0,14 0,04
<b>28</b>	F-[KPdChaWR]	6,5 ± 0,12*	0,3	4 6,69 ± 0,04 0,2

a pD<sub>2</sub>/CI<sub>50</sub>; concentración de péptido que da como resultado una inhibición del 50% en la unión de [<sup>125</sup>I]C5a a PMN intactos.

La CI<sub>50</sub> es el antilogaritmo del valor de pD2 medio.

b pD<sub>2</sub>/CI<sub>50</sub>; concentración de péptido que da como resultado una inhibición del 50% en la capacidad de C5a (100 nM) para producir la liberación de MPQ a partir de PMN

X = (CH<sub>2</sub>) -NH<sub>2</sub>

X<sup>2</sup>= (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

Los valores de pD2 se expresan como media ± DE  
n representa el número de experimentos realizados

# ES 2 294 816 T3

Estos resultados demuestran:

(1) que las moléculas cíclicas tienen una afinidad aparente por el receptor superior y pueden ser antagonistas más potentes que los péptidos acíclicos (lineales),

(2) que uno de los dos posibles diastereómeros cíclicos está favorecido consecuentemente para la unión al receptor de C5a, y es sorprendentemente la estereoquímica opuesta (L-arginina) a la favorecida en los compuestos lineales (D-arginina),

(3) que los ciclos tienen un tamaño de anillo óptimo para la unión al receptor;

(4) que existe una relación pseudolineal entre el logaritmo de la potencia del antagonista y el logaritmo de la afinidad por el receptor.

Las tablas 5 y 6 enumeran las afinidades por el receptor de C5a de algunos ejemplos de antagonistas cíclicos de C5a, y se ilustra su capacidad de unirse a, e inhibir, la unión de C5a a PMN humanos en la figura 6. Sorprendentemente, estos datos muestran que se prefiere la L-arginina sobre la D-arginina, a diferencia del compuesto 7 lineal, en el que la D-arginina confiere afinidad superior por el receptor que la L-arginina. Los datos también muestran que el tamaño del macrociclo es óptimo cuando  $n = 2$  ó 3, siendo claramente el ciclo más pequeño cuando  $n = 1$  y siendo menos activo el ciclo más grande cuando  $n = 4$ . Este requisito de un ciclo fuertemente restringido se debe probablemente a la necesidad de colocar correctamente la cadena lateral unida de residuos de, por ejemplo, Trp, dCha, Arg y Phe para su interacción con el receptor.

## Ejemplo 5

### *Modelización por ordenador de estructuras de antagonistas*

La figura 7 compara la estructura modelada por ordenador del antagonista 12 cíclico con la estructura de RMN en disolución del antagonista 7 acíclico. Estas estructuras principales son sorprendentemente similares, y sugieren sólidamente que las conformaciones de unión al receptor de estas moléculas implican la misma estructura de giro. El compuesto 12, un antagonista más potente que 11, tiene también un ligador más corto, que ajusta el giro y modifica ligeramente el espacio conformacional accesible a las cadenas laterales claves de Phe, dCha, Trp y Arg. Las limitaciones conformacionales ubicadas en el derivado 12 de hexapéptido por el ciclo son responsables de un aumento  $\geq 10^4$  en la afinidad de unión al receptor en todo el decapéptido del extremo C-terminal conformacionalmente flexible de C5a (1, tabla 2).

Existe una correlación entre las afinidades de unión y la potencia del antagonista para los antagonistas del sitio 2 (compuestos 7-12, tabla 2). Por tanto, parece que la potencia del antagonista depende de cambios que se producen en el sitio 2 únicamente. Sin querer restringirse a ningún mecanismo propuesto, se cree que esto puede ser porque el mecanismo de antagonismo está relacionado con el cambio conformacional a una conformación de giro inducido por 7 en el sitio 2 del receptor.

## Ejemplo 6

### *Caracterización de C5aR en diferentes células*

Actualmente, no existe información sobre tipos diferentes de C5aR. Se han mostrado anteriormente marcadas diferencias en la capacidad de respuesta de diferentes células que contienen C5aR a agonistas (Sanderson *et al.*, 1994, 1995; Finch *et al.*, 1997) y se puede proporcionar ahora más información examinando la potencia y eficacia de agonistas y antagonistas selectivos en relación con C5a recombinante humana. Para los agonistas, la selectividad de tejido o célula puede revelar receptores funcionalmente diferentes. Se usan ensayos de unión que usan PMN humanos, células U937 o monocitos circulantes para determinar las afinidades por C5aR. La selectividad de diferentes C5aR se establece mediante antagonismo diferencial. Este enfoque combinado permite la caracterización farmacológica de nuevos agonistas o antagonistas, y puede conducir a una posible clasificación funcional de C5aR en diferentes células.

## Ejemplo 7(a)

### *Neutropenia y antagonismo de C5a in vivo*

Se evaluaron compuestos en un modelo de neutropenia aguda inducida por C5a. La neutropenia transitoria se maximiza 5 min tras la administración i.v. de C5a y es profunda, desapareciendo >90% de los neutrófilos circulantes de la circulación a dosis eficaces de C5a, tal como se muestra en la figura 8. La neutropenia se debe a la adherencia transitoria de neutrófilos circulantes al endotelio vascular. Los datos preliminares muestran que la neutropenia producida por la administración i.v. de C5a se bloquea por un antagonista de C5a. Por ejemplo, F-[OPdChaWR], (1 mg/kg), administrado antes de 2  $\mu$ g de C5a i.v., inhibe la neutropenia inducida por C5a *in vivo* (figura 8).

## Ejemplo 7(b)

*Inhibición de los efectos inducidos por lipolisacáridos mediante antagonistas de C5a*

5 Los LPS producen neutropenia rápida en ratas. Si este efecto de los LPS se bloquea mediante antagonistas de C5a, entonces C5a puede ser de la mayor importancia en los efectos agudos de los LPS, y los resultados mostrados en la figura 9 estaban de acuerdo con esta hipótesis. Se inyectaron antagonistas de C5a (bolo i.v.) 10 min antes de la exposición con LPS. Se anestesiaron las ratas, y se extrajeron muestras de sangre (0,3 ml) para las mediciones de PMN. Se aislaron las PMN y se cuantificaron. Los resultados preliminares muestran que F-[O-PdChaWR], (1 mg/kg),  
10 administrado antes que LPS i.v., inhibe la neutropenia.

Los resultados también indican que el antagonista de C5a inhibe el aumento del hematocrito producido por LPS, mostrando que el escape vascular de suero producido por LPS también se inhibe.

15 Estos resultados demuestran que los antagonistas del receptor de C5a, tales como los descritos en esta invención, pueden tener utilidad terapéutica en individuos septicémicos. La capacidad de inhibir la adherencia de los PMN al endotelio vascular, y de inhibir el escape vascular producido por LPS tal como se muestra por la reducción de los valores de hematocrito, indica efectos antiinflamatorios poderosos de estos compuestos frente a estímulos proinflamatorios que activan el sistema del complemento, tales como endotoxinas o LPS.  
20

## Ejemplo 8

*Actividad *in vivo* de antagonistas cíclicos de C5a*

25 Los experimentos preliminares en ratas han revelado que los antagonistas cíclicos resumidos en la tabla 5 son activos a menos de 20 mg/kg como agentes antiinflamatorios en la supresión de la aparición de, o bien edema de pata inducido por carragenanos, o poliartritis inducida por adyuvante. Las dosificaciones máximamente eficaces para incluso antagonistas moderadamente eficaces son de 10 mg/kg o inferiores, administradas i.p. o v.o. Muchos fármacos  
30 antiinflamatorios usados actualmente en seres humanos se evaluaron inicialmente en tales ensayos, y también mostraron actividad en estos modelos de inflamación de rata. Estas indicaciones preliminares de eficacia *in vivo* indican que los antagonistas de C5a tienen potencial terapéutico en estados inflamatorios humanos.

