

(11) Número de Publicação: **PT 1960422 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 7/08 (2011.01) **C07K 14/47** (2011.01)
A61K 38/08 (2011.01) **A61K 38/16** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.11.28**

(30) Prioridade(s): **2005.11.28 US 740205 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.08.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.05.30**
157/2012

(73) Titular(es):

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER, 3160
CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19104** US

(72) Inventor(es):

JOHN D. LAMBRIS US
MADAN KATRAGADDA US

(74) Mandatário:

LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: ANÁLOGOS DE COMPSTATINA POTENTES

(57) Resumo:

DESCREVEM-SE COMPOSTOS COMPREENDENDO PÉPTIDOS E PEPTIDOMIMÉTICOS CAPAZES DE LIGAR PROTEÍNA C3 E INIBIR A ACTIVAÇÃO DO COMPLEMENTO. ESTES COMPOSTOS APRESENTAM ACTIVIDADE INIBIDORA DA ACTIVAÇÃO DO COMPLEMENTO MUITO MELHORADA EM COMPARAÇÃO COM COMPOSTOS ACTUALMENTE DISPONÍVEIS.

RESUMO

"ANÁLOGOS DE COMPSTATINA POTENTES"

Descrevem-se compostos compreendendo péptidos e peptidomiméticos capazes de ligar proteína C3 e inibir a activação do complemento. Estes compostos apresentam actividade inibidora da activação do complemento muito melhorada em comparação com compostos actualmente disponíveis.

DESCRIÇÃO

"ANÁLOGOS DE COMPSTATINA POTENTES"

Esta invenção refere-se à activação da cascata do complemento no organismo. Em particular, esta invenção proporciona péptidos e peptidomiméticos capazes de se ligarem à proteína C3 e inibir a activação do complemento.

O sistema do complemento é a primeira linha da defesa imunológica contra agentes patogénicos externos. A sua activação através das vias clássica, alternativa ou da lectina conduz à geração de péptidos C3a e C5a anafilotóxicos e à formação do complexo de ataque à membrana C5b-9. O componente C3 do complemento desempenha um papel central na activação da totalidade das três vias. A activação de C3 por convertases da via C3 do complemento e a sua fixação subsequente à superfície do alvo conduz à montagem do complexo de ataque à membrana e, por fim, à lesão ou lise das células alvo. C3 é único na medida em que possui uma arquitectura rica que proporciona uma multiplicidade de sítios de ligação de diferentes ligandos que são importantes na vigilância imunitária e vias de resposta imune.

A activação inapropriada do complemento pode levar à lesão das células do hospedeiro. O complemento está

implicado em diversos estados patológicos, incluindo várias doenças auto-imunes, e verificou-se que contribui para outros estados clínicos, como a síndrome respiratória do adulto, ataque cardíaco, rejeição após xenotransplante e lesões por queimadura. Também se verificou que a lesão de tecidos mediada pelo complemento resulta de situações de bio-incompatibilidade como as encontradas em doentes submetidos a diálise ou derivação cardiopulmonar.

As lesões dos tecidos mediadas pelo complemento são directamente mediadas pelo complexo de ataque à membrana e indirectamente pela geração de C3a e C5a. Estes péptidos induzem lesões através dos seus efeitos sobre várias células, incluindo os neutrófilos e os mastócitos. *In vivo*, a regulação do complemento nos passos de activação de C3 e C5 é proporcionada pelo plasma e pelas proteínas de membrana. Os inibidores das proteínas plasmáticas são o factor H e a proteína de ligação a C4, e as proteínas de membrana reguladoras localizadas nas superfícies das células são os receptores 1 do complemento (CR1), o factor de aceleração da decomposição (DAF) e a proteína do cofactor da membrana (MCP). Estas proteínas inibem as convertases de C3 e C5 (proteases de multi-subunidades) por promoção da dissociação dos complexos multi-subunidades e/ou por inactivação dos complexos através de proteólise (catalisada por factor I). Vários agentes farmacológicos que regulam ou modulam a actividade do complemento foram identificados por ensaio *in vitro*, mas para a maioria demonstrou-se *in vivo* ter baixa actividade ou ser tóxica.

Até à data, não existem inibidores da activação do complemento aprovados para utilização na prática clínica, embora existam certos candidatos para utilização clínica, especificamente uma forma recombinante do receptor 1 do complemento conhecido como receptor 1 do complemento solúvel (sCR1) e um anticorpo monoclonal humanizado anti-C5 (5G1.1-scFv). Foi demonstrado que ambas as substâncias suprimem a activação do complemento em modelos animais *in vivo* (Kalli K. R. et al., 1994; e Wang et al., 1996). No entanto, cada substância tem a desvantagem de ser uma proteína de peso molecular elevado (240 kDa e 26 kDa, respectivamente) que é difícil de fabricar e tem de ser administrada por perfusão. Assim, a investigação recente tem acentuado o desenvolvimento de agentes activos mais pequenos que são mais fáceis de administrar, mais estáveis e menos dispendiosos de fabricar.

A patente U.S. Nº 6319897 de Lambris et al. descreve a utilização de uma biblioteca de péptidos combinatória aleatória de expressão em fagos para identificar um péptido com 27 resíduos que se liga a C3 e inibe a activação do complemento. Este péptido foi truncado num segmento cíclico de 13 resíduos que manteve a actividade completa, que é referido na arte como compstatina. A compstatina inibe a clivagem de C3 a C3a e C3b pelas convertases de C3. A compstatina foi testada numa série de experiências *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e na interface *in vivo/ex vivo* e demonstrou-se que: (1) inibe a activação do complemento no soro humano (Sahu A. et al.,

1996); (2) inibe a activação do complemento induzida por heparina/protamina em primatas sem efeitos secundários significativos (Soulika A. M. et al., 2000), (3) prolonga o tempo de vida de um xenoenxerto de porco para ser humano perfundido com sangue humano (Fiane A. E. et al., 1999a; Fiane A. E. et al., 1999b; e Fiane A. E. et al., 2000); (4) inibe a activação do complemento em modelos de desvio cardiopulmonar, plasmaferese e circuitos extra-corporais de diálise (Nilsson B. et al., 1998) e (5) tem baixa toxicidade (Furlong S. T. et al., 2000).

A compstatina é um péptido compreendendo a sequência ICVVQDWGHHRCT-NH₂ (SEQ ID NO:1), em que Cys2 e Cys12 formam uma ponte dissulfureto. A sua estrutura tridimensional foi determinada utilizando espectroscopia de NMR 2D homonuclear em combinação com duas metodologias computacionais experimentalmente restringidas separadas. A primeira metodologia envolveu geometria de distância, dinâmica molecular e emparelhamento simulado (Morikis D. et al., 1998; W099/13899) e a segunda metodologia envolveu optimização global (Klepeis et al., *J. Computational Chem.*, 20:1344-1370, 1999). A estrutura de compstatina mostrou uma superfície molecular que compreende uma parte polar e uma parte não polar. A parte polar inclui uma espira β de Tipo I e a parte não polar inclui a ponte dissulfureto. Além disso, uma série de análogos com substituições de alanina (um varrimento de alanina) foi sintetizada e testada quanto à actividade, demonstrando que os quatro resíduos da espira β e a ponte de dissulfureto com o aglomerado hidrófobo

circundante desempenham papéis importantes na actividade inibidora da compstatina (Morikis et al., 1998; WO99/13899).

Utilizando um ensaio de actividade do complemento que comprehende a determinação da lise dos eritrócitos mediada pela via alternativa, foi calculada a IC_{50} da compstatina como sendo 12 μM . Alguns dos análogos previamente testados demonstraram actividade equivalente ou maior do que a da compstatina. O pedido internacional publicado N° WO2004/026328 descreve análogos e miméticos de compstatina com variações nos terminais N e C, e nas posições 4 e 9, que conferiram actividade melhorada no ensaio acima referido. Foram descritos melhoramentos de até 99 vezes em relação à compstatina para certos análogos (ver também Mallik et al., 2005). O desenvolvimento de análogos ou miméticos de compstatina com actividade ainda maior constituiria um avanço significativo na arte.

Katragadda et al. (2006) *J. Med. Chem.*, 49(15), páginas 4616-4622 descrevem que o efeito hidrófobo e as ligações hidrogénio são responsáveis pela actividade melhorada do inibidor do complemento compstatina. O documento WO2007/044668 descreve a utilização de compstatina e análogos inibidores do complemento para tratamento e/ou prevenção de doenças oftalmológicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona análogos e miméticos do péptido inibidor do complemento, compstatina (HOOC-ICVVQDWGHHRCT-NH₂; SEQ ID NO:1), que têm actividade inibidora do complemento melhorada em comparação com a compstatina.

Num aspecto, a invenção refere-se a um composto que inibe a activação do complemento, que compreende um péptido que tem a sequência:

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5
(SEQ ID NO:26), em que:

Xaa1 é Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ou um dipéptido Gly-Ile;

Xaa2 é Trp ou um análogo de Trp, em que o análogo de Trp carácter hidrófobo aumentado em comparação com Trp e é seleccionado de um triptofano halogenado, 5-metoxitriptofano, 5-metiltriptofano e 1-metiltriptofano, com a condição que se Xaa3 é Trp, Xaa2 é o análogo de Trp;

Xaa3 é Trp ou um análogo de Trp que tem um hidrogénio do indole substituído com um átomo de flúor, aumentando assim o potencial de ligação de hidrogénio do anel de indole;

Xaa4 é His, Ala, Phe ou Trp;

Xaa5 é L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, um dipéptido Thr-Asn ou Thr-Ala, ou um tripéptido Thr-Ala-Asn, em que um -OH do terminal carboxilo de qualquer de L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ou Asn está opcionalmente substituído por -NH₂, e

os dois resíduos Cys estão unidos por uma ligação dissulfureto.

Em certas formas de realização, Xaa2 participa numa interacção não polar com C3. Noutras formas de realização, Xaa3 participa numa ligação de hidrogénio com C3. Noutras formas de realização, Xaa2 participa numa interacção não polar com C3 e Xaa3 participa numa ligação de hidrogénio com C3.

Em certas formas de realização, Xaa2 comprehende um substituinte metilo na posição 1 do triptofano, Xaa3 comprehende um triptofano fluorado e Xaa4 comprehende Alanina. Em formas de realização específicas, Xaa3 comprehende 5-fluoro-1-triptofano. Alguns compostos exemplificativos da invenção comprehendem qualquer das SES. ID. NOS:16-24.

Noutro aspecto, a invenção refere-se a um composto que inibe a activação do complemento, comprehendendo um péptido que tem a sequência: Xaa1 - Cys - Val - Xaa2 - Gln - Asp - Xaa3 - Gly - Xaa4 - His - Arg - Cys - Xaa5 (SEQ ID NO:26), em que: Xaa1 é Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ou um dipéptido que comprehende Gly-

Ile; Xaa2 é Trp ou um análogo de Trp, em que o análogo de Trp é um análogo que tem um substituinte alcanoílo inferior na posição 1 do triptofano e tem carácter hidrófobo aumentado em comparação com Trp, com a condição de que se Xaa3 é Trp, Xaa2 é o análogo de Trp; Xaa3 é Trp ou um análogo de Trp que é um triptofano halogenado, que +e uma modificação química do seu anel de indole que aumenta o potencial de ligação de hidrogénio do anel de indole; Xaa4 é His, Ala, Phe ou Trp; Xaa5 é L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, um dipéptido Thr-Asn ou Thr-Ala, ou um tripéptido Thr-Ala-Asn, em que um -OH do terminal carboxilo de qualquer de L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ou Asn está opcionalmente substituído por -NH₂; e os dois resíduos Cys estão unidos por uma ligação dissulfureto.

Em algumas formas de realização, o composto compreende um péptido produzido por expressão de um polinucleótido que codifica o péptido. Noutras formas de realização, o composto é produzido pelo menos em parte por síntese de péptidos. Também pode ser utilizada uma combinação de métodos sintéticos.

Em certas formas de realização, os análogos de compstatina são, em que o composto é PEGuilado, como exemplificado pelo composto compreendendo SEQ ID NO:36

Noutras formas de realização, o análogo de compstatina compreende ainda um componente péptido adicional que se prolonga a retenção *in vivo* do composto.

Por exemplo, o componente péptido adicional pode ser um péptido de ligação a albumina. Um conjugado de compstatina-péptido de ligação a albumina exemplificativo compreende a SEQ ID NO:39.

Os análogos, os conjugados e miméticos de compstatina aqui descritos têm utilidade prática para qualquer finalidade para a qual é utilizada a própria compstatina, como é conhecido na arte e aqui descrito em mais pormenor. Algumas destas utilizações envolvem a formulação dos compostos em composições farmacêuticas para administração a um doente. Essas formulações podem compreender sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos, bem como um ou mais diluentes, veículos, excipientes farmaceuticamente aceitáveis e outros semelhantes, como estaria ao alcance do especialista na matéria.

Várias características e vantagens da presente invenção vão ser compreendidas por referência à descrição pormenorizada, desenhos e exemplos a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Actividade da compstatina expressa e dos seus análogos. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (quadrados) e compstatina expressa

com triptofano (SEQ ID NO:15) (círculos), 5-fluoro-triptofano (SEQ ID NO:16) (triângulos), 6-fluoro-triptofano (SEQ ID NO:17) (estrelas), 5-hidroxi-triptofano (SEQ ID NO:27) (hexágonos), 7-aza-triptofano (SEQ ID NO:28) (losangos).

Figura 2. Actividade de análogos sintéticos de compstatina. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (quadrados) e os análogos de compstatina com incorporação de 5-fluoro-l-triptofano na posição 4 (SEQ ID NO:18) (círculos), posição 7 (SEQ ID NO:19) (triângulos), ambas as posições 4 e 7 (SEQ ID NO:20) (losangos).

Figura 3. Actividade de análogos sintéticos adicionais de compstatina. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para (A) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (triângulos) em comparação com Ac-V4(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO: 18) (triângulo invertido), Ac-V4 (5-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:22) (círculos), Ac-V4 (1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (diamantes), Ac-V4 (2-Nal)/H9A (SEQ ID NO:7) (quadrados); (B) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (triângulos) em comparação com Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO: 19) (hexágonos) e (C) compstatina de tipo selvagem (SEQ ID NO:1) (triângulos) em comparação com Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO: 24) (triângulos apontando para a esquerda).

Figura 4. Caracterização termodinâmica da interacção de análogos de compstatina adicionais com C3. Dados de ITC representando a ligação de (A) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5); (B) Ac-V4(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO:18); (C) Ac-V4(5-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:22); (D) Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23); (E) Ac-V4(2-Nal)/H9A (SEQ ID NO:7) e (F) Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO:19) para C3. Os gráficos foram obtidos pelo ajustamento dos dados em bruto corrigidos para o modelo "um conjunto de sítios" em Origem 7.0.

Figura 5. Gráficos ilustrando a relação entre a hidrofobia dos análogos indicados por $\log P$ e a constante de inibição (A), a entropia denotada por $T\Delta S$ (B) e a constante de ligação (C).

Figura 6. Actividade de um análogo sintético adicional de compstatina. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (círculos) e Ac-V4(1-formil-W)/H9A (SEQ ID NO:25) (quadrados)

Figura 7. Actividade do análogo de compstatina PEGuilada. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (círculos) e Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) (quadrados).

