

INHIBIDOR DE TSP1

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido cíclico o una sal farmacéuticamente
5 aceptable del mismo, que puede mejorar el flujo sanguíneo al inhibir una función de la trombospondina
1 (TSP1) y es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tales como isquemia crítica de
extremidades; un conjugado del péptido cíclico que tiene un perfil farmacocinético-farmacodinámico
(PK-PD) mejorado; un medicamento que los contiene como componentes activos; y un método para
producir el conjugado, etc.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad arterial periférica (EAP) es una enfermedad causada por aterosclerosis
en los vasos sanguíneos de las piernas que reduce el flujo de sangre, lo que puede provocar diversos
15 síntomas tales como dolor. La EAP grave se conoce como isquemia crítica de las extremidades (CLI),
y representa del 1 al 3% de los pacientes con EAP. CLI es una afección en la que se produce dolor
en reposo debido a la obstrucción del flujo sanguíneo a las extremidades inferiores y se produce úlcera
o necrosis en la periferia de las extremidades inferiores. CLI se clasifica en etapas III a IV y etapas
4 a 6, respectivamente, según las clasificaciones de Fontaine y Rutherford (NPL 1).

20

La CLI se ha considerado problemática debido al mal pronóstico y la alta mortalidad,
y se han realizado estudios sobre una terapia en pacientes con CLI, en la que el progreso de la úlcera
o necrosis de las extremidades inferiores se suprime mediante la remodelación del sistema vascular
mediante la revascularización en tejidos isquémicos y suministrando oxígeno y nutrientes a los tejidos
isquémicos (NPL 2). Hasta ahora se han realizado varios intentos para aplicar una terapia génica
25 utilizando factores de crecimiento proangiogénicos para la CLI, pero a diferencia de los estudios con
animales, no se ha demostrado que dicha terapia muestre eficacia en ensayos clínicos. A la luz de
los resultados de estos ensayos clínicos, se ha prestado otra atención a los factores angiostáticos,
proponiendo una hipótesis sobre la importancia del equilibrio entre los factores proangiogénicos y
angiostáticos (NPL 3 y 4).

30

La isquemia crónica que amenaza las extremidades (CLTI), que se ha propuesto en
los últimos años, es un término general para enfermedades con riesgos de amputación de
extremidades, tales como isquemia de extremidades inferiores, defectos tisulares, neuropatía e
infecciones, que requieren intervenciones terapéuticas. CLTI es un concepto más completo que
incluye no sólo la isquemia sino también otras afecciones, por ejemplo, el pie diabético. La gravedad
35 de CLTI se evalúa utilizando la clasificación WIfI en una escala de calificación de 0 a 3 para la gravedad

de "Herida; W", "Isquemia; I" e "Infección del pie; fI", respectivamente (NPL 22).

Se informa que la trombospodina 1 (TSP1), una glicoproteína que actúa de manera inhibidora sobre la angiogénesis, se libera de las plaquetas activadas y se sintetiza y secreta por numerosos tipos de células, incluidas células endoteliales, miocitos lisos, células mesangiales renales, células tubulares y podocitos (NPL 5 a 7). La expresión de TSP1 aumenta en la sangre de pacientes con enfermedad vascular periférica y en los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores de pacientes con CLI, y este hallazgo sugiere la participación de TSP1 en el progreso de la úlcera o necrosis en las extremidades inferiores de pacientes con CLI (NPL 8 y 9). Dado que TSP1 limita la recuperación del flujo sanguíneo después de la reperfusión por isquemia de las extremidades posteriores en ratas, y los ratones con deficiencia de TSP1 muestran una angiogénesis mejorada después de la isquemia de las extremidades posteriores, se considera que TSP1 tiene un efecto inhibidor sobre la recuperación del flujo sanguíneo después de la isquemia de las extremidades posteriores (NPL 10 y 11). Además, dado que los ratones con deficiencia de TSP1 muestran un mayor flujo sanguíneo en las áreas heridas y una mayor reducción en el tamaño de la herida, se puede esperar que la inhibición de la función de TSP1 tenga un efecto curativo en las heridas reconocidas en pacientes con CLI (NPL 12).