35 Usando el ensayo de edema de pata de rata producido por carragenanos, se halló que un compuesto, AcF-[O-P-dCha-W-r], que es 100 veces menos activo que 17 *in vitro* como antagonista de C5a en PMN, tiene algo de actividad *in vivo* en ratas a las que se administró 1 mg/kg del compuesto i.p., 30 minutos antes de la inyección de carragenanos. Se midió la hinchazón de las patas durante hasta 4,5 h. Los resultados, mostrados en la figura 10, sugieren que incluso este antagonista de C5a débil inhibe significativamente el desarrollo del edema tras 180 y 270 min. Esta actividad antiinflamatoria sugiere que los antagonistas del receptor de C5a, tales como los descritos en esta invención, pueden 40 tener actividad terapéutica en enfermedades que implican escape vascular tras estímulos inflamatorios.

45 En los últimos años, ha habido muchos intentos de imitar péptidos con giro  $\beta$  y  $\gamma$  que representan superficies proteicas bioactivas, dando como resultado miméticos notables para péptidos RGD (arginina-glicina-aspartato), somatostatina y péptidos opioides, por nombrar unos pocos derivados mediante relaciones de estructura-actividad (véase, por ejemplo, Marraud y Aubry, 1996; Fairlie *et al.*, 1995). La mayoría de estos ejemplos conservan una estructura de giro mediante ciclación del péptido. Por otra parte, existen comparativamente pocos péptidos acíclicos cortos que se haya hallado que tengan estructura de giro en disolución (Dyson *et al.*, 1988; Rizo y Giersch, 1992; Prâcheur *et al.*, 1994). Se alega normalmente que los péptidos acíclicos cortos adoptan una miríada de estructuras en disolución que pueden incluir pequeñas poblaciones de estructuras de giro que son responsables de la bioactividad.  
50

50 Esta invención describe una serie de moléculas que contienen giros restringidos conformacionalmente que se organizan previamente para su unión al/a los mismo(s) receptor(es) acoplado(s) a proteínas G de células humanas que selecciona como objetivo por C5a humana. La invención es aplicable a otros receptores acoplados a proteínas G.

55 La característica principal de los compuestos de la invención es la disposición organizada previamente, que lleva al menos tres grupos hidrófobos y un grupo cargado en el espacio colindante, creando una superficie hidrófoba " parche" ("patch"). Estos resultados permiten el diseño y desarrollo de antagonistas de C5a de molécula pequeña, restringidos conformacionalmente incluso más potentes.

60 A la luz de la técnica anterior mencionada anteriormente, se halló sorprendentemente que no era necesario un carboxilato C-terminal en los compuestos con el fin de obtener buena unión al receptor o actividad antagonista. Los antagonistas cíclicos tienen un enlace amida en la posición de arginina "C-terminal". La sustitución del carboxilato en 7 por un enlace amida covalente estabiliza eficazmente la conformación de giro requerida.

65 Los antagonistas cíclicos y no peptídicos tienen varias ventajas importantes sobre los péptidos como fármacos. Los ciclos descritos en esta invención son estables a la degradación proteolítica durante al menos varias horas a 37°C en la sangre o plasma humanos, o en los jugos gástricos humanos o de rata o en presencia de enzimas digestivas tales como pepsina, tripsina y quimotripsina. En cambio, los péptidos cortos compuestos por L-aminoácidos se degradan

rápidamente en sus aminoácidos componentes en el plazo de unos pocos minutos en estas condiciones. Una segunda ventaja radica en las conformaciones únicas restringidas adoptadas por las moléculas cíclicas y no peptídicas, mientras que los péptidos acíclicos o lineales son lo suficiente flexibles para adoptar varias estructuras en solución diferentes de la estructura de unión al receptor requerida. En tercer lugar, los compuestos cíclicos y no peptídicos tales como los descritos en esta invención son normalmente más liposolubles y están más farmacológicamente biodisponibles como fármacos que los péptidos, que pueden administrarse por vía oral pocas veces. En cuarto lugar, las semividas plasmáticas de las moléculas cíclicas y no peptídicas son normalmente más largas que las de los péptidos.

Las referencias citadas en el presente documento se enumeran en las siguientes páginas.

## 10 Bibliografía

- Abbenante, G., Fairlie, D.P., Gahan, L.R., Hanson, G.R., Pierens, G.K. y van den Brenk, A.L. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996 118 10384-10388.**
- Bandekar, J. *Vib. Spectros.*, 1993 5 143-173.**
- Bean, J.W., Peishoff, C.E. y Kopple, K.D. *Int. J. Protein Res.*, 1994 44 223.**
- Cheng, X. M., Doherty, A. M., Nikam, S. S. *Curr. Med. Chem.* 1994 1 271-312.**
- Coles, M., Sowemimo, V., Scanlon, D., Munro, S.L.A., Craik, D.J. *J. Med. Chem.*, 1993 36 2658.**
- DeMartino, J.A., Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Underwood, D.J., Fischer, P.A., Springer, M.S. *J. Biol. Chem.*, 1995 270 15966-15969.**
- DeMartino, J.A., Van Riper, G., Siciliano, S.J., Molineaux, C.J., Konteatis, Z.D., Rosen, H. Springer, M.S. *J. Biol. Chem.*, 1994 269 14446-14450.**
- Drapeau, G., Brochu, S., Godin, D., Levesque, L., Rioux, F. y Marceau, F. *Biochem. Pharm.*, 1993 45 1289-1299.**
- Dyson, H.J., Rance, M., Hougten, R.A., Lerner, R.A. y Wright, P.E. *J. Mol. Biol.*, 1988 201 161-200.**
- Ember, J.A., Sanderson, S.D., Taylor, S.M., Kawahara, M. y Hugli, T.E. *J. Immunol.*, 1992 148 3165-3173.**
- Fairlie, D.P., Abbenante, G. y March, D. *Curr. Med. Chem.*, 1995 2 672-705.**
- Fairlie, D.P., Whitehouse, M. y Broomhead, J. *Chem. Biol. Interact.*, 1987 61 277-291.**
- Finch, A.M., Vogen, S.M., Sherman, S.A., Kirnarsky, L., Taylor, S.M., y Sanderson, S.D. *J. Med Chem.*, 1997 40 877.**
- Gerard, N y Gerard, C. *Nature*, 1991 349 614-617.**
- Gerard, C y Gerard, N.P. *Ann. Rev. Immunol.*, 1994 12 775-808.**
- Haviland, D.L., McCoy, R.L., Whitehead, W.T., Akama, H., Molmenti, E.P., Brown, A., Haviland, J.C., Parks, W.C., Perlmutter, D.H. y Wetsel, R.A. *J. Immunol.*, 1995 154 1861-1869.**
- Hutchinson, E.G. y Thornton, J.M. *Protein Sci.*, 1994 3 2207-2216.**
- Ihara, M., Fukuroda, T., Saeki, T., Nishikibe, M., Kojiri, K., Suda, H. y Yano, M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1991 178 132-137.**
- Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M., y Yano, M. *Life Sciences*, 1992 50 247.**
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Luly, J.R., Carter, G.W. *J. Med. Chem.*, 1991 34 2068-71.**
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Or, Y.-S., Luly, J.R., y Carter, G.W. *J. Med. Chem.*, 1992 35 220-223.**
- Kessler, H., Diefenbach, B., Finsinger, D., Geyer, A., Gurrath, M., Goodman, S.L., Hoelzemann, G., Haubner, R., Jonczyk, A. *et al. Lett. Pept. Sci.*, 1995 2 155-160.**
- Kohl, J., Lubbers, B., Klos, A., et al. *Eur. J. Immunol.*, 1993 23 646-652.**