Figura 8. Actividade do análogo de compstatina

conjugado com proteína de ligação a albumina. Gráficos da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (círculos) e o péptido de fusão (Ac-ICV(1MeW) QDWGAHRCTRLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂) (SEQ ID NO:39) (quadrados).

DESCRICAÇÃO PORMENORIZADA DE FORMAS DE REALIZAÇÃO
ILUSTRATIVAS

Vários termos relativos aos métodos e outros aspectos da presente invenção são utilizados ao longo da especificação e reivindicações. A esses termos é para ser atribuído o seu significado corrente na arte, salvo indicação em contrário. Outros termos definidos especificamente devem ser interpretados de uma forma consistente com a definição aqui proporcionada.

Definições:

As abreviaturas seguintes podem ser utilizadas na especificação e exemplos: Ac, grupo acetilo; NH₂, amida; MALDI, ionização por dessorção de laser assistida pela matriz; TOF, tempo de voo; ITC, calorimetria de titulação isotérmica; HPLC, cromatografia líquida de alto desempenho; NA, não activa; dT, D-treonina; 2-Nal, 2-naftilalanina; 1-Nal, 1-naftilalanina; 2-Igl, 2-indanilglicina; DHT, dihidrotriptofano; Bpa, 4-benzoíl-L-fenilalanina; 5f-1-W, 5-

fluoro-1-triptofano; 6f-1-W, 6-fluoro-1-triptofano; 5-OH-W, 5-hidroxitriptofano; 5-metoxi-W, 5-metoxitriptofano; 5-metil-W, 5-metiltriptofano; 1-metil-W, 1-metiltriptofano; as abreviaturas de aminoácidos utilizam a nomenclatura corrente de três ou de uma só letra, por exemplo Trp ou W para o triptofano.

O termo "cerca de" tal como aqui utilizado quando se refere a um valor mensurável como uma quantidade, uma duração temporal e outros semelhantes, pretende englobar variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, em algumas formas de realização $\pm 5\%$, em algumas formas de realização $\pm 1\%$ e em algumas formas de realização $\pm 0,1\%$ em relação ao valor especificado, pois essas variações são apropriadas para fazer e utilizar os compostos e composições descritos.

Os termos "farmaceuticamente activo" e "biologicamente activo" referem-se a capacidade dos compostos da invenção para se ligar a C3 ou aos seus fragmentos e inibir a activação do complemento. Esta actividade biológica pode ser medida por um ou mais de vários ensaios reconhecidos na arte, como aqui descrito em maior pormenor.

Tal como aqui utilizado, "alquilo" refere-se a um hidrocarboneto saturado linear, ramificado ou cílico opcionalmente substituído com desde cerca de 1 a cerca de 10 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de

carbono nele contidos), sendo preferido com de cerca de 1 a cerca de 7 átomos de carbono. Os grupos alquilo incluem, mas não estão limitados a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, iso-hexilo, ciclo-hexilo, ciclooctilo, adamantilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo e 2,3-dimetilbutilo. O termo "alquilo inferior" refere-se a um hidrocarboneto saturado linear, ramificado ou cílico opcionalmente substituído com desde cerca de 1 a cerca de 5 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de carbono nele contidos). Os grupos alquilo inferiores incluem, mas não estão limitados a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, ciclopentilo, isopentilo e neopentilo.

Tal como aqui utilizado, "halogeno" refere-se a F, Cl, Br ou I.

Tal como aqui utilizado, "alcanoílo", que pode ser utilizado indiferentemente como "acilo", refere-se a um resíduo acílico alifático linear ou ramificado opcionalmente substituído tendo de cerca de 1 a cerca de 10 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de carbono nele contidos), sendo preferido com cerca de 1 a cerca de 7 átomos de carbono. Os grupos alcanoílo incluem, mas não estão limitados a formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoílo, isopentanoílo, 2-metil-butirilo,

2,2-dimetilpropionilo, hexanoílo, heptanoílo, octanoílo e outros semelhantes. O termo "alcanoílo inferior" refere-se a um resíduo acíclico alifático linear ou ramificado opcionalmente substituído tendo de cerca de 1 a cerca de 5 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de carbono nele contidos). Os grupos alcanoílo inferiores incluem, mas não estão limitados a formilo, acetilo, n-propionilo, iso-propionilo, butirilo, iso-butirilo, pentanoílo, iso-pentanoílo e outros semelhantes.

Tal como aqui utilizado, "arilo" refere-se a um sistema de anel aromático mono- ou bicíclico, opcionalmente substituído tendo de cerca de 5 a cerca de 14 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de carbono nele contidos), sendo preferido com de cerca de 6 a cerca de 10 átomos de carbono. Exemplos não limitativos incluem, por exemplo, fenilo e naftilo.

Tal como aqui utilizado, "aralquilo" refere-se a radicais alquilo tendo um substituinte arilo e têm de cerca de 6 a cerca de 20 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de gamas e números específicos de átomos de carbono nele contidos), sendo preferido com cerca de 6 a cerca de 12 átomos de carbono. Os grupos aralquilo podem estar opcionalmente substituídos. Exemplos não limitativos incluem, por exemplo, benzilo, naftilmetilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo e

difeniletilo.

Tal como aqui utilizado, os termos "alcoxi" e "alcoxilo" referem-se a um grupo alquil-O opcionalmente substituído em que alquilo é como anteriormente definido. Grupos alcoxi e alcoxilo exemplificativos incluem metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi e heptoxi, entre outros.

Tal como aqui utilizado, "carboxilo" refere-se a um grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Tal como aqui utilizado, "alcoxicarbonilo" refere-se a um grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{alquilo}$, em que alquilo é como definido anteriormente.

Tal como aqui utilizado, "aroílo" refere-se a um grupo $-\text{C}(=\text{O})-\text{arilo}$, em que arilo é como definido anteriormente. Grupos aroílo exemplificativos incluem benzoílo e naftoílo.

Tipicamente, unidades químicas substituídas incluem um ou mais substituintes que substituem hidrogénio em locais seleccionados numa molécula. Substituintes exemplificativos incluem, por exemplo, halogéneo, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, sulfidrilo, hidroxilo ($-\text{OH}$), alcoxilo, ciano ($-\text{CN}$), carboxilo ($-\text{COOH}$), acilo (alcanoílo: $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$); $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{alquilo}$, aminocarbonilo ($-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$), aminocarbonilo N-substituído ($-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$), CF_3 ,

CF_2CF_3 e outros semelhantes. Em relação aos substituintes anteriormente mencionados, cada unidade R'' pode ser, independentemente, qualquer de H, alquilo, cicloalquilo, arilo ou aralquilo, por exemplo.

Tal como aqui utilizado, "L-aminoácido" refere-se a qualquer um dos alfa-aminoácidos levorrotatórios de ocorrência natural normalmente presentes em proteínas ou os ésteres alquílicos desses alfa-aminoácidos. O termo D-aminoácido termo refere-se alfa-aminoácidos dextrorrotatórios. Salvo especificação em contrário, todos os aminoácidos aqui referidos são L-aminoácidos.

"Hidrófobo" ou "não polar" são usados aqui como sinónimos e refere-se a qualquer interacção inter- ou intra-molecular não caracterizada por um dipolo.

Tal como aqui utilizado, "carácter pi" refere-se à capacidade da compstatina para participar numa ligação pi com C3. As ligações pi resultam da sobreposição lateral de duas orbitais p paralelas.

Tal como aqui utilizado, "potencial de ligação de hidrogénio" refere-se à capacidade da compstatina para participar numa atracção electrostática com C3 envolvendo unidades electronegativas nos resíduos de triptofano modificado ou análogos de triptofano na compstatina e átomos de hidrogénio em C3. Um exemplo não limitativo dessa unidade electronegativa é um átomo de flúor.

"PEGuilação" refere-se à reacção em que pelo menos uma unidade de polietileno glicol (PEG), independentemente do tamanho, é quimicamente ligada a uma proteína ou péptido para formar um conjugado PEG-péptido.

"PEGuilado" significa que pelo menos uma unidade de PEG, independentemente do tamanho, está quimicamente ligada a um péptido ou proteína.

O termo PEG termo é geralmente acompanhado por um sufixo numérico que indica o peso molecular médio aproximado dos polímeros de PEG; por exemplo PEG-8000 refere-se a um polietileno glicol tendo um peso molecular médio de cerca de 8000.

Tal como aqui utilizado, "saís farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a derivados dos compostos descritos em que o composto mãe é modificado fazendo os seus sais de ácidos ou de bases. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a sais de ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos como aminas; sais alcalinos ou orgânicos de resíduos ácidos como ácidos carboxílicos; e outros semelhantes. Assim, o termo "sal de adição de ácido" refere-se ao correspondente derivado sal de um composto mãe que foi preparado pela adição de um ácido. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais convencionais ou os sais de amónio quaternários do composto mãe formados, por exemplo, a partir de ácidos inorgânicos ou orgânicos. Por exemplo,

esses sais convencionais incluem, mas não estão limitados aos derivados de ácidos inorgânicos tais como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e outros semelhantes, e os sais preparados a partir de ácidos orgânicos tais como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamóico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoíco, fumárico, toluenossulfônico, metanossulfônico, etanodissulfônico, oxálico, isetiónico e outros semelhantes. Certos compostos ácidos ou básicos da presente invenção podem existir como zwitteriões. Todas as formas dos compostos, incluindo ácido livre, base livre e zwitteriões, estão contempladas como estando dentro do âmbito da presente invenção.

Descrição:

De acordo com a presente invenção, a informação sobre as características biológicas e físico-químicas da compstatina foram utilizadas para conceber análogos de compstatina com actividade significativamente melhorada em comparação com o péptido compstatina mãe. Em algumas formas de realização, os análogos têm uma actividade pelo menos 50 vezes maior do que tem a compstatina. Noutras formas de realização, os análogos têm actividade 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125 ou 130 vezes ou mais maior do que tem a compstatina. Ainda noutras formas de realização, os análogos têm actividade 135, 140, 145,

150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265 vezes ou mais maior do que tem a compstatina, comparadas utilizando os ensaios descritos nos exemplos.

Demonstrou-se que os análogos de compstatina sintetizados de acordo com outras abordagens têm actividade um tanto melhorada em comparação com o péptido mãe, i.e., até cerca de 99 vezes (Mallik, B. et al., 2005, *supra*; WO2004/026328). Os análogos produzidos de acordo com a presente invenção possuem actividade ainda maior do que quer o péptido mãe quer os seus análogos produzidos até à data, como demonstrado por ensaios *in vitro* como mostrado nas figuras e nos Exemplos aqui descritos.

A Tabela 1B mostra sequência de aminoácidos e actividades inibidoras complementares da compstatina e análogos seleccionados com actividade significativamente melhorada. Os análogos seleccionados são referidos por modificações específicas de posições designadas (1-13) em comparação com o péptido mãe, compstatina (SEQ ID NO:1) e com os péptidos de SEQ NOS:2-14, apresentados na Tabela 1A, que foram descritas no documento WO2004/026328. Os péptidos de SEQ ID NOS:16-24 são representativos de modificações feitas de acordo com a presente invenção, resultando em análogos de compstatina significativamente mais potentes. Como descrito em mais pormenor adiante, entender-se-á que algumas das modificações feitas ao triptofano na posição 4 como indicado nas SEQ ID NOS:2-13 podem ser combinadas com

uma substituição de um análogo de triptofano na posição 7, para formar ainda análogos de compstatina potentes adicionais.

TABELA 1.

Péptido	Sequência	SEQ ID NO:	Actividade em relação à compstatina
A. Compstatina e análogos descritos anteriormente			
Compstatina	H-ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	1	*
Ac-compstatina	Ac-ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	2	3 x mais
Ac-V4Y/H9A	Ac-ICV <u>Y</u> QDWG <u>A</u> HRCT-CONH ₂	3	19 x mais
Ac-V4W/H9A-OH	Ac-ICV <u>W</u> QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	4	25 x mais
Ac-V4W/H9A	Ac-ICV <u>W</u> QDWG <u>A</u> HRCT-CONH ₂	5	55 x mais
Ac-V4W/H9A/T13dT-OH	Ac-ICV <u>W</u> QDWG <u>A</u> HRCT <u>dT</u> -COOH	6	55 x mais
Ac-V4(2-Nal)/H9A	Ac-ICV(<u>2-Nal</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-CONH ₂	7	99 x mais
Ac-V4(2-Nal)/H9A-OH	Ac-ICV(<u>2-Nal</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	8	39 x mais
Ac-V4(1-Nal)/H9A-OH	Ac-ICV(<u>1-Nal</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	9	30 x mais
Ac-V4Igl/H9A	Ac-ICV(<u>2-Igl</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-CONH ₂	10	39 x mais
Ac-V4Igl/H9A-OH	Ac-ICV(<u>2-Igl</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	11	37 x mais
Ac-V4Dht/H9A-OH	Ac-ICV <u>Dht</u> QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	12	5 x mais
Ac-V4(Bpa)/H9A-OH	Ac-ICV(<u>Bpa</u>)QDWG <u>A</u> HRCT-COOH	13	49 x mais
+G/V4W/H9A +NA -OH	H- <u>G</u> ICV <u>W</u> QDWG <u>A</u> HRCT <u>AN</u> -COOH	14	38 x mais
B. Análogos exemplificativos aqui descritos			
+G/V4W/H9A +N -OH	H- <u>G</u> ICV <u>W</u> QDWG <u>A</u> HRCT <u>N</u> -COOH	15	45 x mais
+G/V4(5f-1-W)/W7(5f-1-W)/H9A +N -OH	H-GICV(<u>5f-1-W</u>)QD(<u>5f-1-W</u>) <u>G</u> HRCT <u>N</u> -COOH	16	112 x mais
+G/V4(6f-1-W)/W7(6f-1-W)/H9A +N -OH	H-GICV(<u>6f-1-W</u>)QD(<u>6f-1-W</u>) <u>G</u> HRCT <u>N</u> -COOH	17	126 x mais

Péptido	Sequência	SEQ ID NO:	Actividade em relação à compstatina
Ac-V4(5f-1-W) /H9A	Ac-ICV (5f-1-W) QDWG A HRCT-CONH ₂	18	31 x mais
Ac-V4W/W7(5f-1-W) /H9A	Ac-ICV W QD (5f-1-W) G AHRCT-CONH ₂	19	121 x mais
Ac-V4(5f-1-W) /W7(5f-1-W) /H9A	Ac-ICV (5f-1-W) QD (5f-1-W) G AHRCT-CONH ₂	20	161 x mais
Ac-V4(5-metoxi-W) /H9A	Ac-ICV (5-metoxi-W) QDWG A HRCT-CONH ₂	21	76 x mais
Ac-V4(5-metil-W) /H9A	Ac-ICV (5-metil-W) QDWG A HRCT-CONH ₂	22	67 x mais
Ac-V4(1-metil-W) /H9A	Ac-ICV (1-metil-W) QDWG A HRCT-CONH ₂	23	264 x mais
Ac-V4(1-metil-W) /W7(5f-1-W) /H9A	Ac-ICV (1-metil-W) QD (5f-1-W) G AHRCT-CONH ₂	24	264 x mais
Ac-V4(1-formil-W) /H9A	Ac-ICV (1-formil-W) QDWG A HRCT-CONH ₂	25	264 x mais

As abreviaturas utilizadas nesta tabela são as seguintes:

dt = D-treonina

2-Nal = 2-naftilalanina

1-Nal = 1-naftilalanina

2-Igl = 2-indanilglicina

dht = di-hidrotriptofano

Bpa = 4-benzoil-L-fenilalanina

5f-1-W = 5-fluoro-1-triptofano

6f-1-W = 6-fluoro-1-triptofano

5-OH-W = 5-hidroxitriptofano

5-metoxi-W = 5-metoxitriptofano

5-metil-W = 5-metiltriptofano

1-metil-W = 1-metiltriptofano

1-formil-W = 1-formiltriptofano

Modificações no terminal N. A acetilação do terminal N tipicamente aumenta a actividade inibidora do complemento da compstatina e dos seus análogos, como se pode observar comparando especificamente a SEQ ID NO:1 com a SEQ ID NO:2. Em conformidade, a adição de um grupo acilo ao terminal amino do péptido, incluindo mas não limitado a N-acetilação, é uma forma de realização preferida da invenção, de particular utilidade quando os péptidos são preparados sinteticamente. No entanto, é por vezes vantajoso para preparar os péptidos por expressão de uma molécula de ácido nucleico que codifica o péptido num sistema de expressão procariótico ou eucariótico, ou por transcrição e tradução *in vitro*. Para estas formas de realização, pode ser utilizado o terminal N de ocorrência natural. Um exemplo de um análogo de compstatina adequado para a expressão *in vitro* ou *in vivo* é representado pelas SEQ ID NOS: 15-17, em que o grupo acetilo está substituído por glicina não modificada no terminal N. As SEQ ID NOS:15-17, que adicionalmente compreende modificações no seio dos péptidos e nos terminais C como discutido adiante, são entre cerca de 45 e cerca de 125 vezes mais activas do que a compstatina no ensaio de inibição do complemento aqui

descrito.

