

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-177403

(P2013-177403A)

(43) 公開日 平成25年9月9日(2013.9.9)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|---------------|-------------|
| C07K 7/08 (2006.01) | C07K 7/08 ZNA | 4B024 |
| A61P 37/06 (2006.01) | A61P 37/06 | 4C084 |
| A61K 38/00 (2006.01) | A61K 37/02 | 4H045 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 A | |

審査請求 有 請求項の数 25 O L 外国語出願 (全 74 頁)

| | | | |
|--------------|-------------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2013-90484 (P2013-90484) | (71) 出願人 | 500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チェスナット ストリート 3160, スイート 200 |
| (22) 出願日 | 平成25年4月23日 (2013.4.23) | (74) 代理人 | 100081422 弁理士 田中 光雄 |
| (62) 分割の表示 | 特願2008-543388 (P2008-543388) の分割 | (74) 代理人 | 100084146 弁理士 山崎 宏 |
| 原出願日 | 平成18年11月28日 (2006.11.28) | (74) 代理人 | 100122301 弁理士 富田 憲史 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/740, 205 | (74) 代理人 | 100156111 弁理士 山中 伸一郎 |
| (32) 優先日 | 平成17年11月28日 (2005.11.28) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強力なコンプスタチン類似体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 C3タンパク質に結合し得、かつ補体活性化を阻害するペプチド及びペプチド擬態体を含む化合物を提供する。

【解決手段】 配列：Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5[式中、Xaa1はIle、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-LeuまたはGly-Ileを含むジペプチドであり；Xaa2はTrpまたはTrpの類似体であり、ここにTrpの類似体はTrpと比較して疎水性が強いものであるが、但し、Xaa3がTrpの場合は、Xaa2はTrpの類似体]を有するペプチドを含む、補体活性化を阻害することを特徴とする化合物。

【選択図】 なし

Xaa4がAlaであることを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項14】

Xaa2がトリプトファンの1位に低級アルケノイル基または低級アルキル基を含み、Xaa3がハロゲン化トリプトファンを任意に含んでもよく、Xaa4がアラニンを含むことを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項15】

Xaa2が1-メチルトリプトファンまたは1-ホルミルトリプトファンであり、かつXaa3が5-フルオロ-1-トリプトファンを任意に含んでもよいことを特徴とする請求項14に記載の化合物。

【請求項16】

配列番号15～25に記載の配列のいずれかを含むことを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項17】

ペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現によって産生されるペプチドを含むことを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項18】

化合物が少なくとも部分的にペプチド合成によって産生されることを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項19】

配列番号15～25の配列のうちいずれか一つを含むことを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項20】

化合物がベグ化されていることを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項21】

配列番号36を含むことを特徴とする請求項20に記載の化合物。

【請求項22】

化合物のインビボにおける保持を延長する付加的ペプチド化合物を含むことを特徴とする請求項1に記載の化合物。

【請求項23】

さらなるペプチド成分がアルブミン結合ペプチドであることを特徴とする請求項22に記載の化合物。

【請求項24】

配列番号39の配列を含むことを特徴とする請求項23に記載の化合物。

【請求項25】

配列番号26の非ペプチドまたは部分ペプチド擬態体を含む、補体活性化を阻害する化合物であって、C3に結合して、かつ同じアッセイ条件において配列番号1を含むペプチドより少なくとも100倍の補体活性阻害力を示す化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体内における補体カスケードの活性化に関する。特に、本発明はタンパク質C3に結合し、かつ補体活性化を阻害し得るペプチド及びペプチド擬態体(peptidomimetics)を提供する。

【背景技術】

【0002】

本出願は、2005年11月28日に提出され、本明細書に記載の引用文献を含めた全内容と同一である米国仮出願第60/740205号に基づく優先権を主張するものである。

【0003】

政府機関による支持

本明細書に開示された本発明は国立保険協会(NIH)により交付番号62134に基づく基金の

10

20

30

40

50

一部が使用されたものであり、米国特許法第202条に従って、米国政府機関が優先権を有することが承認されている。

【0004】

特許出願、公開された特許出願、技術誌、学術記事を含むさまざまな出版物から本明細書の全文を通して引用している。これらの各引用文献の全体を、参照することにより本明細書に一体化させる。本明細書には引用文献の全文を掲載していないが本明細書の最後に明記している。

【0005】

補体系は外来病原体に対する免疫学的防御の最初の系である。補体は古典経路、第二経路、またはレクチン経路を経由して活性化され、アナフィラトキシンペプチドC3aとC5aとを産生し、膜侵襲複合体C5b-9を形成する。補体成分C3は、前記3つすべての経路の活性化において中心的役割を担っている。補体経路を通過してC3コンベルターゼにより補体C3が活性化され、続いて前記補体C3が標的細胞の表面に付着することにより膜侵襲複合体の集合が生じ、最終的に標的細胞に損傷を与えるか、または、標的細胞を融解させる。補体C3は免疫監視機構及び免疫反応経路において重要な役割を有する多様なリガンド結合部位の多様性を提供し得る適応能に優れた構造を所有しているという点でユニークである。

10

【0006】

補体の不適切な活性化により宿主細胞が損傷することがある。補体はさまざまな自己免疫疾患を含むいくつかの病状と結び付けられる。すなわち、呼吸器症候群や心臓発作、異種間移植による拒絶反応、火傷による傷害等、他の臨床状態に影響を及ぼすことがわかっている。また、透析や人工心肺による生理的不和合性により補体媒介の組織傷害が引き起こされることもある。

20

【0007】

補体媒介の組織傷害は膜侵襲複合体によって直接的に引き起こされ、間接的にはペプチドC3a及びC5aの産生によって引き起こされる。これらのペプチド類は、好中球やマスト細胞を含む様々な細胞を媒介して損傷を与える。インビボでの活性化段階における補体C3及びC5は、血漿及び膜タンパク質の両者によって制御されている。血漿阻害タンパク質は補体H因子及びC4結合タンパク質であり、細胞表面にある調節性の膜タンパク質は補体受容体1 (CR1)、崩壊促進因子 (DAF) そして補体調節タンパク質 (MCP) である。これらのタンパク質は、サブユニット複合体の解離を促進することによって、かつ/または、前記複合体をプロテオリシス (第I因子により触媒される) により不活性化することによってC3及びC5コンベルターゼ (複合サブユニットプロテアーゼ) を阻害する。補体活性を阻害あるいは調節するいくつかの薬理剤はインビボの測定により確認されているが、それが低活性であるか、または中毒性であるかを調べる必要がある。

30

【0008】

今までのところ、補体活性化の阻害剤は、特に可溶性補体受容体1 (sCR1) として知られている補体受容体1の組み換え体やヒト化モノクローナル抗C5抗体 (5G1.1-scFv) 等、候補としては挙がっているが、臨床的に承認されているものは未だ存在しないのが現状である。これらの両物質は補体活性化が阻害されることがインビボ動物モデルで明らかとなっている (Kalli KR ら、1994; 及び、Wang ら、1996)。しかしながら、それぞれのタンパク質の分子量が大きい (それぞれ240 kDa と 26 kDa) という不都合があり、そのため製造が難しくかつ点滴による管理を要することとなる。それゆえに、輸送がより容易で、安定性があり、製造にコストがかからないような分子量のより小さい有効な薬剤の開発を目的とした研究がすすめられている。

40

【0009】

ランプリスらの米国特許第6,319,897号には、C3に結合し、かつ補体活性化を阻害するペプチドの27残基を同定するためにファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを使用したことが開示されている。このペプチドは、補体活性を維持した13残基の環状のセグメントに切断され、該セグメントはコンスタチンと当該分野で呼ばれている。コンスタチンは、C3コンベルターゼによってC3が切断されてC3a及びC3bが生成される

50

のを阻害する。現在、コンスタチンに関してインビトロ、インビボ、エクスビボ、インビボ/エクスビボの相互実験により試験が行われ、下記のこと立証されている。すなわち、(1) ヒト血清において補体の活性化を阻害する (Sahu A ら、1996) (2) 霊長類においてヘパリン/プロタミン誘発性の補体活性化を重大な副作用を引き起こすことなく阻害する (Soulika AM ら、2000) (3) ヒト血液により灌流されたブタ-ヒト間異種移植片の寿命を延長する (Fiene AE ら、1999a; Fiene AE ら、1999b; 及び、Fiene AE ら、2000) (4) 心肺バイパス、血漿交換、対外回路による透析のモデルにおける補体の活性化を阻害する (Nilsson B ら、1998) (5) 低毒性である (Furlong ST ら、2000)。

【0010】

コンスタチンはCys2とCys2とがジスルフィド結合を形成している配列ICVVQDWGHRCT-NH₂ (配列番号1)を有するペプチドである。この三次元構造は2つの独立に制限された計算方法におけるホモ原子核2D NMR分光測定法を用いて決定された。一つ目の計算方法は幾何学、分子動力学、シミュレートアニーリングを含み (Morikis D ら、1998; WO99/13899)、二つ目の計算方法は広域の最適化を含む (Klepeis ら、J. Computational Chem., 20:1344-1370, 1999)。コンスタチンの構造における分子表面の極性パッチの有無が明らかとなった。極性部分はタイプI型鎖を包含し、無極性パッチはジスルフィド結合を包含している。さらに、アラニン置換 (アラニンスキャン) に伴う一連の類似化合物を合成し、活性化のテストを行った結果、鎖の4残基と疎水性クラスター周囲のジスルフィド結合とがコンスタチンの阻害性活性化における重要な役割を担っていることがわかった (Morikis ら、1998; WO99/13899)。

【0011】

第二経路を経た赤血球溶血を測定するための補体活性アッセイを用いたところ、コンスタチンのIC₅₀は12μMであった。事前にテストした類似体の中にはコンスタチンの活性と同等またはそれ以上の活性を示すものもあった。国際公開番号WO2004/026328には、これらのアッセイ中で活性化の促進に係るコンスタチンのN末端及びC末端、並びに4位及び9位に変異がある類似体及び擬態体についての開示がある。類似体の中にはコンスタチンの99倍の活性を示すものが報告されている (Mallik ら、2005参照)。さらに高い活性を有するコンスタチン類似体あるいは擬態体についての開発研究が重要な意味を有するとして今後も継続されるだろう。

【0012】

発明の概要

本発明は、コンスタチンと比較して、改善された補体阻害活性を有する補体阻害ペプチド、すなわちコンスタチン (HOOC-ICVVQDWGHRCT-NH₂; 配列番号1)の類似体及び擬態体を提供するものである。

【0013】

一の態様において、本発明は補体活性化を阻害する化合物に関するものであり、この化合物は、配列:

Xaa1 - Cys - Val - Xaa2 - Gln - Asp - Xaa3 - Gly - Xaa4 - His - Arg - Cys - Xaa5 (配列番号:26)

[式中、Xaa1 は Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu または Gly-Ileを含むジペプチドであり;

Xaa2 はTrpまたはTrpの類似体であり、ここにTrpの類似体はTrpと比較して疎水性が強いものであるが、但し、Xaa3が Trpの場合は、Xaa2はTrpの類似体であり;

Xaa3はインドール環に化学修飾を含むTrpまたはTrpの類似体であり、ここに化学修飾はインドール環の水素結合能を高めるものであり;

Xaa4はHis、Ala、PheまたはTrpであり;

Xaa5はL-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、またはThr-Asn若しくはThr-Alaを含むジペプチド、またはThr-Ala-Asnを含むトリペプチドであり、ここに L-Thr、D-Thr、Ile、Val、GlyまたはAsnのいずれかのカルボキシ末端のOH基がNH₂基によって任意に置換されていてもよく; かつ2つのCys残基はジスルフィド結合によって結合されている]

10

20

30

40

50

を有するペプチドを含む。

【0014】

一実施態様について、Xaa2はC3との無極性相互作用に關与している。また、他の実施態様について、Xaa3はC3との間の水素結合に關与している。さらに他の実施態様について、Xaa2はC3との間の無極性相互作用に關与し、かつXaa3はC3との間の水素結合に關与している。

【0015】

様々な実施態様において、Xaa2に關するTrpの類似体は、5 - フルオロ - 1 - トリプトファンまたは6 - フルオロ - 1 - トリプトファンのようなハロゲン化トリプトファンである。また、他の実施態様として、Xaa2に關するTrpの類似体は、例えば5 - メトキシトリプトファンまたは5 - メチルトリプトファンのように、5位が低級アルコキシ置換基または低級アルキル置換基を含む。さらにまた、他の実施態様として、Xaa2に關するTrpの類似体は、代表的な1 - メチルトリプトファンまたは1 - ホルミルトリプトファンのように、1位が低級アルキル置換基または低級アルケノイル置換基を含む。また、他の実施態様として、Xaa3のTrpの類似体は、5 - フルオロ - 1 - トリプトファンまたは6 - フルオロ - 1 - トリプトファンのようなハロゲン化トリプトファンである。

10

【0016】

一実施態様において、トリプトファンの1位に低級アルケノイル置換基または低級アルキル置換基を含み、Xaa3はハロゲン化トリプトファンを任意に含んでいてもよく、Xaa4は、アラニンを含む。好適には、Xaa2が1 - メチルトリプトファンまたは1 - ホルミルトリプトファンで、かつXaa3が5 - フルオロ - 1 - トリプトファンを任意に含んでいてもよい。具体的な化合物としては、配列番号 15 - 25 に記載の配列のいずれかを含むものが挙げられる。

20

【0017】

一実施態様において、本発明の化合物はポリヌクレオチドによってコード化されたペプチドの発現により產生されたペプチドを含む。また、他の実施態様として、本発明の化合物はペプチド類の合成により少なくとも部分的に產生される。合成方法の組み合わせによっても產生することができる。

【0018】

一実施態様において、コンスタチン類似体は、ペグ化された化合物を内包しており、配列番号36に記載の配列を含む化合物として例証されている。

30

【0019】

他の実施態様において、コンスタチン類似体は、さらにインビボで化合物の保持を延長させるようなさらなるペプチド成分を含む。例えば、さらなるペプチドの構成成分はアルブミン結合ペプチドが挙げられる。一例として、コンスタチン - アルブミン結合ペプチド複合体は配列番号39に記載の配列を含む。

【0020】

本発明の他の態様としては、配列番号26または上記類似体及び複合体の他のいずれかの配列の非ペプチドまたは部分ペプチド擬態体を含む、補体活性を阻害する化合物を特徴としている。これらの非ペプチドまたは部分ペプチド擬態体はC3に結合し、かつ同じアッセイ条件下において、配列番号1を含むペプチドよりも少なくとも100倍の補体活性を阻害するように設計される。

40

【0021】

本発明におけるコンスタチン類似体、複合体、擬態体は本明細書に記載される通り、コンスタチン自体の使用目的であればいずれの目的にも利用できる。これらの使用のある種のものは、患者への投与に用いる医薬品の処方も含まれる。かかる処方には、薬剂的に承認される希釈物、担体賦形剤、またはその様なものの一つまたはそれ以上のものと同様に、医薬上許容される塩も含まれ得るが、当該技術分野で認められる範囲であろう。

【0022】

本願発明の様々な特徴及び効果は下記する本願明細書における発明の詳細な説明及び図

50

表を参照することにより理解されるだろう。

【0023】

図の説明

(図1) 発現コンプスタチン及びその類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(四角) Ac-V4W/H9A (配列番号5)、(丸) トリプトファン (配列番号15)、(三角) 5-フルオロ-トリプトファン (配列番号16)、(星) 6-フルオロ-トリプトファン (配列番号17)、(六角形) 5-ヒドロキシ-トリプトファン (配列番号27)、(菱形) 7-アザ-トリプトファン (配列番号28) を表している。

【0024】

(図2) 合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(四角) Ac-V4W/H9A (配列番号5)、(丸) 5-フルオロ-1-トリプトファンを4位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号18)、(三角) 7位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号19)、(菱形) 4位及び7位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号20) を表している。

【0025】

(図3) 追加合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(A) (三角) Ac-V4W/H9A (配列番号5)、これに対して(逆三角) Ac-V4(5f-I-W)/H9A (配列番号18)、(丸) Ac-V4(5-メチル-W)/H9A (配列番号22)、(菱形) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号23)、(四角) Ac-V4(2-NaI)/H9A (配列番号7) ; (B) (三角) Ac-V4W/H9A (配列番号5)、これに対して(六角形) Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号19)、そして(C) (三角形) 野生型コンプスタチン (配列番号1) に対して(左向き三角形) Ac-V4(1-メチル-W)/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号24) を表している。

【0026】

(図4) 追加コンプスタチンとC3との相互作用における熱力学的特徴。ITCデータはC3と(A) Ac-V4W/H9A (配列番号5)、(B) Ac-V4(5f-I-W)/H9A (配列番号18)、(C) Ac-V4(5-メチル-W)/H9A (配列番号22)、(D) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号23)、(E) Ac-V4(2-NaI)/H9A (配列番号7)、(F) Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号19) との結合を表している。この図は、Origin 7.0で補正生データを“one set of sites”モデルに合わせて得られた。

【0027】

(図5) log Pにより表される類似体の疎水性と(A) 阻害定数、(B) -T Sで表されるエントロピー、(C) 結合定数との関係を表す。

【0028】

(図6) 追加合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント対(丸) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号23) 及び(四角形) Ac-V4(1-ホルミル-W)/H9A (配列番号25) の濃度を表したものである。

【0029】

(図7) ペグ化されたコンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント対(丸) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号23) 及び(四角形) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A-K-PEG 500 (配列番号36) のペプチド濃度。

【0030】

(図8) コンプスタチン類似体複合タンパク質が結合されたアルブミンの活性化。補体阻害パーセントのプロット対(丸) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号23) ペプチド濃度及び(四角形) (Ac-ICV(1MeW)QDWGAHRCTRLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂) (配列番号38) 融合ペプチド濃度。

【0031】

実施態様の詳細な説明

本願発明に係る方法及び他の態様に関する様々な用語が明細書及び特許請求の範囲に使

10

20

30

40

50

われている。このような用語は一般的に使用される意味を呈している。本明細書中、特に定義された用語は、この定義された意味で解釈される。

【0032】

定義

下記の略語は本明細書及び実施例中において使われる。Ac、アセチル基；NH₂、アミド；MALDI、マトリック支援レーザー脱離イオン法；TOF、飛行時間型；ITC、等温滴定量熱測定；HPLC、高速液体クロマトグラフィー；NA、不活性；dT、D-スレオニン；2-Nal、2-ナフチルアラニン；1-Nal、1-ナフチルアラニン；2-Igl、2-インダニルグリシン；Dht、ジヒドロトリプトファン；Bpa、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン；5f-l-W、5-フルオロ-l-トリプトファン；6f-l-W、6-フルオロ-l-トリプトファン；5-OH-W、5-ヒドロキシトリプトファン；5-メトキシ-W、5-メトキシトリプトファン；5-メチル-W、5-メチルトリプトファン；1-メチル-W、1-メチルトリプトファン；アミノ酸に関する略語は3文字表記または一文字表記による命名法を用いる。たとえばトリプトファンであればTrp またはWと表す。

【0033】

明細書中、持続時間などのような測定値を表す場合に用いられる「およそ」と表記された用語は、化合物及び成分を公表する上で適切な変動であるように、いくつかの例においては特定の値から±20%または±10%の変動範囲、いくつかの例においては±5%、±1%、±0.1%の変動範囲を意味する。

【0034】

「薬剂的に活性」及び「生物学的に活性」という用語は、C3に結合するかまたはそのフラグメントに結合し、補体活性化を阻害する本発明の化合物の能力を意味する。この生物学的活性は本明細書中詳細に説明されているように、一つまたは他のいくつかの公知のアクセシによって測定され得る。

【0035】

本明細書中に記載された「アルキル」とは任意に置換されていてもよい飽和直鎖状、側鎖状、環状のおよそ1から10の炭素原子（さらに、すべての組み合わせ、この範囲のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む）を有する炭化水素を意味し、そのうち炭素原子数がおよそ1から7からなるものが好ましい。アルキル基は、特に限定されるものではないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、シクロピエンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシル、シクロオクチル、アダマンチル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチルを含む。「低級アルキル」とは、任意に置換されていてもよい飽和直鎖状、側鎖状、環状のおよそ1から5の炭素原子（さらに、すべての組み合わせ、この範囲のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む）を有する炭化水素を意味する。低級アルキル基は、特に限定されるものではないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、シクロピエンチル、イソペンチル、ネオペンチルを含む。

【0036】

本明細書中に記載された「ハロ」とはF、Cl、Br、Iを意味する。

【0037】

本明細書中に記載された「アルカノイル」とは、「アシル」とも互換的に用いられるが、任意に置換されていてもよい直鎖状または側鎖状の脂肪族アシル残基で、およそ1から10の炭素原子（さらに、すべての組み合わせ、この範囲のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む）を有し、そのうちおよそ1から7の炭素原子からなるものが好ましい。アルカノイル基は、特に限定されるものではないが、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソ-ブチリルペンタノイル、イソ-ペンタノイル、2-メチル-ブチル、2,2-ジメチルプロピオニル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイルなどを含む。「低級アルカノイル」は、任意に置換されていてもよい直鎖状または側鎖状の脂肪族アシル残基で、およそ1から5の炭素原子（さらに、すべての組み合わせ、この範囲

のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む)を有する。低級アルカノイル基は、特に限定されるものではないが、ホルミル、アセチル、*n*-プロピオニル、イソ-プロピオニル、ブチリル、イソ-ブチリル、ペンタノイル、イソ-ペンタノイルなどを含む。

【0038】

本明細書中に記載の「アリル」は、およそ5から14の炭素原子を含む(さらに、すべての組み合わせ、この範囲のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む)任意に置換されていてもよい、一または二環性の芳香環システムを意味し、このうち、およそ6から10の炭素を有するものが好ましい。たとえばペニル及びナフチルを含むが、これに限定されるものではない。

【0039】

本明細書中に記載の「アラルキル」はアリル置換基に関連したアルキルラジカルで、およそ6から20の炭素原子(さらに、すべての組み合わせ、この範囲のサブコンビネーション、炭素原子の特定の数を含む)を有し、このうちおよそ6から12の炭素を有するものが好ましい。アラルキル基は、任意に置換され得る。特に限定されるものではないが、たとえばベンジル、ナフチルメチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、フェニルエチル、ジフェニルエチルなどが挙げられる。

【0040】

本明細書中に記載の「アルコキシ」及び「アルコキシル」は任意に置換されていてもよいアルキル-O-基を表す。ここで言うアルキルとは前記に定義されたものである。代表的なアルコキシ及びアルコキシル基はメトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、*i*-プロポキシ、*n*-ブトキシ、ヘプトキシなどを含む。

【0041】

本明細書中に記載の「カルボキシ」は-C(=O)OH基を表す。

【0042】

本明細書中に記載の「アルコキシカルボニル基」は-C(=O)O-アルキル基を表す。ここで言うアルキルとは前記に定義されたものである。

【0043】

本明細書中に記載の「アロイル」は-C(=O)-アリル基を表す。ここで言うアリルとは前記に定義されたものである。代表的なアロイル基はベンゾイル及びナフトイルを含む。