ES 2 294 816 T3

- Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Molineaux, C.J., Pandya, S., Fischer, P., Rosen, H., Mumford, R.A., y Springer, M.S. *J. Immunol.*, 1994 153 4200- 4204.
- 5 Marraud, M. y Aubry, A. *Biopolymers*, 1996 40 45-83.
- Morgan, E.L., Sanderson, S.D., Scholz, W., Noonan, D.J., Weigle, W.O. y Hugli, T.E. *J. Immunol.*, 1992 483937-3942.
- 10 Prâcheur, Bossus, M., Gras-Masse, H., Quiniou, E., Tartar, A. y Craescu, C.T. *J. Biochem.*, 1994 220 415-425.
- Rizo, J. y Giersch, L.M. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992 61 387.
- 15 Sanderson, S.D., Ember, J.A., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Finch, A.M., Taylor, S.M., *J. Med. Chem.*, 1994 37 3171-3180.
- Sanderson, S.D., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Vogen, S.M., Prakesh, O., Ember, J.A., Finch, A.M. y Taylor, S.M., *J. Med. Chem.*, 1995 38 3669-3675.
- 20 Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., VanRiper, G., Bondy, S., Rosen, H. y Springer, M.S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994 91 1214-1218.
- Sim, E. The Natural Immune System. Humoral Factors., 1993, IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- 25 Temporo, R.M., Hollingsworth, M.A., Burdick, M.D., Finch, A.M., Taylor S.M., Vogen, S.M., Morgan, E.L., y Sanderson, S.D. *J. Immunol.*, 1997 158 1377-1382.
- Stradley, S., Rizo, J., Bruch, M., Stroup, A. y Giersch, L. *Biopolymers*, 1990 29 263-287.
- 30 Walker W.R. y Whitehouse, M.W. *Agents & Actions*, 1978 8 85.
- Ward, J.R. y Cloud, R.S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1966 152 116.
- 35 Whaley, K. Complement in Health and Disease. Immunology and Medicine Series, Ed. Reeves, W. G., 1987, MTP Press Ltd, Lancaster.
- Whitehouse, M.W. Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases, Eds. Greenwald, R.A., Diamond, H.S., volumen 1, págs. 3-16 CRC Press.
- 40 Winter, C.A. y Nuss, G.W. *Arth. & Rheumatism*, 1966 9 394.
- Zhang, X., Boyar, W., Galakatos, N. y Gonella, N.C. *Protein Sci.*, 1997 6 65-72.
- 45 Zuiderweg, E.R.P., Nettesheim, D.G., Molison, K.W., Carter, G.W. *Biochemistry*, 1989 28 172-185; 29 2895-2905.

50

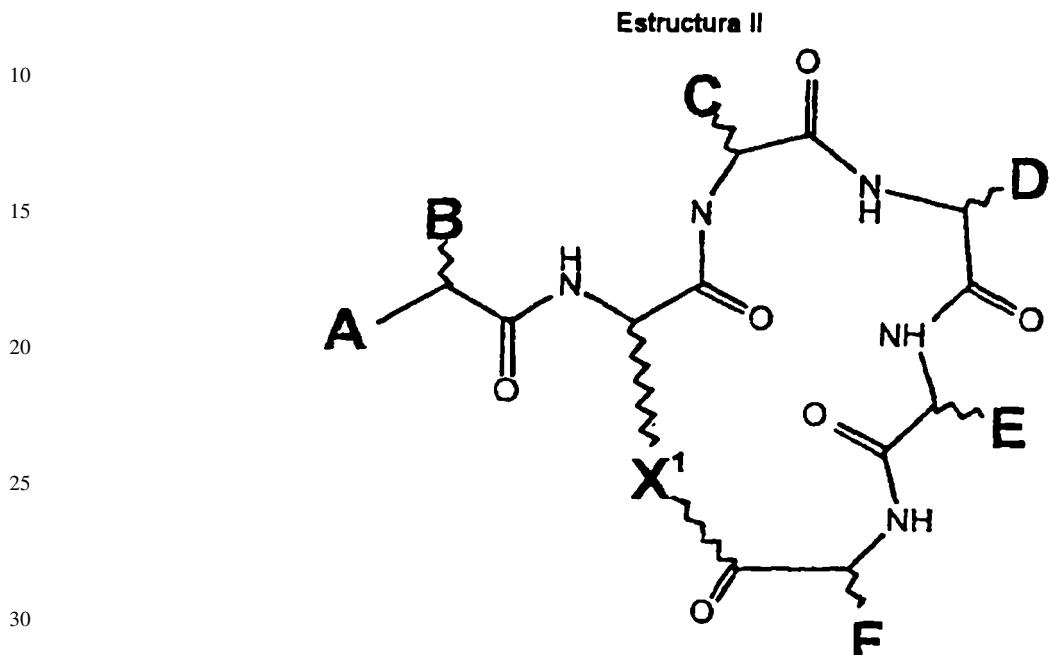
55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que tiene una actividad antagonista frente al receptor de C5a y no tiene actividad agonista de C5a, que tiene la fórmula general:



en la que

35 A es H; alquilo; arilo; NH<sub>2</sub>, NH-alquilo, N(alquilo)<sub>2</sub>, NH-arilo o NH-acilo;

B es un grupo alquilo, arilo, fenilo, bencilo, naftilo o indol, o la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, homofenilalanina, triptófano, homotriptófano, tirosina y homotirosina;

40 C es la cadena lateral de un D-, L- u homoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en prolina, alanina, leucina, valina, isoleucina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, glutamina, asparagina, lisina, tirosina, fenilalanina, ciclohexilalanina, norleucina, triptófano, cisteína y metionina;

45 D es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ciclohexilalanina, homociclohexilalanina, leucina, norleucina, homoleucina, homonorleucina y triptófano;

E es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano y homotriptófano;

50 F es la cadena lateral de un D- o L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, homoarginina, lisina y homolisina,

en la que X<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, o -CH<sub>2</sub>COCHRNH-, en el que R es la cadena lateral de cualquier aminoácido común o no común, “alquilo” se refiere a una cadena de alquilo lineal, ramificada o cíclica de 1 a 6 átomos de carbono, “arilo” se refiere a un grupo homocíclico o heterocíclico en el que el anillo tiene 5 ó 6 átomos de carbono, y “acilo” se refiere a un grupo acilo de 1 a 6 átomos de carbono.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que F es la cadena lateral de un L-aminoácido.

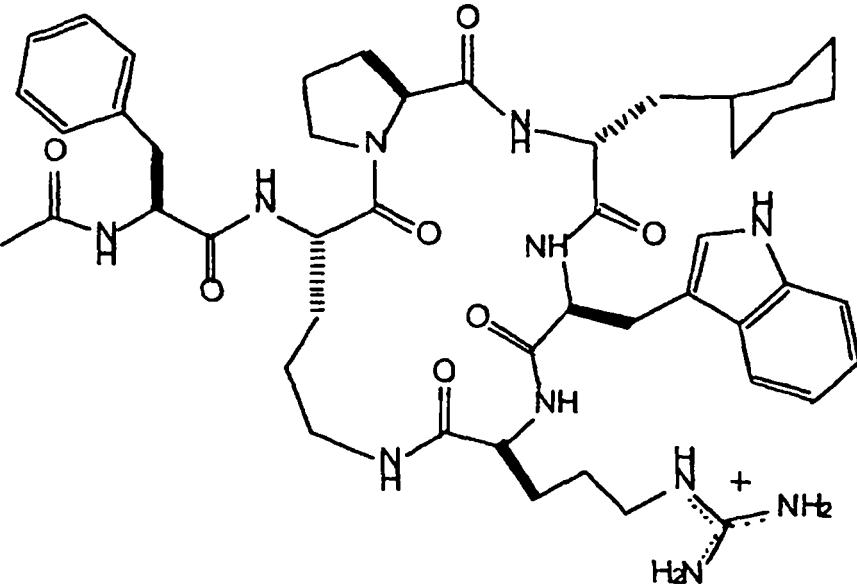
60 3. Un compuesto según la reivindicación 2, en el que F es la cadena lateral de L-arginina.