Modificação no seio do péptido. Utilizando métodos computacionais que classificam as sequências de baixa energia, que foi previamente determinado que Tyr e Val eram os candidatos mais prováveis na posição 4 para apoiar a estabilidade e a actividade do péptido (Klepeis J. L. et al., 2003). Foi descrito no documento WO2004/026328 que Trp na posição 4, especialmente combinado com Ala na posição 9, dá actividade muitas vezes maior do que a do péptido mãe (por exemplo, comparar as actividades das SEQ ID NOS: 4, 5 e 6 com as das SEQ ID NOS: 2 e 3). O documento WO2004/026326 também descreveu que os péptidos que compreendem os análogos de triptofano 2-naftilalanina (SEQ ID NOS: 7, 8), 1-naftilalanina (SEQ ID NO:9), 2-indanilglicina (SEQ ID NOS: 10, 11) ou di-hidrotriptofano (SEQ ID NO:12) na posição 4 se verificou terem todos actividade inibidora de complemento acrescida, variando de 5 vezes a 99 vezes maior do que a da compstatina. Além disso, um péptido compreendendo o análogo de fenilalanina, 4-benzoíl-L-alanina, na posição 4 (SEQ ID NO:13) tinha actividade 49 vezes maior do que a da compstatina.

De acordo com a presente invenção, os péptidos que compreendem 5-fluoro-1-triptofano (SEQ ID NO:19) ou 5-metoxi-, 5-metil- ou 1-metil-triptofano, ou 1-formil-triptofano (SEQ ID NOS: 21, 22, 23 e 25, respectivamente) na posição 4 têm actividade 31-264 vezes maior do que tem a compstatina. A incorporação de 1-metil- ou 1-formil-

triptofano aumentou mais a actividade e a afinidade de ligação em comparação com outros análogos. Crê-se que uma ligação de hidrogénio mediada por N do indole não é necessária na posição 4 para a ligação e actividade da compstatina. A ausência desta ligação de hidrogénio ou a redução do carácter polar por substituição do hidrogénio com metilo ou alcanoílo inferior no azoto do indole na posição 4 aumenta a ligação e a actividade da compstatina. Sem querer ficar limitado por qualquer teoria particular ou mecanismo de acção, crê-se que uma interacção hidrófoba ou efeito na posição 4 reforça a interacção da compstatina com C3. Em conformidade, as modificações de Trp na posição 4 {e.g., alterando a estrutura da cadeia lateral de acordo com métodos bem conhecidos na arte) ou substituições de análogos de Trp que mantêm ou melhoram a interacção hidrófoba acima mencionada estão contempladas na presente invenção para produzir análogos de compstatina com actividade ainda maior. Esses análogos são bem conhecidos na arte e incluem, mas não estão limitados aos análogos aqui exemplificados, bem como aos seus derivados não substituídos ou substituídos alternativamente. Exemplos de análogos adequados podem ser encontrados por referência às seguintes publicações e muitas outras: Beene, et al. (2002) *Biochemistry* 41:10262-10269 (descrevendo, *inter alia*, análogos de Trp mono- e multi-halogenados); Babitzky & Yanofsky (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 12452-12456 (descrevendo, *inter alia*, Trp metilado e halogenado e outros análogos de Trp e indole); e patentes U.S. 6214790, 6169057, 5776970, 4870097, 4576750 e 4299838. Os análogos

de Trp podem ser introduzidos no péptido compstatina por expressão *in vitro* ou *in vivo*, ou por síntese de péptidos, como conhecido na arte e descrito em mais pormenor nos exemplos.

Em certas formas de realização, o Trp na posição 4 da compstatina é substituído por um análogo que compreende um substituinte metilo, particularmente N(α)metil triptofano e 5-metiltriptofano. Noutras formas de realização, Trp na posição 4 do compstatina é substituído por um análogo que compreende um substituinte alcanoílo inferior (e.g., C₁-C₅), tal como definido acima. Além dos análogos exemplificados, estes incluem mas não estão limitados a 1-acetil-L-triptofano.

Experiências termodinâmicas mostraram que a incorporação de 5-fluoro-L-triptofano na posição 7 na compstatina aumentou a entalpia da interacção entre a compstatina e C3, em relação à compstatina de tipo selvagem, enquanto que a incorporação de 5-fluoro-triptofano na posição 4 da compstatina diminuiu a entalpia dessa interacção.

Sem querer ficar comprometido a qualquer mecanismo específico, os resultados anteriores indicam que a substituição de hidrogénios do indole com um átomo de flúor de um resíduo de Trp na posição 7 da compstatina pode reforçar o potencial de ligação de hidrogénio do anel de Índole, introduzir novo potencial de ligação de hidrogénio

ou mediar uma interacção com C3 através de uma molécula de água na interface de ligação. (Katrappa M. et al., 2004). Assim, as modificações de Trp na posição 7 {e.g., alterando a estrutura da cadeia lateral de acordo com métodos bem conhecidos na arte), ou substituições de análogos de Trp que mantêm ou aumentam o potencial de ligação de hidrogénio acima referido ou mediam uma interacção com C3 através de uma molécula de água na interface de ligação, estão contempladas na presente invenção para produzir análogos com actividade ainda maior. Em certas formas de realização, os análogos de Trp cujos anéis de indole têm modificações que resultam em potencial de ligação de hidrogénio acrescido ou mediam uma interacção com C3 através de uma molécula de água na interface de ligação, podem ser introduzidos na posição 7 do péptido compstatina por expressão *in vitro* ou *in vivo* ou por síntese de péptidos. Verificou-se que um péptido que compreende o análogo de triptofano 5-fluoro-triptofano (SEQ ID NO:19) na posição 7 tem uma actividade acrescida 121 vezes em comparação com a compstatina.

Noutra forma de realização, os análogos de Trp são incorporados em ambas as posições 4 e 7 da molécula de compstatina e a His na posição 9 da compstatina é opcionalmente substituída por Ala. Experiências termodinâmicas mostraram que a incorporação de 5-fluoro-triptofano nas posições 4 e 7 na compstatina aumentou a entalpia da interacção entre a compstatina e C3, em relação à compstatina de tipo selvagem. Em conformidade, as

modificações de Trp nas posições 4 e 7 (e.g., alterando a estrutura da cadeia lateral de acordo com métodos bem conhecidos na arte) ou substituições de análogos de Trp que mantêm ou melhoram a interacção hidrófoba com C3 acima referida através da posição 4 e mantêm ou aumentam o potencial de ligação de hidrogénio com C3 acima referido através da posição 7, ou a interacção com C3 através de uma molécula de água na interface de ligação através da posição 7, estão contempladas na presente invenção para produzir análogos de compstatina com actividade ainda maior. Esse Trp ou análogos de Trp modificados podem ser introduzidos no péptido compstatina nas posições 4 e 7 por expressão *in vitro* ou *in vivo*, ou por síntese de péptidos. Verificou-se que os péptidos que compreendem análogos de triptofano 5-fluoro-triptofano (SEQ ID NO:16) e que compreendem análogos de triptofano 6-fluoro-triptofano (SEQ. ID NO:17) nas posições 4 e 7 têm actividade significativamente aumentada em relação à compstatina, variando de um aumento de actividade de 112 a 264 vezes. Além disso, verificou-se que os péptidos que compreendem o análogo de triptofano 1-metil-triptofano na posição 4 e 5-fluoro-triptofano na posição 7 (SEQ ID NO:24) têm uma actividade aumentada 264 vezes em relação à compstatina.

Modificações no terminal carboxilo. Os péptidos produzidos por métodos sintéticos são vulgarmente modificados no terminal carboxilo para incluir uma amida em vez de um ácido; esta modificação comum pode ser observada na Tabela 1 na compstatina (SEQ ID NO:1) e vários análogos.

De facto, em alguns casos, verificou-se que os péptidos contendo terminal amida têm maior actividade do que os péptidos contendo terminal ácido (comparar, por exemplo, as SEQ ID NOS: 5 e 7 com as SEQ ID NOS: 4 e 8, respectivamente). Em conformidade uma forma de realização preferida da invenção utiliza a modificação amida do terminal C. No entanto, algumas circunstâncias favorecem a utilização de um ácido no terminal C. Essas circunstâncias incluem, mas não estão limitadas a considerações de solubilidade e a expressão dos péptidos *in vitro* ou *in vivo* das moléculas de ácido nucleico que codificam péptido.

O resíduo do terminal carboxilo da compstatina é treonina. Descreve-se péptidos em que a treonina do terminal C está substituída por um ou mais aminoácidos de ocorrência natural ou análogos. Por exemplo, o péptido com a SEQ ID NO:6 compreende D-treonina em vez de L-treonina e tem ainda um grupo COOH no terminal C. Este péptido apresenta actividade igual à do péptido de SEQ ID NO:5, compreendendo L-treonina e CONH₂ no terminal C. Além disso, Ile foi substituída por Thr na posição 13, para se obter um péptido com actividade 21 vezes maior do que a da compstatina. Além disso, os péptidos de SEQ ID NOS:14-17, que compreendem uma extensão de péptido no terminal C de Asn ou uma extensão de dipéptido de Ala-Asn, juntamente com um COOH no terminal C e um terminal N não acetilado, demonstram uma actividade entre 38 e 126 vezes maior do que a actividade da compstatina. Também são adequados para a produção por meio de um sistema de expressão procariótico

ou eucariótico, como descrito em mais pormenor adiante.

Os análogos de compstatina da presente invenção podem ser preparados por vários métodos sintéticos de síntese de péptidos através da condensação de um ou mais resíduos de aminoácidos, de acordo com métodos convencionais de síntese de péptidos. Por exemplo, os péptidos são sintetizados de acordo com metodologias de fase sólida correntes, como podem ser realizadas num sintetizador de péptidos modelo 431A de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), de acordo com as instruções do fabricante. Outros métodos de síntese de péptidos ou peptidomiméticos, por metodologias quer em fase sólida quer em fase líquida, são bem conhecidos pelos especialistas na matéria. No decurso da síntese de péptidos, os grupos amino e carboxilo de cadeia ramificada pode ser protegidos/desprotegidos consoante necessário, utilizando-se grupos protectores vulgarmente conhecidos. Um exemplo de um método sintético de péptidos adequado está apresentado no Exemplo 3. A modificação utilizando grupos protectores alternativos para péptidos e derivados peptídicos serão evidentes para os especialistas na matéria.

Alternativamente, certos péptidos da invenção podem ser produzidos por expressão num sistema procariótico ou eucariótico adequado. Por exemplo, uma construção de ADN pode ser inserida num vector de plasmídeo adaptado para expressão numa célula bacteriana (como *E. coli*) ou numa

célula de levedura (como *Saccharomyces cerevisiae*) ou num vector de baculovírus para expressão numa célula de insecto ou vector viral para expressão numa célula de mamífero. Esses vectores compreendem os elementos reguladores necessários para a expressão do ADN na célula hospedeira, posicionado de maneira a permitir a expressão do ADN na célula hospedeira. Esses elementos reguladores necessários para expressão incluem sequências promotoras, sequências de iniciação da transcrição e, opcionalmente, sequências potenciadoras.

Os péptidos de SEQ ID NOS:14-17, e outros de concepção semelhante, são adequados para a produção por expressão de uma molécula de ácido nucleico *in vitro* ou *in vivo*. Uma construção de ADN que codifica um concatâmero dos péptidos, estando o limite superior do concatâmero dependente do sistema de expressão utilizado, pode ser introduzida *in vivo* num sistema de expressão. Depois de ser produzido o concatâmero, a clivagem entre Asn do terminal C e G do terminal N seguinte é realizada por exposição do polipéptido a hidrazina.

Os péptidos produzidos por expressão do gene num sistema recombinante procariótico ou eucariótico podem ser purificados de acordo com métodos conhecidos na arte. Os Exemplos 1 e 2 apresentam métodos adequados para utilização na presente invenção. Numa forma de realização, pode ser utilizado um sistema de expressão/secreção disponível comercialmente, em que o péptido recombinante é expresso e

subsequentemente segregado da célula hospedeira, para ser facilmente purificado a partir do meio circundante.

Uma combinação de expressão do gene e métodos sintéticos também pode ser utilizada para produzir análogos de compstatina. Por exemplo, um análogo pode ser produzido por expressão do gene e depois submetido a um ou mais processos sintéticos pós-tradução, por exemplo, para modificar o terminal N ou C ou para ciclizar a molécula.

A estrutura da compstatina é conhecida na arte e as estruturas dos análogos anteriores são determinadas por meios semelhantes. Uma vez determinada uma conformação particular desejada de um péptido curto, os métodos para a concepção de um péptido ou peptidomimético para se adaptar a essa conformação são bem conhecidos na arte. Ver, e.g., G. R. Marshall (1993), *Tetrahedron*, 49: 3547-3558; Hruby e Nikiforovich (1991), em *Molecular Conformation and Biological Interactions*, P. Balařam & S. Ramasehan, eds., Indian Acad. of Sci., Bangalore, páginas 429-455). De especial relevância para a presente invenção, a concepção de análogos peptídicos pode ser adicionalmente refinada por consideração da contribuição de várias cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, como discutido acima (i.e., pelo efeito de grupos funcionais ou por considerações estereoquímicas).

Será entendido pelos especialistas na matéria que uma imitação de um péptido pode servir igualmente bem como

um péptido para efeitos de proporcionar a conformação do esqueleto específica e funcionalidades da cadeia lateral necessárias para a ligação a C3 e inibição da activação do complemento. Por conseguinte, está contemplada como estando dentro do âmbito da presente invenção para produzir compostos inibidores de complemento por C3-ligação através da utilização de aminoácidos de ocorrência natural, derivados de aminoácidos, análogos ou moléculas não de aminoácidos capazes de ser ligados para formar a conformação apropriada do esqueleto. Um análogo não peptídico, ou um análogo compreendendo componentes peptídicos e não peptídicos, é por vezes aqui referido como um "peptidomimético" ou "mimético isostérico", para designar substituições ou derivações dos péptidos da invenção, que têm as mesmas características conformacionais do esqueleto e/ou outras funcionalidades, de modo a ser suficientemente semelhante aos péptidos exemplificados para inibir a activação do complemento.