La TSP1 no sólo tiene actividad angiostática sino también otras actividades farmacológicas y se considera que está implicada en muchas enfermedades. La TSP1, secretada por las plaquetas, aumenta los niveles de PAI-1 en el sistema fibrinolítico y estimula la trombogénesis (NPL 13). Los pacientes obesos resistentes a la insulina muestran niveles elevados de TSP1, lo que sugiere que la TSP1 actúa sobre los macrófagos para promover respuestas inflamatorias inducidas por la obesidad y exacerbar la resistencia a la insulina (NPL 14 y 15). TSP1 promueve la apoptosis de los podocitos renales e induce la disfunción de los podocitos (NPL 16). TSP1 se une a la proteína reguladora de señales- α en células no fagocíticas, activa la NADPH oxidasa, limita la vasodilatación e induce lesión por reperfusión de isquemia renal (NPL 17). Estos resultados sugieren la posibilidad de que la inhibición de TSP1 pueda mejorar el infarto de miocardio y las respuestas inflamatorias y la resistencia a la insulina en pacientes obesos, así como los trastornos renales, incluida la lesión por reperfusión de isquemia. Además, las micropartículas derivadas de plaquetas liberadas por TSP1 inducen una crisis vasooclusiva en pacientes con anemia de células falciformes (NPL 18 y 19). Además, se informa que TSP1 promueve la migración y adhesión de monocitos, lo que contribuye a mejorar las respuestas inflamatorias vasculares durante el desarrollo del aneurisma aórtico (NPL 20). Se informa que TSP1 puede estar involucrada tanto en la supresión como en la promoción de cánceres al actuar sobre el crecimiento, la adhesión y la invasión de células cancerosas (NPL 21).

Mientras tanto, existen algunos anticuerpos (PTL 1) y polipéptidos (PTL 2) conocidos como antagonistas de la unión de TSP1 al receptor CD47. El presente solicitante también ha

desarrollado polipéptidos macrocíclicos que se pueden unir a TSP1 para bloquear la adhesión de células tales como células endoteliales vasculares a TSP1.

Lista de citas

Literatura de patentes

5

PTL 1: WO 2008/060785

PTL 2: US 2014/296477

PTL 3: WO 2018/052002

Literatura no patente

NPL 1: Kinlay S. *Circ Cardiovasc Interv.* 2016; 9: e001946.

10

NPL 2: Davies MG. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2012; 8: 20-27.

NPL 3: Hellsten Y, Hoier B. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42: 1616-1622.

NPL 4: Olfert IM. *Microcirculation* 2016; 23: 146-156.

NPL 5: Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. *Nat Med.* 2000; 6: 41-48.

NPL 6: Henkin J, Volpert OV. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15(12): 1369-1386.

15

NPL 7: Murphy-Ullrich JE, Iozzo RV. *Matrix Biol.* 2012; 31(3): 152-154.

NPL 8: Smadja DM, d'Audigier C, Bieche I, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 551-559.

NPL 9: Favier J, Germain S, Emmerich J, et al. *J Pathol* 2005; 207: 358-366.

NPL 10: Isenberg JS, Romeo MJ, Abu-Asab M, et al. *Circ Res.* 2007; 100(5): 712-720.

20

NPL 11: Csanyi G, Yao M, Rodriguez AI, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2966-2973.

NPL 12: Soto-Pantoja DR, Shih HB, Maxhimer JB, et al. *Matrix Biol.* 2014; 37: 25-34.

NPL 13: Prakash P, Kulkarni PP, Chauhan AK. *Blood* 2015; 125(2): 399-406.

NPL 14: Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, et al. *Diabetes.* 2008; 57(2): 432-439.

25

NPL 15: Li Y, Tong X, Rumala C, et al. *PLoS One.* 2011; 6(10): e26656.

NPL 16: Cui W, Maimaitiyiming H, Zhou Q, et al. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(7): 1323-1333.

NPL 17: Yao M, Rogers NM, Csanyi G, et al. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(6): 1171-1186.

NPL 18: Hagag AA, Elmashad G, Abd El-Lateef AE. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014; 6(1): e2014044.

30

NPL 19: Camus SM, Gausseres B, Bonnin P, et al. *Blood.* 2012; 120(25): 5050-5058.

NPL 20: Liu Z, Morgan S, Ren J, et al. *Circ Res.* 2015; 117(2): 129-141.

NPL 21: Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D. et al., The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res.* 2004;122(1):135-42.