4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que A es H o NH-acetilo.

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que B es un grupo indol, bencilo, fenilo o naftilo.

65 6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que B es la cadena lateral de fenilalanina.

# ES 2 294 816 T3

7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que C es D- o L-ciclohexilalanina (Cha), leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, triptófano o metionina.
8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que C es la cadena lateral de prolina, metionina o lisina.
9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que D es la cadena lateral de D-ciclohexilalanina.
10. 10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que E es la cadena lateral de triptófano.
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que F es la cadena lateral de arginina.
12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que X<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-, en el que n es 3 ó 4.
13. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, seleccionado del grupo que consiste en los compuestos Ac-F-[KP(dCha)Wr], Ac-F-[OP(dCha)Wr], F[NH(CH<sub>2</sub>NH)CO-PdChaWR], F-[NH[((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH)CO-Pd-ChaWR], AcF-[OPd-ChaWR], [FPdChaWr], AcF-[KMdChaWr], ACF-[KKdChaWr], AcF-[NH(CH<sub>2</sub>NH)CO-Pd-ChaWr], AcKF-[OPdChaWr], F-[OP(dCha)WR] y F-[KP(dCha)WR].
14. Un compuesto según la reivindicación 13, de estructura
- 25  
  
30  
35  
40  
45
15. Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, opcionalmente junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
50. 16. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado patológico mediado por el receptor de C5a.
55. 17. Uso según la reivindicación 16, en el que el estado mediado por los receptores C5a implica la sobreexpresión o regulación disminuida de C5a.
55. 18. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado inflamatorio.
60. 19. Uso según la reivindicación 18, en el que el estado inflamatorio es artritis inflamatoria.
65. 20. Uso según la reivindicación 18, en el que el estado se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), lupus eritematoso sistémico, rechazo del injerto de tejido, enfermedad cardiaca isquémica, lesión por reperfusión, choque séptico, psoriasis, gingivitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, lesión pulmonar y síndrome extracorporeal tras la diálisis.