【0044】

典型例として、置換された化学的部分は、分子上の選択された位置における水素を置換した一つまたはそれ以上の置換基を含む。代表的な置換基は、たとえば、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、アリル、スルフヒドリル、ヒドロキシル(-OH)、アルコキシル、シアノ(-CN)、カルボキシル(-COOH)、アシル(アルカノイル:-C(=O)R); -C(=O)O-アルキル、アミノカルボニル(-C(=O)NH₂)、-N-置換されたアミノカルボニル(-C(=O)NHR") CF₃、CF₂CF₃などである。これらの置換基の関係において、それぞれのR"部分には、独立にH、アルキル、シクロアルキル、アリル、またはアラルキルなどのいずれであってもよい。

【0045】

本明細書中に記載の「L-アミノ酸」は、標準的に存在する左旋性のアルファ-アミノ酸またはアルファ-アミノ酸のアルキルエステルを表す。「D-アミノ酸」は右旋性のアルファ-アミノ酸を表す。特にことわりがなければ、本明細書中に記載のすべてのアミノ酸はL-アミノ酸を表す。

【0046】

「疎水性の」または「無極性の」はここでは同義語として用いられ、双極子によって特徴づけられるのではなく、それぞれの分子間作用を表す。

【0047】

本明細書中に記載の「pi特性」は、C3とのpi結合に關与するコンプスタチンの能力を表す。pi結合は2つの平行なp軌道の横の重複部分の結果として生ずる。

【0048】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の「水素結合能」は、コンプスタチン内の置換されたトリプトファン残基またはトリプトファン誘導体における電気陰性部位とC3内の水素原子との関係のように、コンプスタチンとC3との電気誘引に關与する能力を示す。かかる電気陰性部位の非限定的な例はフッ素原子である。

【0049】

「ペグ化」とは、大きさは関係なく、少なくとも一つのポリエチレングリコール（PEG）部分がタンパク質またはペプチドと結合して、PEG-ペプチド複合体を形成するような化学的な結合反応を示す。PEGは、一般的にPEGポリマーの近似平均分子量を示す数的接尾語とともに使われる；たとえば、PEG-8,000とは平均分子量が8000のポリエチレングリコールを表す。

10

【0050】

本明細書に記載された「医薬上許容される塩」とは開示された化合物の誘導体を意味し、その中の親化合物は酸性または塩基性塩を形成することによって修飾される。医薬上許容される塩としては、特に限定されるものではないが、アミンのような塩基残基の無機質または有機酸塩；カルボキシル酸のような酸性残基のアルカリまたは有機酸塩などが挙げられる。つまり、「酸付加塩」は酸の付加により調合された親化合物の塩誘導体と一致する。医薬上許容される塩は、従来の塩または親化合物の四級アンモニウム塩を含み、たとえば、無機または有機酸が挙げられる。たとえば、前記従来の塩とは、特に限定されるものではないが、塩化水素、臭化水素、硫化、リン化、窒化などのような無機酸；さらに、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸などの有機酸から調合された塩に由来するものを含む。本発明の酸性またはアルカリ性化合物は双性イオンとして存在する。遊離酸、遊離塩基、双性イオンを含む化合物のすべての形式は、本発明の範囲内であると熟慮されている。

20

【0051】

説明：

本発明によれば、コンプスタチンの生物学的及び物理化学的特徴についての情報は、親コンプスタチンペプチドと比較して活性化がさらに促進されるコンプスタチン類似体の設計に利用されている。一例では、類似体は少なくとも50倍の活性を備えている。他の態様としては、類似体はコンプスタチンより60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130倍またはそれ以上の活性化を有する。さらにまた、実施例において詳述したアッセイを利用したものと比較すると、類似体はコンプスタチンより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倍またはそれ以上の活性化を有する。

30

【0052】

他の方法で合成されたコンプスタチン類似体は親ペプチドと比較して99倍まで活性が促進された（Mallik, B. ら、2005, supra; WO2004/026328）。本発明のとおり産生された類似体は、本明細書の図及び実施例で示すとおりインビトロアッセイにより実証されているが、親ペプチドまたはそれらの類似体より活性化の向上している。

40

【0053】

表1Bに、コンプスタチン及び活性向上に伴う選択的類似体についてのアミノ酸配列及び補体阻害活性を示す。選択的類似体は親ペプチド、つまりコンプスタチン（配列番号1）及びWO2004/026328に開示されているが、表1Aで示した配列番号2-14のペプチド、と比較して指定部位（1-13）で特定の修飾を受けたものを表す。配列番号15-24のペプチドは、本発明により得られる修飾体の体表例であり、有意に潜在能力がより高い類似体となる。詳しくは下記に示すが、配列番号2-13に明記されているように、4位

50

のトリプトファンの置換は7位のトリプトファン類似体での置換と組み合わせさせて、さらなる強力コンスタチン類似体となると理解される。

【0054】

【表1-1】

表1

| ペプチド | 配列 | 配列番号 | コンスタチンと比較した活性化率 |
|----------------------|--|------|-----------------|
| A. コンスタチン及び前記類似体 | | | |
| コンスタチン | H-ICVVQDWGHRCT-CONH ₂ | 1 | * |
| Ac-コンスタチン | Ac-ICVVQDWGHRCT-CONH ₂ | 2 | 3倍 |
| Ac-V4Y/H9A | Ac-ICVYQDWGAHRCT-CONH ₂ | 3 | 19倍 |
| Ac-V4W/H9A -OH | Ac-ICVWQDWGAHRCT-COOH | 4 | 25倍 |
| Ac-V4W/H9A | Ac-ICVWQDWGAHRCT-CONH ₂ | 5 | 55倍 |
| Ac-V4W/H9A/T13dT -OH | Ac-ICVWQDWGAHRCTdT-COOH | 6 | 55倍 |
| Ac-V4(2-Nal)/H9A | Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 7 | 99倍 |
| Ac-V4(2-Nal)/H9A -OH | Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-COOH | 8 | 39倍 |
| Ac-V4(1-Nal)/H9A -OH | Ac-ICV(1-Nal)QDWGAHRCT-COOH | 9 | 30倍 |
| Ac-V4Igl/H9A | Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 10 | 39倍 |
| Ac-V4Igl/H9A -OH | Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-COOH | 11 | 37倍 |
| Ac-V4Dht/H9A -OH | Ac-ICVDhtQDWGAHRCT-COOH | 12 | 5倍 |
| Ac-V4(Bpa)/H9A -OH | Ac-ICV(Bpa)QDWGAHRCT-COOH | 13 | 49倍 |
| +G/V4W/H9A +AN -OH | H-GICVWQDWGAHRCTAN-COOH | 14 | 38倍 |

10

20

【表1-2】

| B. 開示された類似体の代表例 | | | |
|------------------------------------|---|----|------|
| +G/V4W/H9A +N -OH | H-GICVWQDWGAHRCTN-COOH | 15 | 45倍 |
| +G/V4(5f-1-W)/W7(5f-1-W)/H9A+N -OH | H-GICV(5f-1-W)QD(5f-1-W)GAHRCTN-COOH | 16 | 112倍 |
| +G/V4(6f-1-W)/W7(6f-1-W)/H9A+N -OH | H-GICV(6f-1-W)QD(6f-1-W)GAHRCTN-COOH | 17 | 126倍 |
| Ac-V4(5f-1-W)/H9A | Ac-ICV(5f-1-W)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 18 | 31倍 |
| Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A | Ac-ICVWQD(5f-1-W)GAHRCT-CONH ₂ | 19 | 121倍 |
| Ac-V4(5f-1-W)/W7(5f-1-W)/H9A | Ac-ICV(5f-1-W)QD(5f-1-W)GAHRCT-CONH ₂ | 20 | 161倍 |
| Ac-V4(5-メトキシ-W)/H9A | Ac-ICV(5-メトキシ-W)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 21 | 76倍 |
| Ac-V4(5-メチル-W)/H9A | Ac-ICV(5-メチル-W)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 22 | 67倍 |
| Ac-V4(1-メチル-W)/H9A | Ac-ICV(1-メチル-W)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 23 | 264倍 |
| Ac-V4(1-メチル-W)/W7(5f-1-W)/H9A | Ac-ICV(1-メチル-W)QD(5f-1-W)GAHRCT-CONH ₂ | 24 | 264倍 |
| Ac-V4(1-ホルミル-W)/H9A | Ac-ICV(1-ホルミル-W)QDWGAHRCT-CONH ₂ | 25 | 264倍 |

表において下記の略語を用いた：

dT = D-スレオニン

2-Nal = 2-ナフチルアラニン

1-Nal = 1-ナフチルアラニン

2-Igl = 2-インダニルグリシン

Dht = ジヒドロトリプトファン

Bpa = 4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン

5f-1-W = 5-フルオロ-1-トリプトファン

6f-1-W = 6-フルオロ-1-トリプトファン

5-OH-W = 5-ヒドロキシトリプトファン

5-メトキシ-W = 5-メトキシトリプトファン

5-メチル-W = 5-メチルトリプトファン

1-メチル-W = 1-メチルトリプトファン

1-ホルミル-W = 1-ホルミルトリプトファン

30

40

50

【 0 0 5 5 】

N - 末端における修飾

配列番号 1 と配列番号 2 を比較すると、N - 末端のアセチル化によってコンプスタチン及びその類似体の補体阻害活性が顕著に向上していることがわかる。したがって、ペプチドのアミノ末端でのアシル基の付加、特に限定されるものではないが N - アセチル化が挙げられ、本発明においてはこれが好ましい例であり、ペプチドが合成され調合された場合、特に優れた効果を奏し得る。しかしながら、原核生物または真核生物におけるペプチドをコード化している核酸分子の発現によりまたはインビトロでの転写及び翻訳により予めペプチドを準備してもよい。これらの実施例として、自然界にある N - 末端が利用できる。インビトロまたはインビボにおいて適したコンプスタチン類似体の一例は配列番号 1 5 - 1 7 によって代表され、それらにおいて N - 末端でアセチル基は置換されていないグリシンと置き換わる。配列番号 1 5 - 1 7 は、以下に詳述するとおり、ペプチド中及び C - 末端での修飾を追加的に含むものであり、本明細書中に記載された補体阻害アッセイにおいて、コンプスタチンよりも約 4 5 倍から約 1 2 5 倍の活性がある。

10

【 0 0 5 6 】

ペプチド内の修飾

コンピューター法 (the rank low lying energy sequences) を用いた結果、Tyr と Val が 4 位においてペプチドの安定化及び活性化を支持する役割があるとして候補に挙げられるのは、以前から明らかであった (Klepeis JL ら、2003) 。特に 4 位の Trp が 9 位の Ala と組み合わされて親ペプチドよりも何倍も高い活性を示すことは、WO2004/026328 に開示されていた (たとえば、配列番号 4、5、6 の活性化と配列番号 2、3 を比較する) 。WO2004/026326 にもまた、4 位にトリプトファン類似体である 2 - ナフチルアラニン (配列番号 7、8)、1 - ナフチルアラニン (配列番号 9)、2 - インドールグリシン (配列番号 1 0、1 1) またはジヒドロトリプトファン (配列番号 1 2) を含むペプチドすべてが、コンプスタチンと比較して 5 倍から 9 9 倍の範囲で補体阻害活性を促進することが開示されていた。さらに、4 位にフェニルアラニン類似体を含むペプチド、4 - ベンゾイル - L - アラニン (配列番号 1 3) はコンプスタチンよりも 4 9 倍高い活性を有していた。

20

【 0 0 5 7 】

本発明のとおり、5 - フルオロ - 1 - トリプトファン (配列番号 1 9) または 5 - メトキシ - 若しくは 5 - メチル - 若しくは 1 - メチル - のいずれかのトリプトファンまたは 1 - ホルミル - トリプトファン (それぞれ配列番号 2 1、2 2、2 3、2 5) を含むペプチド類は、コンプスタチンよりも 3 1 から 2 6 4 倍高い活性を有する。1 - メチル - または 1 - ホルミル - トリプトファンの取り込みにより他の類似体と比較すると活性及び結合親和性が向上した。4 位におけるインドール窒素 - 水素結合は、コンプスタチンの結合及び活性に必要なと考えられる。水素を低級アルキル、アルカノイル、またはインドール窒素に置き換えることによる 4 位の水素結合の非存在または極性の減少が、コンプスタチンの結合及び活性を高める。反応の特定の理論またはメカニズムを限定せずに、4 位の疎水性相互作用または効果がコンプスタチンと C3 との相互作用を強化すると考えられる。したがって、4 位での Trp の修飾 (例えば、側鎖の構造を公知の方法で変更する) または前述の疎水性相互作用を維持または高める Trp 類似体の置換は、活性能のあるコンプスタチンの類似体を産生するために本願発明において熟慮されている。このような類似体は、置換されないかまたは置換された誘導体と同様に、当該技術分野においてよく知られ、含まれているが、本明細書に例証された類似体に限定されるものではない。適した類似体の例としては、下記出版物、その他に開示されている : Beene ら (2002) Biochemistry 41: 1026 2-10269 (とりわけ単一及び複数のハロゲン化 Trp 類似体についての開示) ; Babitzky 及び Yanofsky (1995) J. Biol. Chem. 270: 12452-12456 (とりわけメチル化及びハロゲン化された Trp 及びその他の Trp 及びインドール類似体について開示) 及び米国特許第 6, 214, 790 号、6, 169, 057 号、5, 776, 970 号、4, 870, 097 号、4, 576, 750 号、4, 299, 838 号。Trp 類似体は、当該技術分野においてよく知られ、また実施例において詳述されているようにインビトロまたはインビボでの発現によって、またはペプチド合成によってコンプ

30

40

50

スタチンペプチド中に導入される。

【0058】

実施例において、コンプスタチンの4位のTrpは、1-アルキル基、さらに好ましくは上記に定義した低級アルキル(例えば、 C_1-C_5)基を含む類似体にて置換される。特に限定されるものではないが、これらはN()メチルトリプトファン及び5-メチルトリプトファンを含む。他の実施態様として、コンプスタチンの4位のTrpは、1-アルカノイル基、さらに好ましくは上記に定義した低級アルカノイル(例えば、 C_1-C_5)基を含む類似体にて置換される。例証された類似体に加えて、これらは1-アセチル-L-トリプトファン及びL- -ホモトリプトファンを含むが、これに限定されるものではない。

【0059】

熱力学的実験により、コンプスタチン内の7位に5-フルオロ-L-トリプトファンを組み込むと、コンプスタチンとC3との相互作用におけるエンタルピーを、野生コンプスタチンよりも向上させることが示された。一方、コンプスタチン内の4位に5-フルオロ-L-トリプトファンを組み込むと、それらの相互作用が減退した。特定のメカニズムに結合されることを目的とせず、先の結果は、コンプスタチンの7位においてTrp残基中のインドール水素をフッ素原子に置換することによりインドール環の水素結合ポテンシャルを強化することができるか、または新たな水素結合ポテンシャルを導入することができるか、または結合面において水分子を通してC3との相互作用を仲介することができるかを示唆している。(Katragadda M ら、2004)。それゆえに本発明において、7位のTrpの修飾(例えば、側鎖の構造を公知の方法で変更する)、または前記水素結合ポテンシャルを維持し、高めるか、または結合面での水分子を通してC3との相互作用を仲介するようなTrp類似体の置換に関しては、より活性の強い類似体を産生する上で熟慮されている。インドール環が修飾を有し、水素結合能を増加させるか、あるいは結合海面において水分子を介するC3との相互作用を媒介するTrp類似体を、インビトロまたはインビボ発現により、あるいはペプチド合成により、コンプスタチンペプチドの7位に導入してもよい。7位に5-フルオロ-L-トリプトファン(配列番号19)のトリプトファン類似体を含むペプチドがコンプスタチンより1.21倍高い活性を示すことが明らかとなった。

【0060】

他の態様として、Trp類似体はコンプスタチン分子の4位と7位の両者に組み込まれ、さらにコンプスタチンの9位のHisはAlaに任意に置換されてもよい。熱力学的実験により、コンプスタチンの4位及び7位に5-フルオロ-L-トリプトファンを組み込むことによって、コンプスタチンとC3との間の相互作用におけるエンタルピーが、野生型コンプスタチンよりも上がることが示された。したがって、4位と7位のTrpの修飾(例えば、側鎖の構造を公知の方法で変更する)、または前記C3と4位との疎水性相互作用を維持または向上させ、かつC3と7位で前記水素結合ポテンシャル、またはC3と7位で結合面での水分子を介する相互作用を維持または向上させるTrp類似体の置換は、本発明において、より活性の強い類似体を産生する上で熟慮されている。このような修飾されたTrpまたはTrp類似体はインビトロまたはインビボの発現によって、またはペプチド合成によってコンプスタチンペプチドの4位及び7位に導入され得る。5-フルオロ-L-トリプトファン(配列番号16)のトリプトファン類似体及び6-フルオロ-L-トリプトファン(配列番号17)のトリプトファン類似体を含むペプチドは、コンプスタチン以上に、1.12倍から2.64倍までの範囲で活性を向上させることが明らかとなった。さらに、4位に1-メチル-L-トリプトファン及び7位に5-フルオロ-L-トリプトファン(配列番号24)を有するペプチドはコンプスタチンと比較して2.64倍の活性増加を示すことが明らかとなった。

【0061】

カルボキシ末端における修飾

合成方法により産生されたペプチドは、酸の代わりにアミドを有するようカルボキシ末端で一般的に修飾される；この共通の修飾は表1のコンプスタチン(配列番号1)及びいくつかの類似体に見ることができる。確かに実施例において、末端にアミドを含むペプチドは末端に酸を含むペプチド(比較例として例えば配列番号5及び7と配列番号4と8の

10

20

30

40

50

それぞれ)より活性を向上させる。したがって、本発明の利用態様としてC末端アミド修飾が好ましい。しかしながら、ある状況ではC末端に酸を用いることは好ましい。このような状況とは、特に限定されるものではないが、溶解度及びインビトロまたはインビボにおけるペプチドコード核酸分子からのペプチドの発現を含む。

【0062】

コンスタチンのカルボキシ末端残基はスレオニンである。本発明の実施例において、C末端スレオニンは一つまたはそれ以上の自然界のアミノ酸またはその類似体に置換される。たとえば、配列番号6を有するペプチドはL-スレオニンの代わりにD-スレオニンを有し、さらにC末端でCOOH基を有する。このペプチドはC末端にL-スレオニンとCONH₂とを有する配列番号5のペプチドと同じ活性を示す。さらにまた、Ileは13位でThrの代わりに用いられ、コンスタチンより21倍の活性を維持する。さらに、C末端におけるAsnのペプチド伸張またはAla-Asnのペプチド伸張を含む配列番号14から17のペプチドは、C末端のCOOHとN末端の未アセチル化とともに、コンスタチンより活性が38倍ないし126倍向上することを実証した。それらは下記に詳細を述べるとおり、原核生物または真核生物の発現システムを介した産生にも適している。

10

【0063】

本発明のコンスタチン類似体は従来のペプチド合成法と同じように、一つまたはそれ以上のアミノ酸残基の縮合によるペプチド合成のように様々な合成方法によって調整される。たとえばペプチドは、バイオシステムモデル431Aペプチド合成(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)のような標準固相法によって合成される。固相法または液相法によるペプチドまたはペプチド類似体の他の合成方法は当業者によく知られたものである。ペプチド合成の過程で、側鎖のアミノ基及びカルボキシ基は、よく知られた保護基を用いることによって、必要であれば保護/脱保護される。本発明に適したペプチド合成法の例は実施例3に記載されている。ペプチドまたはペプチド誘導体に対する他の保護基を用いた修飾は当業者には明らかであろう。

20

【0064】

また、本発明のペプチドは適した原核生物または真核生物のシステムで発現されることによって産生される。たとえば、DNAコンストラクトをバクテリア細胞または酵母細胞の発現に適したプラスミドベクターに挿入するか、または昆虫細胞の発現に適したバキュロウイルス若しくは哺乳類細胞の発現に適したウイルスベクターに挿入する。このようなベクターは宿主細胞においてDNAの発現に必要な調節エレメントを含み、この調節エレメントは宿主細胞においてDNAの発現を許容する役割がある。このような発現を要求する調節エレメントはプロモーター配列、転写開始配列、そして任意のエンハンサー配列を含む。

30

【0065】

配列番号14から17のペプチド、またはこれに類似して設計された他のペプチドはインビトロまたはインビボでの核酸分子の発現による産生に適している。ペプチドコンカテマーをコードしているDNAは、コンカテマーの上限が発現システムに参与しているのであるが、インビボでの発現システムに挿入される。コンカテマーが産生された後、ポリペプチドをヒドラジンに曝すことによってC末端のAsnとN末端のGとの間で切断が生じる。

40

【0066】

原核生物または真核生物システムに組み込んで遺伝子発現することにより産生されたペプチドは当該分野で知られた方法によって精製される。実施例1及び2に本発明の使用に適した方法を示す。実施態様において、商業的に利用可能な発現系/分泌系システムを使うことができる。それによって組み込まれたペプチドが発現され、宿主細胞から分泌され、周囲の培養液で容易に精製される。

【0067】

発現と合成を組み合わせた方法はコンスタチン類似体の産生にも利用される。たとえば、類似体は遺伝子発現により産生され、その後の一つまたはそれ以上の翻訳後合成過程で、たとえばN-またはC-末端の修飾や分子環化を受ける。

50

【0068】

コンスタチンの構造は該技術分野において知られ、前記類似体の構造も同じような方法で決定される。かつて特に好ましい短いペプチドの構造を確認したのでペプチドまたはペプチド擬態体をその構造に合わせて形成させる方法がこの分野でよく知られている。たとえば、G.R. Marshall (1993), Tetrahedron, 49: 3547-3558; Hruby 及び Nikiforovich (1991), in Molecular Conformation 及び Biological Interactions, P. Balaram 及び S. Ramasehan, eds., Indian Acad. of Sci., Bangalore, PP. 429-455。本発明に特に関連して、ペプチド類似体の設計は、前述したように(たとえば、機能基の効果または立体的な機能)、アミノ酸残基の多様な側鎖の寄与を考慮することによって精練される。

10

【0069】

ペプチド擬態体もまたC3と結合しかつ補体活性を阻害するのに必要な特別な骨格コンフォメーション及び側鎖官能基を提供する目的で、ペプチドと同等に役立ち得ることは当業者によって容易に理解されるだろう。また、適切な骨格コンフォメーションを形成することができる自然界のアミノ酸、アミノ酸誘導体、類似体、非アミノ酸分子を使った補体阻害化合物C3結合を産生することは本発明の範囲内であると考えられる。本発明のペプチドの置換基か誘導体かを明らかにするために、本明細書において、非ペプチド類似体またはペプチド及び非ペプチド構成成分を含む類似体を「ペプチド擬態体」または「イソステリック擬態体」と呼び、補体活性を阻害することが例証されたペプチドと同じ効果を示すよう、同じ骨格コンフォメーションの特徴を示し、かつ/または他の機能を備えたものである。

20

【0070】

高い親和性を有するペプチド類似体の開発のためにペプチド擬態体を使うことは当該技術分野においてはよく知られている。(Zhao B ら、1995; Beeley, N. 1994; 及び、Hruby, VJ 1993参照)。ペプチド内にアミノ酸残基と同じような回転の制約を受けることを想定して、非アミノ酸部分を含む類似体を分析し、ラマチャンドラプロット(Hruby & Nikiforovich 1991)を用いて立体構造のモチーフを検証した。