35

NPL 22: Conte MS, Bradbury AW, et al.: Global vascular guidelines on the management of

chronic limb-threatening ischemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2019; 58: S1-S109 e133.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos que puedan mejorar el flujo sanguíneo inhibiendo una función de TSP1 y que sean útiles para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades tales como la isquemia crítica de las extremidades. Otro objeto de la presente invención es proporcionar compuestos que puedan mejorar el flujo sanguíneo inhibiendo una
10 función de TSP1 y que tengan un perfil PK-PD (farmacocinético-farmacodinámico) mejorado, por ejemplo, compuestos que exhiban una eficacia excelente a una frecuencia de administración más baja.

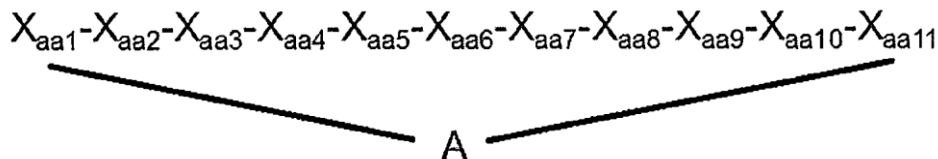
Solución al problema

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos para lograr el objetivo mencionado anteriormente y, como resultado, descubrieron que los péptidos cíclicos que tienen
15 secuencias de aminoácidos particulares, que se vuelven bicíclicos mediante cadenas laterales de dos residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos que constituyen el anillo al estar acoplados entre sí (péptidos bicíclicos), se unen a TSP1 para bloquear la adhesión de las células a TSP1 y, por lo tanto, pueden mejorar el flujo sanguíneo al inhibir una función de TSP1; y han descubierto además que los compuestos que pueden mejorar el flujo sanguíneo al inhibir una función de TSP1 se conjugan
20 con moléculas que contienen Fc y, por lo tanto, pueden mejorar el flujo sanguíneo con una frecuencia de administración más baja. Los presentes inventores han realizado estudios adicionales basados en estos hallazgos, completando así la presente invención.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente.

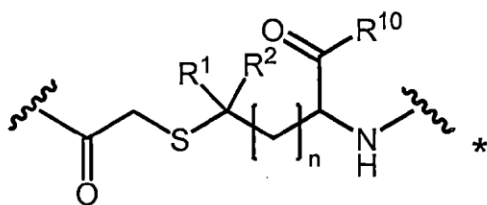
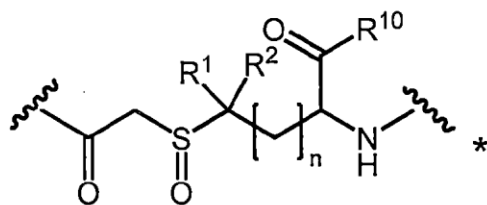
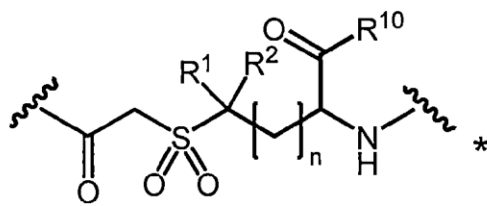
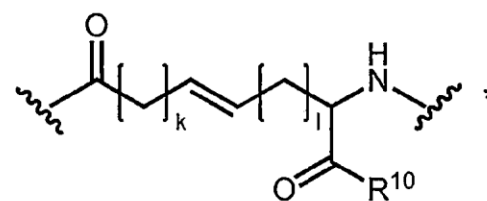
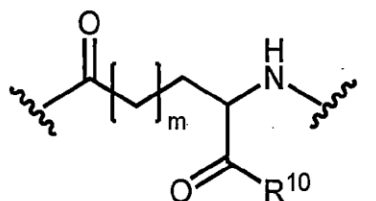
[1] Un péptido cíclico representado por la fórmula (I)

25 [Fórmula química 1]



[en el que A se selecciona de grupos formadores de anillos de fórmulas:

[Fórmula química 2]

A₁A₂A₃A₄A₅

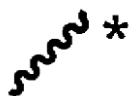
en donde

[Fórmula química 3]



5 representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de X_{aa1},

[Fórmula química 4]



representa un punto de unión al grupo carbonilo C-terminal de X_{aa11},

R¹ y R² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃;

R¹⁰ es un grupo amino o un grupo hidroxilo,

n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3),

k y l son cada uno independientemente un número entero de 0 a 3, (por ejemplo, 0, 1, 2, o

3),

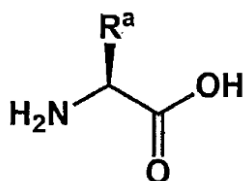
n es un número entero de 1 a 7 (por ejemplo, (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7);