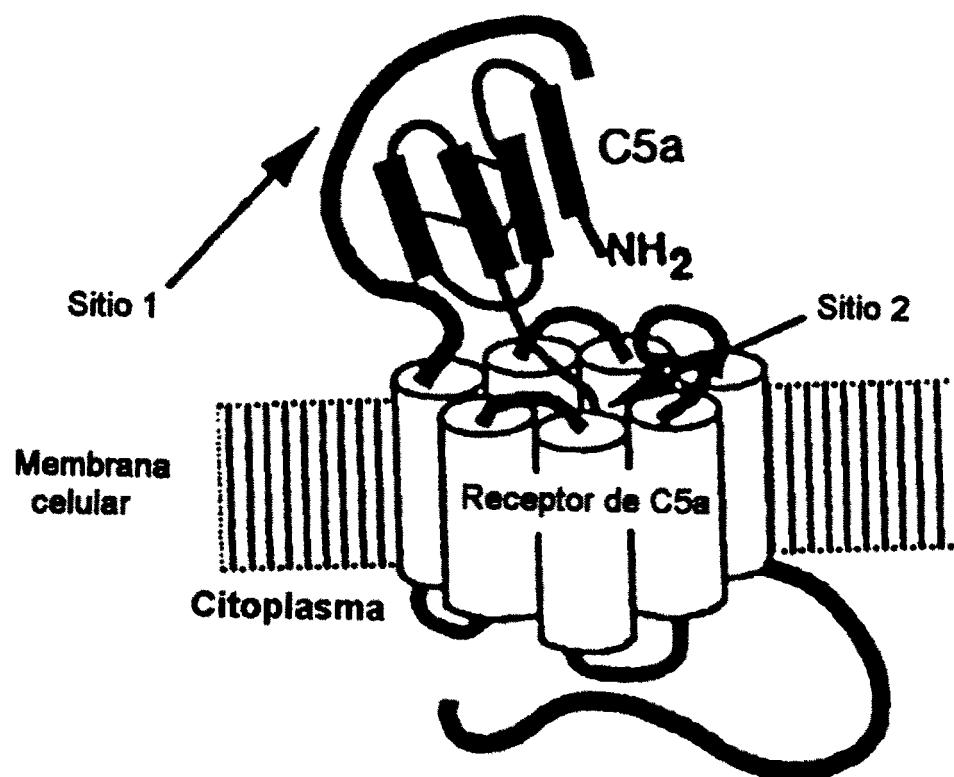


Fig. 1

ES 2 294 816 T3

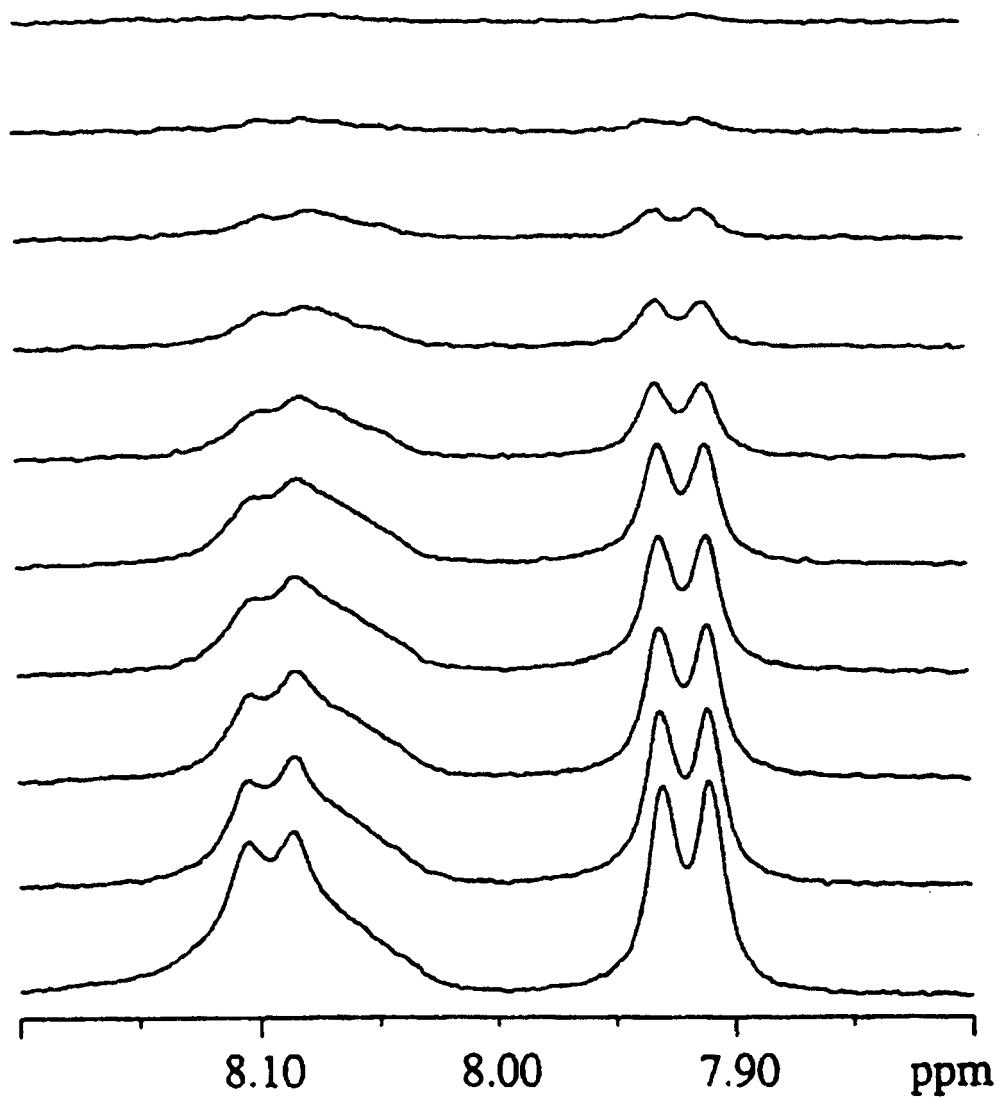


Fig. 2

ES 2 294 816 T3

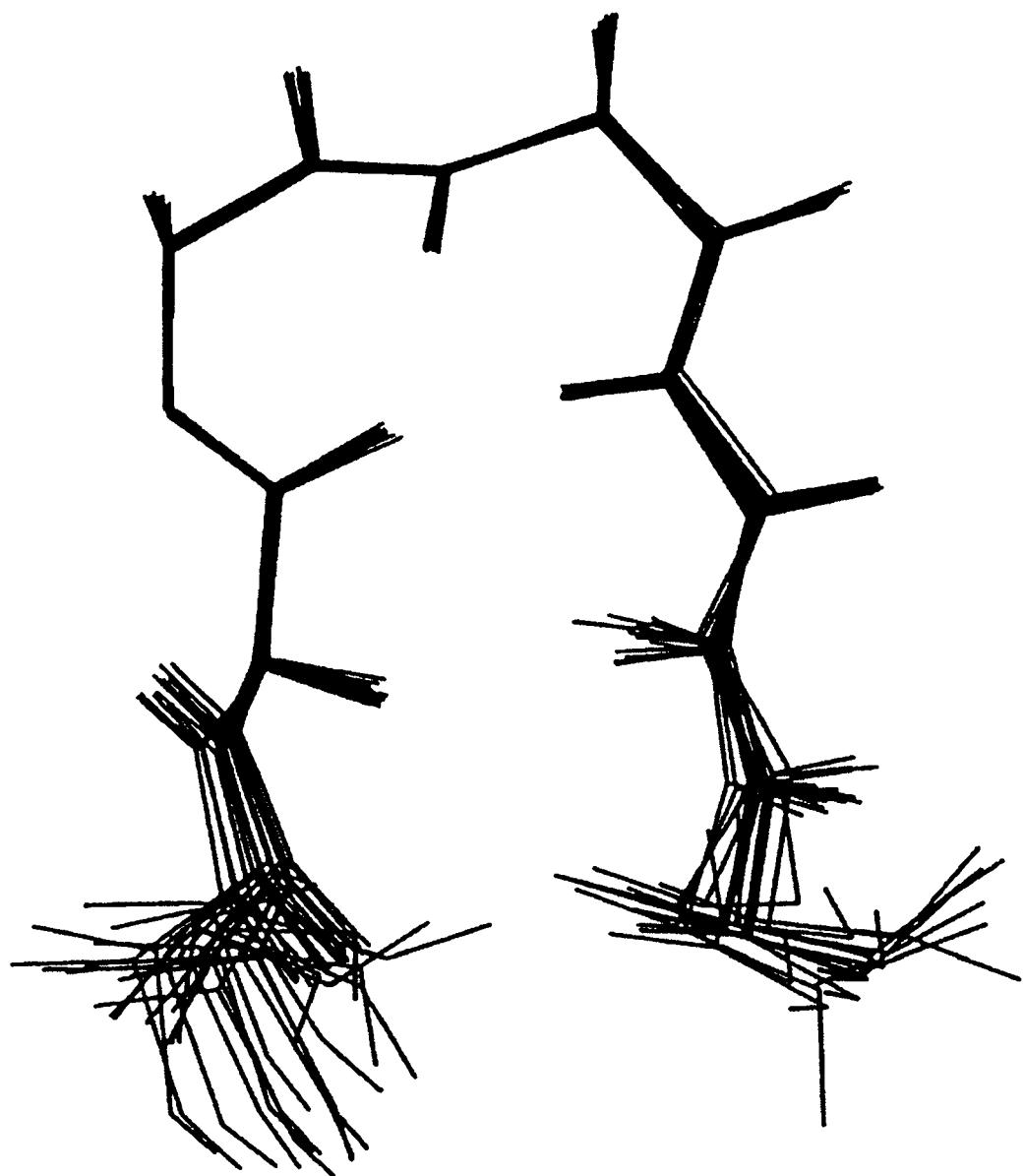


Fig. 3