A utilização de peptidomiméticos para o desenvolvimento de análogos peptídicos de alta afinidade é bem conhecida na arte (ver, e.g., Zhao B. et al., 1995; Beeley, N. 1994; e Hruby, V. J. 1993). Assumindo constrangimentos rotacionais semelhantes aos de resíduos de aminoácidos no seio de um péptido, análogos compreendendo unidades de não aminoácidos podem ser analisadas, e os seus motivos conformacionais verificados, por meio do gráfico de Ramachandran (Hruby e Nikiforovich 1991), entre outras técnicas conhecidas.

Os análogos de compstatina da presente invenção podem ser modificados pela adição de componentes de polietileno glicol (PEG) ao péptido. Como é bem conhecido na arte, a PEGilação pode aumentar a semi-vida de péptidos e proteínas terapêuticas *in vivo*. Numa forma de realização, o PEG tem um peso molecular médio de cerca de 1000 a cerca de 50000. Noutra forma de realização, o PEG tem um peso molecular médio de cerca de 1000 a cerca de 20000. Noutra forma de realização, o PEG tem um peso molecular médio de cerca de 1000 a cerca de 10000. Numa forma de realização exemplificativa, o PEG tem um peso molecular médio de cerca de 5000. O polietilenoglicol pode ter uma cadeia linear ou ramificada, e preferencialmente tem uma cadeia linear.

Os análogos de compstatina da presente invenção podem estar ligados covalentemente a PEG através de um grupo ligante. Esses métodos são bem conhecidos na arte. (Objecto de revisão em Kozlowski A. et al. 2001; ver também Harris J. M. e Zalipsky S., eds. *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS Symposium Series 680 (1997)). Exemplos não limitativos de grupos ligantes aceitáveis incluem um grupo éster, um grupo amida, um grupo imida, um grupo carbamato, um grupo carboxilo, um grupo hidroxilo, um hidrato de carbono, um grupo succinimida (incluindo, sem limitação, succinato de succinimidilo (SS), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinimidil succinamida (SSA) e N-hidroxi succinimida (NHS)), um grupo epóxido, um grupo oxicarbonilimidazole (incluindo, sem limitação,

carbonildimidazole (CDI)), um grupo nitro fenilo (incluindo, sem limitação, carbonato de nitrofenilo (NPC) ou carbonato de triclorofenilol (TPC)), um grupo trisilato, um grupo aldeído, um grupo isocianato, um grupo vinilsulfona, um grupo tirosina, um grupo cisteína, um grupo histidina ou uma amina primária. Em certas formas de realização, o grupo ligante é um grupo succinimida. Numa forma de realização, o grupo de ligação é NHS.

Os análogos de compstatina da presente invenção podem, alternativamente, ser directamente acoplados a PEG {i.e., sem um grupo ligante) através de um grupo amino, um grupo sulfidrilo, um grupo hidroxilo ou um grupo carboxilo. Numa forma de realização, o PEG é acoplado a um resíduo de lisina adicionado ao terminal C da compstatina.

A PEGilação é uma forma de aumentar a retenção *in vivo* de péptidos e proteínas terapêuticos. A eliminação *in vivo* de péptidos também podem ser reduzida por ligação dos péptidos a certos outros péptidos. Por exemplo, certos péptidos de ligação a albumina apresentam uma semi-vida invulgarmente longa de 2,3 h quando injectados por bolus intravenoso em coelhos (Dennis *et al.*, 2002). Um péptido deste tipo, fundido ao factor anti-tecidular Fab de D3H44 permitiu que o Fab se ligasse albumina, enquanto mantinha a capacidade do Fab de se ligar ao factor tecidular (Nguyen *et al.*, 2006). Esta interacção com albumina resultou em eliminação significativamente reduzida *in vivo* e semi-vida prolongada em murganhos e coelhos, quando comparada com Fab

de D3H44 de tipo selvagem, comparável com as observadas para as moléculas de Fab PEGuilado, imunoadesinas e fusões de albumina. Tal como aqui descrito no Exemplo 11, os inventores sintetizaram um análogo de compstatina fundido com um péptido de ligação a albumina e demonstraram que a proteína de fusão é activa na inibição da activação do complemento.

A actividade de inibição da activação do complemento de análogos, peptidomiméticos e conjugados de compstatina pode ser testada por uma variedade de ensaios conhecidos na arte. Numa forma de realização preferida, é utilizado o ensaio descrito no Exemplo 4. Uma lista não exaustiva de outros ensaios está apresentada na patente U.S. 6319897, incluindo, mas não limitados a (1) ligação de péptido a C3 e fragmentos de C3, (2) vários ensaios hemolíticos; (3) medição da clivagem de C3 mediada por convertase de C3 e (4) de medição da clivagem de Factor Factor B por Factor D.

Os péptidos e peptidomiméticos aqui descritos são de utilidade prática para qualquer finalidade para a qual é utilizada a própria compstatina, como é conhecido na arte. Essas utilizações incluem, mas não estão limitadas a: (1) inibição da activação do complemento no soro, tecidos ou órgãos de um doente (homem ou animal), que pode facilitar o tratamento de certas doenças ou patologias, incluindo mas não limitadas a degeneração macular relacionada com a idade, artrite reumatóide, lesão da medula espinal, doença

de Parkinson e doença de Alzheimer; (2) inibição da activação do complemento que ocorre durante a utilização de órgãos artificiais ou implantes (e.g., por revestimento ou de outro tratamento do órgão artificial ou implante com um péptido da invenção), (3) inibição da activação do complemento que ocorre durante a derivação extracorporal de fluidos fisiológicos (sangue, urina) (e.g., por revestimento com um péptido da invenção da tubagem através da qual os fluidos são desviados) e (4) no rastreio de bibliotecas de moléculas pequenas para identificar outros inibidores de activação da compstatina (e.g., ensaios de alta produtividade em fase líquida ou sólida concebidos para medir a aptidão de um composto de teste para competir com um análogo de compstatina para ligação com C3 ou um fragmento de C3).

Os exemplos seguintes são apresentados para descrever a invenção em mais pormenor. Destinam-se a ilustrar, e não a limitar, a invenção. Os materiais e os métodos apresentados nos Exemplos 1-5 foram utilizados para gerar os resultados descritos nos Exemplos 6-11.

EXEMPLO 1

Expressão Bacteriana da compstatina

Um análogo de compstatina com a seguinte sequência, NH₂-GICVWQDWGAHRCTN-OH ("G(-1)/V4W/H9A/N14") (SEQ ID NO:15) foi expresso em fusão com domínio de ligação

de quitina e a inteína DnaB (New England Biolabs, Beverly, MA). Guiado pela sequência peptídica e a utilização de codões para *E. coli* foi utilizado o seguinte código genético para gerar um gene sintético para este péptido com a sequência seguinte:

^{5'}ATTTGCGTTGGCAGGATTGGGGTGCGCACCGTTGCACCAATTAA^{3'} (SEQ ID NO:29)

Para clonar o gene sintético no vector pGEM-T, foram concebidas uma região flanqueadora 5' contendo um sítio *SapI* e uma região flanqueadora 3' contendo um sítio *PstI*. Para construir o gene sintético, os quatro oligonucleotídos sobrepostos indicados a seguir foram desenhados utilizando o software DnaWorks e sintetizados em Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA) :

^{5'}GGTGGTGCTCTCCAACGGTATTGCGTTGGCAGGA^{3'} (SEQ ID:30)

^{5'}TTGGGGTGCGCACCGTTGCACCAATTAACTGCAGG^{3'} (SEQ ID:31)

^{3'}CAACGTGGTTAATTGACGTCCGC^{5'} (SEQ ID NO:32)

^{3'}CATAAACGCAAACCGTCCTAACCCCCACGCGTGG^{5'} (SEQ ID NO:33)

Os fragmentos de ADN que se sobrepõem foram montados por PCR como descrito por Stemmer *et al.*, 1995. O gene resultante foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores:

^{5'}CGCCTGCAGTTAATTGGT^{3'} (SEQ ID NO:34)

^{5'}GGTGGTGCTCTCCAACG^{3'} (SEQ ID NO:35)

Os fragmentos amplificados por PCR de compstatina foram então clonados no vector pGEM-T, e o clone resultante foi digerido com *Pst*I e *Sap*I. O fragmento *Pst*I-*Sap*I que codifica o análogo de compstatina foi ainda subclonado no vector de expressão pTWIN1, que tinha sido pré-digerido com *Pst*I e *Sap*I; a sequência do clone foi verificada por sequenciação de ADN.

Para expressar o análogo de compstatina, células de *E. coli* ER2566 transformadas com o clone de compstatina foram cultivadas em meio SOB (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levedura, 0,5 g/L de NaCl, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM) a 37°C. Quando se atingiu uma OD₆₀₀ de 0,7, a expressão foi induzida pela adição de IPTG até uma concentração final de 0,3 mM, seguido por uma incubação adicional a 37°C durante 4 h. As células foram recolhidas por centrifugação e lisadas por sonicação em tampão de B1 (tampão fosfato 20 mM, pH 8,5, com NaCl 500 mM e EDTA 1 mM) suplementado com Tween-20 a 0,2%. O extracto celular foi centrifugado e a fracção solúvel foi aplicada numa coluna de ligação de quitina (New England Biolabs, Beverly, MA) pré-equilibrada com tampão B1. A coluna foi lavada com 100 mL de tampão B1, seguida por uma lavagem rápida com 3 volumes de coluna de tampão B2 (acetato de amónio 50 mM, pH 7,0). A coluna foi incubada à temperatura ambiente durante 20 h e o péptido

foi eluído com tampão B2, liofilizado e adicionalmente purificado numa coluna de HPLC C18. O péptido purificado foi identificado utilizando espectrometria de massa MALDI-TOF.

EXEMPLO 2**Expressão de análogos de triptofano de compstatina em *E. coli***

Para expressar análogos de compstatina contendo derivados de triptofano, o clone pTWIN1-compstatina foi transformado no auxotrofo ER2566 Trp 82. A expressão foi realizada em meio M9 mínimo suplementado com L-triptofano 1 mM como descrito acima. As células foram cultivadas a uma OD₆₀₀ de 0,8-1,0, em seguida, recolhidas por centrifugação e ressuspensas em meio mínimo fresco contendo 2 mM do(s) análogo(s) de triptofano desejado(s): 5-fluoro-triptofano, 6-fluoro-triptofano, 7-aza-triptofano ou 5-hidroxi-triptofano. Os análogos de compstatina expressos foram adicionalmente purificados como descrito no Exemplo 1.

EXEMPLO 3**Síntese de péptidos**

A síntese e purificação de péptidos foi realizada como descrito por Sahu *et al.*, 1996; Sahu *et al.*, 2000; e Mallik *et al.*, 2005. Resumidamente, os péptidos foram

sintetizados num sintetizador de péptidos de Applied Biosystem (modelo 431A) utilizando resina de amida Fmoc e grupos protectores da cadeia lateral correntes. Os péptidos foram clivados da resina por incubação durante 3 horas a 22°C com uma mistura de solventes contendo 5% de fenol, 5% de tioanisole, 5% de água, 2,5% de etanoditiol e 82,5% de ácido trifluoroacético (TFA). A mistura reaccional foi filtrada através de um funil de frita, precipitada com éter frio, dissolvida em acetonitrilo a 50% contendo TFA a 0,1%, e liofilizada.

Os péptidos em bruto obtidos após clivagem foram dissolvidos em acetonitrilo a 10% contendo 0,1% de TFA e purificados utilizando uma coluna C-18 de fase inversa (Waters, Milford, MA). A oxidação de dissulfureto foi conseguida por um método de ciclização em resina utilizando o reagente trifluoroacetato de tálio(III). Este método elimina os passos de oxidação em solução diluída e subsequente concentração demorada através de passos de liofilização antes de HPLC de fase inversa. Utilizando este método, a formação de multímeros era inexistente e obteve-se um nível elevado (~90%) de material oxidado ou ciclizado, desprotegido. A identidade e pureza de todos os péptidos foram confirmadas por espectroscopia de massa de dessorção a laser e HPLC.

Para a síntese de análogos de 5-fluoro-triptofano, 1-metil-triptofano e 5-metil-triptofano, utilizou-se derivados Fmoc-*dl*. A separação dos péptidos

enantioméricos foi realizada como descrito por Meyers *et al.* 1978. A mistura *dl* de cada péptido foi separada em péptidos isoméricos *d* e *l* numa coluna de HPLC C-18 de fase inversa utilizando acetonitrilo a 10% em acetato de amónio 0,01 M, pH 4,1. A identidade isomérica dos péptidos eluídos foi determinada por tratamento dos péptidos com protease V8, seguida por análise utilizando espectrometria de massa de MALDI-TOF (Micromass TOFspec2E).

EXEMPLO 4**Ensaios de inibição do complemento**

A actividade inibidora de compstatina e dos seus análogos no sistema do complemento foi determinada medindo o seu efeito sobre a activação do sistema do complemento por imunocomplexos. A inibição da activação do complemento foi avaliada medindo a inibição da fixação de C3 a complexos de ovalbumina-anti-ovalbumina em plasma humano normal. Poços de microtitulação foram revestidos com 50 µL de ovalbumina (10 mg/mL) durante 2 horas a 25°C (de um dia para o outro a 4°C). Os poços foram saturados com 200 µL de BSA a 10 mg/mL durante 1 hora a 25°C e depois adicionou-se um anticorpo anti-ovalbumina de coelho para formar um imunocomplexo através do qual o complemento pode ser activado. Trinta microlitros de péptidos em várias concentrações foram adicionados directamente a cada poço seguidos por 30 µL de uma diluição 1:80 de plasma humano.

Após 30 min de incubação, C3b/iC3b ligado foi detectado utilizando um anticorpo conjugado com HRP anti-C3 humana de cabra. A cor foi desenvolvida pela adição de substrato de peroxidase ABTS e densidade óptica medida a 405 nm.

Os dados de absorvência obtidos a 405 nm foram traduzidos em % de inibição com base na absorvência correspondente a 100% de activação do complemento. A % de inibição foi representada graficamente em função da concentração de péptido e o conjunto de dados resultante foi ajustado para a função dose-resposta logística utilizando o software Origin 7.0. A concentração do péptido que causou 50% de inibição de deposição de C3b/iC3b foi tomada como a IC₅₀ e utilizada para comparar as actividades dos vários péptidos. Os valores da IC₅₀ foram obtidos a partir dos parâmetros ajustados que obtiveram o valor mais baixo de qui-quadrado.