X_{aa1} es un residuo de un aminoácido aromático;

X_{aa2} es un residuo de un aminoácido aromático, un aminoácido básico o un aminoácido alifático;

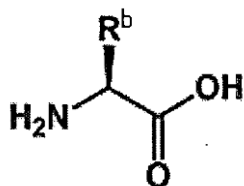
X_{aa3} y X_{aa8} tienen cada uno una estructura seleccionada independientemente de un residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III)

[Fórmula química 5]



[en donde R^a es un grupo representado por la fórmula $-(CH_2)_tSH$ (en donde t es un número entero de 1 a 3) (por ejemplo, 1, 2, o 3))] o fórmula (III')

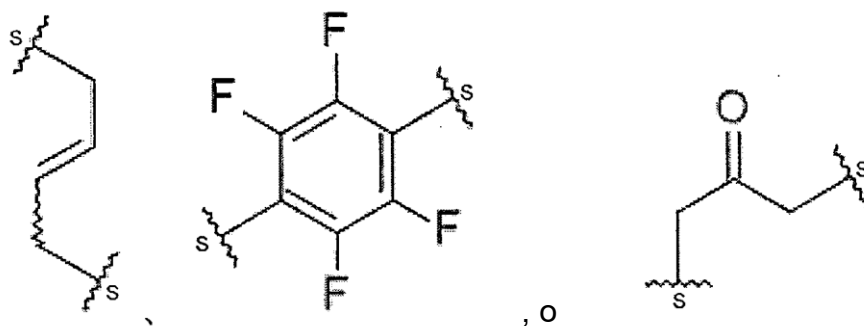
10 [Fórmula química 5-1]



[en donde R^b es un grupo representado por la fórmula $-CH_v(CH_3)_{2-v}CH_w(CH_3)_{2-w}SH$ (en donde v es un número entero de 0 a 2; cuando v es 0 o 1, w es 2 y cuando v es 2, w es 0 ó 1) o $-CH_x(CH_3)_{2-x}SH$ (donde x es 0 o 1)], en el que los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} forman un enlace; representado por -

15 S-S-, -S-CH₂-S-, o -S-X-S- (en el que X se selecciona de

[Fórmula química 6]



(en donde

[Fórmula química 7]



representa un punto de unión a S)), y al menos uno de X_{aa3} y X_{aa8} es un residuo del aminoácido representado por la fórmula (III);

X_{aa4} es un residuo de un aminoácido neutro;

X_{aa5} es un residuo de un aminoácido básico;

5 X_{aa6} es un residuo de un aminoácido neutro o un aminoácido ácido;

X_{aa7} es un residuo de un aminoácido aromático;

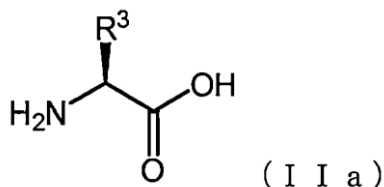
X_{aa9} es un residuo de un aminoácido aromático, un aminoácido alifático o un aminoácido básico;

X_{aa10} es un residuo de un aminoácido aromático;

10 X_{aa11} es un residuo de un aminoácido alifático;

en donde el aminoácido alifático es un aminoácido representado por la fórmula (IIa)

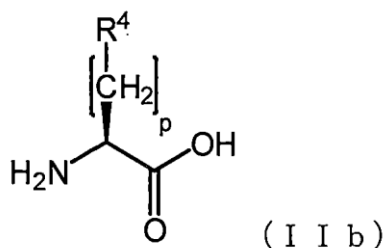
[Fórmula química 8]



(donde R^3 es alquilo de C_{1-6} , alqueno de C_{2-6} o cicloalquilo de C_{3-6});

15 el aminoácido alifático es un aminoácido representado por la fórmula (IIb)

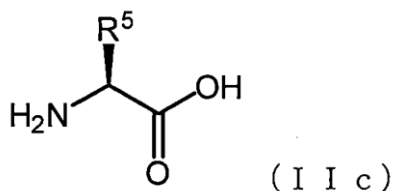
[Fórmula química 9]



(en el que R^4 es un grupo aromático seleccionado entre fenilo, tienilo, piridilo, naftilo, indolilo, benzofuranilo y benzotienilo, en el que el grupo aromático puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de C_{1-3} , átomos de halógeno, hidroxilo y alcoxi de C_{1-3} y p es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3));

el aminoácido básico es un aminoácido representado por la fórmula (IIc)