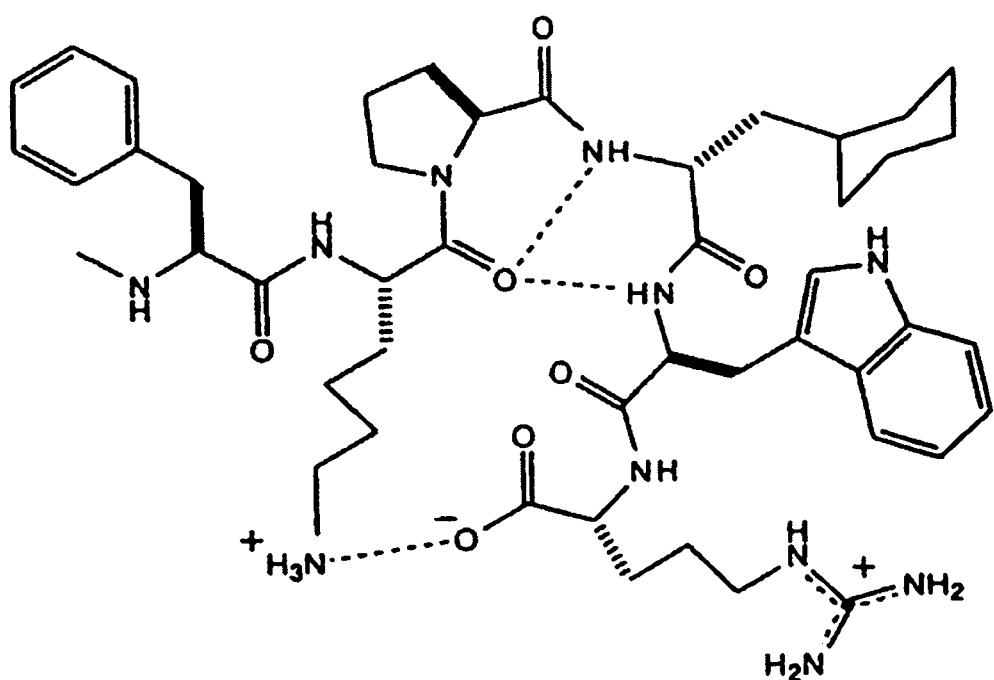


Fig. 4

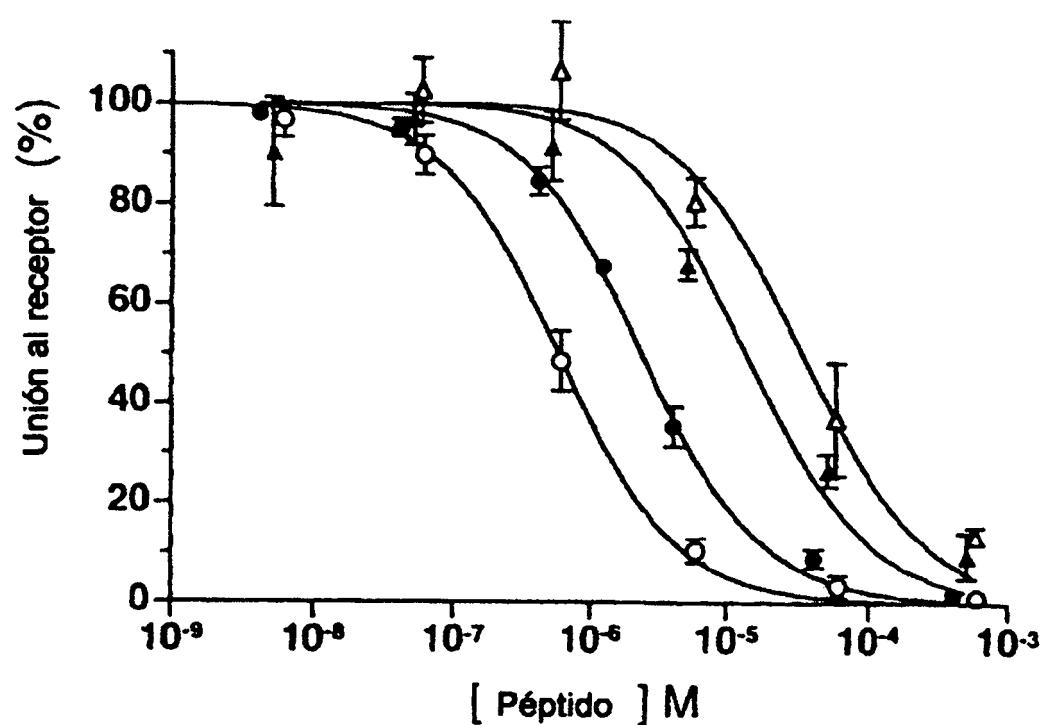


Fig. 5a

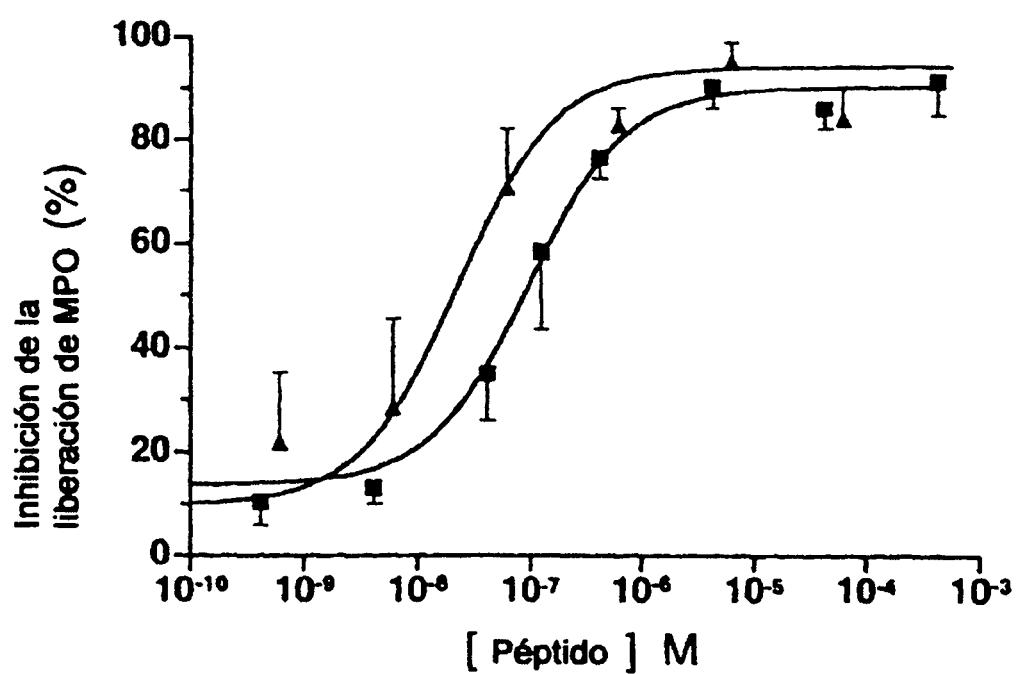
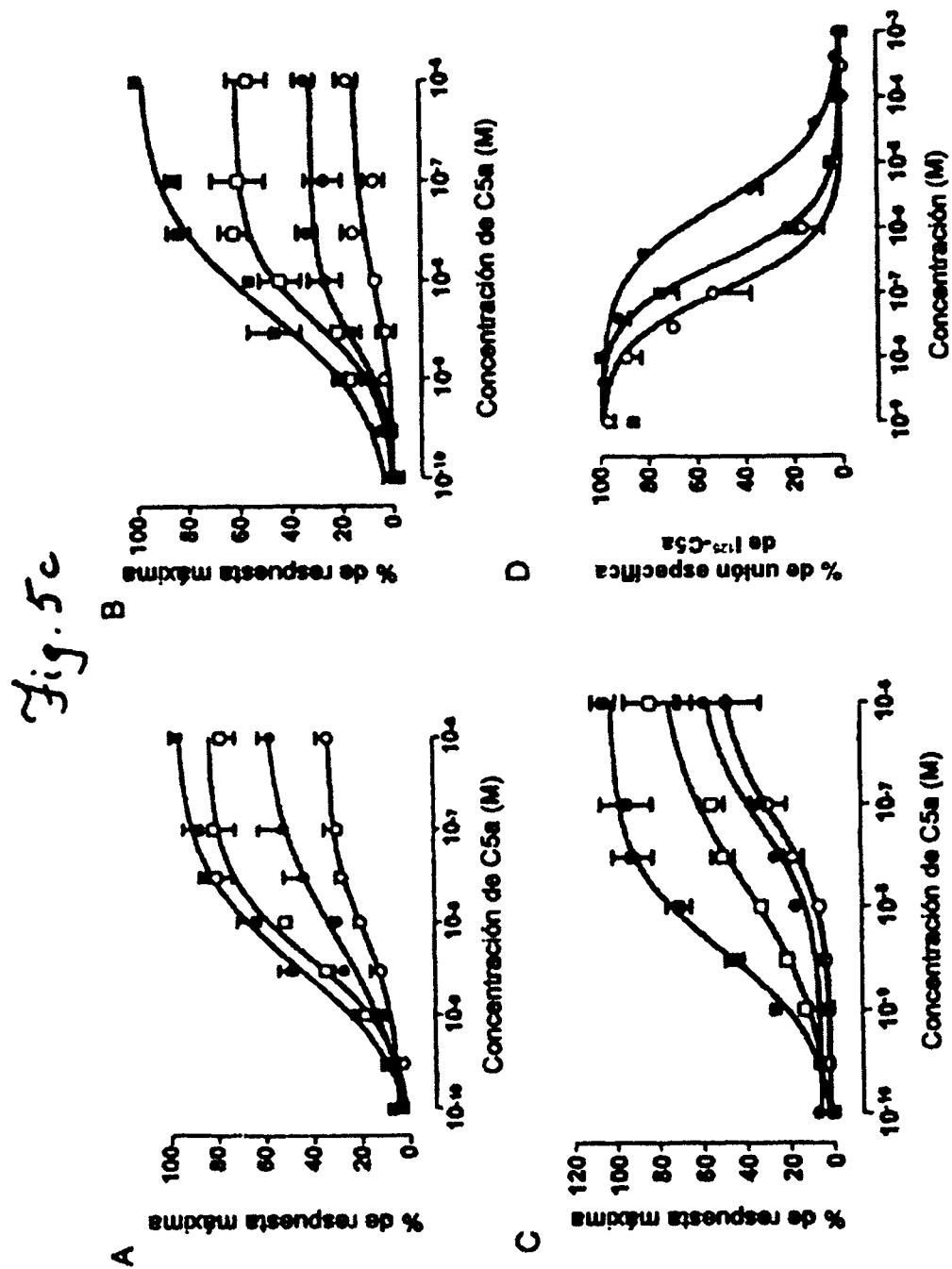