【0071】

本発明のコンスタチン類似体は、ペプチドへのポリエチレングリコール(PEG)成分の付加によって修飾される。本技術分野ではよく知られているが、ペグ化はインビボにおいて治療薬としてのペプチドやタンパク質の半減期を伸ばすことができる。実施態様においては、PEGの平均分子量はおよそ1000からおよそ50000である。他の態様としては、PEGの平均分子量はおよそ1000からおよそ20000である。さらに他の態様としては、PEGの平均分子量はおよそ1000からおよそ10000である。さらにまた他の態様としては、PEGの平均分子量はおよそ5000である。ポリエチレングリコールは側鎖であるかまたは直鎖であり、好ましくは直鎖である。

30

【0072】

本発明のコンスタチン類似体は、リンキング基を介してPEGと共有結合することができる。このような方法は、当該技術分野ではよく知られている。(Kozlowski A. ら、2001; see also, Harris JM 及び Zalipsky S, eds. Poly(ethylene glycol), Chemistry 及び Biological Applications, ACS Symposium Series 680 (1997)参照)。承認されるリンキング基においてこれに制限されない実施例は、エステル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、糖鎖、サクシンイミド基(サクシンイミジルサクシネート(SS)、サクシンイミジルプロピオネート(SPA)、サクシンイミジルカルボキシメチレート(SCM)、サクシンイミジルサクシンアミド(SSA)及びN-ヒドロキシサクシンイミド(NHS)を含有するが、これらに限定されない)、エポキシド基、オキシカルボニルイミダゾール基(カルボニルジイミダゾール(CDI)を包含するが、これらに限定されない)、ニトロフェニル基(ニトロフェニルカルボネート(NPC)またはトリクロロフェニルカルボネート(TPC)を包含するが、これらに限定されない)、トリシレート基、アルデヒド基、イソシアネート基、ビニルスルホン基、チロシン基、システイン基、ヒスチジ

40

50

ン基、一級アミンを含む。実施態様において、リンキング基はコハク酸イミド基を使用した。また、他の態様のリンキング基として、NHSを使用した。

【0073】

本発明のコンプスタチン類似体はアミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基を介して、直接的にPEG（すなわち、リンキング基なしに）に共役結合することも代わりにできる。ある実施態様において、PEGはコンプスタチンのC末端に付加されたリシン残基とカップリングする。

【0074】

ペグ化は治療薬としてのペプチド及びタンパク質のインビボにおける保持時間を増大させる一つの方法である。例えば、ウサギに急速静注によって注入したとき、ペプチドに結合するアルブミンは2・3時間という非常に長い半減期を示す(Dennis ら、2002)。このタイプのペプチドは、組織因子に結合してFabフラグメントの活性が保持されている間、抗組織因子FabフラグメントD3H44に融合してFabフラグメントがアルブミンに結合できるようになる(Nguyen ら、2006)。野生型D3H44のFabフラグメントと比較し得るペグ化されたFabフラグメント分子及びイムノアドヘシン及びアルブミン融合体を比較したとき、アルブミンとの相互作用の結果、マウス及びウサギにおいてインビボクリアランスが明らかに減少し、半減期が顕著に伸びた。本明細書において実施例11に明記したように発明者らはアルブミン結合ペプチドと融合し、かつその融合タンパク質が補体活性を阻害することが実証されたコンプスタチン類似体を合成した。

【0075】

コンプスタチン類似体及びペプチド擬態体及び複合体の補体活性阻害活性は、当該分野で知られている様々なアッセイによって試験される。好ましい実施態様において、実施例4で明記されたアッセイが利用される。他のアッセイの部分的なリストは米国特許第6,319,897号に明記されており、(1) C3及びC3フラグメントに結合するペプチド；(2) さまざまな溶血性アッセイ；(3) C3コンベルターゼが仲介したC3の切断の測定；(4) D因子によるB因子切断の測定を含むが、これに限定されるものではない。

【0076】

本発明に記載されたペプチド及びペプチド擬態体は当該分野で知られるコンプスタチン自体が利用されるさまざまな目的において実質的利用可能性がある。このような利用は(1) 患者(ヒトまたは動物)の血清、組織、器官における、補体活性阻害性、つまりこれに限定されるものではないが、加齢黄斑変性症、リウマチ性関節炎、脊椎損傷、パーキンソン病、アルツハイマー病を含む任意の疾病または任意の状態の治療を促進することが可能なもの；(2) 人工器官または移植組織の使用により生じる補体活性阻害性(たとえば、本発明のペプチドを用いて人工器官または移植組織を被覆するかまたは処理することによって)；(3) 生理学的流体(血液、尿)における体外シャント中に生じる補体活性阻害性(たとえば、本発明のペプチドを用いてシャントされる流動を通る管を被覆することによって)；(4) コンプスタチン活性の他の阻害剤の同定のための小分子ライブラリーのスクリーニング(たとえば、C3またはC3フラグメントに結合する間、コンプスタチン類似体と競合する化合物の能力を液相法または固相高処理アッセイによって測定した)を包含するが、これらに限らない。

【0077】

下記の実施例は本発明をより詳細に説明するために提供されたものである。これらは本発明に限定されるものではない。実施例1から5に明記された物質及び方法は実施例6から11に記載された結果を得るために利用される。

【0078】

実施例 1

コンプスタチンのバクテリア発現

配列NH₂-GICVWQDWGAHRCTN-OH (“G(-1)/V4W/H9A/N14”) (配列番号15)を有するコンプスタチン類似体はキチン結合ドメインとDnaBインテイン(New Engl及び Biolabs, Beverly, MA)との融合物として発現された。E.coliについてのペプチド配列及びコドンの利

10

20

30

40

50

用によって導かれるように、以下の遺伝的コードを用いて、このペプチドに関する下記配列を有する合成遺伝子を得た。該合成遺伝子は下記の配列を有する：

5' ATTTGCGTTTGGCAGGATTGGGGTGCACCGTTGCACCAATTAA³' (配列番号 29)

【0079】

合成遺伝子をpGEM-Tベクターにクローニングするために、SapIサイトを有する5' フランキング領域とPstIサイトを有する3' フランキング領域とを設計した。合成遺伝子を作成するために下記の4つの重複オリゴヌクレオチドをDnaWorksソフトウェアを用いて設計し、Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA) で合成した：

5' GGTGGTGCTCTTCCAACGGTATTTGCGTTTGGCAGGA³' (配列番号 30)

5' TTGGGGTGCACCGTTGCACCAATTAAGTGCAGG³' (配列番号 31)

3' CAACGTGGTTAATTGACGTCCGC⁵' (配列番号 32)

3' CATAAACGCAAACCGTCCTAACCCACGCGTGG⁵' (配列番号 33)

【0080】

1995年Stemmerらが明記したように、重複DNAフラグメントをPCRを用いて構築した。その結果生じる遺伝子を下記のプライマーを用いて増幅した：

5' CGCCTGCAGTTAATTGGT³' (配列番号 34)

5' GGTGGTGCTCTTCCAACG³' (配列番号 35)

【0081】

次に、コンスタチンのPCR増幅フラグメントをpGEM-Tベクターにクローニングし、その結果生じるクローンをPstI及びSapIを用いて設計した。コンスタチン類似体をコードするPstI-SapIフラグメントをさらに発現ベクターpTWIN1にサブクローニングした。この発現ベクターpTWIN1とはPstI及びSapIを用いて解読しやすいようにされたものである；そのクローンの配列はDNA配列によって確認された。

【0082】

コンスタチン類似体を発現させるために、コンスタチンクローンで形質転換されたER2566 E. coli細胞をSOB培地(20 g/L トリプトン、5 g/L イースト抽出液、0.5 g/L NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl₂)を用いて37℃にて増殖させた。OD₆₀₀が0.7に達したとき、最終濃度0.3 mMにIPTGを追加することによって発現が誘発され、続いて37℃で4時間追加的にインキュベートした。細胞を遠心分離法によって収集し、0.2% Tween-20を補足したバッファーB1(500 mM NaCl及び1 mM EDTAとともにpH 8.5の20 mM リン酸エステルバッファー)内で超音波処理によって溶解した。細胞抽出液を遠心分離し、可溶性フラクションを、バッファーB1にて前もって平衡化しておいたキチン結合カラム(New England及びBiolabs, Beverly, MA)に適用した。このカラムを100mlのバッファーB1で洗浄し、次いでバッファーB2(pH 7.0の50 mMアンモニウムアセテート)でカラムの3倍量を用いて洗浄した。このカラムは室温で20時間インキュベートするとバッファーB2中にペプチドが溶出し、これを凍結乾燥させ、C18 HPLCカラムで精製した。この精製されたペプチドをMALDI-TOFマスペクトロメトリーを用いて同定した。

【0083】

実施例 2

E. coli内におけるコンスタチンのトリプトファン類似体の発現

トリプトファン誘導体を有するコンスタチン類似体を発現させるためにpTWIN1 - コンスタチンクローンをER2566 Trp 82栄養要求株に形質転換した。前述したように1 mM L - トリプトファンが補充されたM9最小培地上で発現が行われた。細胞はOD₆₀₀ 0.8から1.0において成長し、その後遠心分離法によって収集し、望ましいトリプトファン類似体2mMを含む新鮮な最小培地中に再懸濁した：前記望ましいトリプトファン類似体は、5 - フルオロ - トリプトファン、6 - フルオロ - トリプトファン、7 - アザ - トリプトファン、または5 - ヒドロキシ - トリプトファンであった。発現されたコンスタチン類似体を実施例1と同様にさらに精製した。

【0084】

実施例 3

ペプチド合成

ペプチド合成と精製を1996年Sahuら；2000年Sahuら；2005年Mallikらが明記した方法を用いて実行した。簡潔に述べると、Fmocアミド残基及び標準サイドの鎖状保護基を用いたバイオシステムペプチドシンセサイザー（モデル431A）でペプチドを合成した。5%フェノール、5%チオアニソール、5%精製水、2.5%エタンジチオール、82.5%トリフルオロ酢酸（TFA）を含む溶媒混合物中、22、3時間かけてペプチドをインキュベートすることによりペプチドを残基から切断した。この反応液をフリットの漏斗に通して濾過し、冷エーテルを用いて沈殿を誘発させた後、0.1% TFAを含む50%アセトニトリル中に溶解した後、凍結乾燥した。

【0085】

切断後そのまま未精製のペプチドを0.1% TFAを含む10%アセトニトリル中に溶解し、逆相C-18カラム（Waters, Milford, MA）を使って精製した。タリウム（III）トリフルオロアセテート試薬を用いた樹脂上環化方法を用いることによって酸化ジスルフィドを得た。この方法は、希釈溶液の酸化工程及び逆相HPLCに先立って凍結乾燥により時間をかけて濃縮する工程を省く。この方法を用いることによって、多量体が存在せず、完全に脱保護され、酸化または環化されたものが高レベル（～90%）で得られる。すべてのペプチドの同定及び純度をレーザー脱離質量分光測定法及びHPLCを用いて確認した。

【0086】

5-フルオロ-トリプトファン及び1-メチル-トリプトファン及び5-メチル-トリプトファン類似体を合成するために、Fmoc-dl-誘導体を用いた。エナンチオマーペプチドの分離は1978年Meyersらが開示した方法で行った。C18 逆相 HPLCカラムにおいて、pH4.1の0.01Mアンモニウム中の10%アセトニトリルを用いて、それぞれのペプチドのdl混合物をdとlの異性体ペプチドに分離した。溶出したペプチドの同位体の同定は、MALDI-TOFマスマスペクトロメトリー（MicroMass TOFspec2E）を用いて分析し、V8プロテアーゼとともにペプチドを処理することによって決定した。

【0087】

実施例 4

補体阻害アッセイ

免疫複合体による補体系の活性におけるそれらの効果を測定することにより補体系におけるコンプスタチン及びその類似体の阻害活性を決定した。正常な血漿中における卵白アルブミン-抗-卵白アルブミン複合体へのC3の固定の阻害を測定することによって補体活性の阻害を評価した。マイクロタイターウェルを50 μ l卵白アルブミン（10mg/ml）で2時間25（4で一晩）被覆した。ウェルを10 mg/ml BSA 200 μ lで、25で1時間飽和させ、その後補体が活性化され得るようにウサギ抗-卵白アルブミン抗体を添加して免疫複合体を形成させた。様々な濃度でのペプチド30 μ lをそれぞれのウェルに直接加え、続いて血漿の1:80希釈液30 μ l加えた。30分インキュベートした後、ヤギ抗-ヒトC3 HRP-複合抗体を用いてC3C3b/iC3bのバンドを検出した。ABTSペルオキダーゼ基質を加えることによって発色させ、光学的密度を405 nmにて測定した。

【0088】

405 nmの吸光度を100%補体活性に対応する吸光度を基準にして阻害%として換算した。阻害%をペプチド濃度に対する割合として表示し、その結果データはOrigin 7.0ソフトウェアを用いてロジスティックな用量-応答関数に適合させた。C3b/iC3b析出の50%阻害を引き起こすペプチドの濃度は IC_{50} として得られ、様々なペプチドの活性と比較した。 IC_{50} の値は、最小のカイ二乗値を与える適合パラメーターから得られた。

【0089】

実施例 5

C3とコンプスタチン及びその類似体との相互作用の等温滴定量熱測定

VP-ITC マイクロカロリメトリー（Microcal Inc, Northampton, MA）を用いて、等温滴定量熱測定を実行した。これらの実験にはタンパク質濃度3.5-5 μ M及びペプチド濃度80-200 μ Mを用いた。すべての滴定ではPBS（150 mM NaClとともに10 mMリン酸エステルバッフ

10

20

30

40

50

ァー、pH 7.4)を用いた。それぞれの実験において、標的タンパク質であるC3を細胞内に入れ、ペプチドをシリンジ内に入れた。すべての実験は25℃で行われ、前記タンパク質が入った細胞内に2μlペプチドを注入した。それぞれの実験において、ペプチドをバッファに注入する際に代表されるように等温線が減ることによる希釈熱を考慮して等温線を補正した。その結果生ずる等温線はOrigin 7.0ソフトウェア内で適合され、最小のカイ二乗値を与えたモデルをそれぞれのデータセットに関して適正なものとし、結合親和性及びエントロピーをlog Pに対してプロットした。

【0090】

実施例 6

細菌により発現されたコンスタチン類似体によりアッセイされたC3 - コンスタチン相互作用におけるトリプトファンの役割

10

インドール環の化学的性質において異なる4つのトリプトファン類似体をインテイン媒介タンパク質発現系を用いてコンスタチンに組み込んだ。発現後、ペプチドは培養液2mg/Lの最終収量にて単一工程で精製された。トリプトファン類似体、5 - フルオロ - トリプトファン、6 - フルオロ - トリプトファン、7 - アザ - トリプトファン、5 - ヒドロキシ - トリプトファンをMALDIによって示されるER2566/Trp 82栄養要求株を用いて発現させ、その結果生ずるペプチドを均一に精製した。PHMBと反応しないことによって証明されるように、未変性のコンスタチン及び類似体をインビボでジスルフィド結合を通して環化した。すべてのペプチドを逆相C18 HPLCカラムで精製した。

【0091】

20

発現したコンスタチン類似体G(-1)/V4W/H9A/N14(配列番号15)の活性化は1.2μMのIC₅₀を示した。これはAc-V4W/H9A類似体(配列番号5)に見られる活性と同様である。ここで明らかとなったのは、発現されたペプチドのN末端におけるグリシンは、Ac-V4W/H9A類似体のN末端におけるアセチル基と同様の役割を持つということである。

【0092】

7 - アザ - トリプトファン類似体を除くすべての発現されたコンスタチン類似体は試験した濃度において活性化されることが解った。しかしながら、ペプチド類似体は、Ac-V4W/H9A(図1;表2)に関する活性においてレベルが異なっていた。9位のアラニンと同様に6 - フルオロ - トリプトファン及び5 - フルオロ - トリプトファンを含むコンスタチンは、Ac-V4W/H9A類似体の活性と比較して、それぞれ2.8倍及び2.5倍の活性を示した。

30

【0093】

【表2】

表2 発現したペプチドの補体阻害活性

| 発現したペプチド | 配列番号 | IC ₅₀ (μM) | 相対活性* |
|---|------|-----------------------|-------|
| 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 ^o -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 |

40

*ペプチド II-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂(コンスタチン、配列番号1)に対する相対活性

^o ヒドロキシを表す

^b 合成ペプチド

【0094】

特定のメカニズムに限定されるものではなく、インドール環の疎水性を高めることにより付加するフッ素原子がペプチドの活性を高めると考えられている。5 - ヒドロキシ - トリプトファン及び7 - アザ - トリプトファンなどのあまり疎水性でないトリプトファンの

50

取り込みについて研究した。5 - フルオロ及び6 - フルオロ類似体と比較対照したところ、5 - ヒドロキシ - トリプトファンを含むコンプスタチン類似体はAc-V4W/H9A類似体（配列番号5）と比較して27.5倍活性が減少し、さらに7 - アザ - トリプトファンは濃縮試験においてまったく活性を示さなかった。7 - アザ - トリプトファンは、インドール環の7位の炭素原子に対して窒素原子を有することは別として、分子構造上トリプトファンに類似している。7 - アザ - トリプトファンの置換により見られる活性の喪失は、この炭素原子が比較的重要であることを示している。

【0095】

実施例7

C3コンプスタチン相互作用における個々のトリプトファンの役割

4位もしくは7位、または4位かつ7位に選択的に組み込まれた5 - フルオロ - トリプトファンや、9位にアラニンをもつようなコンプスタチン類似体を産生するために固相ペプチド合成を用いた。合成はFmoc-5-フルオロ-dl-トリプトファンを用いて行った。この反応では5 - フルオロ - d - トリプトファン及び5 - フルオロ - l - トリプトファンのエナンチオマーを産生した。3つの異なるペプチドを合成した：それらは4位または7位において独立的に一つの置換基を有する2つのペプチド及び4位及び7位の両者に置換基を有する1つのペプチドである。一置換の場合、5 - フルオロ - l - トリプトファン及び5 - フルオロ - d - トリプトファン類似体の混合物が生じ得るが、二置換の場合、4つのエナンチオマーの組み合わせの混合物が生じ得る。それぞれのペプチドの混合を逆相HPLCを用いてペプチドエナンチオマーを分離した。V8プロテアーゼにてペプチドを消化し、次いでMALDIを用いて消化産物を分析することにより、エナンチオマーの同定を行った。V8プロテアーゼは、l - アミノ酸の場合に限りAsp残基のC末端側で切断した。質量スペクトルにおける切断産物の同定によりl - エナンチオマーのペプチドが最初に溶出し、続いて、d - 型が溶出したことが示されたが、切断されたフラグメントは検出されなかった。

【0096】

5 - フルオロ - l - トリプトファンまたは5 - フルオロ - d - トリプトファンまたはその両者を含むすべてのペプチドについて、補体阻害活性を試験した。両位置で5 - フルオロ - l - トリプトファンにて置換された合成ペプチドはAc-V4W/H9A（配列番号5）と比較して2.5倍の高活性を示した（表3）。

【0097】

【表3】

表3 5-フルオロ-l-トリプトファンを含む合成コンプスタチン類似体の補体阻害活性

| ペプチド | 配列番号 | IC ₅₀ (μM) | 相対活性* |
|------------------------------|------|-----------------------|-------|
| Ac-V4W/H9A | 5 | 1.20 | 45 |
| Ac-V4(5f-l-W)/H9A | 18 | 1.74 | 31 |
| Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A | 19 | 0.446 | 121 |
| Ac-V4(5f-l-W)/W7(5f-l-W)/H9A | 20 | 0.482 | 112 |

* ペプチド H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂ (コンプスタチン、配列番号1)の相対活性

【0098】

補体阻害アッセイ（図2、表3）により、4位のみにある5 - フルオロ - l - トリプトファン置換基はAc-V4W/H9A（配列番号5）に比べて少なくとも1.5倍活性を低下させたことが示唆された。7位のみにある5 - フルオロ - l - トリプトファン置換基はAc-V4W/H9A（配列番号5）に比べて2.7倍活性を高めた。4位及び7位に同時に存在する5 - フルオロ - l - トリプトファン置換基はAc-V4W/H9A（配列番号5）に比べて2.5倍活性を高めた。4位若しくは7位、または両者に存在する5 - フルオロ - d - トリプトファン置換基はペプチドの不活性を引き起こした。

【0099】

10

20

30

40

50

実施例 8

C3によるトリプトファンを媒介としたコンプスタチンの認識に関する熱力学的根拠

等温滴定熱量測定によりペプチドとC3との結合を検証し、それらの活性に関する熱力学的根拠について調べた。すべてのペプチドとC3との相互作用による熱量データは1に近似した化学量論の1組のサイトモデルに適合する。これらのペプチドとC3との結合は1:1の割合で生じると考えられていた。これらの適合から得られた熱力学的パラメータを表4に示す。K_d値から明白なように、7位にある5-フルオロ-L-トリプトファン置換基及び4位及び7位にある2つの置換基を有するペプチドは、Ac-V4W/H9A(配列番号5)及びAc-V4(5f-l-w)/H9A(配列番号18)類似体に比べて強固な結合を示した。この知見は、補体阻害アッセイ(表3)で観察された相対活性と一致するものであり、結合-活性の相関関係があることを示すものである。

【0100】

すべてのペプチドは負のエンタルピー及び正のエントロピーにてC3と結合した。このような結合はC3とコンプスタチンとの相互作用の特徴である。試験されたすべてのペプチドの中で、7位に置換したAc-V4W/W7(5f-l-w)/H9A類似体(配列番号19)はその野生型より高い結合エンタルピー($H = -21.83$, $H = -3.69$)を示した。4位に置換基のあるAc-V4(5f-l-w)/H9A類似体(配列番号18)は-16.69 kcal/mole、1.45 kcal/moleのエントロピーにてC3に結合し、この値はその野生型が示す値よりも低かった。

【0101】

4位に5-フルオロ-トリプトファンが置換されたものは同じ場所がトリプトファンであるものと比較してエンタルピーが1.45 kcal/mole下がった(表4)。トリプトファンと5-フルオロ-トリプトファンとの唯一の相違はインドール環C5におけるフッ素原子の置換であるため、エンタルピーの減少は水素をフッ素に換えたことに起因する。

【0102】

【表4】

表4 5-フルオロトリプトファンを含むコンプスタチン類似体とC3との相互作用に関する熱力学的パラメータ

| ペプチド | 配列番号 | K _d (μM) | (kcal/mole) | | | | | |
|------------------------------|------|---------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|------|
| | | | ΔH | ΔΔH | -TΔS | -TΔΔS | ΔG | ΔΔG |
| Ac-V4W/H9A | 5 | 0.14 | -18.14 | 0 | 8.79 | 0 | -9.4 | 0 |
| Ac-V4(5f-l-w)/H9A | 18 | 0.15 | -16.69 | 1.45 | 7.39 | -1.4 | -9.4 | 0 |
| Ac-V4W/W7(5f-l-w)/H9A | 19 | 0.035 | -21.83 | -3.69 | 11.56 | 2.77 | -10.25 | -1 |
| Ac-V4(5f-l-w)/W7(5f-l-w)/H9A | 20 | 0.017 | -17.33 | 0.81 | 6.73 | -2.06 | -10.6 | -1.2 |

【0103】

7位に5-フルオロ-トリプトファンが置換されたものは野生型に比べエンタルピーが3.69 kcal/mole高かった(表4)。特定のメカニズムに限定されないが、7位のトリプトファンは水素結合のようなエンタルピー的に好ましい相互作用を及ぼすと考えられる。インドール環の一つの水素がフッ素原子に置き換わることによって、pK_aが下がりインドール環のNHの性質上水素結合が強固となる。代わりに、テトラデカ(3-フルオロチロシル)グルタチオントランスフェラーゼの構造において実証されたように、電子供与性という性質の結果としてフッ素が水素結合を形成する。