[Fórmula química 10]

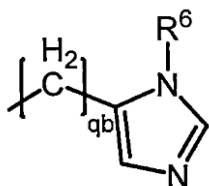


[donde R⁵ es un grupo representado por

la fórmula $-(CH_2)_{qa}NH_2$ (en la que qa es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)),

la fórmula

5 [Fórmula química 11]



(donde R⁶ es un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃, y qb es un número entero de 1 a 6

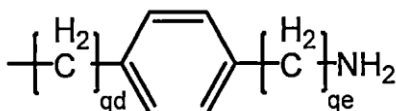
(por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)),

la fórmula $-((CH_2)_{qc}NHC(=NH)NH_2)$ (donde qc es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4,

10 5, o 6)), o

la fórmula

[Fórmula química 12]

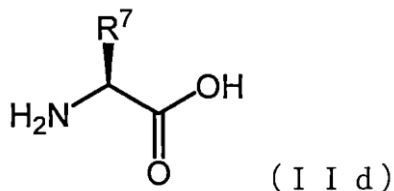


(en donde qd y qe son cada uno independientemente un número entero de 1 a 3 (por

15 ejemplo, 1, 2, o 3));

el aminoácido neutro es un aminoácido representado por la fórmula (II d)

[Fórmula química 13]



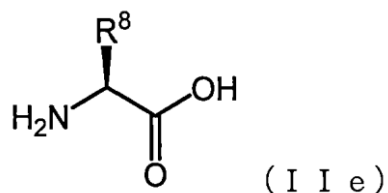
[en donde R⁷ es un grupo representado por la fórmula $-(CH_2)_{ra}NHCONH_2$ (en donde ra es un

20 número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)) o la fórmula $-(CH_2)_{rb}SH$ (en donde rb es un

número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3)), Gly, Met, Pro, 3HyP, Asn, Gln, Ser, ^mS, MS o Thr.

el aminoácido ácido es un aminoácido representado por la fórmula (II e)

[Fórmula química 14]



[en donde R^8 es un grupo representado por la fórmula $-(CH_2)_sCOOH$ (en donde s es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6))] o

5 o su sal farmacéuticamente aceptable.

[2] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [1], en donde

X_{aa1} es un residuo 2Nal;

X_{aa2} es un residuo de Arg, AGB, PHG o Tle;

en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III)

10 o (III') es un residuo de HCY o Cys;

X_{aa4} es un residuo de Gly;

X_{aa5} es un residuo de Arg o AGB;

X_{aa6} es un residuo de Asn o Asp;

X_{aa7} es un residuo de Trp;

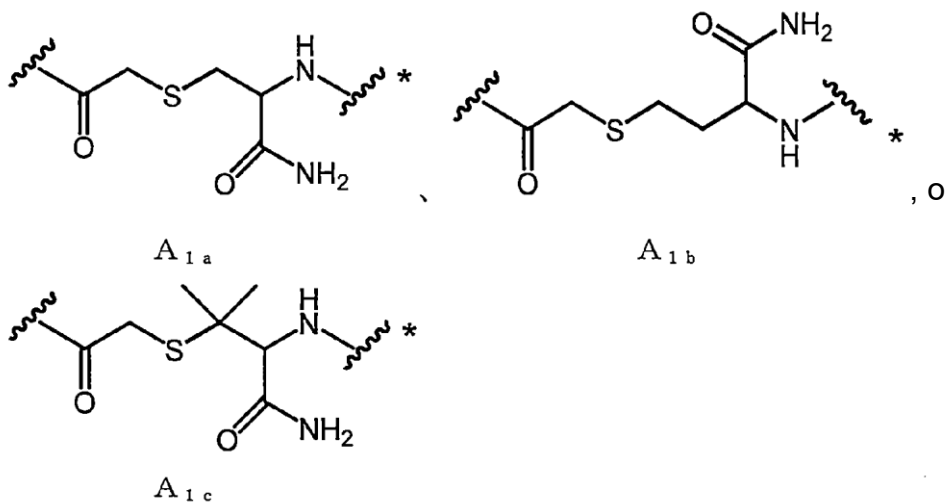
15 X_{aa9} es un residuo de Val, Arg, PHG, 4PAL o AGB;

X_{aa10} es un residuo de Trp; y

X_{aa11} es un residuo de Val, CPTG o CHXG.