Fig. 5 b



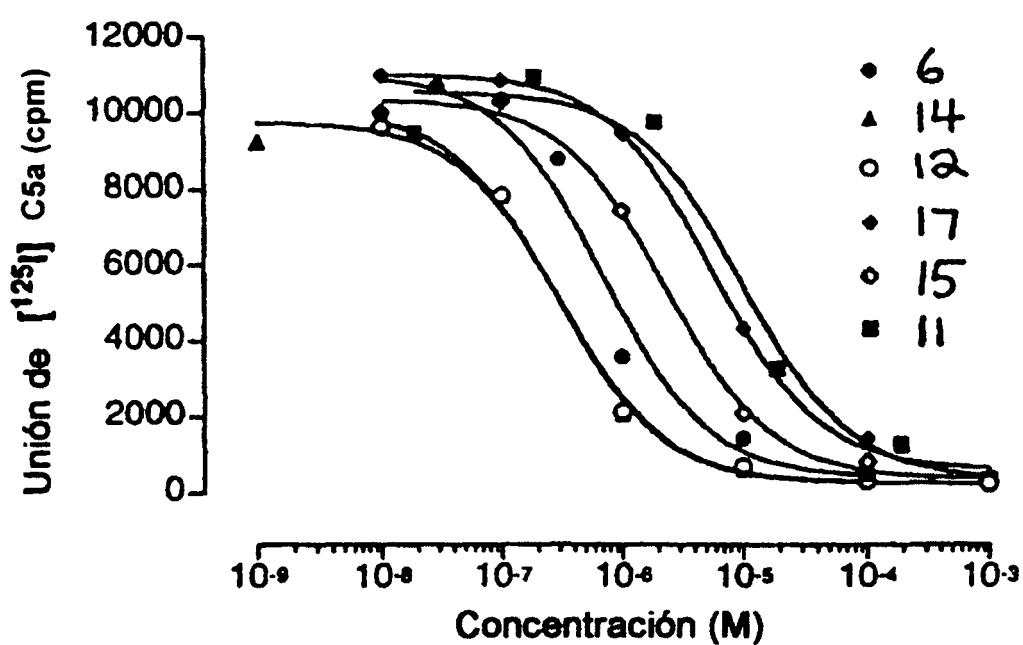


Fig. 6

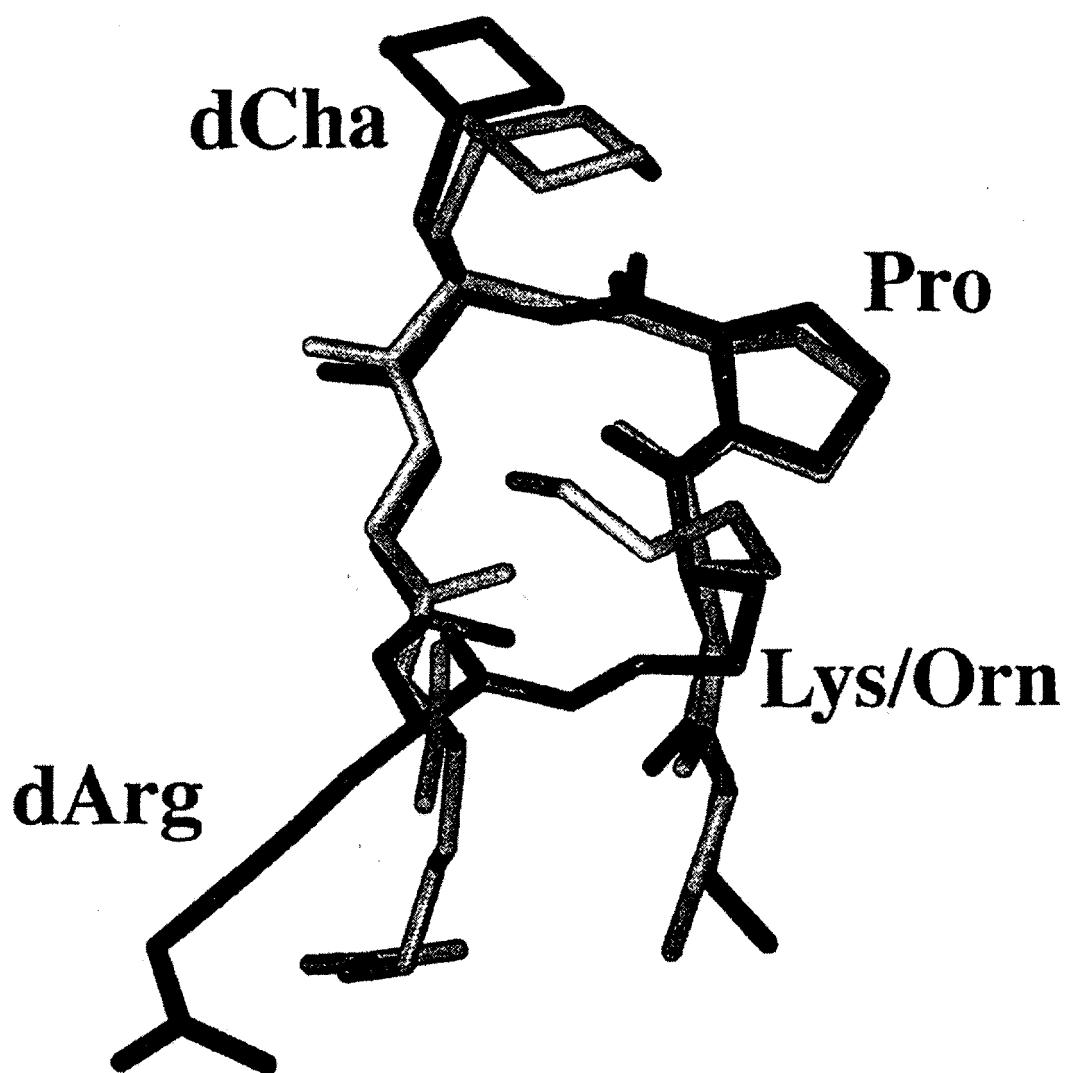


Fig. 7