【0104】

エンタルピーが上昇する他の理由は、水分子がフッ素原子とC3上の水素受容体との間で相互に架橋するためであると考えられる。さらにこれを形成するのに2つの水素結合(4 kcal/mole相当のエネルギー)が必要である。この説の裏づけとして7位に置換されたAc-V4W/W7(5f-w)/H9A類似体(配列番号19)の相互作用に見られるエントロピーが野生型に

比べて低下することに由来すると考えられ(表4)、この減少はその側面におけるさらなる水分子の結合によって生じるものである。フッ素原子と他の水素結合受容体との間の水を介した相互作用は、他のシステムにおいても見受けられる。

【0105】

二重に置換された類似体のC3への結合によりエンタルピー変化-19.85 kcal/mole、エントロピー変化-9.35 kcal/mole、自由エネルギー変化-10.5 kcal/moleを生じた。同時に両方の位置に5-フルオロ-トリプトファンを組み込んだものは単一の置換による効果を抑制すると考えられる。

【0106】

実施例9

さらなるコンプスタチン類似体

4位のトリプトファン類似体の相互作用。コンプスタチンの4位にあるトリプトファンをバリンに換えるとその活性が45倍となることは実施例5及び6に示した。コンプスタチンがC3に結合している中で4位の残基によって仲介された相互作用の性質をさらに調べるために、4位のトリプトファンをトリプトファン類似体及び2-ナフチルアラニンに換えた。

【0107】

ELISA法を用いて4位にトリプトファン類似体を9位にアラニンを有するすべてのペプチド類似体の活性を試験した。1-メチル-トリプトファンが置換した(Ac-V4(1-メチル-W)/H9A)(配列番号23)及び2-ナフチルアラニンが置換した(Ac-V4(2-Nal)/H9A)(配列番号7)は、コンプスタチンと比較して、それぞれ264倍及び99倍活性が高まり、5-フルオロ-トリプトファンが置換した(Ac-V4(5f-1-W)/W7/H9A)(配列番号18)及び5-メチルトリプトファンが置換した(Ac-V4(5-メチル-W)/H9A)(配列番号22)は、活性が低い結果となり;野生型ペプチドが示す活性よりそれぞれ31倍及び67倍高かった(表5)。図3は活性についての阻害曲線を示し、表5は前記曲線から算出された IC_{50} 値及び元のコンプスタチンの活性と比較したペプチドの相対活性を示す。図5はトリプトファン類似体及び2-ナフチルアラニンのlog P値に対してプロットした阻害定数(IC_{50})を示す。

【0108】

【表5】

表5 コンプスタチン類似体の補体阻害活性

| ペプチド | 配列番号 | IC_{50} (μ M) | 相対活性* |
|-------------------------------|------|----------------------|-------|
| Ac-V4W/H9A | 5 | 1.20 | 45 |
| Ac-V4(5f-1-W)/7W/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-メトキシ W)/H9A | 29 | 0.46 | 0.5 |
| Ac-V4(5-メトキシ W)/7W/H9A | 21 | 0.71 | 76 |
| Ac-V4(5-メチル W)/7W/H9A | 22 | 0.81 | 67 |
| Ac-V4(1-メチル W)/7W/H9A | 23 | 0.205 | 264 |
| Ac-V4(2-Nal)/W7/H9A | 7 | 0.545 | 99 |
| Ac-V4(1-メチル W)/W7(5f-1-W)/H9A | 24 | 0.205 | 264 |

* H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂ (コンプスタチン、配列番号1)の相対活性

【0109】

コンプスタチンペプチドの結合も等温滴定熱量測定を用いて同様に調べた。すべてのペプチドのC3との相互作用から生じる熱量測定データは1に近似した化学量論に伴った一連

10

20

30

40

50

のモデルに当てはまる(図4)。この結果はこれらのペプチドのC3との結合は1:1の割合で生じることを示唆している。これらの適合から生ずる熱力学的パラメータを表6に示す。Kd値からも明らかなように、Ac-V4(1-メチル-W)/H9Aは、4位に単一の置換基を有する他のすべてのペプチドと比較して高い結合親和力($K_d = 0.015 \mu\text{M}$)を示した。類似体のlog P値に対してこれらの値をプロットすることによりトリプトファン類似体及び2-ナフチルアラニンの結合親和性及び疎水性の相関関係が示される。前記相関関係としては、4位に組み込まれた類似体の疎水性が上昇するにつれて結合親和性も高まる。この観察結果はlog Pと阻害定数との間に見られる相関関係と矛盾しない。

【0110】

【表6】

表6 5-フルオロ-1-トリプトファンを含むコンプスタチン類似体とC3との相互作用における熱力学的パラメータ

| ペプチド | 配列番号 | K _d (μM) | (kcal/mole) | | | | | |
|-------------------------------|------|---------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | | | ΔH | ΔΔH | -TΔS | -TΔΔS | ΔG | ΔΔG |
| 野生型 | 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-メチル-W)/H9A | 22 | 0.12 | -17.75 | 0.34 | 8.2 | -0.54 | -9.55 | -0.15 |
| Ac-V4(1-メチル-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 | -0.8 |
| Ac-V4(1-メチル-W)/W7(5f-1-W)/H9A | 24 | 0.017 | -17.33 | 0.81 | 6.73 | -2.06 | -10.6 | -1.2 |

【0111】

すべてのペプチドは負のエンタルピー及び正のエントロピーによりC3に結合し、その結合がエンタルピーにより生ずることが示唆される。このような結合はコンプスタチンとC3との相互作用の特徴である。しかしながら、これらのペプチドの結合は、野生型より低いエンタルピー変化と好ましい方へ向かってシフトするエントロピー変化によって特徴付けられる。図5Bはlog P対-T Sをプロットしたもので、4位に組み込まれた類似体の疎水性の影響で上昇していることが示唆され、エントロピーが増大するため自由エネルギーの変化において正の影響を及ぼす。

【0112】

7位にトリプトファン類似体を組み込んだ場合、7位のトリプトファンがC3上の残基と水素結合を形成することを実施例7に示した。さらにこの可能性を検証するために、7位のトリプトファンを4位において置換したものと同一ようなトリプトファン類似体に置き換えて、この位置にあるトリプトファンによる相互作用の性質を解明しようと試みた。5-フルオロ-トリプトファン(Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A)(配列番号19)を置換すると、121倍活性が高いペプチドが産生された(図3、表5)。7位のトリプトファンを5-メチルトリプトファンまたは1-メチルトリプトファンのトリプトファン類似体に置換すると、コンプスタチンの不活性が認められた(データは載せていない)。このことから、トリプトファン類似体の活性と疎水性との相関関係が明らかとなった。

【0113】

7位における異なったトリプトファン類似体の熱力学的特性を熱量測定と平行して調査した(表6)。7位に5-メチルトリプトファンまたは1-メチルトリプトファンを含むペプチドでは結合が見られなかったため、この結合パラメータは存在しない。唯一Ac-V4W/W7(5f-1-W)/H9A(配列番号19)のペプチドのみC3と結合した。結合親和性は $0.035 \mu\text{M}$

10

20

30

40

50

Mであった。これは、4位にトリプトファン類似体を有するAc-V4(1-メチル-W)/H9A(配列番号23)のペプチド以外のすべてのペプチドで観測された値よりも高いものである。4位にトリプトファン類似体を有するペプチドとは対照的に、Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A(配列番号19)は、高く好ましい結合エンタルピー変化($H = -21.83$, $H = -3.69$)と、好ましくないエントロピー変化($-T S = 11.56$, $-T S = 2.77$)を伴ってC3に結合し、極性の性質による付加的な好ましい非共有結合の相互作用が示唆される。

【0114】

7位に5-フルオロ-トリプトファンを組み入れた場合にはコンスタチンの活性が増大する一方、5-メチル-トリプトファン及び1-メチル-トリプトファンの類似体を組み入れた場合にはコンスタチンは活性化されないことが結果として示された。1-メチル-トリプトファンを組み入れたコンスタチンが活性化されないということから、コンスタチンとC3との相互作用において7位のトリプトファンのN-Hにより仲介される水素結合は重要な役割を担っていることが結論付けられる。さらに、5-メチル-トリプトファンを組み込むとコンスタチンの活性が完全に喪失するということから、7位に疎水性のアミノ酸を組み込むことは有効でないことがわかった。

10

【0115】

4位及び7位へのトリプトファン類似体の組み込み

4位のトリプトファンの代わりに1-メチル-トリプトファンを置換し、7位に5-フルオロ-トリプトファンを置換すると、活性が劇的に上昇したコンスタチンが産生されたので、4位及び7位に置換基を有するコンスタチンを産生した。その結果、ペプチド(Ac-V4(1-メチル-W)/W7(5f-I-W)/H9A)(配列番号24)は、単一置換基である1-メチル-トリプトファン(Ac-V4(1-メチル-W)/H9A)(配列番号23)と同じような阻害曲線を描いた(図3、表5)。このペプチドの結合親和性($K_d = 0.017$)は熱量測定の結果においてもAc-V4(1-メチル-W)/H9A(配列番号23)と同じような値が観測された。これらの結果から、実験条件下において、4位に1-メチル-トリプトファンが存在する場合、7位の5-フルオロ-トリプトファンは影響を及ぼさないことが示唆される。

20

【0116】

4位への他のトリプトファン類似体の組み

コンスタチンがC3に結合している間に4位の残基により仲介された相互作用の性質をさらに調べるために4位のトリプトファンをトリプトファン類似体である1-ホルミル-トリプトファンに置き換えた。

30

【0117】

図6はAc-V4(1-メチル-W)/H9A(配列番号23)(環状)及びAc-V4(1-ホルミル-W)/H9A(配列番号25)の濃度に対する補体阻害パーセントの比較を示す。ここで見られるように、補体阻害活性において1-ホルミル-W類似体は1-メチル-W類似体と同じような動向を示した。

【0118】

実施例10

コンスタチン類似体のペグ化

コンスタチンの半減期の延長は慢性治療の使用に効果的である。ペグ化(Veroneseら、2001参照)によって、試験された治療薬としてのペプチドの半減期を延長することができた。ペグ化は、腎臓でのクリアランス、タンパク質分解及び免疫原性の減少を含むさまざまなメカニズムによって循環系から生体分子を排除することを遅延させる能力を有している。腎臓でのクリアランス及びタンパク質分解及び免疫原性を減少させる性質を備えている。ペグ化は、巨大分子、好ましくはリジンの第一級アミンへのPEGポリマーの共有結合を包含する。

40

【0119】

この実施例では、ペグ化されたコンスタチン類似体、Ac-V4(1-メチル-W)/H9A-K-PEG 5000(配列番号36)の調整及びこの化合物の補体活性を阻害する能力についての評価を開示する。

50

【 0 1 2 0 】

Fmoc-NH-NHS-5000 PEGは、Nektar transforming therapeutics, 490 discovery Dr, Huntsville, AL 35806から購入した。

【 0 1 2 1 】

化合物Ac-V4(1-メチル-W)/H9A-K-PEG 5000 (配列番号 3 6) を改変された標準プロトコルによるFmoc固相ペプチドにより化学的に合成した。簡潔に述べると、PEGを3mlのジクロロメタンに溶解し、2M DIEAを1ml手動で加えて、5分間混合した。

【 0 1 2 2 】

その後、PEGを容器に移して、2日間オーバーナイトで放置した。次いで、PEGはピペリジン20%を用いて20分間脱保護された。

10

【 0 1 2 3 】

その後は、PEGが側鎖に連結する目的で、分子のC末端に組み込まれたリジンを用いて標準プロトコルに従って合成した。

【 0 1 2 4 】

所望産物を得るために、試薬D (TFA:H₂O:TIS:Phenol, 87.5:5:2.5:5) (4 ml) を用いて25 90分間、ペプチドの最終切断を行った。その後ペプチドをC18逆相HPLCカラムを用いて精製し、凍結乾燥した後、MALDI-TOFによって特徴付けした。

【 0 1 2 5 】

ペグ化されたコンスタチン類似体を実験4に記載したインビトロアッセイを用いて補体阻害活性について試験を実施した。図7に示すように、ペグ化された類似体は補体阻害性を示したが、非ペグ化類似体Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号 2 3) が補体阻害量と同じ量阻害するのに7倍以上の複合体を必要とした。

20

【 0 1 2 6 】

実施例 1 1コンスタチン類似体のアルブミン結合タンパク質複合体

Dennisら(2002)は、多様な種類のうち血清アルブミンに対して特異的に高い親和性をもって結合するコア配列DICLPRWGCLW (配列番号 3 7) を有する一連のペプチドを同定した。これらのペプチドは化学量論において1:1の割合で、低分子結合サイトで知られているものと異なる部位でアルブミンに結合した。ペプチドSA21 (AcRLIEDICLPRWGCLWEDDNH 2; 配列番号 3 8) をウサギに急速静注した際に2.3時間という非常に長い半減期を示す。詳細な説明で述べたように、この配列はD3H44という抗組織因子Fabフラグメントに結合するものであるが、この配列によって、SA21の結合親和性と同じような結合親和性をもって、Fabが組織因子1に結合する能力が保持しつつ、Fabフラグメントがアルブミンに結合することを可能にした(Nguyenら、2006)。野生型のFabフラグメントD3H44と比較すると、アルブミンとの相互作用はマウス及びウサギにおいてインビボでのクリアランスをそれぞれ2.5倍及び5.8倍減少させた。半減期はウサギで3.7倍延びて32.4時間、またマウスで2.6倍延びて10.4時間となり、これらの動物におけるアルブミンの半減期の25-43%に達した。これらの半減期はFab2の半減期を超え、ペグ化されたFab分子及びイムノアドヘシン及びアルブミン融合に見られる半減期に匹敵する。

30

【 0 1 2 7 】

この実施例はアルブミン結合ペプチドに融合するコンスタチン類似体の合成及びインビトロのアッセイにおける補体阻害活性を表す。

40

【 0 1 2 8 】

化合物4(1MeW)-ABPは、標準的なプロトコルに従ってFmoc固相ペプチドにより化学的に合成された。ペプチドのN末端及びC末端をアセチル基及びアミド基を用いて保護した。ペプチドをC18逆相HPLCカラムを用いてさらに精製し、凍結乾燥して、MALDIマスペクトル法により同定した。

【 0 1 2 9 】

環化にはペプチドレジン(アミノ酸分析に基づいて0.10 mmol/g 添加)をジクロロメタン(DCM) (2 mL) で5分間膨潤させ、濾過して25 において94:1:5 DCM/TFA/TIS (5 mL)

50

で2分間(3回)処理し、S-Mmt保護基を選択的に脱保護し、溶媒の窒素圧を除去した。これらのピス(チオール)、ピス(Acm) - ペプチド - レジン中間体をCH₂Cl₂、及びDMF及びNMP(それぞれ5回 x 2分, 2 mL)で洗浄し、さらにNMP(2 mL)で5分間膨潤させた後、NMP中でEt₃N(2 eq.)を用いて25 - 4時間処理した。その後、このペプチド - 樹脂をDMF及びCH₂Cl₂(それぞれ5回 x 2分, 2 mL)で洗浄した。最初のループの樹脂結合の形成後、ペプチド - レジンをDMF(5 times x 2 min, 2 mL)を用いて再び洗浄し、DMF(2 mL)で5分間膨潤させ、濾過して、DMF - アニソール(4mL)中TI(tfa)₃(1.5 eq.)を用いて処理し、二番目のジスルフィドループを環化させた。25 で4時間ゆっくりと攪拌した後、タリウム試薬をDMF(8回 x 2分, 2 mL)を用いて除去し、ペプチド - 樹脂をさらにCH₂Cl₂(5回 x 2分, 2 mL)で洗浄した。二環性のペプチドを試薬D(TFA:H₂O:TIS:Phenol, 87.5:5:2.5:5)(4 mL)を用いて二環性のペプチドを25 で90分間開裂させ、目的のペプチドを得た。

10

【0130】

産生された複合体ペプチド(配列番号39)を下記に示す。



【0131】

アルブミン結合ペプチド - コンスタチンの補体 - 阻害活性を実施例4に示すインビトロアッセイを用いて試験した。図8に示すように、複合体は補体活性を阻害する点においては活性を示したが、非複合類似体Ac-V4(1-メチル-W)/H9A(配列番号23)の阻害し得る量と同じ量を阻害するのに7倍の複合体を必要とした。

20

【0132】

参考文献:

Babitzke P, and 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.

30

Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, and Dougherty DA. (2002) Cation-pi interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT_{3A}) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry.* 41:10262-9.

Dennis MS, Zhang M, Meng YG, Kadkhodayan M, Kirchhofer D, Combs D, Damico LA. (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem.* 277:35035-43

40

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

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

Fiane AE, Videm V, Lambris JD, Geiran OR, Svennevig JL, and Mollnes TE. (2000) Modulation of fluid-phase complement activation inhibits hyperacute rejection in

50

a porcine-to-human xenograft model. *Transplant. Proc* 32:899-900.

Furlong ST, Dutta AS, Coath MM, Gormley JJ, Hubbs SJ, Lloyd D, Mauger RC, Strimpier AM, Sylvester MA, Scott CW, and Edwards PD. (2000) C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology*. 48:199-212.

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

10

Kalli KR, Hsu P, Fearon and DT. (1994) Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. *Springer Semin. Immunopathol*. 15:417-31.

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

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

20

Kozlowski A, Charles SA, and Harris JM. (2001) Development of PEGylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs*. 15:419-29.

Mallik B, Katragadda M, Spruce LA, Carafides C, Tsokos CG, Morikis D, and Lambris JD (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, and Lambris JD. (1998) Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sci*. 7:619-27.

30

Nguyen A, Reyes AE 2nd, Zhang M, McDonald P, Wong WL, Damico LA, Dennis MS. (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 KN, Sahu A, and Lambris JD. (1998) Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood*. 92:1661-7.

40

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

Soulika AM, Khan MM, Hattori T, Bowen FW, Richardson BA, Hack CE, Sahu A, Edmunds LH Jr, and Lambris JD. (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, and J.D. Lambris (2002) Chemical synthesis of small complement proteins and protein modules. *International*

50

I Immunopharmacology. 2: 1320-1321.

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

Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, and Matis LA. (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. U S A. 93:8563-8.

10

Zhao B, Helms LR, DesJarlais RL, Abdel-Meguid SS, and 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.

【 0 1 3 3 】

本発明は、上記に例証された具体例に限定されないが、特許請求の範囲内で変化及び修飾が可能である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 3 4 】

【 図 1 】 発現コンプスタチン及びその類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(四角) Ac-V4W/H9A (配列番号 5)、(丸) トリプトファン (配列番号 15)、(三角) 5 - フルオロ - トリプトファン (配列番号 16)、(星) 6 - フルオロ - トリプトファン (配列番号 17)、(六角形) 5 - ヒドロキシ - トリプトファン (配列番号 27)、(菱形) 7 - アザ - トリプトファン (配列番号 28) を表している。

20

【 図 2 】 合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(四角) Ac-V4W/H9A (配列番号 5)、(丸) 5 - フルオロ - 1 - トリプトファンを 4 位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号 18)、(三角) 7 位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号 19)、(菱形) 4 位及び 7 位に取り込んだコンプスタチン類似体 (配列番号 20) を表している。

【 図 3 】 追加合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント对各ペプチド濃度を表した図である。ペプチド濃度はそれぞれ、(A) (三角) Ac-V4W/H9A (配列番号 5)、これに対して (逆三角) Ac-V4(5f-I-W)/H9A (配列番号 18)、(丸) Ac-V4(5-メチル-W)/H9A (配列番号 22)、(菱形) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号 23)、(四角) Ac-V4(2-NaI)/H9A (配列番号 7) ; (B) (三角) Ac-V4W/H9A (配列番号 5)、これに対して (六角形) Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号 19)、そして (C) (三角形) 野生型コンプスタチン (配列番号 1) に対して (左向き三角形) Ac-V4(1-メチル-W)/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号 24) を表している。

30

【 図 4 】 追加コンプスタチンと C3 との相互作用における熱力学的特徴。ITC データは C3 と (A) Ac-V4W/H9A (配列番号 5)、(B) Ac-V4(5f-I-W)/H9A (配列番号 18)、(C) Ac-V4(5-メチル-W)/H9A (配列番号 22)、(D) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号 23)、(E) Ac-V4(2-NaI)/H9A (配列番号 7)、(F) Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (配列番号 19) との結合を表している。この図は、Origin 7.0 で補正生データを "one set of sites" モデルに合わせて得られた。

40

【 図 5 】 log P により表される類似体の疎水性と (A) 阻害定数、(B) -T S で表されるエントロピー、(C) 結合定数との関係を表す。

【 図 6 】 追加合成コンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント対 (丸) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号 23) 及び (四角形) Ac-V4(1-ホルミル-W)/H9A (配列番号 25) の濃度を表したものである。

【 図 7 】 ペグ化されたコンプスタチン類似体の活性化。補体阻害パーセント対 (丸) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A (配列番号 23) 及び (四角形) Ac-V4(1-メチル-W)/H9A-K-PEG 5000

50

(配列番号36)のペプチド濃度。

【図8】コンスタチン類似体複合タンパク質が結合されたアルブミンの活性化。補体阻害パーセントのプロット対(丸)Ac-V4(1-メチル-W)/H9A(配列番号23)ペプチド濃度及び(四角形)(Ac-ICV(1MeW)QDWGAHRCTRLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂)(配列番号38)融合ペプチド濃度。

【図1】

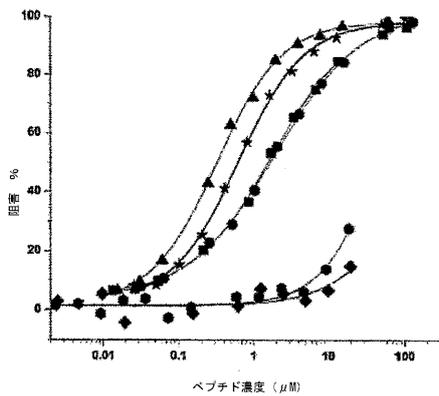


Fig. 1

【図2】

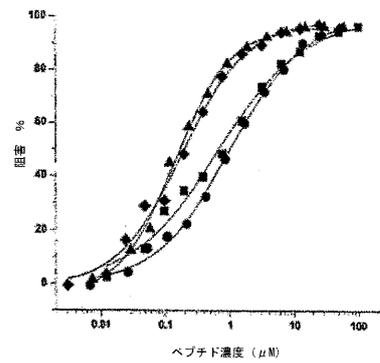


Fig. 2

【 図 3 】

Fig. 3a

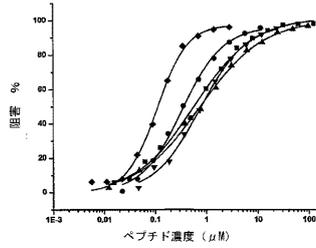


Fig. 3b

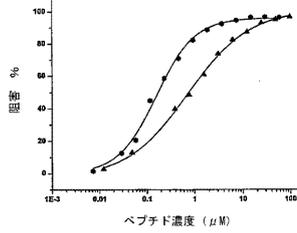
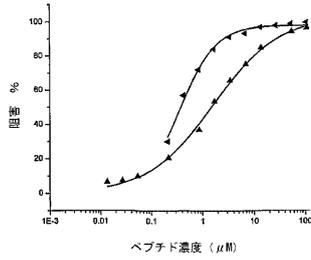