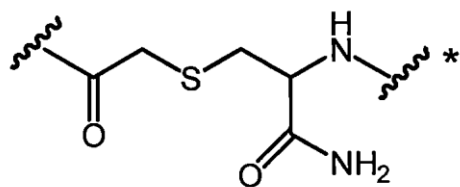
[3] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [1] o [2], en donde A es un grupo formador de anillos.

20 [Fórmula química 15]



[4] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [3], en donde A es un grupo formador de anillos.

[Fórmula química 16]



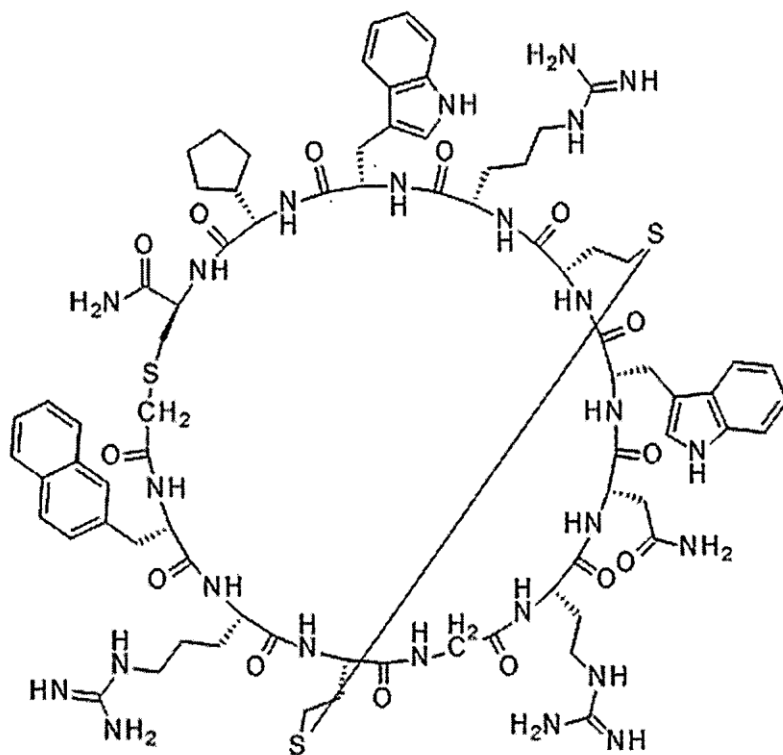
A_{1a}

5 [5] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [4], en donde la estructura de X_{aa3} y X_{aa8}, los grupos tiol forman el enlace representado por -S-S- o -S-CH₂-S-

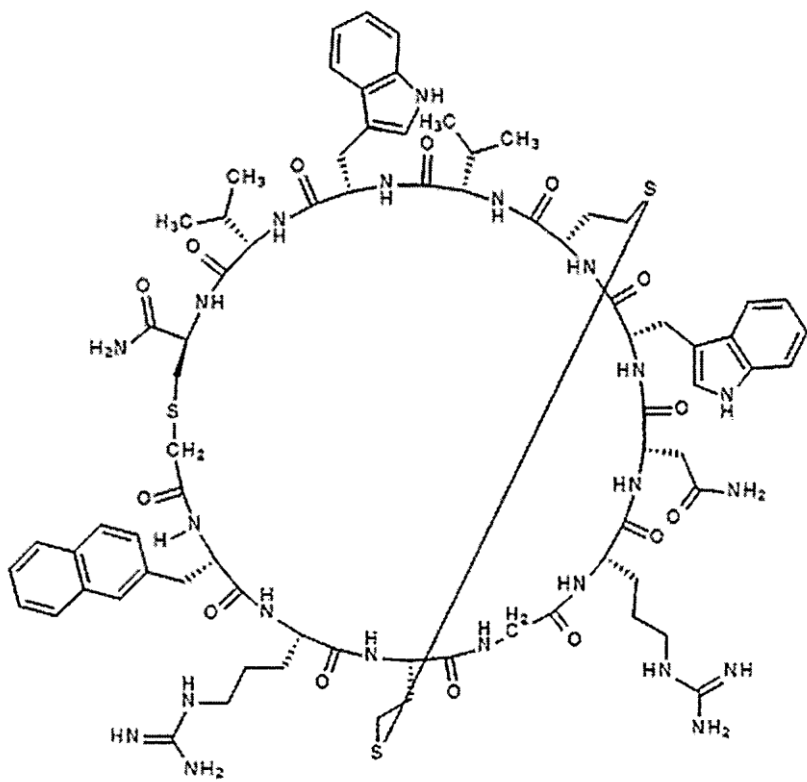
[6] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [1] a [5], en donde el péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en