EXEMPLO 5

Análise por calorimetria de titulação isotérmica da interacção de C3 com compstatina e os seus análogos

Foram realizadas experiências por calorimetria de titulação isotérmica utilizando o calorímetro VP-ITC Microcal (Microcal Inc., Northampton, MA). Para estas experiências foram utilizadas concentrações de proteína de 3,5-5 μ M e concentrações de péptido de 80-200 μ M. Todas as

titulações foram realizadas em PBS (tampão fosfato 10 mM com NaCl 150 mM, pH 7,4). Em cada experiência, a proteína alvo, C3, foi carregada na célula e o péptido foi carregado na seringa. Todas as experiências foram realizadas a 25°C e para cada experiência, foram feitas injecções de 2 µL de péptido para a célula contendo a proteína. Em cada experiência, as isotérmicas em bruto foram corrigidas para os calores de diluição subtraindo as isotérmicas que representam as injecções de péptido no tampão. As isotérmicas resultantes foram ajustadas a vários modelos dentro do software 7.0 Origem e o modelo que obteve o valor de qui-quadrado mais baixo foi considerado apropriado para o respectivo conjunto de dados. Os valores da afinidade de ligação e da entropia foram traçados num gráfico contra os valores de log P.

Exemplo 6

Papel do triptofano na interacção C3-compstatina avaliado por análogos de compstatina expressos bacterianamente

Quatro análogos de triptofano diferentes que diferem na natureza química do anel de indole foram incorporados em compstatina utilizando um sistema de expressão de proteína mediado por inteína. Após a expressão, os péptidos foram purificados num só passo com um rendimento final de 2 mg/L de cultura. Os análogos de triptofano 5-fluoro-triptofano, 6-fluoro-triptofano, 7-aza-

triptofano e 5-hidroxi-triptofano foram também expressas utilizando o auxotrofo ER2566/Trp 82 como indicado pelos perfis de MALDI e os péptidos resultantes foram purificados até à homogeneidade. A compstatina nativa e os análogos foram ciclizados *in vivo* através de uma ligação dissulfureto, como evidenciado pela sua incapacidade para reagir com PHMB. Todos os péptidos foram adicionalmente purificados por HPLC em coluna C18 de fase inversa.

A actividade do análogo de compstatina expresso G(-1)/V4W/H9A/N14 (SEQ ID NO:15) apresentaram uma IC₅₀ de 1,2 µM, que é semelhante à actividade observada para o análogo Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5). Esta constatação indica que a glicina localizada no terminal N do péptido expresso desempenha um papel semelhante ao do grupo acetilo localizado no terminal N do análogo Ac-V4W/H9A.

Verificou-se que todos os análogos de compstatina expressos, excepto o análogo 7-aza-triptofano, eram activos nas concentrações testadas. No entanto, o péptido mostrou diferentes níveis de actividade em relação ao análogo, Ac-V4W/H9A (Figura 1, Tabela 2). A compstatina contendo 6-fluoro-triptofano e 5-fluoro-triptofano, bem como alanina na posição 9 apresentaram uma actividade de 2,8 e 2,5 vezes mais alta, respectivamente, do que a do análogo Ac-V4W/H9A.

Tabela 2. Actividade inibidora do complemento dos péptidos expressos

Péptido expresso	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (μ M)	Actividade relativa*
Ac-V4W/H9A ^b	5	1,2	45
G(-1)/V4W/H9A/N14	15	1,2	45
G(-1)/V4(5FW)/W7(5FW)/H9A/N14	16	0,48	112
G(-1)/V4(6FW)/W7(6FW)/H9A/N14	17	0,43	126
G(-1)/V4(5-OH ^c -W)/W7(5-OH-W)/H9A/N14	27	33	1,6
G(-1)/V4(7-aza-W)/W7(7-aza-W)/H9A/N14	28	122	0,44

* relativa à actividade do péptido H-I(CVVQDWGHRC)T-NH₂ (compstatina, SEQ ID NO:1)

^c representa hidroxilo

^b péptido sintético

Sem ficar limitado a qualquer mecanismo particular, crê-se que a adição de um átomo de flúor aumenta a actividade do péptido através do aumento da hidrofobia do anel de indole. A incorporação dos análogos de triptofano menos hidrófobos 5-hidroxi-triptofano e 7-aza-triptofano também foi investigada. Em contraste com os resultados obtidos com os análogos 5-fluoro e 6-fluoro, os análogos de compstatina contendo 5-hidroxi-triptofano mostrou perda de actividade de 27,5 vezes em comparação com o análogo Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) e o péptido contendo 7-aza-triptofano não mostrou qualquer actividade para todas

as concentrações testadas. O 7-aza-triptofano assemelha-se ao triptofano na estrutura molecular, excepto que tem um átomo de azoto na posição 7 do anel de indole em oposição a um átomo de carbono. A perda de actividade observada por substituição com 7-aza-triptofano mostra a importância relativa deste átomo de carbono.

Exemplo 7

Papel de triptofanos individuais na interacção C3- compstatina

A síntese de péptidos em fase sólida foi utilizada para gerar os análogos de compstatina com 5-fluoro-triptofano incorporado selectivamente na posição 4, na posição 7 ou em ambas as posições 4 e 7, com alanina na posição 9. A síntese foi realizada utilizando Fmoc-5-fluoro-dl-triptofano. Esta reacção produziu uma mistura enantiomérica dos péptidos tendo 5-fluoro-d-triptofano e 5-fluoro-l-triptofano. Foram sintetizados três péptidos diferentes: dois péptidos com uma única substituição independentemente na posição 4 ou 7 e um péptido com substituições em ambas as posições 4 e 7. Enquanto que podia ocorrer uma mistura de análogos de 5-fluoro-l-triptofano e 5-fluoro-d-triptofano no caso das substituições únicas, era possível uma mistura de quatro combinações enantioméricas no caso da substituição dupla. Cada uma das misturas de péptidos foi submetida a HPLC de fase inversa para separar os enantiómeros peptídicos. A

identificação dos enantiómeros foi realizada por digestão dos péptidos com protease V8 e subsequentemente análise do produto digerido utilizando MALDI. A protease V8 cliva no lado do terminal C dos resíduos de Asp só quando seguida por um *l*-aminoácido. A identificação dos produtos de clivagem nos espectros de massa indicaram que o péptido *l*-enantiomérico eluiu em primeiro lugar, seguido pela forma *d*, em que não foram detectados fragmentos de clivagem.

Todos os péptidos, contendo 5-fluoro-*l*-triptofano ou 5-fluoro-*d*-triptofano, ou ambos, foram testados quanto à sua actividade inibidora do complemento. O péptido sintético substituído com 5-fluoro-*l*-triptofano em ambas as posições mostrou uma actividade 2,5 vezes mais elevada do que a de Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (Tabela 3).

Tabela 3. Actividade inibidora do complemento dos análogos sintéticos de compstatina contendo 5-fluoro-*l*-triptofano

Péptido	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (μ M)	Actividade relativa*
Ac-V4W/H9A	5	1,20	45
Ac-V4(5f- <i>l</i> -W)/H9A	18	1,74	31
Ac-V4W/W7(5f- <i>l</i> -W)/H9A	19	0,446	121
Ac-V4(5f- <i>l</i> -W)/W7(5f- <i>l</i> -W)/H9A	20	0,482	112

* relativa à actividade do péptido H-I(CVVODWGHRC)T-NH₂ (compstatina, SEQ ID NO:1)

Os ensaios de inibição do complemento (Figura 2, Tabela 3) indicaram que (a) a substituição de 5-fluoro-*l*-

triptofano na posição 4 só tornou o péptido pelo menos 1,5 vezes menos activo do que Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5). A substituição de 5-fluoro-1-triptofano só na posição 7 aumentou a actividade em 2,7 vezes quando comparado com Ac-V4W/H9A. A substituição de 5-fluoro-1-triptofano simultaneamente nas posições 4 e 7 também produziu um aumento de 2,5 vezes na actividade em relação ao Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5). A substituição de 5-fluoro-d-triptofano em qualquer das posições 4 ou 7, ou ambas, tornou o péptido inactivo.

EXEMPLO 8

Base termodinâmica para o reconhecimento mediado por triptofano de compstatina por C3

Utilizou-se a calorimetria de titulação isotérmica para examinar a ligação dos péptidos a C3 e investigar a base termodinâmica para as suas actividades. Os dados calorimétricos obtidos para a interacção de todos os péptidos com C3 ajustam-se a um conjunto de um modelo de sítios com estequeometria próxima de 1. Crê-se que a ligação destes péptidos a C3 ocorre numa proporção de 1:1. Os parâmetros termodinâmicos resultantes desses ajustamentos estão apresentados na Tabela 4. Como é evidente a partir dos valores de K_d , o péptido com uma única substituição de 5-fluoro-1-triptofano na posição 7 e uma substituição dupla nas posições 4 e 7 apresentou ligação mais forte do que os análogos de Ac-V4W/H9A (SEQ ID

NO:5) e Ac-V4(5f-1-W)/H9A (SEQ ID NO:18). Esta constatação está de acordo com as actividades relativas observados no ensaio de inibição do complemento (Tabela 3), indicando que existe uma correlação actividade-ligação.

Todos os péptidos se ligaram a C3 com uma entalpia negativa e entropia positiva. Essa ligação é uma característica da interacção da compstatina com C3. Entre todos os péptidos examinados, o análogo de Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A substituído na posição 7 (SEQ ID NO:19) apresentou maior entalpia de ligação ($\Delta H = -21,83$, $\Delta\Delta H = -3,69$) do que o seu homólogo de tipo selvagem. O análogo Ac-V4(5f-1-W)/H9A substituído na posição 4 (SEQ ID NO:18) ligou-se a C3 com uma entalpia de $-16,69$ kcal/mole, $1,45$ kcal/mol menor do que a apresentada pelo seu homólogo de tipo selvagem.

A incorporação do 5-fluoro-triptofano na posição 4 conduziu a uma perda de entalpia de $1,45$ kcal/mol em relação à de triptofano nesta posição (Tabela 4). Uma vez que a única diferença entre o triptofano e 5-fluoro-triptofano é o átomo de flúor em C5 do indole, esta perda de entalpia pode ser atribuída à substituição de hidrogénio por flúor.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos para a interacção de análogos sintéticos de compstatina contendo 5-fluoro-1-triptofano e C3

Peptide	SEQ ID	Kd (μ M)	(kcal/mole)					
			ΔH	$\Delta\Delta H$	$-T\Delta S$	$-T\Delta\Delta S$	ΔG	$\Delta\Delta G$
Ac-V4W/H9A	5	0,14	-18,14	0	8,79	0	-9,4	0
Ac-V4(5f-1-W) /H9A	18	0,15	-16,69	1,45	7,39	-1,4	-9,4	0
Ac-V4W/W7(5f-1-W) /H9A	19	0,035	-21,83	-3,69	11,56	2,77	-10,25	-1
Ac-V4(5f-1-W) /W7(5f-1-W) /H9A	20	0,017	-17,33	0,81	6,73	-2,06	-10,6	-1,2

A incorporação do 5-fluoro-triptofano na posição 7 aumentou a entalpia em 3,69 kcal/mol em relação ao tipo selvagem (Tabela 4). Sem ficar limitado a qualquer mecanismo específico, crê-se que o triptofano na posição 7 está a participar numa interacção entalpicamente favorável como ligação de hidrogénio. Substituindo um dos hidrogénios do indole com um átomo de flúor pode reforçar o carácter de ligação de hidrogénio do NH do indole devido à queda do pK_a . Alternativamente, o flúor forma uma ligação de hidrogénio como resultado da sua natureza de electrodoadora, como foi demonstrado na estrutura da tetradeça (3-fluorotirosil)glutationa transferase.

Outra explicação para o aumento de entalpia observado é que uma molécula de água é a ponte de interacção entre o átomo de flúor e um aceitador de

hidrogénio em C3, caso em que duas ligações de hidrogénio (equivalentes a uma energia de cerca de 4 kcal/mol) precisam de ser formadas. O suporte para esta teoria vem da decréscimo de entropia observado para a interacção do análogo Ac-V4W/W7(5fW)/H9A substituído na posição 7 (SEQ ID NO:19) em relação ao análogo de tipo selvagem (Tabela 4), um decréscimo que poderia ser produzido pela ligação de uma molécula de água adicional na interface. As interacções mediadas por água entre átomos de flúor e outros aceitadores de ligações de hidrogénio têm sido observadas noutras sistemas.

A ligação do análogo duplamente substituído a C3 deu uma variação de entalpia de -19,85 kcal/mole, uma alteração de entropia de -9,35 kcal/mol e uma variação de energia livre de -10,5 kcal/mol. Crê-se que a incorporação de 5-fluoro-triptofano simultaneamente em ambas as posições anula os efeitos das substituições individuais.

EXEMPLO 9

Análogos de compstatina adicionais

Incorporação de análogos de triptofano na posição

4. Foi demonstrado nos Exemplos 5 e 6 que a substituição de valina por triptofano na posição 4 da compstatina aumentou a sua actividade 45 vezes. Para investigar mais a natureza da interacção mediada pelo resíduo na posição 4 no decurso da ligação de compstatina a C3, o triptofano na posição 4

foi substituído com análogos de triptofano e 2-naftilalanina.

Utilizou-se ensaios baseados em ELISA para testar a actividade de todos os análogos peptídicos tendo os análogos de triptofano na posição 4 e alanina na posição 9. Enquanto que a substituição com 1-metil-triptofano (Ac-V4(1-metil-W)/H9A) (SEQ ID NO:23) e 2-naftilalanina (Ac-V4(2-Nal)/H9A) (SEQ ID NO:7) aumentou a actividade em relação à compstatina 264 e 99 vezes, respectivamente, a substituição de 5-fluoro-triptofano (Ac-V4(5f-1-W)/W7/H9A) (SEQ ID NO:18 e 5-metil triptofano (Ac-V4(5-metil-W)/H9A) (SEQ ID NO:22) resultou numa actividade mais baixa; a 31 e 67 vezes maior do que a actividade apresentada pelo péptido de tipo selvagem (Tabela 5). A Figura 3 mostra as curvas de inibição que descrevem a actividade e a Tabela 5 mostra os valores da IC_{50} calculados a partir das curvas e as actividades relativas dos péptidos, em comparação com a actividade da compstatina original. A Figura 5 mostra as constantes de inibição (IC_{50}) traçadas em função dos valores de log P de análogos de triptofano e 2-naftilalanina.