Fig. 3c



【 図 4 - 1 】

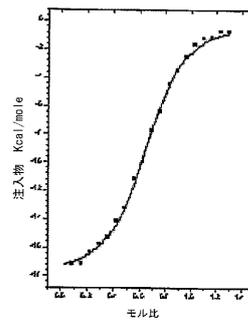


Fig. 4a

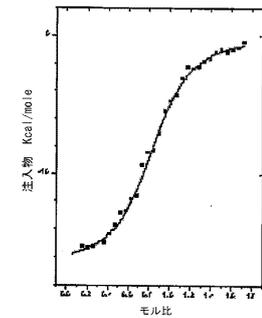
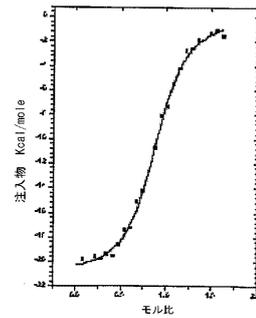


Fig. 4b

Fig. 4c



【 図 4 - 2 】

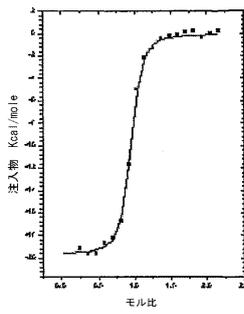


Fig. 4d

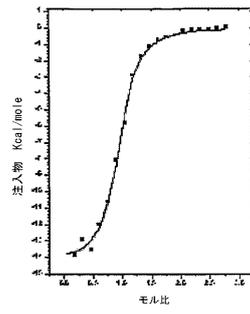
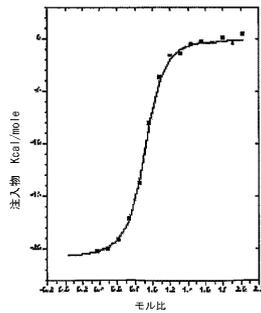


Fig. 4e

Fig. 4f



【 図 5 】

Fig. 5a

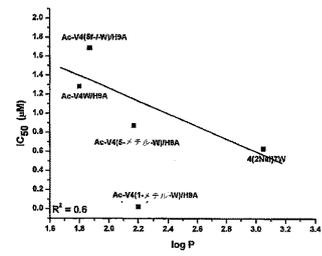


Fig. 5b

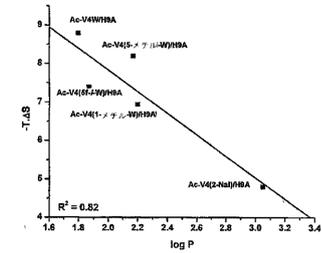
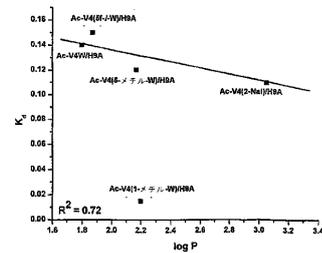


Fig. 5c



【 図 6 】

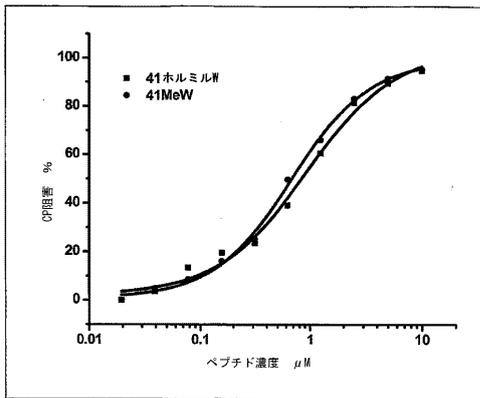


FIG. 6

【 図 7 】

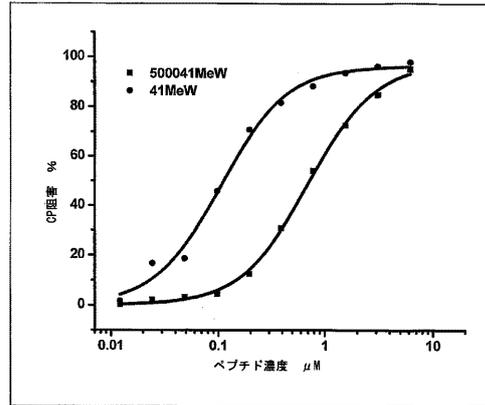


FIG. 7

【 図 8 】

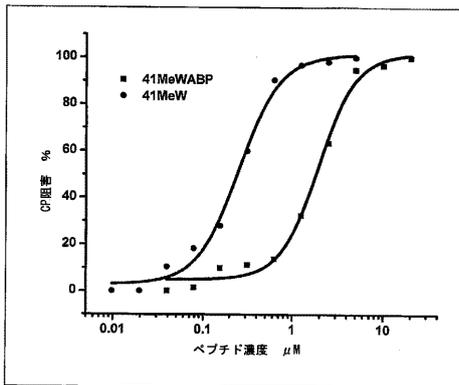


FIG. 8

【配列表】

2013177403000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジョン・ディ・ランプリス

アメリカ合衆国 1 9 0 1 0 ペンシルベニア州プリン・マー、ヘイマーケット・レイン 3 6 番

(72)発明者 マダン・カトラガッタ

アメリカ合衆国 4 8 1 9 6 ミシガン州イプシランティ、アパートメント・ティエイ、ツイン・レイクス・ドライブ 2 3 3 1 番

Fターム(参考) 4B024 BA19 CA04 CA20 DA06 EA04 FA02 GA11 HA03

4C084 AA02 BA01 BA08 BA09 BA18 BA26 CA59 DA58 NA14 ZB08

4H045 AA10 AA30 BA16 CA40 DA55 EA20 FA20 FA74

【 外国語明細書 】

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

POTENT COMPSTATIN ANALOGS

This claims benefit of U.S. Provisional Application No. 60/740,205, filed November 28, 2005, the entire contents of which are incorporated by reference herein.

GOVERNMENT SUPPORT

Pursuant to 35 U.S.C. §202(c), it is acknowledged that the United States government may have certain rights in the invention described herein, which was made in part with funds from the National Institutes of Health under Grant No. GM 62134.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to activation of the complement cascade in the body. In particular, this invention provides peptides and peptidomimetics capable of binding the C3 protein and inhibiting complement activation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Various publications, including patents, published applications, technical articles and scholarly articles are cited throughout the specification. Each of these cited publications is incorporated by reference herein, in its entirety. Full citations for publications not cited fully within the specification are set forth at the end of the specification.

The complement system is the first line of immunological defense against foreign pathogens. Its activation through the classical, alternative or lectin pathways leads to the generation of anaphylatoxic peptides C3a and C5a and formation of the C5b-9 membrane attack complex. Complement component C3 plays a central role in activation of all three pathways. Activation of C3 by complement pathway C3 convertases and its subsequent attachment to target surface leads to assembly of the membrane attack complex and ultimately to damage or lysis of the target cells. C3 is unique in that it possesses a rich architecture that provides a multiplicity of diverse ligand binding sites that are important in immune surveillance and immune response pathways.

Inappropriate activation of complement may lead to host cell damage. Complement is implicated in several disease states, including various autoimmune diseases, and has been found

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

to contribute to other clinical conditions such as adult respiratory syndrome, heart attack, rejection following xenotransplantation and burn injuries. Complement-mediated tissue injury has also been found to result from bioincompatibility situations such as those encountered in patients undergoing dialysis or cardiopulmonary bypass.

Complement-mediated tissue injuries are directly mediated by the membrane attack complex, and indirectly by the generation of C3a and C5a. These peptides induce damage through their effects on various cells, including neutrophils and mast cells. *In vivo*, regulation of complement at the C3 and C5 activation steps is provided by both plasma and membrane proteins. The plasma protein inhibitors are factor H and C4-binding protein, and the regulatory membrane proteins located on cell surfaces are complement receptors 1 (CR1), decay-accelerating factor (DAF), and membrane cofactor protein (MCP). These proteins inhibit the C3 and C5 convertases (multi-subunit proteases), by promoting dissociation of the multisubunit complexes and/or by inactivating the complexes through proteolysis (catalyzed by factor I). Several pharmacological agents that regulate or modulate complement activity have been identified by *in vitro* assay, but most have been shown *in vivo* to be of low activity or toxic.

To date, there are no inhibitors of complement activation approved for use in the clinic, though certain candidates for clinical use exist, specifically, a recombinant form of complement receptor 1 known as soluble complement receptor 1 (sCR1) and a humanized monoclonal anti-C5 antibody (5G1.1-scFv). Both of these substances have been shown to suppress complement activation in *in vivo* animal models (Kalli KR *et al.*, 1994; and, Wang *et al.*, 1996). However, each substance possesses the disadvantage of being a large molecular weight protein (240 kDa and 26 kDa, respectively) that is difficult to manufacture and must be administered by infusion. Accordingly, recent research has emphasized the development of smaller active agents that are easier to deliver, more stable and less costly to manufacture.

U.S. Patent No. 6,319,897 to Lambris *et al.* describes the use of a phage-displayed combinatorial random peptide library to identify a 27-residue peptide that binds to C3 and inhibits complement activation. This peptide was truncated to a 13-residue cyclic segment that maintained complete activity, which is referred to in the art as compstatin. Compstatin inhibits the cleavage of C3 to C3a and C3b by C3 convertases. Compstatin has been tested in a series of *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, and *in vivo/ex vivo* interface experiments, and has been demonstrated to: (1) inhibit complement activation in human serum (Sahu A *et al.*, 1996); (2) inhibit heparin/protamine-induced complement activation in primates without significant side effects (Soulika AM *et al.*, 2000); (3) prolong the lifetime of a porcine-to-human xenograft perfused

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

with human blood (Fiane AE *et al.*, 1999a; Fiane AE *et al.*, 1999b; and, Fiane AE *et al.*, 2000); (4) inhibit complement activation in models of cardio-pulmonary bypass, plasmapheresis, and dialysis extra-corporeal circuits (Nilsson B *et al.*, 1998); and (5) possess low toxicity (Furlong ST *et al.*, 2000).

Compstatin is a peptide comprising the sequence ICVVQDWGHRCT-NH₂ (SEQ ID NO:1), where Cys2 and Cys12 form a disulfide bridge. Its three-dimensional structure was determined using homonuclear 2D NMR spectroscopy in combination with two separate experimentally restrained computational methodologies. The first methodology involved distance geometry, molecular dynamics, and simulated annealing (Morikis D *et al.*, 1998; WO99/13899) and the second methodology involved global optimization (Klepeis *et al.*, *J. Computational Chem.*, 20:1344-1370, 1999). The structure of compstatin revealed a molecular surface that comprises of a polar patch and a non-polar patch. The polar part includes a Type I β -turn and the non-polar patch includes the disulfide bridge. In addition, a series of analogs with alanine replacements (an alanine scan) was synthesized and tested for activity, revealing that the four residues of the β -turn and the disulfide bridge with the surrounding hydrophobic cluster play important roles in compstatin's inhibitory activity (Morikis *et al.*, 1998; WO99/13899).

Using a complement activity assay comprising measuring alternative pathway-mediated erythrocyte lysis, the IC₅₀ of compstatin has been measured as 12 μ M. Certain of the analogs previously tested have demonstrated activity equivalent to or greater than that of compstatin. Published International application No. WO2004/026328 discloses compstatin analogs and mimetics with variations at the N- and C-termini, and at positions 4 and 9, which imparted improved activity in the aforementioned assay. Improvements of up to 99-fold over compstatin were reported for certain analogs (*see also*, Mallik *et al.*, 2005). The development of compstatin analogs or mimetics with even greater activity would constitute a significant advance in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides analogs and mimetics of the complement-inhibiting peptide, compstatin (HOOC-ICVVQDWGHRCT-NH₂; SEQ ID NO:1), which have improved complement-inhibiting activity as compared to compstatin.

In one aspect, the invention features a compound that inhibits complement activation, which comprises a peptide having a sequence:

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

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

Xaa1 is Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu or a dipeptide comprising Gly-Ile;

Xaa2 is Trp or an analog of Trp, wherein the analog of Trp has increased hydrophobic character as compared with Trp, with the proviso that, if Xaa3 is Trp, Xaa2 is the analog of Trp;

Xaa3 is Trp or an analog of Trp comprising a chemical modification to its indole ring wherein the chemical modification increases the hydrogen bond potential of the indole ring;

Xaa4 is His, Ala, Phe or Trp;

Xaa5 is L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, a dipeptide comprising Thr-Asn, or a dipeptide comprising Thr-Ala, or a tripeptide comprising Thr-Ala-Asn, wherein a carboxy terminal -OH of any of the L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly or Asn optionally is replaced by -NH₂; and the two Cys residues are joined by a disulfide bond.

In certain embodiments, Xaa2 participates in a nonpolar interaction with C3. In other embodiments, Xaa3 participates in a hydrogen bond with C3. In other embodiments, Xaa2 participates in a nonpolar interaction with C3, and Xaa3 participates in a hydrogen bond with C3.

In various embodiments, the analog of Trp of Xaa2 is a halogenated tryptophan, such as 5-fluoro-L-tryptophan or 6-fluoro-L-tryptophan. In other embodiments, the Trp analog at Xaa2 comprises a lower alkoxy or lower alkyl substituent at the 5 position, e.g., 5-methoxytryptophan or 5-methyltryptophan. In other embodiments, the Trp analog at Xaa 2 comprises a lower alkyl or a lower alkenoyl substituent at the 1 position, with exemplary embodiments comprising 1-methyltryptophan or 1-formyltryptophan. In other embodiments, the analog of Trp of Xaa3 is a halogenated tryptophan such as 5-fluoro-L-tryptophan or 6-fluoro-L-tryptophan.

In certain embodiments, Xaa2 comprises a lower alkenoyl or lower alkyl substituent at the 1 position of tryptophan, Xaa3 optionally comprises a halogenated tryptophan and Xaa4 comprises Alanine. In particular embodiments, Xaa2 is 1-methyltryptophan or 1-formyltryptophan and Xaa3 optionally comprises 5-fluoro-L-tryptophan. Some exemplary compounds of the invention comprise any of SEQ ID NOS: 15-25.

In some embodiments, the compound comprises a peptide produced by expression of a polynucleotide encoding the peptide. In other embodiments, the compound is produced at least in part by peptide synthesis. A combination of synthetic methods can also be used.

In certain embodiments, the compstatin analogs are, wherein the compound is PEGylated, as exemplified by the compound comprising SEQ ID NO:36

In other embodiments, the compstatin analog further comprises an additional peptide component that extends the *in vivo* retention of the compound. For example, the additional

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

peptide component can be an albumin binding peptide. One exemplary compstatin-albumin binding peptide conjugate comprises SEQ ID NO:39.

Another aspect of the invention features a compound that inhibits complement activation, comprising a non-peptide or partial peptide mimetic of SEQ ID NO:26 or any of the other sequences of analogs and conjugates described hereinabove. These non-peptide or partial peptide mimetics are designed to bind C3 and inhibit complement activation with at least 100-fold greater activity than does a peptide comprising SEQ ID NO:1 under equivalent assay conditions.

The compstatin analogs, conjugates and mimetics of the invention are of practical utility for any purpose for which compstatin itself is utilized, as known in the art and described in greater detail herein. Certain of these uses involve the formulation of the compounds into pharmaceutical compositions for administration to a patient. Such formulations may comprise pharmaceutically acceptable salts of the compounds, as well as one or more pharmaceutically acceptable diluents, carriers excipients, and the like, as would be within the purview of the skilled artisan.

Various features and advantages of the present invention will be understood by reference to the detailed description, drawings and examples that follow.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Activity of expressed compstatin and its analogs. Plots of percent complement inhibition versus peptide concentration for Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (squares) and expressed compstatin with tryptophan (SEQ ID NO:15) (circles), 5-fluoro-tryptophan (SEQ ID NO:16) (triangles), 6-fluoro-tryptophan (SEQ ID NO:17) (stars), 5-hydroxy-tryptophan (SEQ ID NO:27) (hexagons), 7-aza-tryptophan (SEQ ID NO: 28) (diamonds).

Figure 2. Activity of synthetic compstatin analogs. Plots of percent complement inhibition versus peptide concentration for Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (squares) and the compstatin analogs with 5-fluoro-*L*-tryptophan incorporation at position 4 (SEQ ID NO:18) (circles), position 7 (SEQ ID NO:19) (triangles), both positions 4 and 7 (SEQ ID NO:20) (diamonds).

Figure 3. Activity of additional synthetic compstatin analogs. Plots of percent complement inhibition vs. peptide concentration for (A) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (triangles) compared to Ac-V4(5f-*L*-W)/H9A (SEQ ID NO:18) (inverted triangle), Ac-V4(5-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:22) (circles), Ac-V4(1-methyl-*L*-W)/H9A (SEQ ID NO:23)

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

(diamonds), Ac-V4(2-Nal)/H9A (SEQ ID NO:7) (squares); (B) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (triangles) compared to Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (SEQ ID NO:19) (hexagons); and, (C) wild-type compstatin (SEQ ID NO:1) (triangles) compared to Ac-V4(1-methyl-W)/W7(5f-I-W)/H9A (SEQ ID NO:24) (triangles pointing left).

Figure 4. Thermodynamic characterization of the interaction of additional compstatin analogs with C3. ITC data representing the binding of (A) Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5); (B) Ac-V4(5f-I-W)/H9A (SEQ ID NO:18); (C) Ac-V4(5-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:22); (D) Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23); (E) Ac-V4(2-Nal)/H9A (SEQ ID NO:7); and, (F) Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A (SEQ ID NO:19) to C3. The plots were obtained by fitting the corrected raw data to “one set of sites” model in Origin 7.0

Figure 5. Plots showing the relation between hydrophobicity of the analogs denoted by log P and the inhibitory constant (A), entropy denoted by $-T\Delta S$ (B) and the binding constant (C).

Figure 6. Activity of an additional synthetic compstatin analog. Plots of percent complement inhibition vs. peptide concentration for Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (circles) and Ac-V4(1-formyl-W)/H9A (SEQ ID NO:25) (squares)

Figure 7. Activity of the PEGylated compstatin analog. Plots of percent complement inhibition vs. peptide concentration for Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (circles) and Ac-V4(1-methyl-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) (squares).

Figure 8. Activity of the albumin binding protein-conjugated compstatin analog. Plots of percent complement inhibition vs. peptide concentration for Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (circles) and the fusion peptide (Ac-ICV(1MeW)QDWGAHRCTRLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂) (SEQ ID NO:39) (squares).

DETAILED DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

Various terms relating to the methods and other aspects of the present invention are used throughout the specification and claims. Such terms are to be given their ordinary meaning in the art unless otherwise indicated. Other specifically defined terms are to be construed in a manner consistent with the definition provided herein.

Definitions:

The following abbreviations may be used in the specification and examples: Ac, acetyl group; NH₂, amide; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; TOF, time of flight; ITC, isothermal titration calorimetry; HPLC, high performance liquid chromatography; NA, not

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

active; dT, D-threonine; 2-Nal, 2-naphthylalanine; 1-Nal, 1-naphthylalanine; 2-Igl, 2-indanylglycine; Dht, dihydrotryptophan; Bpa, 4-benzoyl-L-phenylalanine; 5f-*l*-W, 5-fluoro-*l*-tryptophan; 6f-*l*-W, 6-fluoro-*l*-tryptophan; 5-OH-W, 5-hydroxytryptophan; 5-methoxy-W, 5-methoxytryptophan; 5-methyl-W, 5-methyltryptophan; 1-methyl-W, 1-methyltryptophan; amino acid abbreviations use the standard three- or single-letter nomenclature, for example Trp or W for tryptophan.

The term "about" as used herein when referring to a measurable value such as an amount, a temporal duration, and the like, is meant to encompass variations of $\pm 20\%$ or $\pm 10\%$, in some embodiments $\pm 5\%$, in some embodiments $\pm 1\%$, and in some embodiments $\pm 0.1\%$ from the specified value, as such variations are appropriate to make and used the disclosed compounds and compositions.

The terms "pharmaceutically active" and "biologically active" refer to the ability of the compounds of the invention to bind C3 or fragments thereof and inhibit complement activation. This biological activity may be measured by one or more of several art-recognized assays, as described in greater detail herein.

As used herein, "alkyl" refers to an optionally substituted saturated straight, branched, or cyclic hydrocarbon having from about 1 to about 10 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein), with from about 1 to about 7 carbon atoms being preferred. Alkyl groups include, but are not limited to, methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *t*-butyl, *n*-pentyl, cyclopentyl, isopentyl, neopentyl, *n*-hexyl, isohexyl, cyclohexyl, cyclooctyl, adamantyl, 3-methylpentyl, 2,2-dimethylbutyl, and 2,3-dimethylbutyl. The term "lower alkyl" refers to an optionally substituted saturated straight, branched, or cyclic hydrocarbon having from about 1 to about 5 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein). Lower alkyl groups include, but are not limited to, methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *t*-butyl, *n*-pentyl, cyclopentyl, isopentyl and neopentyl.

As used herein, "halo" refers to F, Cl, Br or I.

As used herein, "alkanoyl", which may be used interchangeably with "acyl", refers to an optionally substituted a straight or branched aliphatic acyclic residue having from about 1 to about 10 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein), with from about 1 to about 7 carbon atoms being preferred. Alkanoyl groups include, but are not limited to, formyl, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, pentanoyl, isopentanoyl, 2-methyl-butyryl, 2,2-dimethylpropionyl, hexanoyl, heptanoyl,

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

octanoyl, and the like. The term "lower alkanoyl" refers to an optionally substituted straight or branched aliphatic acyclic residue having from about 1 to about 5 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein). Lower alkanoyl groups include, but are not limited to, formyl, acetyl, n-propionyl, iso-propionyl, butyryl, iso-butyryl, pentanoyl, iso-pentanoyl, and the like.

As used herein, "aryl" refers to an optionally substituted, mono- or bicyclic aromatic ring system having from about 5 to about 14 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein), with from about 6 to about 10 carbons being preferred. Non-limiting examples include, for example, phenyl and naphthyl.

As used herein, "aralkyl" refers to alkyl radicals bearing an aryl substituent and have from about 6 to about 20 carbon atoms (and all combinations and subcombinations of ranges and specific numbers of carbon atoms therein), with from about 6 to about 12 carbon atoms being preferred. Aralkyl groups can be optionally substituted. Non-limiting examples include, for example, benzyl, naphthylmethyl, diphenylmethyl, triphenylmethyl, phenylethyl, and diphenylethyl.

As used herein, the terms "alkoxy" and "alkoxyl" refer to an optionally substituted alkyl-O- group wherein alkyl is as previously defined. Exemplary alkoxy and alkoxyl groups include methoxy, ethoxy, n-propoxy, i-propoxy, n-butoxy, and heptoxy, among others.

As used herein, "carboxy" refers to a $-C(=O)OH$ group.

As used herein, "alkoxycarbonyl" refers to a $-C(=O)O$ -alkyl group, where alkyl is as previously defined.

As used herein, "aroyl" refers to a $-C(=O)$ -aryl group, wherein aryl is as previously defined. Exemplary aroyl groups include benzoyl and naphthoyl.