10 compuestos representados por las fórmulas:

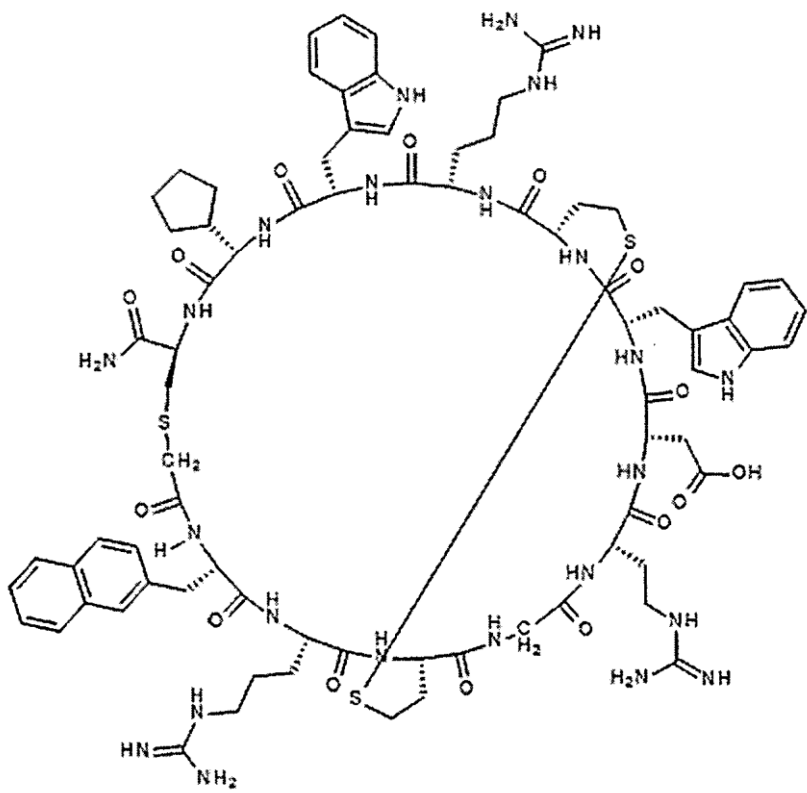
[Fórmula química 17]



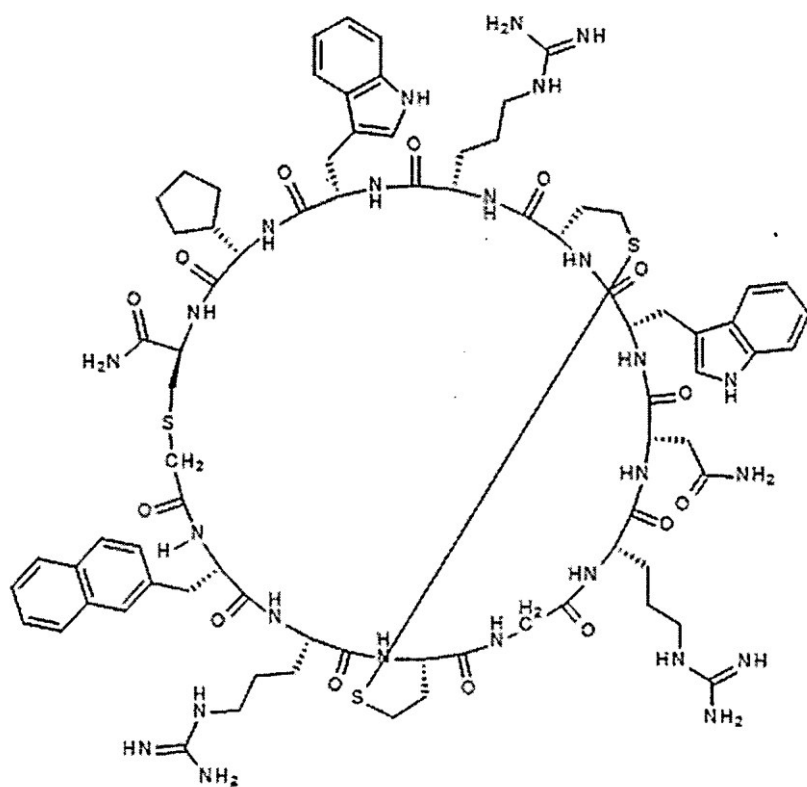
[Fórmula química 18]