Tabela 5. Actividade inibidora do complemento dos análogos de compstatina

Péptido	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (μ M)	Actividade relativa*
Ac-V4W/H9A	5	1,20	45
Ac-V4(5f-1-W)/H9A	18	1,74	31
Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A	19	0,446	121
Ac-V4(5f-1-W)/W7(5f-1-W)/H9A	20	0,482	112
Ac-V4W/7(5-metoxi W)/H9A	29	0,46	0,5
Ac-V4(5-metoxi W)/7W/H9A	21	0,71	76
Ac-V4(5-metil W)/7W/H9A	22	0,81	67
Ac-V4(1-metil W)/7W/H9A	23	0,205	264
Ac-V4(2-Nal)/W7/H9A	7	0,545	99
Ac-V4(1-metil W)/7W(5f-1-W)/H9A	24	0,205	264

* relativa à actividade de H-I (CVVQDWGHRC) T-NH₂ (compstatina, SEQ ID NO:1)

A ligação de péptidos de compstatina também foi investigada utilizando calorimetria de titulação isotérmica. Os dados calorimétricos obtidos para a interacção de todos os péptidos com C3 adaptam-se a um conjunto de um modelo de sítios com estequeometria próxima de 1 (Figura 4). Este resultado sugere que a ligação destes péptidos a C3 ocorre numa proporção de 1:1. Os parâmetros termodinâmicos que resultaram destas adaptações estão apresentados na Tabela 6. Como é evidente a partir dos

valores de K_d , Ac-V4(1-metil-W)/H9A apresentou maior afinidade de ligação ($K_d = 0,015 \mu M$) em comparação com todos os outros péptidos tendo uma só substituição na posição 4. Traçando um gráfico destes valores em função dos valores de log P de análogos indica que existe uma correlação entre a afinidade de ligação e a natureza hidrofoba dos análogos de triptofano e 2-naftilalanina. De acordo com a correlação, a afinidade de ligação aumenta com um aumento da hidrofobia do análogo incorporado na posição 4. Esta observação é consistente com a correlação mostrada entre log P e as constantes de inibição.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos para a interacção de análogos sintéticos de compstatina contendo 5-fluoro-1-triptofano e C3

péptido	SEQ ID NO:	K_d (μM)	(kcal/mole)					
			ΔH	$\Delta\Delta H$	$-\Delta S$	$-\Delta\Delta S$	ΔG	$\Delta\Delta G$
Tipo selvagem	1	0,14	-18,14	0	8,79	0	-9,4	0
Ac-V4(5f-1-W)/H9A	18	0,15	-16,69	1,45	7,39	-1,4	-9,4	0
Ac-V4(5-metil-W)/H9A	22	0,12	-17,75	0,34	8,2	-0,54	-9,55	-0,15
Ac-V4(1-metil-W)/H9A	23	0,015	-17,59	0,81	6,94	-1,85	-10,65	-1,1
Ac-V4(2-Nal)/H9A	7	0,11	-14,27	3,87	4,8	-3,99	-9,5	-0,1
Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A	19	0,035	-21,83	-3,69	11,56	2,77	-10,25	-1
Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-1-W)/H9A	24	0,017	-17,33	0,81	6,73	-2,06	-10,6	-1,2

Todos os péptidos se ligaram a C3 com uma entalpia negativa e entropia positiva, sugerindo que a ligação é determinada pela entalpia. Essa ligação é uma característica da interacção da compstatina com C3. No entanto, a ligação destes péptidos é caracterizada por uma variação de entalpia menor do que a de tipo selvagem, e a variação de entropia deslocou-se para um fim favorável. A Figura 5B mostra um gráfico de $\log P$ em função de $-\Delta S$, que indica que com um aumento da hidrofobia dos análogos incorporados na posição, a entropia é mais favorecida tendo assim um impacto positivo na variação da energia livre.

Incorporação de análogos de triptofano na posição

7. Foi proposto no Exemplo 7 que o triptofano na posição 7 forma uma ligação de hidrogénio com um resíduo em C3. Para examinar mais esta possibilidade, o triptofano na posição 7 foi substituído por análogos de triptofano semelhantes às substituições na posição 4 para elucidar a natureza da interacção feita pelo triptofano nesta posição. A substituição com 5-fluoro-triptofano (Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A) (SEQ ID NO:19) deu um péptido 121 vezes mais activo (Figura 3, Tabela 5). As substituições de triptofano 7 com o análogo 5-metil Trp ou 1-metil Trp tornaram a compstatina inactiva (dados não apresentados). Assim, não foi observada correlação entre a actividade e a hidrofobia de análogos de triptofano.

As propriedades termodinâmicas dos diferentes 7-análogos de Trp foram investigadas em paralelo por calorimetria (Tabela 6). Uma vez que nenhuma ligação foi

detectada para péptidos contendo quer 5-metil trp ou 1-metil trp na posição 7, não existem os parâmetros de ligação. Só o péptido Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A (SEQ ID NO:19) se ligou a C3. A afinidade de ligação era 0,035 μ M, que é maior do que a observado para todos os péptidos tendo um análogo de Trp na posição 4, com excepção do péptido Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23). Em contraste com os péptidos que têm um análogo de Trp na posição 4, Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A (SEQ ID NO:19) ligou-se a C3 com variação de entalpia de ligação favorável elevada ($\Delta H = -21,83$, $\Delta\Delta H = -3,69$) e variação de entropia desfavorável ($-T\Delta S = 11,56$, $-T\Delta\Delta S = 2,77$), sugerindo interacções não covalentes favoráveis adicionais de natureza polar.

Os resultados mostram que a incorporação de 5-fluoro-triptofano na posição 7 resulta num aumento da actividade da compstatina, enquanto que a incorporação dos análogos 5-metil-triptofano e 1-metil-triptofano torna a compstatina inactiva. A perda de actividade da compstatina por incorporação de 1-metil-triptofano apoia a conclusão de que a ligação de hidrogénio mediada por NH de Trp 7 é importante para a interacção da compstatina com C3. Além disso, a perda completa de actividade da compstatina por incorporação de 5-metil-triptofano sugere que um aminoácido hidrofóbo não é bem tolerada na posição 7.

Incorporação de análogos de triptofano em ambas as posições 4 e 7. Uma vez que a substituição de triptofanos na posição 4 com 1-metil-triptofano e na

posição 7 com 5-fluoro-triptofano deu análogos de compstatina que mostraram um aumento drástico de actividade, foi produzido um análogo de compstatina contendo substituições nas posições 4 e 7. O péptido resultante (Ac-V4(1-metil-W)/W7(5f-1-W)/H9A) (SEQ ID NO:24) produziu uma curva de inibição semelhante à da substituição só com 1-metil-triptofano (Ac-V4(1-metil-W)/H9A) (SEQ ID NO:23), (Figura 3, Tabela 5). A afinidade de ligação ($K_d = 0,017$) observada para este péptido no calorímetro é também semelhante à do Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23). Estas observações sugerem que o 5-fluoro-triptofano não tem qualquer efeito na posição 7 na presença de 1-metil-triptofano na posição 4 nestas condições experimentais.

Incorporação de outro análogo de triptofano na posição 4. Para investigar mais a natureza da interacção mediada por resíduo na posição 4 no decurso da ligação de compstatina a C3, o triptofano na posição 4 foi substituído pelo análogo de triptofano 1-formil-triptofano.

A Figura 6 mostra uma comparação da percentagem de inibição do complemento em função da concentração de péptido para Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (círculos) e Ac-V4(1-formil-W)/H9A (SEQ ID NO:25). Como se pode observar, o análogo 1-formil-W era essencialmente idêntico ao análogo 1-metil-W na sua actividade de inibição do complemento.

EXEMPLO 10**PEGuilação de análogo de compstatina**

Um prolongamento da semi-vida de compstatina é vantajoso para a sua utilização em tratamentos crónicos. O prolongamento da semi-vida de péptidos terapêuticos testados tem sido conseguido em vários casos através de PEGuilação (ver Veronese *et al.*, 2001), uma vez que PEG tem a capacidade de atrasar a eliminação de biomoléculas da circulação através de uma variedade de mecanismos, incluindo a diminuição da eliminação renal, proteólise e imunogenicidade. A PEGuilação envolve a ligação covalente de polímeros de PEG a macromoléculas, preferencialmente à amina primária de lisinas.

Este exemplo descreve a preparação de um análogo de compstatina PEGuilado, Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) e avaliação do composto quanto à sua aptidão para inibir a activação do complemento.

Fmoc-NH-NHS-PEG 5000 foi adquirido a Nektar transforming therapeutics, 490 Discovery Dr, Huntsville, AL 35806.

O composto Ac-V4(1-metil-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) foi sintetizado quimicamente por química de péptidos em fase sólida Fmoc de acordo com um protocolo corrente modificado. Resumidamente, o PEG foi dissolvido em

3 mL de diclorometano, adicionou-se manualmente 1 mL de DIEA 2M e o PEG foi misturado durante 5 minutos.

Em seguida, o PEG foi transferida para o reactor e deixados acoplar de um dia para o outro. O PEG foi então desprotegido com piperidina a 20% durante 20 min.

Depois a síntese prosseguiu de acordo com o protocolo corrente, com uma lisina incorporada no terminal C da molécula com o objectivo de ligar o PEG à sua cadeia lateral.

As clivagens finais dos péptidos foram realizadas com Reagente D (TFA:H₂O:TIS:Fenol, 87,5:5:2,5:5) (4 mL) a 25°C durante 90 min, para dar o produto desejado. O péptido foi então purificado numa coluna de HPLC C18 de fase inversa, liofilizado e caracterizado por MALDI-TOF.

O análogo de compstatina PEGuilado foi testado quanto à actividade inibidora do complemento utilizando o ensaio *in vitro* descrito no Exemplo 4. Como ilustrado na Figura 7, o análogo PEGuilado era activo na inibição da activação do complemento, no entanto era necessário sete vezes mais conjugado para atingir a mesma quantidade de inibição que o análogo não PEGuilado, Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23).

EXEMPLO 11**Conjugado de proteína de ligação de albumina do análogo de compstatina**

Dennis *et al.* (2002) identificaram uma série de péptidos possuindo a sequência de núcleo DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:37) que se liga especificamente a albumina de soro de múltiplas espécies com elevada afinidade. Estes péptidos ligam-se a albumina com estequeometria 1:1 num sítio distinto dos sítios de ligação conhecidos de moléculas pequenas. O péptido SA21 (AcRLIEDICLPRWGCLWEDDNHE; SEQ ID NO:38) tem uma semi-vida invulgarmente longa de 2,3 h quando injectado por bolus intravenoso em coelhos. Como mencionado na Descrição Pormenorizada, uma sequência relacionada, fundida com o factor anti-tecido Fab de D3H44 permitiu que Fab se ligasse a albumina com afinidade semelhante à de SA21 mantendo a capacidade do Fab para se ligar ao factor de tecido 1 (Nguyen *et al.*, 2006). Esta interacção com albumina resultou em eliminação *in vivo* reduzida de 25-58 vezes em murganhos e coelhos, respectivamente, quando comparada com o Fab de D3H44 de tipo selvagem. A meia-vida foi prolongada 37 vezes para 32,4 h em coelhos e 26 vezes para 10,4 h em murganhos, obtendo-se 25-43% da semi-vida da albumina nestes animais. Estas semi-vidas excederam as de uma Fab 2 e são comparáveis com as observadas para as moléculas de Fab PEGuilado, imunoadesinas e fusões de albumina.

Este exemplo descreve a síntese de um análogo de compstatina fundido com um péptido de ligação de albumina e ensaios *in vitro* da sua actividade para inibição do complemento.

O composto 4(1MeW)-ABP foi sintetizado quimicamente por química de péptidos em fase sólida Fmoc de acordo com protocolos correntes. Os terminais N e C do péptido foram protegidos com grupos acetilo e amida. O péptido foi adicionalmente purificado por HPLC numa coluna C18 de fase inversa, liofilizado e caracterizado por espectrometria de massa MALDI.

Para ciclização, o péptido-resina (0,10 mmol/g de carga com base na análise de aminoácidos) foi inchado em diclorometano (DCM) (2 mL) durante 5 min, filtrado e tratado com DCM/TFA/TIS 94:1:5 (5 mL) a 25°C 3 vezes x 2 min cada para desproteger selectivamente os grupos protectores S-MmT, removendo-se o solvente com pressão de N₂. Estes intermediários bis(tiol), bis(Acm)-péptido-resina foram lavados com CH₂Cl₂, DMF e NMP (cada 5 vezes x 2 min, 2 mL), adicionalmente inchados em NMP (2 mL) durante 5 min e depois tratados com Et₃N (2 eq.) em NMP a 25°C durante 4 h. O péptido-resina foi depois lavado com DMF e CH₂Cl₂ (cada 5 vezes x 2 min, 2 mL). Após as formações ligadas à resina da primeira ansa, o péptido-resina foi novamente lavado com DMF (5 vezes x 2 min, 2 mL) e inchado em DMF (2 mL) durante 5 min, filtrado e tratado com Tl(tfa)3 (1,5 eq.) em DMF-anisole (4 mL) para ciclizar as segundas ansas

dissulfureto. Após agitação suave a 25°C durante 4 h, os reagentes de tálio foram removidos com DMF (8 vezes x 2 min, 2 mL) e os péptidos-resinas foram adicionalmente lavados com CH₂Cl₂ (5 vezes x 2 min, 2 mL). As clivagens finais do péptido bicíclico foram feitas com Reagente D (TFA:H₂O:TIS:Fenol, 87,5:5:2,5:5) (4 mL) a 25°C durante 90 min, para dar o produto desejado.

O péptido conjugado resultante (SEQ ID NO:39) está apresentado a seguir:



O péptido compstatina de ligação a albumina foi testado quanto à actividade inibidora do complemento utilizando o ensaio *in vitro* descrito no Exemplo 4. Como ilustrado na Figura 8, o conjugado foi activo na inibição da activação do complemento, contudo foi necessário sete vezes mais conjugado para atingir a mesma quantidade de inibição que o análogo não conjugada, Ac-V4(1-metil-W)/H9A (SEQ ID NO:23).

Referências:

Babitzke P. e Yanofsky C. (1995) Structural features of L-tryptophan required for activation of TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 270:12452-6.

Beeley N. (1994) Peptidomimetics and small-molecule drug design: towards improved bioavailability and *in vivo* stability. *Trends Biotechnol.* 12:213-6.

Beene D. L., Brandt G. S., Zhong W., Zacharias N. M., Lester H. A. e Dougherty D. A. (2002) Cation- pi interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT3A) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry*. 41:10262-9.

Dennis M. S., Zhang M., Meng Y. G., Kadfcodayan M., Kirchhofer D., Combs D., Damico L. A. (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.* 277:35035-43

Fiane A. E., Mollnes T. E., Videm V., Hovig T., Hogasen K., Mellbye O. J., Spruce L., Moore W. T., Sahu A. e Lambris J. D. (1999a) Prolongation of *ex vivo*-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. *Transplant. Proc.* 31:934-5.

Fiane A. E., Mollnes T. E., Videm V., Hovig T., Hogasen K., Mellbye O. J., Spruce L., Moore W. T., Sahu A. e Lambris J. D. (1999b) Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of *ex vivo* perfused pig xenografts. *Xenotransplantation*. 6:52-65.

Fiane A. E., Videm V., Lambris J. D., Geiran O. R., Svennevig J. L. e Mollnes T. E. (2000) Modulation of fluid-

phase complement activation inhibits hyperacute rejection in a porcine-to-human xenograft model. *Transplant. Proc.* 32:899-900.

Furlong S. T., Dutta A. S., Coath M. M., Gormley J. J., Hubbs S. J., Lloyd D., Mauger R. C., Strimpler A. M., Sylvester M. A., Scott C. W. e Edwards P. D. (2000) C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology* 48:199-212.

Hruby V. J. (1993) Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides. *Biopolymers* 33:1073-82.

Kalli K. R., Hsu P. e Fearon D. T. (1994) Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417-31.

Katragadda M., Morikis D. e Lambris J. D. (2004) Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. *J. Biol. Chem.* 279:54987-95.

Klepeis J. L., Floudas C. A., Morikis D., Tsokos C. G., Argyropoulos E., Spruce L. e Lambris J. D. (2003) Integrated computational and experimental approach for lead optimization and design of compstatin variants with improved activity. *J. Am. Chem. Soc.* 125:8422-3.

Kozlowski A., Charles S. A. e Harris J. M. (2001) Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs* 15:419-29.

Mallik B., Katragadda M., Spruce L. A., Carafides C., Tsokos C. G., Morikis D. e Lambris J. D. (2005) Design and NMR Characterization of Active Analogs of Compstatin Containing Non-Natural Amino Acids. *J. Med. Chem.* 48:274-286.

Morikis D., Assa-Munt N., Sahu A. e Lambris J. D. (1998) Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sd.* 7:619-27.

Nguyen A., Reyes A. E. 2nd, Zhang M., McDonald P., Wong W. L., Damico L. A., Dennis M. S. (2006) The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. *Protein Eng. Des. Sel.* 19:291-7.