Typically, substituted chemical moieties include one or more substituents that replace hydrogen at selected locations on a molecule. Exemplary substituents include, for example, halo, alkyl, cycloalkyl, aralkyl, aryl, sulfhydryl, hydroxyl ($-OH$), alkoxy, cyano ($-CN$), carboxyl ($-COOH$), acyl (alkanoyl: $-C(=O)R$); $-C(=O)O$ -alkyl, aminocarbonyl ($-C(=O)NH_2$), $-N$ -substituted aminocarbonyl ($-C(=O)NHR$), CF_3 , CF_2CF_3 , and the like. In relation to the aforementioned substituents, each moiety R can be, independently, any of H, alkyl, cycloalkyl, aryl, or aralkyl, for example.

As used herein, "L-amino acid" refers to any of the naturally occurring levorotatory alpha-amino acids normally present in proteins or the alkyl esters of those alpha-amino acids.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

The term "D-amino acid" refers to dextrorotatory alpha-amino acids. Unless specified otherwise, all amino acids referred to herein are L-amino acids.

"Hydrophobic" or "nonpolar" are used synonymously herein, and refer to any inter- or intra-molecular interaction not characterized by a dipole.

As used herein, "pi character" refers to the capacity of compstatin to participate in a pi bond with C3. Pi bonds result from the sideways overlap of two parallel *p* orbitals.

As used herein, "hydrogen bond potential" refers to the capacity of compstatin to participate in an electrostatic attraction with C3 involving electronegative moieties on the modified tryptophan residues or tryptophan analogs on compstatin and hydrogen atoms on C3. A non-limiting example of such an electronegative moiety is a fluorine atom.

"PEGylation" refers to the reaction in which at least one polyethylene glycol (PEG) moiety, regardless of size, is chemically attached to a protein or peptide to form a PEG-peptide conjugate. "PEGylated" means that at least one PEG moiety, regardless of size, is chemically attached to a peptide or protein. The term PEG is generally accompanied by a numeric suffix that indicates the approximate average molecular weight of the PEG polymers; for example, PEG-8,000 refers to polyethylene glycol having an average molecular weight of about 8,000.

As used herein, "pharmaceutically-acceptable salts" refers to derivatives of the disclosed compounds wherein the parent compound is modified by making acid or base salts thereof. Examples of pharmaceutically-acceptable salts include, but are not limited to, mineral or organic acid salts of basic residues such as amines; alkali or organic salts of acidic residues such as carboxylic acids; and the like. Thus, the term "acid addition salt" refers to the corresponding salt derivative of a parent compound that has been prepared by the addition of an acid. The pharmaceutically-acceptable salts include the conventional salts or the quaternary ammonium salts of the parent compound formed, for example, from inorganic or organic acids. For example, such conventional salts include, but are not limited to, those derived from inorganic acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, sulfamic, phosphoric, nitric and the like; and the salts prepared from organic acids such as acetic, propionic, succinic, glycolic, stearic, lactic, malic, tartaric, citric, ascorbic, pantoic, maleic, hydroxymaleic, phenylacetic, glutamic, benzoic, salicylic, sulfanilic, 2-acetoxybenzoic, fumaric, toluenesulfonic, methanesulfonic, ethane disulfonic, oxalic, isethionic, and the like. Certain acidic or basic compounds of the present invention may exist as zwitterions. All forms of the compounds, including free acid, free base, and zwitterions, are contemplated to be within the scope of the present invention.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

Description:

In accordance with the present invention, information about the biological and physico-chemical characteristics of compstatin have been employed to design compstatin analogs with significantly improved activity compared to the parent compstatin peptide. In some embodiments, the analogs have at least 50-fold greater activity than does compstatin. In other embodiments, the analogs have 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100-, 105-, 110-, 115-, 120-, 125-, or 130-fold or greater activity than does compstatin. In still other embodiments, the analogs have, 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-fold or greater activity than does compstatin, as compared utilizing the assays described in the examples.

Compstatin analogs synthesized in accordance with other approaches have been shown to possess somewhat improved activity as compared with the parent peptide, i.e., up to about 99-fold (Mallik, B. *et al*, 2005, *supra*; WO2004/026328). The analogs produced in accordance with the present invention possess even greater activity than either the parent peptide or analogs thereof produced to date, as demonstrated by *in vitro* assays as shown in the figures and in the Examples herein.

Table 1B shows amino acid sequence and complement inhibitory activities of compstatin and selected analogs with significantly improved activity. The selected analogs are referred to by specific modifications of designated positions (1-13) as compared to the parent peptide, compstatin (SEQ ID NO:1) and to the peptides of SEQ NOS: 2-14, shown in Table 1A, which were described in WO2004/026328. The peptides of SEQ ID NOS: 15-24 are representative of modifications made in accordance with the present invention, resulting in significantly more potent compstatin analogs. As described in greater detail below, it will be understood that certain of the modifications made to tryptophan at position 4 as set forth in SEQ ID NOS: 2-13 may be combined with a tryptophan analog substitution at position 7, to form yet additional potent compstatin analogs.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

TABLE 1.

| Peptide | Sequence | SEQ ID NO: | Activity over compstatin |
|---|--|------------|--------------------------|
| A. Compstatin and Previously Described Analogs | | | |
| Compstatin | H-ICVVQDWDGHRCT-CONH ₂ | 1 | * |
| Ac-compstatin | Ac-ICVVQDWDGHRCT-CONH ₂ | 2 | 3xmore |
| Ac-V4Y/H9A | Ac-ICVYQDWDGAHRCT-CONH ₂ | 3 | 19xmore |
| Ac-V4W/H9A -OH | Ac-ICVWQDWDGAHRCT-COOH | 4 | 25xmore |
| Ac-V4W/H9A | Ac-ICVWQDWDGAHRCT-CONH ₂ | 5 | 55xmore |
| Ac-V4W/H9A/T13dT -OH | Ac-ICVWQDWDGAHRCTdT-COOH | 6 | 55xmore |
| Ac-V4(2-Nal)/H9A | Ac-ICV(2-Nal)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 7 | 99xmore |
| Ac V4(2-Nal)/H9A -OH | Ac-ICV(2-Nal)QDWDGAHRCT-COOH | 8 | 39xmore |
| Ac V4(1-Nal)/H9A -OH | Ac-ICV(1-Nal)QDWDGAHRCT-COOH | 9 | 30xmore |
| Ac-V4(Igl)/H9A | Ac-ICV(2-Igl)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 10 | 39xmore |
| Ac-V4(Igl)/H9A -OH | Ac-ICV(2-Igl)QDWDGAHRCT-COOH | 11 | 37xmore |
| Ac-V4Dht/H9A -OH | Ac-ICVDhtQDWDGAHRCT-COOH | 12 | 5xmore |
| Ac-V4(Bpa)/H9A -OH | Ac-ICV(Bpa)QDWDGAHRCT-COOH | 13 | 49xmore |
| +G/V4W/H9A +AN -OH | H-GICVWQDWDGAHRCTAN-COOH | 14 | 38xmore |
| B. Exemplary Analogs Described Herein | | | |
| +G/V4W/H9A +N -OH | H-GICVWQDWDGAHRCTN-COOH | 15 | 45xmore |
| +G/V4(5f-I-W)/W7(5f-I-W)/H9A+N -OH | H-GICV(5f-I-W)QD(5f-I-W)GAHRCTN-COOH | 16 | 112xmore |
| +G/V4(6f-I-W)/W7(6f-I-W)/H9A+N -OH | H-GICV(6f-I-W)QD(6f-I-W)GAHRCTN-COOH | 17 | 126xmore |
| Ac-V4(5f-I-W)/H9A | Ac-ICV(5f-I-W)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 18 | 31xmore |
| Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A | Ac-ICVWQD(5f-I-W)GAHRCT-CONH ₂ | 19 | 121xmore |
| Ac-V4(5f-I-W)/W7(5f-I-W)/H9A | Ac-ICV(5f-I-W)QD(5f-I-W)GAHRCT-CONH ₂ | 20 | 161xmore |
| Ac-V4(5-methoxy-W)/H9A | Ac-ICV(5-methoxy-W)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 21 | 76xmore |
| Ac-V4(5-methyl-W)/H9A | Ac-ICV(5-methyl-W)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 22 | 67xmore |
| Ac-V4(1-methyl-W)/H9A | Ac-ICV(1-methyl-W)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 23 | 264xmore |
| Ac-V4(1-methyl-W)/W7(5f-I-W)/H9A | Ac-ICV(1-methyl-W)QD(5f-I-W)GAHRCT-CONH ₂ | 24 | 264xmore |
| Ac-V4(1-formyl-W)/H9A | Ac-ICV(1-formyl-W)QDWDGAHRCT-CONH ₂ | 25 | 264xmore |

Abbreviations used in this table are as follows:

- dT = D-threonine
- 2-Nal = 2-naphthylalanine
- 1-Nal = 1-naphthylalanine
- 2-Igl = 2-indanylglycine
- Dht = dihydrotryptophan
- Bpa = 4-benzoyl-L-phenylalanine
- 5f-I-W = 5-fluoro-L-tryptophan
- 6f-I-W = 6-fluoro-L-tryptophan
- 5-OH-W = 5-hydroxytryptophan
- 5-methoxy-W = 5-methoxytryptophan
- 5-methyl-W = 5-methyltryptophan
- 1-methyl-W = 1-methyltryptophan
- 1-formyl-W = 1-formyltryptophan

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

Modifications at the N-terminus. Acetylation of the N-terminus typically increases the complement-inhibiting activity of compstatin and its analogs, as can be seen specifically by comparing SEQ ID NO: 1 with SEQ ID NO:2. Accordingly, addition of an acyl group at the amino terminus of the peptide, including but not limited to N-acetylation, is one preferred embodiment of the invention, of particular utility when the peptides are prepared synthetically. However, it is sometimes of advantage to prepare the peptides by expression of a peptide-encoding nucleic acid molecule in a prokaryotic or eukaryotic expression system, or by *in vitro* transcription and translation. For these embodiments, the naturally-occurring N-terminus may be utilized. One example of a compstatin analog suitable for expression *in vitro* or *in vivo* is represented by SEQ ID NOS:15-17, wherein the acetyl group is replaced by unmodified glycine at the N-terminus. SEQ ID NOS:15-17, which additionally comprise modifications within the peptides and at the C-termini as discussed below, are between about 45- and about 125-fold more active than compstatin in the complement inhibition assay described herein.

Modification within the peptide. Using computational methods that the rank low lying energy sequences, it was previously determined that Tyr and Val were the most likely candidates at position 4 to support stability and activity of the peptide (Klepeis JL *et al.*, 2003). It was disclosed in WO2004/026328 that Trp at position 4, especially combined with Ala at position 9, yields many-fold greater activity than that of the parent peptide (for example, compare activities of SEQ ID NOS: 4, 5 and 6 with those of SEQ ID NOS: 2 and 3). WO2004/026326 also disclosed that peptides comprising the tryptophan analogs 2-naphthylalanine (SEQ ID NOS: 7, 8), 1-naphthylalanine (SEQ ID NO: 9), 2-indanylglycine (SEQ ID NOS: 10, 11) or dihydrotryptophan (SEQ ID NO: 12) at position 4 were all found to possess increased complement-inhibitory activity, ranging from 5-fold to 99-fold greater than compstatin. In addition, a peptide comprising the phenylalanine analog, 4-benzoyl-L-alanine, at position 4 (SEQ ID NO: 13) possessed 49-fold greater activity than compstatin.

In accordance with the present invention, peptides comprising 5-fluoro-L-tryptophan (SEQ ID NO:19) or either 5-methoxy-, 5-methyl- or 1-methyl-tryptophan, or 1-formyl-tryptophan (SEQ ID NOS: 21, 22, 23 and 25, respectively) at position 4 possess 31-264-fold greater activity than does compstatin. Incorporation of 1-methyl- or 1-formyl-tryptophan increased the activity and the binding affinity the most in comparison to other analogs. It is believed that an indole 'N'-mediated hydrogen bond is not necessary at position 4 for the binding and activity of compstatin. The absence of this hydrogen bond or reduction of the polar character by replacing hydrogen with lower alkyl, alkanoyl or indole nitrogen at position 4

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

enhances the binding and activity of compstatin. Without intending to be limited to any particular theory or mechanism of action, it is believed that a hydrophobic interaction or effect at position 4 strengthens the interaction of compstatin with C3. Accordingly, modifications of Trp at position 4 (*e.g.*, altering the structure of the side chain according to methods well known in the art), or substitutions of Trp analogs that maintain or enhance the aforementioned hydrophobic interaction are contemplated in the present invention to produce analogs of compstatin with even greater activity. Such analogs are well known in the art and include, but are not limited to the analogs exemplified herein, as well as unsubstituted or alternatively substituted derivatives thereof. Examples of suitable analogs may be found by reference to the following publications, and many others: Beene, *et al.* (2002) *Biochemistry* 41: 10262-10269 (describing, *inter alia*, singly- and multiply-halogenated Trp analogs); Babitzky & Yanofsky (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 12452-12456 (describing, *inter alia*, methylated and halogenated Trp and other Trp and indole analogs); and U.S. Patents 6,214,790, 6,169,057, 5,776,970, 4,870,097, 4,576,750 and 4,299,838. Trp analogs may be introduced into the compstatin peptide by *in vitro* or *in vivo* expression, or by peptide synthesis, as known in the art and described in greater detail in the examples.

In certain embodiments, Trp at position 4 of compstatin is replaced with an analog comprising a 1-alkyl substituent, more particularly a lower alkyl (*e.g.*, C₁-C₅) substituent as defined above. These include, but are not limited to, N(α) methyl tryptophan and 5-methyltryptophan. In other embodiments, Trp at position 4 of compstatin is replaced with an analog comprising a 1-alkanoyl substituent, more particularly a lower alkanoyl (*e.g.*, C₁-C₅) substituent as defined above. In addition to exemplified analogs, these include but are not limited to 1-acetyl-L-tryptophan and L- β -homotryptophan.

Thermodynamic experiments showed that incorporation of 5-fluoro-L-tryptophan at position 7 in compstatin increased enthalpy of the interaction between compstatin and C3, relative to wildtype compstatin, whereas incorporation of 5-fluoro-tryptophan at position 4 in compstatin decreased the enthalpy of this interaction. Without intending to be bound to any particular mechanism, the former results indicate that replacement of indole hydrogens with a fluorine atom on a Trp residue at position 7 of compstatin can strengthen hydrogen bonding potential of the indole ring, introduce new hydrogen bonding potential, or mediate an interaction with C3 through a water molecule at the binding interface. (Katragadda M *et al.*, 2004). Hence, modifications of Trp at position 7 (*e.g.*, altering the structure of the side chain according to methods well known in the art), or substitutions of Trp analogs that maintain or enhance the

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

aforementioned hydrogen bonding potential, or mediate an interaction with C3 through a water molecule at the binding interface, are contemplated in the present invention to produce analogs with even greater activity. In certain embodiments, Trp analogs whose indole rings have modifications that result in increased hydrogen bonding potential or mediate an interaction with C3 through a water molecule at the binding interface may be introduced into position 7 of the compstatin peptide by *in vitro* or *in vivo* expression, or by peptide synthesis. A peptide comprising the tryptophan analog 5-fluoro-tryptophan (SEQ ID NO:19) at position 7 was found to possess a 121-fold increased activity as compared with compstatin.

In another embodiment, Trp analogs are incorporated at both positions 4 and 7 of the compstatin molecule, and His at position 9 of compstatin is optionally replaced by Ala. Thermodynamic experiments showed that incorporation of 5-fluoro-tryptophan at positions 4 and 7 in compstatin increased enthalpy of the interaction between compstatin and C3, relative to wildtype compstatin. Accordingly, modifications of Trp at positions 4 and 7 (*e.g.*, altering the structure of the side chain according to methods well known in the art), or substitutions of Trp analogs that maintain or enhance the aforementioned hydrophobic interaction with C3 *via* position 4 and maintain or enhance the aforementioned hydrogen bonding potential with C3 *via* position 7, or interaction with C3 through a water molecule at the binding interface *via* position 7, are contemplated in the present invention to produce compstatin analogs with even greater activity. Such modified Trp or Trp analogs may be introduced into the compstatin peptide at positions 4 and 7 by *in vitro* or *in vivo* expression, or by peptide synthesis. Peptides comprising tryptophan analogs 5-fluoro-tryptophan (SEQ. ID. NO:16) and comprising tryptophan analogs 6-fluoro-tryptophan (SEQ. ID. NO: 17) at positions 4 and 7 were found to possess significantly increased activity over compstatin, ranging from a 112- to a 264-fold increase in activity. In addition, peptides comprising the tryptophan analog 1-methyl-tryptophan at position 4 and 5-fluoro-tryptophan at position 7 (SEQ ID NO: 24) were found to possess a 264-fold increase in activity relative to compstatin.

Modifications at the carboxy terminus. Peptides produced by synthetic methods are commonly modified at the carboxy terminus to comprise an amide instead of an acid; this common modification can be seen in Table 1 in compstatin (SEQ ID NO:1) and several analogs. Indeed, in some instances, it has been determined that the terminal amide-containing peptides possess greater activity than do the terminal acid-containing peptides (compare, for example, SEQ ID NOS: 5 and 7 with SEQ ID NOS: 4 and 8, respectively). Accordingly, one preferred embodiment of the invention utilizes the C-terminal amide modification. However, some

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

circumstances favor the use of an acid at the C-terminus. Such circumstances include, but are not limited to solubility considerations and the expression of the peptides *in vitro* or *in vivo* from peptide-encoding nucleic acid molecules.

The carboxy-terminal residue of compstatin is threonine. In some embodiments of the present invention, the C-terminal threonine is replaced by one or more naturally-occurring amino acids or analogs. For example, the peptide having SEQ ID NO:6 comprises D-threonine instead of L-threonine, and further possesses a COOH group at the C-terminus. This peptide shows activity equal to that of peptide SEQ ID NO:5, comprising L-threonine and CONH₂ at the C-terminus. Further, Ile has been substituted for Thr at position 13, to obtain a peptide with 21-fold greater activity than that of compstatin. In addition, the peptides of SEQ ID NOS: 14-17, which comprise a C-terminal peptide extension of Asn, or a dipeptide extension of Ala-Asn, along with a COOH at the C-terminus and a non-acetylated N-terminus, demonstrate between 38- and 126-fold greater activity than does compstatin. They are also suitable for production *via* a prokaryotic or eukaryotic expression system, as described in greater detail below.

The compstatin analogs of the present invention may be prepared by various synthetic methods of peptide synthesis *via* condensation of one or more amino acid residues, in accordance with conventional peptide synthesis methods. For example, peptides are synthesized according to standard solid-phase methodologies, such as may be performed on an Applied Biosystems Model 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), according to manufacturer's instructions. Other methods of synthesizing peptides or peptidomimetics, either by solid phase methodologies or in liquid phase, are well known to those skilled in the art. During the course of peptide synthesis, branched chain amino and carboxyl groups may be protected/deprotected as needed, using commonly-known protecting groups. An example of a suitable peptide synthetic method is set forth in Example 3. Modification utilizing alternative protecting groups for peptides and peptide derivatives will be apparent to those of skill in the art.

Alternatively, certain peptides of the invention may be produced by expression in a suitable prokaryotic or eukaryotic system. For example, a DNA construct may be inserted into a plasmid vector adapted for expression in a bacterial cell (such as *E. coli*) or a yeast cell (such as *Saccharomyces cerevisiae*), or into a baculovirus vector for expression in an insect cell or a viral vector for expression in a mammalian cell. Such vectors comprise the regulatory elements necessary for expression of the DNA in the host cell, positioned in such a manner as to permit expression of the DNA in the host cell. Such regulatory elements required for expression

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

include promoter sequences, transcription initiation sequences and, optionally, enhancer sequences.

The peptides of SEQ ID NOS:14-17, and others similarly designed, are suitable for production by expression of a nucleic acid molecule *in vitro* or *in vivo*. A DNA construct encoding a concatemer of the peptides, the upper limit of the concatemer being dependent on the expression system utilized, may be introduced into an *in vivo* expression system. After the concatemer is produced, cleavage between the C-terminal Asn and the following N-terminal G is accomplished by exposure of the polypeptide to hydrazine.

The peptides produced by gene expression in a recombinant procaryotic or eucaryotic system may be purified according to methods known in the art. Examples 1 and 2 set forth methods suitable for use in the present invention. In one embodiment, a commercially available expression/secretion system can be used, whereby the recombinant peptide is expressed and thereafter secreted from the host cell, to be easily purified from the surrounding medium.

A combination of gene expression and synthetic methods may also be utilized to produce compstatin analogs. For example, an analog can be produced by gene expression and thereafter subjected to one or more post-translational synthetic processes, e.g., to modify the N- or C-terminus or to cyclize the molecule.

The structure of compstatin is known in the art, and the structures of the foregoing analogs are determined by similar means. Once a particular desired conformation of a short peptide has been ascertained, methods for designing a peptide or peptidomimetic to fit that conformation are well known in the art. See, e.g., G.R. Marshall (1993), *Tetrahedron*, 49: 3547-3558; Hruby and Nikiforovich (1991), in *Molecular Conformation and Biological Interactions*, P. Balam & S. Ramasehan, eds., Indian Acad. of Sci., Bangalore, PP. 429-455). Of particular relevance to the present invention, the design of peptide analogs may be further refined by considering the contribution of various side chains of amino acid residues, as discussed above (i.e., for the effect of functional groups or for steric considerations).

It will be appreciated by those of skill in the art that a peptide mimic may serve equally well as a peptide for the purpose of providing the specific backbone conformation and side chain functionalities required for binding to C3 and inhibiting complement activation. Accordingly, it is contemplated as being within the scope of the present invention to produce C3-binding, complement-inhibiting compounds through the use of either naturally-occurring amino acids, amino acid derivatives, analogs or non-amino acid molecules capable of being joined to form the appropriate backbone conformation. A non-peptide analog, or an analog comprising peptide and

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

non-peptide components, is sometimes referred to herein as a "peptidomimetic" or "isosteric mimetic," to designate substitutions or derivations of the peptides of the invention, which possess the same backbone conformational features and/or other functionalities, so as to be sufficiently similar to the exemplified peptides to inhibit complement activation.

The use of peptidomimetics for the development of high-affinity peptide analogs is well known in the art (see, *e.g.*, Zhao B *et al.*, 1995; Beeley, N. 1994; and, Hraby, VJ 1993). Assuming rotational constraints similar to those of amino acid residues within a peptide, analogs comprising non-amino acid moieties may be analyzed, and their conformational motifs verified, by means of the Ramachandran plot (Hraby & Nikiforovich 1991), among other known techniques.

The compstatin analogs of the present invention can be modified by the addition of polyethylene glycol (PEG) components to the peptide. As is well known in the art, PEGylation can increase the half-life of therapeutic peptides and proteins *in vivo*. In one embodiment, the PEG has an average molecular weight of about 1,000 to about 50,000. In another embodiment, the PEG has an average molecular weight of about 1,000 to about 20,000. In another embodiment, the PEG has an average molecular weight of about 1,000 to about 10,000. In an exemplary embodiment, the PEG has an average molecular weight of about 5,000. The polyethylene glycol may be a branched or straight chain, and preferably is a straight chain.