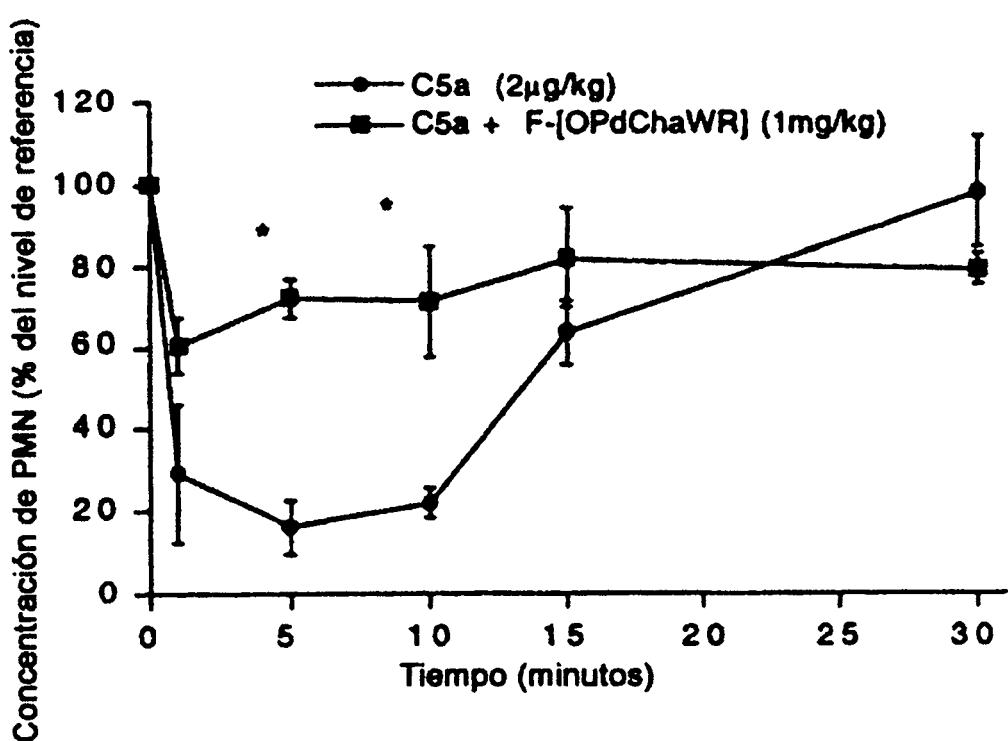


Fig. 8

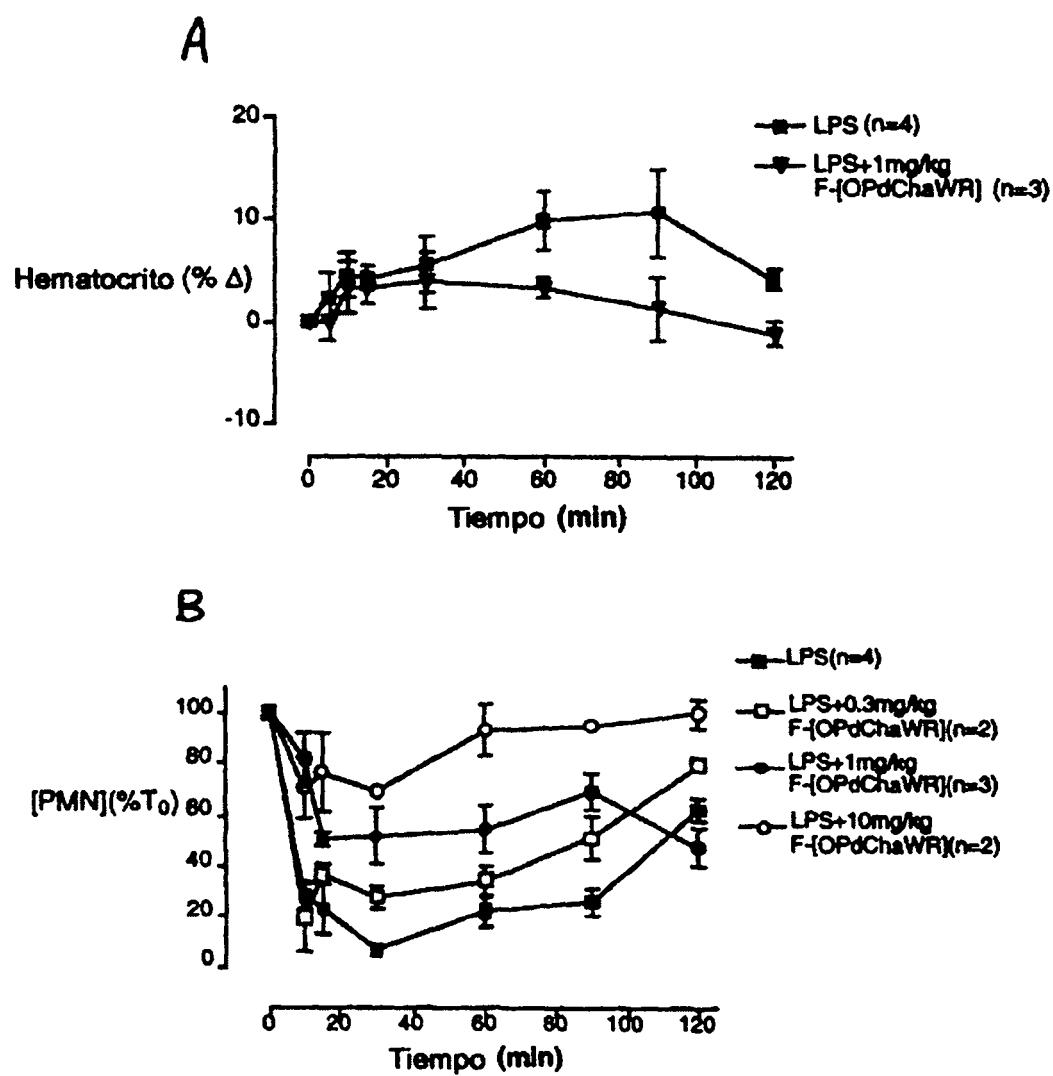


Fig. 9

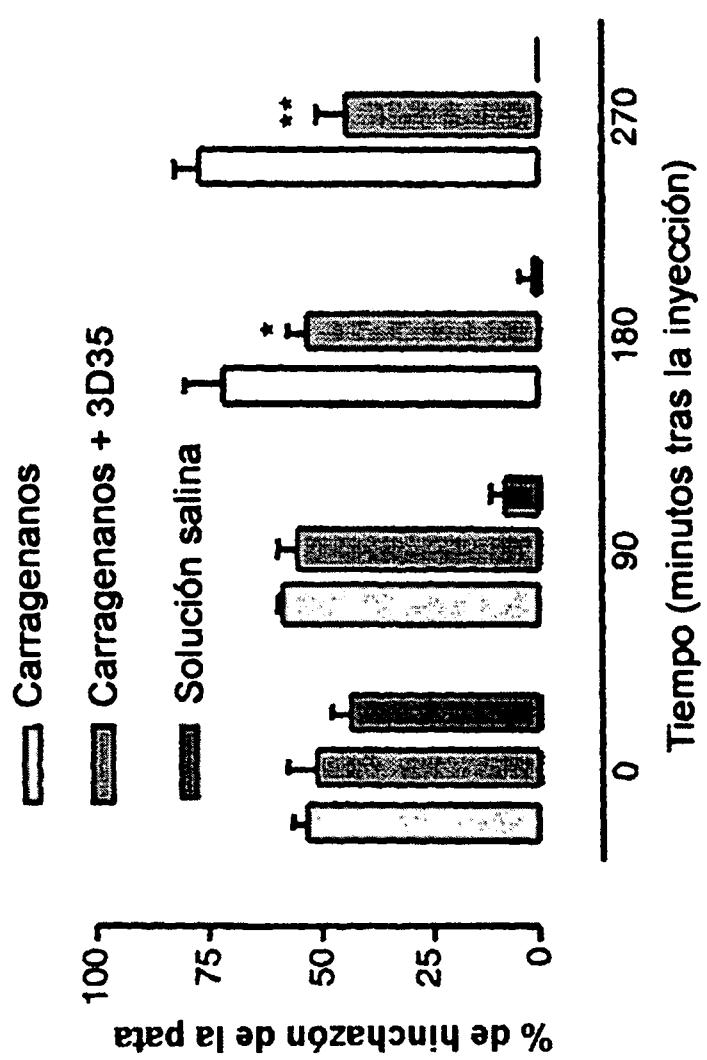


Fig. 10