Nilsson B., Larsson R., Hong J., Elgue G., Ekdahl K. N., Sahu A. e Lambris J. D. (1998) Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood* 92:1661-7.

Sahu A., Kay B. K. e Lambris J. D. (1996) Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J. Immunol.* 157:884-91.

Soulika A. M., Khan M. M., Hattori T., Bowen F. W., Richardson B. A., Hack C. E., Sahu A., Edmunds L. H. Jr. e Lambris J. D. (2000) Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons. *Clin. Immunol.* 96:212-21.

Spruce L., E. Argyropoulos, D. Mastellos, G. Sfyroera e J. D. Lambris (2002) Chemical synthesis of small complement proteins and protein modules. *International Immunopharmacology* 2: 1320-1321.

Veronese F. M. (2001) Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 22:405-417.

Wang Y., Hu Q., Madri J. A., Rollins S. A., Chodera A. e Matis L. A. (1996) Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8563-8.

Zhao B., Helms L. R., DesJarlais R. L., Abdel-Meguid S. S. e Wetzel R. (1995) A paradigm for drug discovery using a conformation from the crystal structure of a presentation scaffold. *Nat. Struct. Biol.* 2:1131-7.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto que inibe a activação do complemento, compreendendo um péptido tendo a sequência: Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5 (SEQ ID NO:26), em que:

Xaa1 é Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ou um dipéptido Gly-Ile;

Xaa2 é Trp ou um análogo de Trp, em que o análogo de Trp tem carácter hidrófobo aumentado em comparação com Trp e é seleccionado de um triptofano halogenado, 5-metoxitriptofano, 5-metiltriptofano e 1-metiltriptofano, com a condição que se Xaa3 é Trp, Xaa2 é o análogo de Trp;

Xaa3 é Trp ou um análogo de Trp que tem um hidrogénio do indole substituído por um átomo de flúor, aumentando assim o potencial de ligação de hidrogénio do anel de indole;

Xaa4 é His, Ala, Phe ou Trp;

Xaa5 é L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, um dipéptido Thr-Asn ou Thr-Ala, ou um tripéptido Thr-Ala-Asn, em que um -OH do terminal carboxilo de qualquer de L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ou Asn está opcionalmente substituído por -NH₂, e

os dois resíduos Cys estão unidos por uma ligação

dissulfureto.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que o análogo de Trp de Xaa2 é 5-fluoro-1-triptofano ou 6-fluoro-1-triptofano.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que o análogo de Trp de Xaa2 é 5-metoxitriptofano ou 5-metiltriptofano.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que o análogo de Trp de Xaa2 é 1-metiltriptofano.

5. Composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que Xaa4 é Ala.

6. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que Xaa2 é 1-metiltriptofano, Xaa3 é opcionalmente um análogo de Trp que tem um hidrogénio do indole substituído por um átomo de flúor e Xaa4 é Ala.

7. Composto de acordo com a reivindicação 6, em que o análogo de Trp opcional de Xaa3 é 5-fluoro-1-triptofano.

8. Composto de acordo com a reivindicação 1, compreendendo qualquer das SEQ ID NOS:16-24.

9. Composto que inibe a activação do complemento, compreendendo um péptido tendo a sequência:

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5
(SEQ ID NO:26), em que:

Xaa1 é Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu ou um dipéptido Gly-Ile;

Xaa2 é Trp ou um análogo de Trp, em que o análogo de Trp é um análogo que tem um substituinte alcanoílo inferior na posição 1 do triptofano e que tem carácter hidrófobo aumentado em comparação com Trp, com a condição de que se Xaa3 é Trp, Xaa2 é o análogo de Trp;

Xaa3 é Trp ou um análogo de Trp que é um triptofano halogenado, que é uma modificação química do seu anel de indole que aumenta o potencial de ligação de hidrogénio do anel de indole;

Xaa4 é His, Ala, Phe ou Trp;

Xaa5 é L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, um dipéptido Thr-Asn ou Thr-Ala, ou um tripéptido Thr-Ala-Asn, em que um -OH do terminal carboxílico de qualquer de L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly ou Asn está opcionalmente substituído por -NH₂, e

os dois resíduos Cys estão unidos por uma ligação dissulfureto.

10. Composto de acordo com a reivindicação 10, em que o análogo de Trp de Xaa2 é 1-formiltriptofano e Xaa4 opcionalmente é Ala.

11. Composto de acordo com a reivindicação 10, compreendendo a SEQ ID NO:25.

12. Composto de acordo com a reivindicação 9, 10 ou 11, compreendendo ainda um componente peptídico adicional que prolonga a retenção *in vivo* do composto, opcionalmente em que o componente peptídico adicional é um péptido de ligação de albumina; opcionalmente compreendendo a SEQ ID NO:39.

13. Composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, que compreende um péptido produzido por expressão de um polinucleotido que codifica o péptido.

14. Composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o composto é produzido pelo menos em parte por síntese de péptidos.

15. Composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o composto está PEGuilado; opcionalmente compreendendo a SEQ ID NO:36.

16. Composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, que inibe a activação do

complemento com uma actividade pelo menos 100 vezes maior do que um péptido compreendendo a SEQ ID NO:1 em condições de ensaio equivalentes.

17. Composto de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a SEQ ID NO:23.

18. Composto de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a SEQ ID NO:24.

Lisboa, 9 de Agosto de 2012

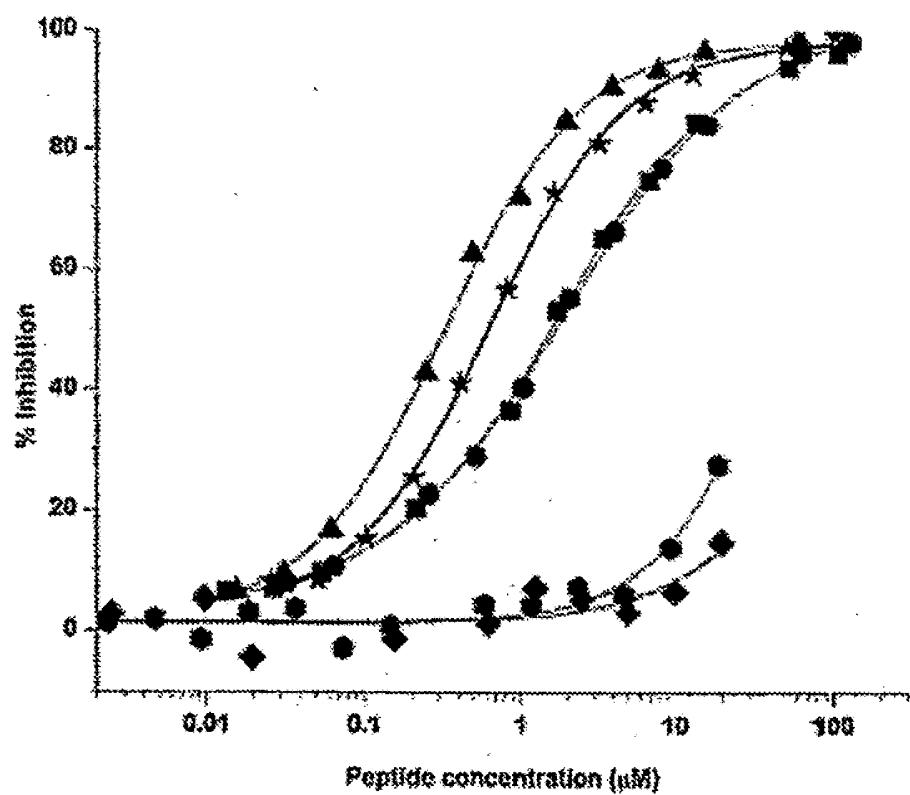


Fig. 1

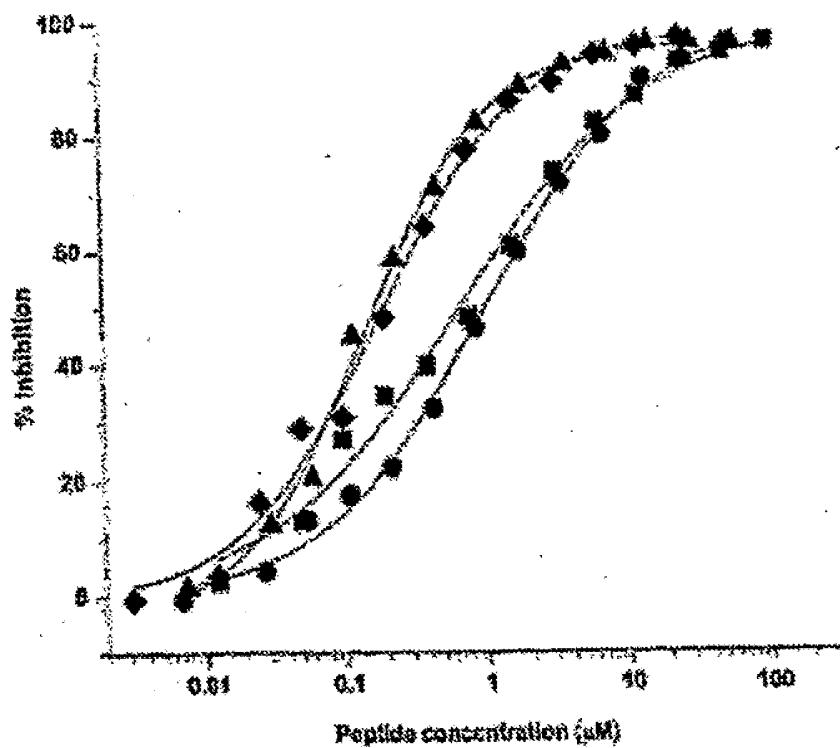
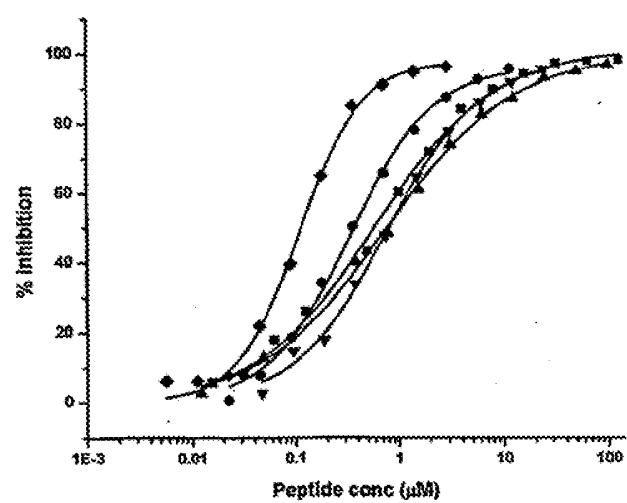
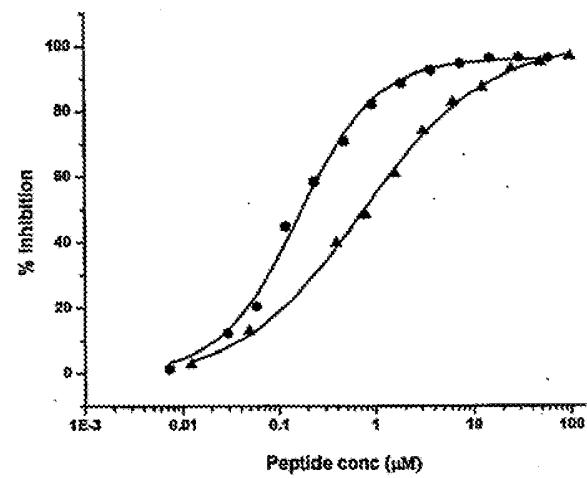


Fig. 2

Fig. 3a**Fig. 3b**

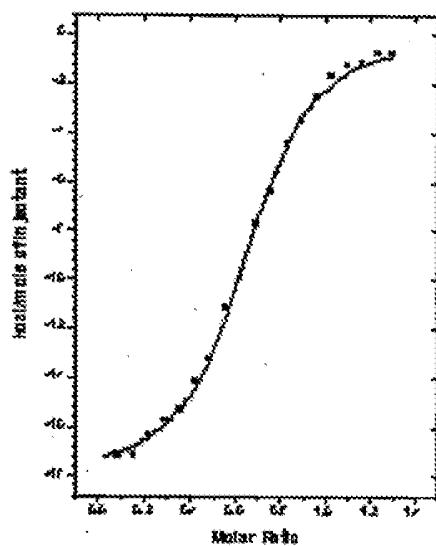


Fig. 4a

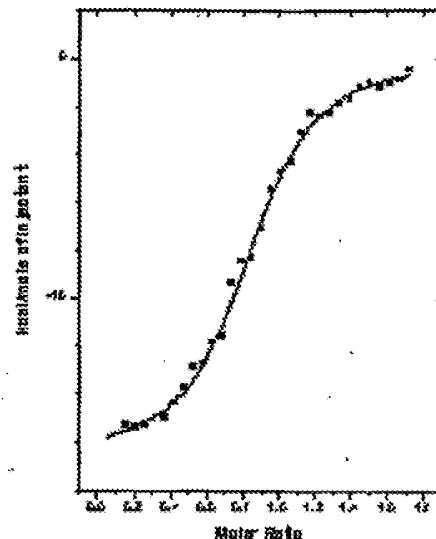
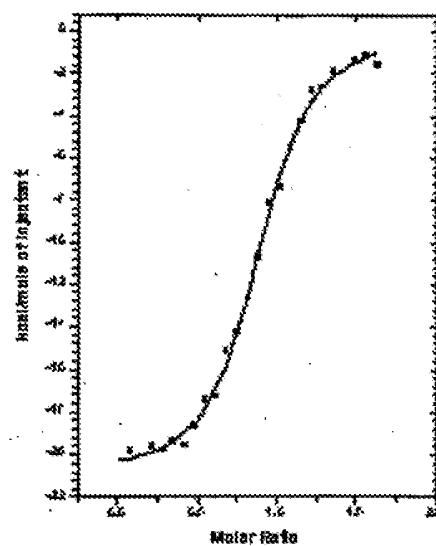