The compstatin analogs of the present invention can be covalently bonded to PEG via a linking group. Such methods are well known in the art. (Reviewed in Kozlowski A. *et al.* 2001; see also, Harris JM and Zalipsky S, eds. Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series 680 (1997)). Non-limiting examples of acceptable linking groups include an ester group, an amide group, an imide group, a carbamate group, a carboxyl group, a hydroxyl group, a carbohydrate, a succinimide group (including without limitation, succinimidyl succinate (SS), succinimidyl propionate (SPA), succinimidyl carboxymethylate (SCM), succinimidyl succinamide (SSA) and N-hydroxy succinimide (NHS)), an epoxide group, an oxycarbonylimidazole group (including without limitation, carbonyldimidazole (CDI)), a nitro phenyl group (including without limitation, nitrophenyl carbonate (NPC) or trichlorophenyl carbonate (TPC)), a trysylate group, an aldehyde group, an isocyanate group, a vinylsulfone group, a tyrosine group, a cysteine group, a histidine group or a primary amine. In certain embodiments, the linking group is a succinimide group. In one embodiment, the linking group is NHS.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

The compstatin analogs of the present invention can alternatively be coupled directly to PEG (*i.e.*, without a linking group) through an amino group, a sulfhydryl group, a hydroxyl group or a carboxyl group. In one embodiment, PEG is coupled to a lysine residue added to the C-terminus of compstatin.

PEGylation is one way to increase *in vivo* retention of therapeutic peptides and proteins. The *in vivo* clearance of peptides can also be reduced by linking the peptides to certain other peptides. For instance, certain albumin binding peptides display an unusually long half-life of 2.3 h when injected by intravenous bolus into rabbits (Dennis *et al.*, 2002). A peptide of this type, fused to the anti-tissue factor Fab of D3H44 enabled the Fab to bind albumin while retaining the ability of the Fab to bind tissue factor (Nguyen *et al.*, 2006). This interaction with albumin resulted in significantly reduced *in vivo* clearance and extended half-life in mice and rabbits, when compared with the wild-type D3H44 Fab, comparable with those seen for PEGylated Fab molecules, immunoadhesins, and albumin fusions. As described in Example 11 herein, the inventors have synthesized a compstatin analog fused with an albumin-binding peptide and demonstrated that the fusion protein is active in inhibiting complement activation.

The complement activation-inhibiting activity of compstatin analogs, peptidomimetics and conjugates may be tested by a variety of assays known in the art. In a preferred embodiment, the assay described in Example 4 is utilized. A non-exhaustive list of other assays is set forth in U.S. Patent 6,319,897, including, but not limited to, (1) peptide binding to C3 and C3 fragments; (2) various hemolytic assays; (3) measurement of C3 convertase-mediated cleavage of C3; and (4) measurement of Factor B cleavage by Factor D.

The peptides and peptidomimetics described herein are of practical utility for any purpose for which compstatin itself is utilized, as known in the art. Such uses include, but are not limited to: (1) inhibiting complement activation in the serum, tissues or organs of a patient (human or animal), which can facilitate treatment of certain diseases or conditions, including but not limited to but not limited to, age-related macular degeneration, rheumatoid arthritis, spinal cord injury, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease; (2) inhibiting complement activation that occurs during use of artificial organs or implants (*e.g.*, by coating or otherwise treating the artificial organ or implant with a peptide of the invention); (3) inhibiting complement activation that occurs during extracorporeal shunting of physiological fluids (blood, urine) (*e.g.*, by coating the tubing through which the fluids are shunted with a peptide of the invention); and (4) in screening of small molecule libraries to identify other inhibitors of compstatin activation (*e.g.*,

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

liquid- or solid-phase high-throughput assays designed to measure the ability of a test compound to compete with a compstatin analog for binding with C3 or a C3 fragment).

The following examples are provided to describe the invention in greater detail. They are intended to illustrate, not to limit, the invention. The materials and methods set forth in Examples 1-5 were utilized to generate the results described in Examples 6-11.

EXAMPLE 1

Bacterial Expression Of Compstatin

A compstatin analog with the following sequence, NH₂-GICVWQDWGAHRCTN-OH ("G(-1)/V4W/H9A/N14") (SEQ ID NO:15) was expressed in fusion with chitin binding domain and the DnaB intein (New England Biolabs, Beverly, MA). Guided by the peptide sequence and the codon usage for *E. coli* the following genetic code was used to generate a synthetic gene for this peptide with the following sequence:

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

To clone the synthetic gene into the pGEM-T vector, a 5' flanking region containing a *SapI* site and 3' flanking region containing a *PstI* site were designed. To construct the synthetic gene, the four overlapping oligonucleotides shown below were designed using DnaWorks software and synthesized at Invitrogen Inc.(Carlsbad, CA):

5'GGTGGTGCTCTTCCAACGGTATTTGCGTTTGGCAGGA^{3'} (SEQ ID NO: 30)

5'TTGGGGTGCACCGTTGCACCAATTAAGTGCAGG^{3'} (SEQ ID NO: 31)

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

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

The overlapping DNA fragments were assembled by PCR as described by Stemmer *et al.*, 1995. The resulting gene was amplified using the following primers:

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

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

The PCR-amplified fragments of compstatin were then cloned into the pGEM-T vector, and the resulting clone was digested with *PstI* and *SapI*. The *PstI*-*SapI* fragment encoding the compstatin analog was further subcloned into the expression vector pTWIN1, which had been predigested with *PstI* and *SapI*; the sequence of the clone was verified by DNA sequencing.

To express the compstatin analog, ER2566 *E. coli* cells transformed with the compstatin clone were grown in SOB medium (20 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 0.5 g/L NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂) at 37 °C. When an OD₆₀₀ 0.7 was reached, expression was induced by the

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

addition of IPTG to a final concentration of 0.3 mM, followed by an additional incubation at 37 °C for 4 hr. Cells were collected by centrifugation and lysed by sonication in buffer B1 (20 mM phosphate buffer, pH 8.5, with 500 mM NaCl and 1 mM EDTA) supplemented with 0.2% Tween-20. The cell extract was centrifuged, and the soluble fraction was applied to a chitin binding column (New England Biolabs, Beverly, MA) pre-equilibrated with buffer B1. The column was washed with 100ml of buffer B1, followed by a quick wash with 3 column volumes of buffer B2 (50 mM ammonium acetate, pH 7.0). The column was incubated at room temperature for 20 hr, and the peptide was eluted with Buffer B2, lyophilized and further purified on a C18 HPLC column. The purified peptide was identified using MALDI-TOF mass spectrometry.

EXAMPLE 2

Expression Of Tryptophan Analogs Of Compstatin In *E. coli*

To express compstatin analogs containing tryptophan derivatives, the pTWIN1-compstatin clone was transformed into the ER2566 Trp 82 auxotroph. Expression was carried out in M9 minimal medium supplemented with 1 mM L-tryptophan as described above. Cells were grown to an OD₆₀₀ 0.8-1.0, then collected by centrifugation and resuspended in fresh minimal medium containing 2 mM of the desired tryptophan analog(s): 5-fluoro-tryptophan, 6-fluoro-tryptophan, 7-aza-tryptophan or 5-hydroxy-tryptophan. The expressed compstatin analogs were further purified as described in Example 1.

EXAMPLE 3

Peptide Synthesis

Peptide synthesis and purification was performed as described by Sahu *et al.*, 1996; Sahu *et al.*, 2000; and Mallik *et al.*, 2005. Briefly, peptides were synthesized in an Applied Biosystem peptide synthesizer (model 431A) using Fmoc amide resin and standard side chain protecting groups. Peptides were cleaved from the resin by incubation for 3 hours at 22°C with a solvent mixture containing 5% phenol, 5% thioanisole, 5% water, 2.5% ethanedithiol, and 82.5% trifluoroacetic acid (TFA). The reaction mixture was filtered through a fritted funnel, precipitated with cold ether, dissolved in 50% acetonitrile containing 0.1% TFA, and lyophilized.

The crude peptides obtained after cleavage were dissolved in 10% acetonitrile containing 0.1% TFA and purified using a reverse phase C-18 column (Waters, Milford, MA). Disulfide oxidation was achieved by an on-resin cyclization method using the reagent Thallium (III) trifluoroacetate. This method eliminates the dilute solution oxidation steps and subsequent time-

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

consuming concentration through lyophilization steps prior to reverse-phase HPLC. Using this method, the multimer formation was nonexistent and a high level (~90%) of fully deprotected, oxidized or cyclized material was obtained. The identity and purity of all peptides were confirmed by laser desorption mass spectroscopy and HPLC.

For the synthesis of the 5-fluoro-tryptophan, 1-methyl-tryptophan, and 5-methyl-tryptophan analogs, Fmoc-*dl*-derivatives were used. Separation of the enantiomeric peptides was performed as described by Meyers *et al.* 1978. The *dl* mixture of each peptide was separated into *d* and *l* isomeric peptides on a C18 reversed-phase HPLC column using 10 % acetonitrile in 0.01M ammonium acetate, pH 4.1. The isomeric identity of the eluted peptides was determined by treating the peptides with V8 protease, followed by analysis using MALDI-TOF mass spectrometry (MicroMass TOFspec2E).

EXAMPLE 4

Complement Inhibition Assays

Inhibitory activity of compstatin and its analogs on the complement system was determined by measuring their effect on the activation of the complement system by immunocomplexes. Complement activation inhibition was assessed by measuring the inhibition of C3 fixation to ovalbumin - anti-ovalbumin complexes in normal human plasma. Microtiter wells were coated with 50 μ l of ovalbumin (10 mg/ml) for 2 hr at 25°C (overnight at 4°C). The wells were saturated with 200 μ l of 10 mg/ml BSA for 1 hr at 25°C and then a rabbit anti-ovalbumin antibody was added to form an immunocomplex by which complement can be activated. Thirty microliters of peptides at various concentrations were added directly to each well followed by 30 μ l of a 1:80 dilution of human plasma. After 30 min incubation, bound C3b/iC3b was detected using a goat anti-human C3 HRP-conjugated antibody. Color was developed by adding ABTS peroxidase substrate and optical density measured at 405 nm.

The absorbance data obtained at 405 nm were translated into % inhibition based on the absorbance corresponding to 100 % complement activation. The % inhibition was plotted against the peptide concentration, and the resulting data set was fit to the logistic dose-response function using Origin 7.0 software. The concentration of the peptide causing 50% inhibition of C3b/iC3b deposition was taken as the IC₅₀ and used to compare the activities of various peptides. IC₅₀ values were obtained from the fitted parameters that achieved the lowest chi-square value.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

EXAMPLE 5**Isothermal Titration Calorimetry Analysis Of The Interaction C3
With Compstatin And Its Analogs**

Isothermal titration calorimetry experiments were performed using the Microcal VP-ITC calorimeter (Microcal Inc, Northampton, MA). Protein concentrations of 3.5-5 μM and peptide concentrations of 80-200 μM were used for these experiments. All titrations were performed in PBS (10 mM phosphate buffer with 150 mM NaCl, pH 7.4). In each experiment, the target protein, C3, was loaded into the cell, and peptide was loaded into the syringe. All experiments were performed at 25 °C and for each experiment, 2- μl peptide injections were made into the cell containing the protein. In each experiment, the raw isotherms were corrected for the heats of dilution by subtracting the isotherms representing peptide injections into the buffer. The resulting isotherms were fit to various models within the Origin 7.0 software, and the model that achieved the lowest chi square value was deemed to be appropriate for the respective dataset. Binding affinity and entropy values were plotted against log P values.

EXAMPLE 6**Role Of Tryptophan In C3-Compstatin Interaction As Assessed By
Bacterially Expressed Compstatin Analogs**

Four different tryptophan analogs that differ in the chemical nature of the indole ring were incorporated into compstatin using an intein-mediated protein expression system. Following expression, the peptides were purified in a single step with a final yield of 2 mg/L of culture. The tryptophan analogs 5-fluoro-tryptophan, 6-fluoro-tryptophan, 7-aza-tryptophan and 5-hydroxy-tryptophan were also expressed using the ER2566/Trp 82 auxotroph as indicated by the MALDI profiles, and the resulting peptides were purified to homogeneity. Native compstatin and analogs were cyclized *in vivo* through a disulfide bond, as evidenced by their inability to react with PHMB. All peptides were further purified on a reverse-phase C18 HPLC column.

The activity of the expressed compstatin analog G(-1)/V4W/H9A/N14 (SEQ ID NO:15) exhibited an IC_{50} of 1.2 μM , which is similar to the activity observed for the Ac-V4W/H9A analog (SEQ ID NO:5). This finding indicates that the glycine located at the N-terminus of the expressed peptide plays a role similar to that of the acetyl group located at the N-terminus of the Ac-V4W/H9A analog.

All the expressed compstatin analogs except the 7-aza tryptophan analog were found to be active at the concentrations tested. However, the peptide showed different levels of activity

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

relative to the analog, Ac-V4W/H9A (Figure 1; Table 2). Compstatin containing 6-fluoro-tryptophan and 5-fluoro-tryptophan as well as alanine at position 9 exhibited a 2.8 and 2.5-fold higher activity, respectively, than that of the Ac-V4W/H9A analog.

Table 2. Complement inhibitory activity of the expressed peptides

| Expressed peptide | SEQ ID NO: | IC ₅₀ (μM) | Relative activity* |
|---|------------|-----------------------|--------------------|
| 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 |

* relative to the activity of the peptide H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂ (compstatin, SEQ ID NO:1)

^c represents hydroxy

^b synthetic peptide

Without being limited to any particular mechanism, it is believed that adding fluorine atom increases the activity of the peptide by increasing the hydrophobicity of the indole ring. The incorporation of less hydrophobic tryptophan analogs 5-hydroxy tryptophan and 7-aza-tryptophan was also investigated. In contrast to the results with the 5-fluoro and 6-fluoro analogs, compstatin analogs containing 5-hydroxy-tryptophan showed 27.5-fold loss in the activity compared to the Ac-V4W/H9A analog (SEQ ID NO:5), and the peptide containing 7-aza-tryptophan showed no activity at all at the concentrations tested. 7-aza-tryptophan resembles tryptophan in molecular structure except that it has a nitrogen atom at position 7 of the indole ring as opposed to a carbon atom. The loss in activity observed upon substitution of 7-aza-tryptophan shows the relative importance of this carbon atom.

EXAMPLE 7

Role Of Individual Tryptophans In C3-Compstatin Interaction

Solid-phase peptide synthesis was used to generate compstatin analogs with 5-fluoro-tryptophan incorporated selectively at position 4, position 7, or both positions 4 and 7, with alanine at position 9. Synthesis was undertaken using Fmoc-5-fluoro-*dl*-tryptophan. This reaction yielded an enantiomeric mixture of the peptides bearing 5-fluoro-*d*-tryptophan and 5-fluoro-*l*-tryptophan. Three different peptides were synthesized: two peptides with single substitution independently at position 4 or 7 and one peptide with substitutions at both positions

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

4 and 7. While a mixture of 5-fluoro-*l*-tryptophan and 5-fluoro-*d*-tryptophan analogs could occur in the case of the single substitutions, a mixture of four enantiomeric combinations was possible in the case of the double substitution. Each of the peptide mixtures was further subjected to reversed-phase HPLC to separate the peptide enantiomers. Identification of the enantiomers was carried out by digesting the peptides with V8 protease and subsequently analyzing the digested product using MALDI. V8 protease cleaves at the C-terminal side of Asp residues only when followed by an *l*-amino acid. Identification of cleavage products in the mass spectra indicated that the *l*-enantiomeric peptide eluted first followed by the *d*-form, where no cleavage fragments were detected.

All the peptides, containing either 5-fluoro-*l*-tryptophan or 5-fluoro-*d*-tryptophan or both, were tested for their complement inhibitory activity. The synthetic peptide substituted with 5-fluoro-*l*-tryptophan in both the positions showed a 2.5-fold higher activity than that of Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) (Table 3).

Table 3. Complement inhibitory activity of the synthetic compstatin analogs containing 5-fluoro-*l*-tryptophan

| Peptide | SEQ ID NO: | IC ₅₀ (μM) | Relative activity* |
|--|------------|-----------------------|--------------------|
| 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 |

*relative to the activity of the peptide H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂ (compstatin, SEQ ID NO:1)

Complement inhibition assays (Figure 2; Table 3) indicated that (a) substitution of 5-fluoro-*l*-tryptophan at position 4 alone rendered the peptide at least 1.5 times less active than Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5). Substitution of 5-fluoro-*l*-tryptophan at position 7 alone increased the activity 2.7-fold when compared to Ac-V4W/H9A. Substitution of 5-fluoro-*l*-tryptophan simultaneously at positions 4 and 7 also yielded a 2.5-fold increase in the activity relative to Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5). Substitution of 5-fluoro-*d*-tryptophan at either position 4 or 7, or both, rendered the peptide inactive.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

EXAMPLE 8**Thermodynamic Basis For The Tryptophan-Mediated
Recognition of Compstatin By C3**

Isothermal titration calorimetry was used to examine the binding of the peptides to C3 and investigate the thermodynamic basis for their activities. The calorimetric data obtained for the interaction of all the peptides with C3 fit to a one set of sites model with stoichiometry close to 1. It is believed that the binding of these peptides to C3 occurs in a 1:1 ratio. The thermodynamic parameters resulting from these fits are shown in Table 4. As evident from the K_d values, the peptide with a single substitution of 5-fluoro-*L*-tryptophan at position 7 and a double substitution at positions 4 and 7 exhibited tighter binding than the Ac-V4W/H9A (SEQ ID NO:5) and the Ac-V4(5f-*L*-W)/H9A (SEQ ID NO:18) analogs. This finding is in agreement with the relative activities observed in the complement inhibition assay (Table 3), indicating that a binding-activity correlation exists.

All peptides bound to C3 with a negative enthalpy and positive entropy. Such binding is a characteristic of the interaction of compstatin with C3. Among all the peptides examined, the position 7-substituted Ac-V4W/W7(5f-*L*-W)/H9A analog (SEQ ID NO:19) exhibited a higher binding enthalpy ($\Delta H = -21.83$, $\Delta\Delta H = -3.69$) than did its wild-type counterpart. The position 4-substituted Ac-V4(5f-*L*-W)/H9A analog (SEQ ID NO:18) bound to C3 with an enthalpy of -16.69 kcal/mole, 1.45 kcal/mole lower than that exhibited by its wild-type counterpart.

Incorporation of 5-fluoro-tryptophan at position 4 led to a loss in enthalpy of 1.45 kcal/mole relative to that of tryptophan at this position (Table 4). Since the only difference between tryptophan and 5-fluoro-tryptophan is the fluorine atom at C5 of the indole, this loss in enthalpy can be attributed to the replacement of hydrogen with fluorine.

Table 4. Thermodynamic parameters for the interaction of synthetic compstatin analogs containing 5-fluoro-*L*-tryptophan and C3

| peptide | SEQ ID NO: | K_d (μM) | (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- <i>L</i> -W)/H9A | 18 | 0.15 | -16.69 | 1.45 | 7.39 | -1.4 | -9.4 | 0 |
| Ac-V4W/W7(5f- <i>L</i> -W)/H9A | 19 | 0.035 | -21.83 | -3.69 | 11.56 | 2.77 | -10.25 | -1 |
| Ac-V4(5f- <i>L</i> -W)/W7(5f- <i>L</i> -W)/H9A | 20 | 0.017 | -17.33 | 0.81 | 6.73 | -2.06 | -10.6 | -1.2 |

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

Incorporation of 5-fluoro-tryptophan at position 7 increased the enthalpy by 3.69 kcal/mole relative to wild-type (Table 4). Without being limited to any particular mechanism, it is believed that tryptophan at position 7 is participating in an enthalpically favorable interaction such as hydrogen bonding. Replacing one of the indole hydrogens with a fluorine atom might strengthen the hydrogen bonding character of the indole NH due to the drop in pK_a . Alternatively, the fluorine forms a hydrogen bond as a result of its electron-donating nature, as has been demonstrated in the structure of the tetradeca (3-fluorotyrosyl)glutathione transferase.

Another explanation for the observed increase in enthalpy is that a water molecule is bridging the interaction between the fluorine atom and a hydrogen acceptor on C3, in which case two hydrogen bonds (equivalent to about 4 kcal/mole energy) need to be formed. Support for this theory comes from the decrease in entropy observed for the interaction of the position 7-substituted Ac-V4W/W7(5fW)/H9A analog (SEQ ID NO:19) relative to the wild-type analog (Table 4), a decrease that could be produced by the binding of an additional water molecule at the interface. Water-mediated interactions between fluorine atoms and other hydrogen bond acceptors have been observed in other systems.

Binding of the double-substituted analog to C3 yielded an enthalpy change of -19.85 kcal/mole, an entropy change of -9.35 kcal/mole and a free energy change of -10.5 kcal/mole. It is believed that incorporation of 5-fluoro-tryptophan simultaneously at both positions abrogates the effects of the single substitutions.

EXAMPLE 9

Additional Compstatin Analogs

Incorporation of tryptophan analogs at position 4. It was shown in Examples 5 and 6 that substitution of valine with tryptophan at position 4 of compstatin increased its activity 45-fold. To further investigate the nature of interaction mediated by residue at position 4 during the course of the binding of compstatin to C3, the tryptophan at position 4 was replaced with tryptophan analogs and 2-naphthylalanine.

ELISA-based assays were used to test the activity of all the peptide analogs bearing tryptophan analogs at position 4 and alanine at position 9. While substitution with 1-methyl-tryptophan (Ac-V4(1-methyl-W)/H9A) (SEQ ID NO:23) and 2-naphthylalanine (Ac-V4(2-Nal)/H9A) (SEQ ID NO:7) increased the activity over compstatin 264 and 99-fold, respectively, substitution of 5-fluoro-tryptophan (Ac-V4(5f-L-W)/W7/H9A) (SEQ ID NO:18) and 5-methyl tryptophan (Ac-V4(5-methyl-W)/H9A) (SEQ ID NO:22) resulted in a lower activity, to 31 and 67-fold greater than the activity exhibited by the wild-type peptide (Table 5). Figure 3 shows

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

the inhibitory curves depicting the activity and Table 5 shows the IC₅₀ values calculated from the curves and the relative activities of the peptides in comparison to the activity of original compstatin. Figure 5 shows inhibitory constants (IC₅₀) plotted against log P values of tryptophan analogs and 2-naphthylalanine.

Table 5. Complement inhibitory activity of the compstatin analogs

| Peptide | SEQ ID NO: | IC ₅₀ (μM) | Relative activity* |
|----------------------------------|------------|-----------------------|--------------------|
| Ac-V4W/H9A | 5 | 1.20 | 45 |
| Ac-V4(5f-I-W)/7W/H9A | 18 | 1.74 | 31 |
| Ac-V4W/W7(5f-I-W)/H9A | 19 | 0.446 | 121 |
| Ac-V4(5f-I-W)/W7(5f-I-W)/H9A | 20 | 0.482 | 112 |
| Ac-V4W/7(5-methoxy W)/H9A | 29 | 0.46 | 0.5 |
| Ac-V4(5-methoxy W)/7W/H9A | 21 | 0.71 | 76 |
| Ac-V4(5-methyl W)/7W/H9A | 22 | 0.81 | 67 |
| Ac-V4(1-methyl W)/7W/H9A | 23 | 0.205 | 264 |
| Ac-V4(2-Nal)/W7/H9A | 7 | 0.545 | 99 |
| Ac-V4(1-methyl W)/W7(5f-I-W)/H9A | 24 | 0.205 | 264 |

* Relative to the activity of H-I(CVVQDWGHHRC)T-NH₂ (compstatin, SEQ ID NO:1).