Fig. 4b

Fig. 4c



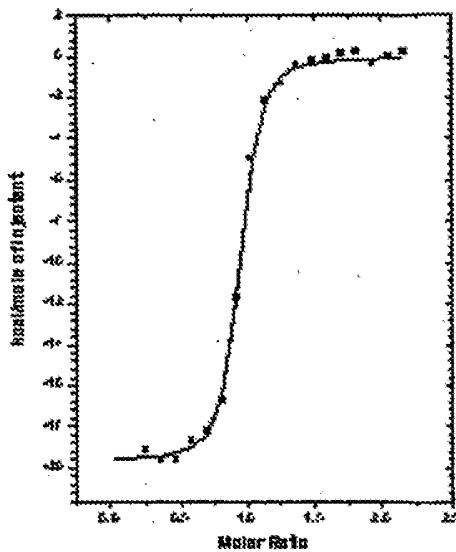


Fig. 4d

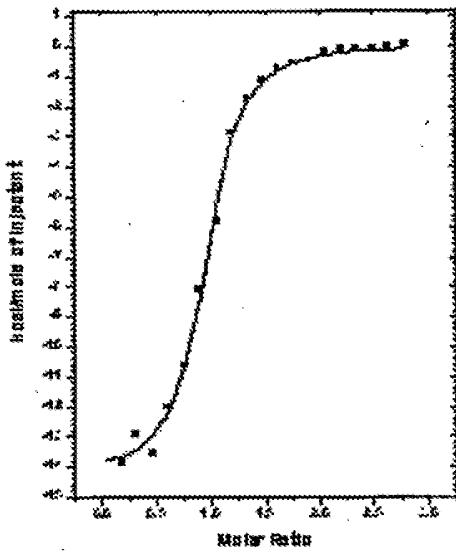


Fig. 4e

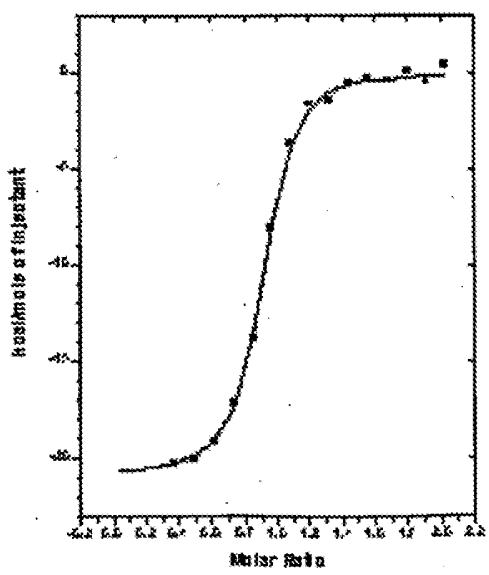


Fig. 4f

Fig. 5a

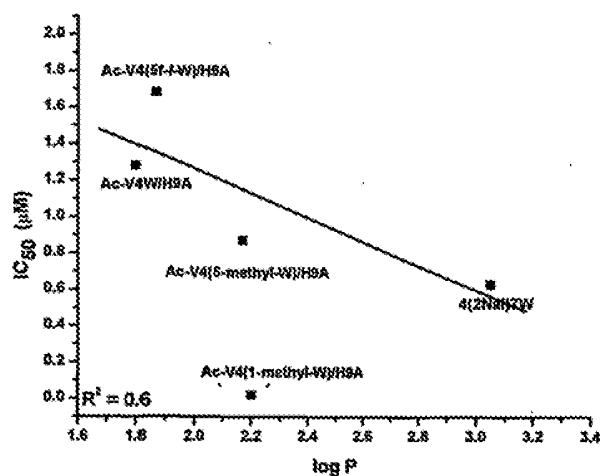


Fig. 5b

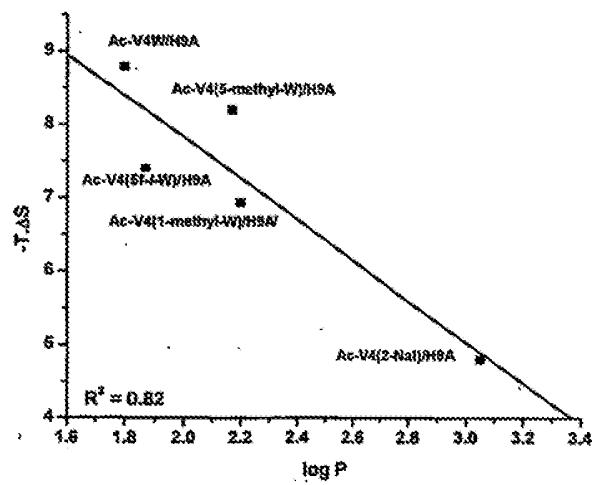
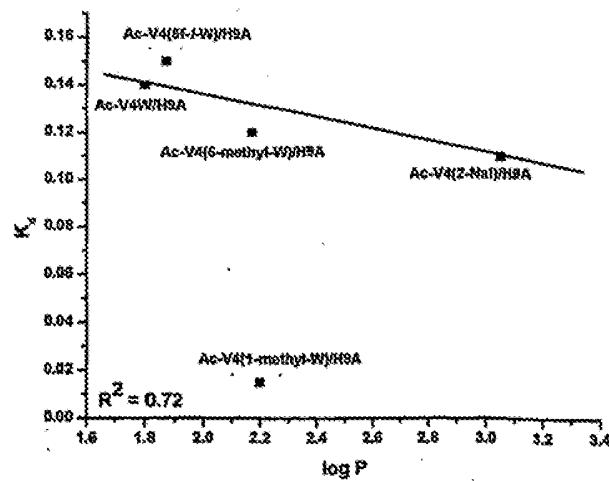


Fig. 5c



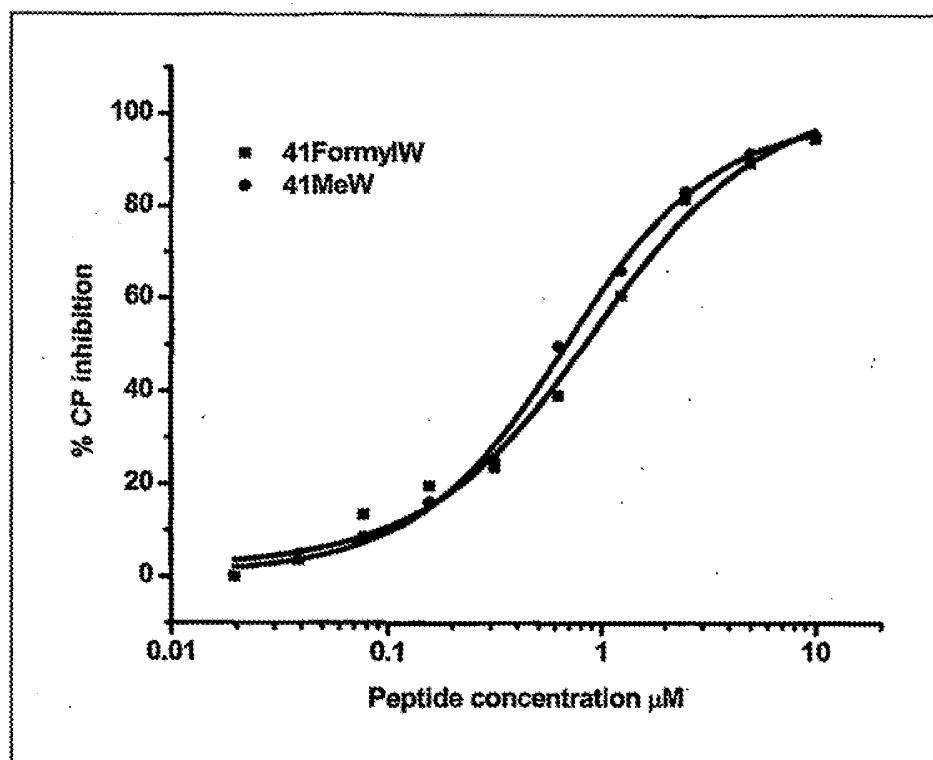


FIG. 6

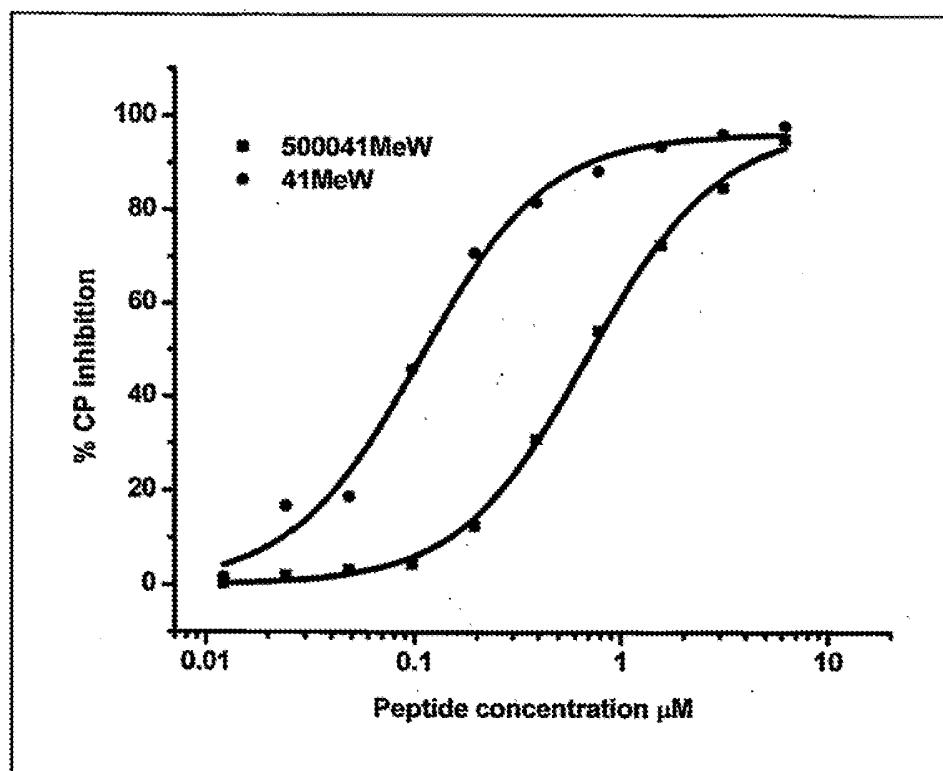


FIG. 7

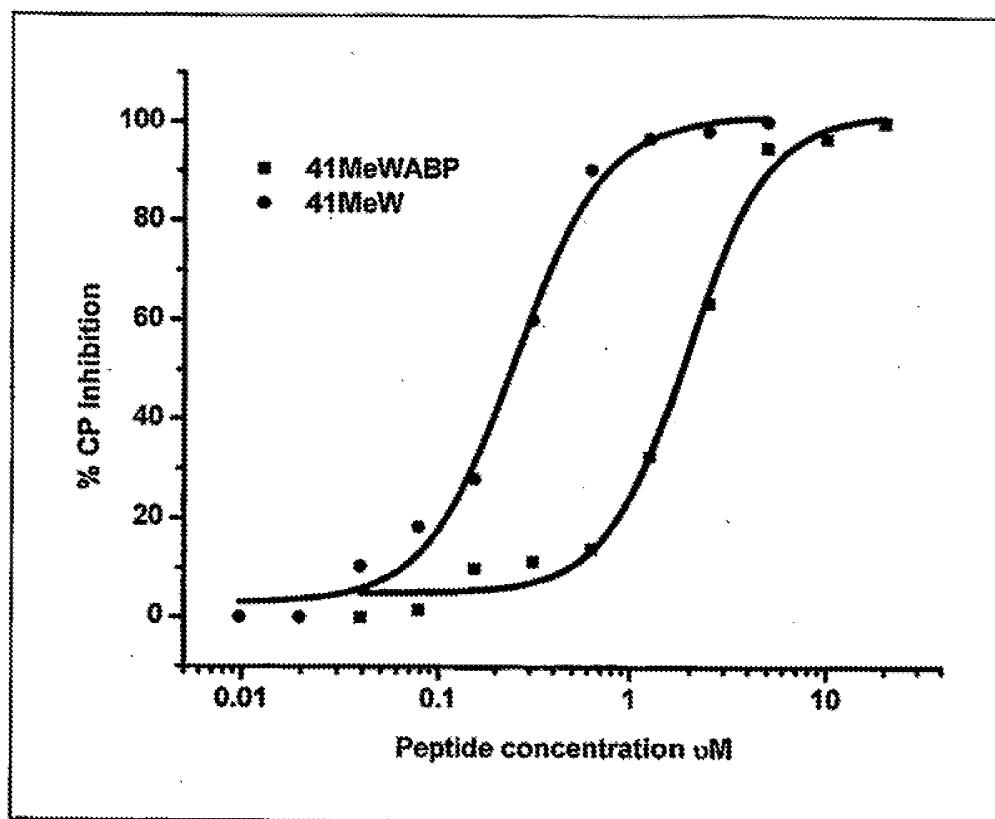


FIG. 8

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1, 2, 3a, 3b, 3c

Eixo horizontal: Concentração de péptido (μ M)

Eixo vertical: % de inibição

Figura 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f

Eixo horizontal: Razão molar

Eixo vertical: kcal/mole de injectado

Figura 5a, 5b, 5c

Manter

Figura 6, 7, 8

Eixo horizontal: Concentração de péptido (μ M)

Eixo vertical: % de inibição de CP

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na descrição

- US 6319897 B, Lambris
- WO 9913899 A, Morikis D
- WO 2004026328 A
- WO 2007044668 A
- WO 2004026326 A
- US 6214790 B
- US 6169057 B
- US 5776970 A
- US 4870097 A
- US 4576750 A
- US 4299838 A

Literatura que não é de patentes citada na descrição

- **Klepeis et al.** *J. Computational Chem.*, 1999, vol. 20, 1344-1370
- **Katragadda et al.** *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49 (15), 4616-4622
- **Beene et al.** *Biochemistry*, 2002, vol. 41, 10262-10269
- **Babitzky ; Yanofsky.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 12452-12456
- **G.R. Marshall.** *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, 3547-3558
- Molecular Conformation and Biological Interactions. **Hruby ; Nikiforovich.** Indian Acad. of Sci. 1991, 429-455
- Poly(ethylene glycol). Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Series, 1997
- **Babitzke P ; Yanofsky C.** Structural features of L-tryptophan required for activation of TRAP, the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 12452-6
- **Beeley N.** Peptidomimetics and small-molecule drug design: towards improved bioavailability and in vivo stability. *Trends Biotechnol.*, 1994, vol. 12, 213-6
- **Beene DL ; Brandt GS ; Zhong W ; Zacharias NM ; Lester HA ; Dougherty DA.** Cation-pi interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT3A) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry*, 2002, vol. 41, 10262-9
- **Dennis MS ; Zhang M ; Meng YG ; Kadkhodayan M ; Kirchhofer D ; Combs D ; Damico LA.** Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem.*, 2002, vol. 277, 35035-43
- **Fiane AE ; Mollnes TE ; Videm V ; Hovig T ; Hogasen K ; Mellbye OJ ; Spruce L ; Moore WT ; Sahu A ; Lambris JD.** Prolongation of ex vivo-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. *Transplant. Proc.*, 1999, vol. 31, 934-5
- **Fiane AE ; Mollnes TE ; Videm V ; Hovig T ; Hogasen K ; Mellbye OJ ; Spruce L ; Moore WT ; Sahu A ; Lambris JD.** Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. *Xenotransplantation*, 1999, vol. 6, 52-65
- **Fiane AE ; Videm V ; Lambris JD ; Geiran OR ; Svennevig JL ; Mollnes TE.** Modulation of fluid-phase complement activation inhibits hyperacute rejection in a porcine-to-human xenograft model. *Transplant. Proc.*, 2000, vol. 32, 899-900
- **Furlong ST ; Dutta AS ; Coath MM ; Gormley JJ ; Hubbs SJ ; Lloyd D ; Mauger RC ; Strimpler AM ; Sylvester MA ; Scott CW.** C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology*, 2000, vol. 48, 199-212
- **Hruby VJ.** Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides. *Biopolymers*, 1993, vol. 33, 1073-82
- **Kallil KR ; Hsu P ; Fearon and DT.** Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1994, vol. 15, 417-31
- **Katragadda M ; Morikis D ; Lambris JD.** Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, 54987-95
- **Klepeis JL ; Floudas CA ; Morikis D ; Tsokos CG ; Argyropoulos E ; Spruce L ; Lambris JD.** Integrated computational and experimental approach for lead optimization and design of compstatin variants with improved activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, 8422-3
- **Kozlowski A ; Charles SA ; Harris JM.** Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs*, 2001, vol. 15, 419-29