The binding of compstatin peptides was also investigated using isothermal titration calorimetry. The calorimetric data obtained for the interaction of all the peptides with C3 fit to a one set of sites model with stoichiometry close to 1 (Figure 4). This result suggests that the binding of these peptides to C3 occurs in a 1:1 ratio. The thermodynamic parameters resulted from these fits are shown in Table 6. As evident from the K_d values, Ac-V4(1-methyl-W)/H9A exhibited higher binding affinity (K_d = 0.015 μM) compared to all other peptides having a single substitution at position 4. Plotting these values against the log P values of analogs indicates that a correlation exists between binding affinity and hydrophobic nature of the tryptophan analogs and 2-naphthylalanine. As per the correlation, binding affinity increases with an increase in the hydrophobicity of the analog incorporated at position 4. This observation is consistent with the correlation shown between log P and the inhibitory constants.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

Table 6. Thermodynamic parameters for the interaction of synthetic compstatin analogs containing 5-fluoro-l-tryptophan and C3

| peptide | SEQ ID NO. | K _d (μM) | (kcal/mole) | | | | | |
|----------------------------------|------------|---------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | | | ΔH | ΔΔH | -TΔS | -TΔΔS | ΔG | ΔΔG |
| Wild-type | 1 | 0.14 | -18.14 | 0 | 8.79 | 0 | -9.4 | 0 |
| Ac-V4(5f-l-W)/H9A | 18 | 0.15 | -16.69 | 1.45 | 7.39 | -1.4 | -9.4 | 0 |
| Ac-V4(5-methyl-W)/H9A | 22 | 0.12 | -17.75 | 0.34 | 8.2 | -0.54 | -9.55 | -0.15 |
| Ac-V4(1-methyl-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-l-W)/H9A | 19 | 0.035 | -21.83 | -3.69 | 11.56 | 2.77 | -10.25 | -0.8 |
| Ac-V4(1-methyl-W)/W7(5f-l-W)/H9A | 24 | 0.017 | -17.33 | 0.81 | 6.73 | -2.06 | -10.6 | -1.2 |

All the peptides bound to C3 with a negative enthalpy and positive entropy, suggesting that the binding is enthalpy-driven. Such binding is a characteristic of the interaction of compstatin with C3. However, the binding of these peptides is characterized by an enthalpy change lower than the wild-type, and entropy change shifted towards favorable end. Figure 5B shows a plot of log P vs. -TΔS, which indicates that with an increase in the hydrophobicity of the analogs incorporated at position 4, the entropy is more favored thus making a positive impact on the free energy change.

Incorporation of tryptophan analogs at position 7. It was proposed in Example 7 that tryptophan at position 7 makes a hydrogen bond with a residue on C3. To examine this possibility further, tryptophan at position 7 was replaced with tryptophan analogs similar to the replacements at position 4 to elucidate the nature of interaction made by tryptophan at this position. Substitution with 5-fluoro-tryptophan (Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A) (Seq ID NO:19), yielded a 121-fold more active peptide. (Figure 3, Table 5). Substitutions of tryptophan 7 with the analog 5-methyl trp or 1-methyl trp rendered compstatin inactive (data not shown). Thus, no correlation between the activity and hydrophobicity of tryptophan analogs was observed.

The thermodynamic properties of the different Trp 7-analogs was investigated in parallel by calorimetry. (Table 6). Since no binding was detected for peptides containing either the 5-methyl trp or 1-methyl trp at position 7, the binding parameters do not exist. Only the peptide Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A (SEQ ID NO:19) bound to C3. The binding affinity was 0.035 μM, which is greater than that observed for all the peptides having a Trp analog at position 4, except for the peptide Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23). In contrast to the peptides having a Trp analog at position 4, Ac-V4W/W7(5f-l-W)/H9A (SEQ ID NO:19) bound to C3 with high favorable binding enthalpy change (ΔH = -21.83, ΔΔH = -3.69) and unfavorable entropy change

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

(-TAS = 11.56, -TΔΔS = 2.77), suggesting additional favorable non-covalent interactions of polar nature.

The results show that incorporation of 5-fluoro-tryptophan at position 7 results in an increase in the activity of compstatin, whereas incorporation of analogs 5-methyl-tryptophan and 1-methyl-tryptophan renders compstatin inactive. The loss of activity of compstatin upon incorporation of 1-methyl-tryptophan supports the conclusion that the hydrogen bond mediated by N-H of Trp 7 is important for the interaction of compstatin with C3. In addition, the complete loss of activity of compstatin upon incorporation of 5-methyl-tryptophan suggests that a hydrophobic amino acid is not well tolerated at position 7.

Incorporation of tryptophan analogs at both positions 4 and 7. Since the substitution of tryptophans at position 4 with 1-methyl-tryptophan and position 7 with 5-fluoro-tryptophan yielded compstatin analogs that showed a drastic increase in the activity, a compstatin analog containing substitutions at positions 4 and 7 was generated. The resulting peptide (Ac-V4(1-methyl-W)/W7(5f-1-W)/H9A) (SEQ ID NO:24) generated an inhibition curve similar to that of the single substitution with 1-methyl-tryptophan (Ac-V4(1-methyl-W)/H9A) (SEQ ID NO:23), (Figure 3, Table 5). The binding affinity ($K_d = 0.017$) observed for this peptide in the calorimeter is also similar to that of Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23). These observations suggest that 5-fluoro-tryptophan has no effect at position 7 in the presence of 1-methyl-tryptophan at position 4 under these experimental conditions.

Incorporation of another tryptophan analog at position 4. To further investigate the nature of interaction mediated by residue at position 4 during the course of the binding of compstatin to C3, the tryptophan at position 4 was replaced with the tryptophan analog 1-formyl-tryptophan.

Figure 6 shows a comparison of percent complement inhibition vs. peptide concentration for Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23) (circles) and Ac-V4(1-formyl-W)/H9A (SEQ ID NO:25). As can be seen, the 1-formyl-W analog was essentially identical to the 1-methyl-W analog in its complement inhibition activity.

EXAMPLE 10

PEGylation of Compstatin Analog

A prolonged half-life of compstatin is advantageous for its use in chronic treatments. Extending the half-life of tested therapeutic peptides has been achieved in several instances through PEGylation (*see* Veronese et al., 2001), as PEG has the ability to delay the elimination of biomolecules from the circulation through a variety of mechanisms, including

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

decreasing renal clearance, proteolysis and immunogenicity. PEGylation involves covalent attachment of PEG polymers to macromolecules, preferably to the primary amine of lysines.

This example describes the preparation of a PEGylated compstatin analog, Ac-V4(1-methyl-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) and evaluation of the compound for its ability to inhibit complement activation.

Fmoc-NH-NHS-5000 PEG was purchased from Nektar transforming therapeutics, 490 discovery Dr, Huntsville, AL 35806.

The compound Ac-V4(1-methyl-W)/H9A-K-PEG 5000 (SEQ ID NO:36) was synthesized chemically by Fmoc solid-phase peptide chemistry according to a modified standard protocol. Briefly, PEG was dissolved in 3 ml of dichloromethane, 1 ml of 2M DIEA was added manually, and the PEG was mixed for 5 minutes.

Then the PEG was transferred to the vessel, and left to couple overnight. The PEG was then deprotected with 20% piperidine for 20 min.

Then the synthesis proceeded according to the standard protocol, with a lysine incorporated at the C-terminus of the molecule for the purpose of linking the PEG to its side chain.

Final cleavages of the peptides was achieved with Reagent D (TFA:H₂O:TIS:Phenol, 87.5:5:2.5:5) (4 mL) at 25C for 90 min, to provide the desired product. The peptide was then purified on a C18 reversed-phase HPLC column, lyophilized and characterized by MALDI-TOF.

The PEGylated compstatin analog was tested for complement-inhibiting activity using the *in vitro* assay described in Example 4. As shown in Figure 7, the PEGylated analog was active in inhibiting complement activation, however, seven-fold more conjugate was required to achieve the same amount of inhibition as the non-PEGylated analog, Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23).

EXAMPLE 11

Albumin Binding Protein Conjugate of Compstatin Analog

Dennis *et al.*(2002) identified a series of peptides having the core sequence DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:37) that specifically bound serum albumin from multiple species with high affinity. These peptides bound to albumin with 1:1 stoichiometry at a site distinct from known small molecule binding sites. The peptide SA21 (AcRLIEDICLPRWGCLWEDDNH₂; SEQ ID NO:38) has an unusually long half-life of 2.3 h when injected by intravenous bolus into rabbits. As mentioned in the Detailed Description, a

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

related sequence, fused to the anti-tissue factor Fab of D3H44 enabled the Fab to bind albumin with similar affinity to that of SA21 while retaining the ability of the Fab to bind tissue factor1 (Nguyen *et al.* 2006). This interaction with albumin resulted in reduced *in vivo* clearance of 25- and 58-fold in mice and rabbits, respectively, when compared with the wild-type D3H44 Fab. The half-life was extended 37-fold to 32.4 h in rabbits and 26-fold to 10.4 h in mice, achieving 25–43% of the albumin half-life in these animals. These half-lives exceed those of a Fab 2 and are comparable with those seen for PEGylated Fab molecules, immunoadhesins, and albumin fusions.

This example describes the synthesis of a Compstatin analog fused with an albumin-binding peptide and its activity in *in vitro* assays for complement inhibition.

The compound 4(1MeW)-ABP was synthesized chemically by Fmoc solid-phase peptide chemistry according to standard protocols. The N- and C-termini of the peptide were protected with acetyl and amide groups. The peptide was further purified on a C18 reversed-phase HPLC column, lyophilized, and characterized by MALDI mass spectrometry.

For cyclization, the peptide-resin (0.10 mmol/g loading based on amino acid analysis) was swollen in dichloromethane (DCM) (2 mL) for 5 min, filtered and treated with 94:1:5 DCM/TFA/TIS (5 mL) at 25°C 3 times x 2 min each to selectively deprotect the S-Mmt protecting groups, removing the solvent N₂ pressure. These bis(thiol), bis(Acm)-peptide-resin intermediates were washed with CH₂Cl₂, DMF and NMP (each 5 times x 2 min, 2 mL), swollen further in NMP (2 mL) for 5 min and then treated with Et₃N (2 eq.) in NMP at 25°C for 4 h. The peptide-resin was then washed with DMF and CH₂Cl₂ (each 5 times x 2 min, 2 mL). Following resin-bound formations of the first loop, the peptide-resin was again washed with DMF (5 times x 2 min, 2 mL) and swollen in DMF (2 mL) for 5 min, filtered and treated with Tl(tfa)₃ (1.5 eq.) in DMF-anisole (4 mL) to cyclize the second disulfide loops. After gentle agitation at 25°C for 4 h, the thallium reagents were removed with DMF (8 times x 2 min, 2 mL) and the peptide-resins were washed further with CH₂Cl₂ (5 times x 2 min, 2 mL). Final cleavages of the bicyclic peptide was achieved with Reagent D (TFA:H₂O:TIS:Phenol, 87.5:5:2.5:5) (4 mL) at 25°C for 90 min, to provide the desired product.

The resultant conjugated peptide (SEQ ID NO:39) is shown below.



WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

The Albumin-binding peptide-compstatin was tested for complement-inhibiting activity using the *in vitro* assay described in Example 4. As shown in Figure 8, the conjugate was active in inhibiting complement activation, however, seven-fold more conjugate was required to achieve the same amount of inhibition as the unconjugated analog, Ac-V4(1-methyl-W)/H9A (SEQ ID NO:23).

References:

- Babitzke P, and 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 DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, and Dougherty DA. (2002) Cation- π interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT_{3A}) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry.* 41:10262-9.
- Dennis MS, Zhang M, Meng YG, Kadkhodayan M, Kirchhofer D, Combs D, Damico LA. (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem.* 277:35035-43
- Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A, and Lambris JD. (1999a) Prolongation of ex vivo-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. *Transplant. Proc.* 31:934-5.
- Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A, and Lambris JD. (1999b) Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. *Xenotransplantation.* 6:52-65.
- Fiane AE, Videm V, Lambris JD, Geiran OR, Svennevig JL, and Mollnes TE. (2000) Modulation of fluid-phase complement activation inhibits hyperacute rejection in a porcine-to-human xenograft model. *Transplant. Proc.* 32:899-900.
- Furlong ST, Dutta AS, Coath MM, Gormley JJ, Hubbs SJ, Lloyd D, Mauger RC, Strimpler AM, Sylvester MA, Scott CW, and Edwards PD. (2000) C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology.* 48:199-212.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

- Hruby VJ. (1993) Conformational and topographical considerations in the design of biologically active peptides. *Biopolymers*. 33:1073-82.
- Kalli KR, Hsu P, Fearon and DT. (1994) Therapeutic uses of recombinant complement protein inhibitors. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417-31.
- Katragadda M, Morikis D, and Lambris JD. (2004) Thermodynamic studies on the interaction of the third complement component and its inhibitor, compstatin. *J. Biol. Chem.* 279:54987-95.
- Klepeis JL, Floudas CA, Morikis D, Tsokos CG, Argyropoulos E, Spruce L, and Lambris JD. (2003) Integrated computational and experimental approach for lead optimization and design of compstatin variants with improved activity. *J. Am. Chem. Soc.* 125:8422-3.
- Kozłowski A, Charles SA, and Harris JM. (2001) Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs*. 15:419-29.
- Mallik B, Katragadda M, Spruce LA, Carafides C, Tsokos CG, Morikis D, and Lambris JD (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, and Lambris JD. (1998) Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sci.* 7:619-27.
- Nguyen A, Reyes AE 2nd, Zhang M, McDonald P, Wong WL, Damico LA, Dennis MS. (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 KN, Sahu A, and Lambris JD. (1998) Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood.* 92:1661-7.
- Sahu A, Kay BK, and Lambris JD. (1996) Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J. Immunol.* 157:884-91.
- Soulika AM, Khan MM, Hattori T, Bowen FW, Richardson BA, Hack CE, Sahu A, Edmunds LH Jr, and Lambris JD. (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, and J.D. Lambris (2002) Chemical synthesis of small complement proteins and protein modules. *International Immunopharmacology*. 2: 1320-1321.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

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

Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, and Matis LA. (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. U S A.* 93:8563-8.

Zhao B, Helms LR, DesJarlais RL, Abdel-Meguid SS, and 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.

The present invention is not limited to the embodiments described and exemplified above, but is capable of variation and modification within the scope of the appended claims.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

What is Claimed:

1. A compound that inhibits complement activation, comprising a peptide having a sequence:
Xaa1 – Cys – Val – Xaa2 - Gln - Asp – Xaa3 - Gly – Xaa4 - His - Arg – Cys – Xaa5
(SEQ ID NO:26);
wherein:
Xaa1 is Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu or a dipeptide comprising Gly-Ile;
Xaa2 is Trp or an analog of Trp, wherein the analog of Trp has increased hydrophobic character as compared with Trp, with the proviso that, if Xaa3 is Trp, Xaa2 is the analog of Trp;
Xaa3 is Trp or an analog of Trp comprising a chemical modification to its indole ring wherein the chemical modification increases the hydrogen bond potential of the indole ring;
Xaa4 is His, Ala, Phe or Trp;
Xaa5 is L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, a dipeptide comprising Thr-Asn or Thr-Ala, or a tripeptide comprising Thr-Ala-Asn, wherein a carboxy terminal –OH of any of the L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly or Asn optionally is replaced by –NH₂; and
the two Cys residues are joined by a disulfide bond.
2. The compound of claim 1, wherein Xaa2 participates in a nonpolar interaction with C3.
3. The compound of claim 1, wherein Xaa2 participates in a nonpolar interaction with C3, and Xaa3 participates in a hydrogen bond with C3.
4. The compound of claim 1, wherein Xaa3 participates in a hydrogen bond with C3.
5. The compound of claim 1, wherein the analog of Trp of Xaa2 comprises a halogenated tryptophan.
6. The compound of claim 5, wherein the halogenated tryptophan is 5-fluoro-*l*-tryptophan, or 6-fluoro-*l*-tryptophan.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

7. The compound of claim 1, wherein the analog of Trp of Xaa2 comprises a lower alkoxy or lower alkyl substituent at the 5 position of tryptophan.
8. The compound of claim 7, wherein the analog of Trp of Xaa2 is 5-methoxytryptophan or 5-methyltryptophan. or 1-methyltryptophan or 1-formyltryptophan.
9. The compound of claim 1, wherein the analog of Trp of Xaa2 comprises a lower alkenoyl or lower alkyl substituent at the 1 position of tryptophan.
10. The compound of claim 9, wherein the analog of Trp of Xaa2 is 1-methyltryptophan or 1-formyltryptophan.
11. The compound of claim 1, wherein the analog of Trp of Xaa3 comprises a halogenated tryptophan.
12. The compound of claim 11, wherein the halogenated tryptophan is 5-fluoro-*l*-tryptophan, or 6-fluoro-*l*-tryptophan.
13. The compound of claim 1, wherein Xaa4 is Ala.
14. The compound of claim 1, wherein Xaa2 comprises a lower alkenoyl or lower alkyl substituent at the 1 position of tryptophan, Xaa3 optionally comprises a halogenated tryptophan and Xaa4 comprises Alanine.
15. The compound of claim 14, wherein Xaa2 is 1-methyltryptophan or 1-formyltryptophan and Xaa3 optionally comprises 5-fluoro-*l*-tryptophan.
16. The compound of claim 1, comprising any of SEQ ID NOS: 15-25.
17. The compound of claim 1, which comprises a peptide produced by expression of a polynucleotide encoding the peptide.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

18. The compound of claim 1, wherein the compound is produced at least in part by peptide synthesis.
19. The compound of claim 1, comprising any one of SEQ ID NOS: 15-25.
20. The compound of claim 1, wherein the compound is PEGylated.
21. The compound of claim 20, comprising SEQ ID NO:36
22. The compound of claim 1, further comprising an additional peptide component that extends the *in vivo* retention of the compound.
23. The compound of claim 22, wherein the additional peptide component is an albumin binding peptide.
24. The compound of claim 23, comprising SEQ ID NO:39.
25. A compound that inhibits complement activation, comprising a non-peptide or partial peptide mimetic of SEQ ID NO:26, wherein the compound binds C3 and inhibits complement activation with at least 100-fold greater activity than does a peptide comprising SEQ ID NO:1 under equivalent assay conditions.

(57) Abstract: Compounds comprising peptides and peptidomimetics capable of binding C3 protein and inhibiting complement activation are disclosed. These compounds display greatly improved complement activation-inhibitory activity as compared with currently available compounds.

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

1/9

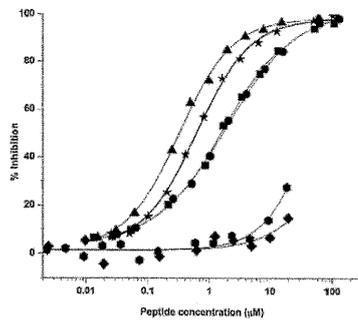


Fig. 1

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

2/9

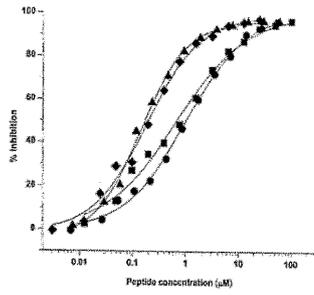


Fig. 2

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

3/9

Fig. 3a

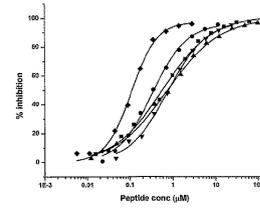


Fig. 3b

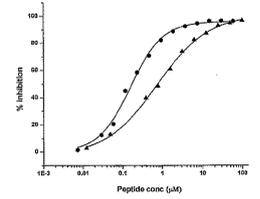
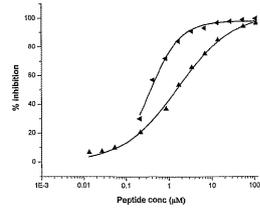


Fig. 3c



WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

4/9

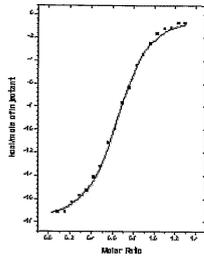


Fig. 4a

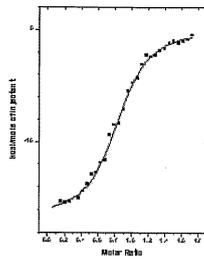
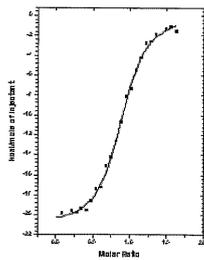


Fig. 4b

Fig. 4c



WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

5/9

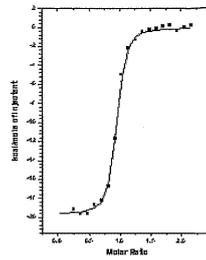


Fig. 4d

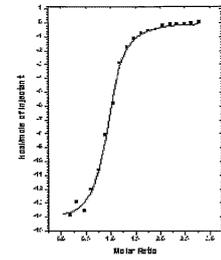
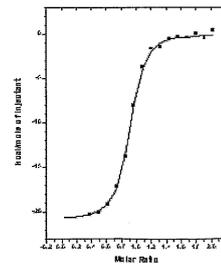


Fig. 4e

Fig. 4f



WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

6/9

Fig. 5a

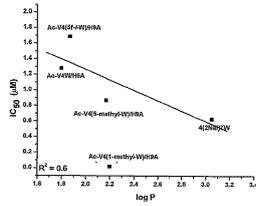


Fig. 5b

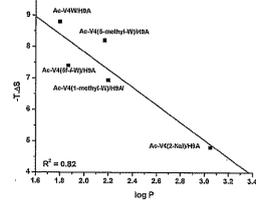
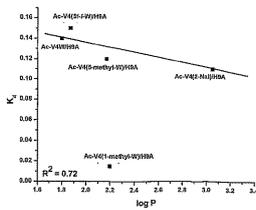


Fig. 5c



WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

7/9

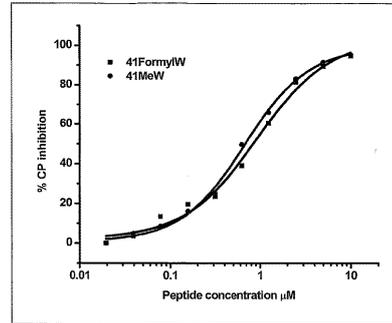


FIG. 6

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

8/9

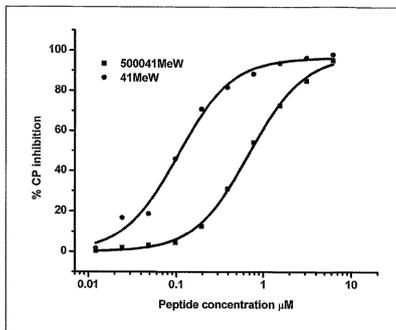


FIG. 7

WO 2007/062249

PCT/US2006/045539

9/9

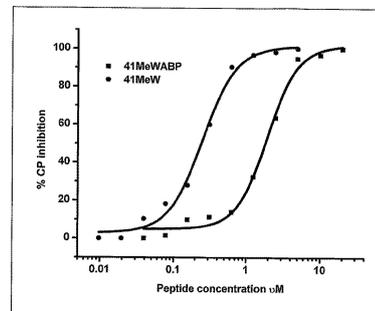


FIG. 8

【配列表】

2013177403000002.app