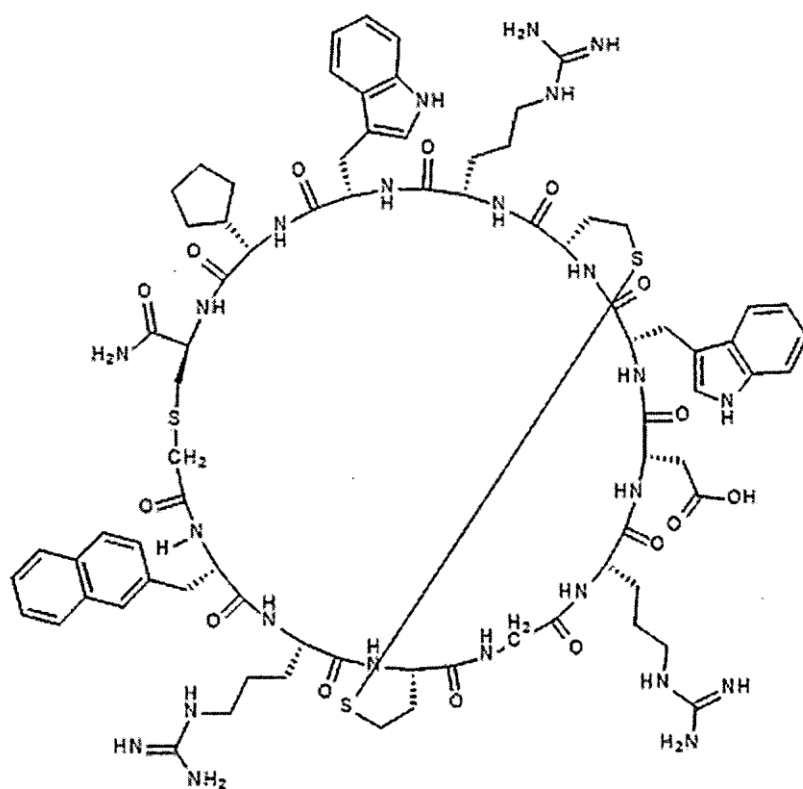
[Fórmula química 19]



[Fórmula química 20]

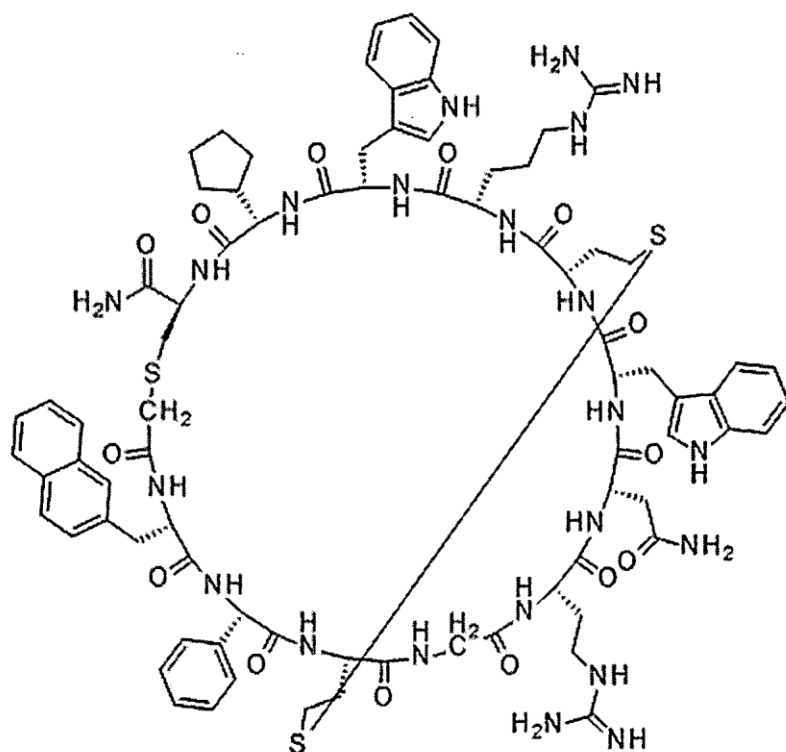


[Fórmula química 21]

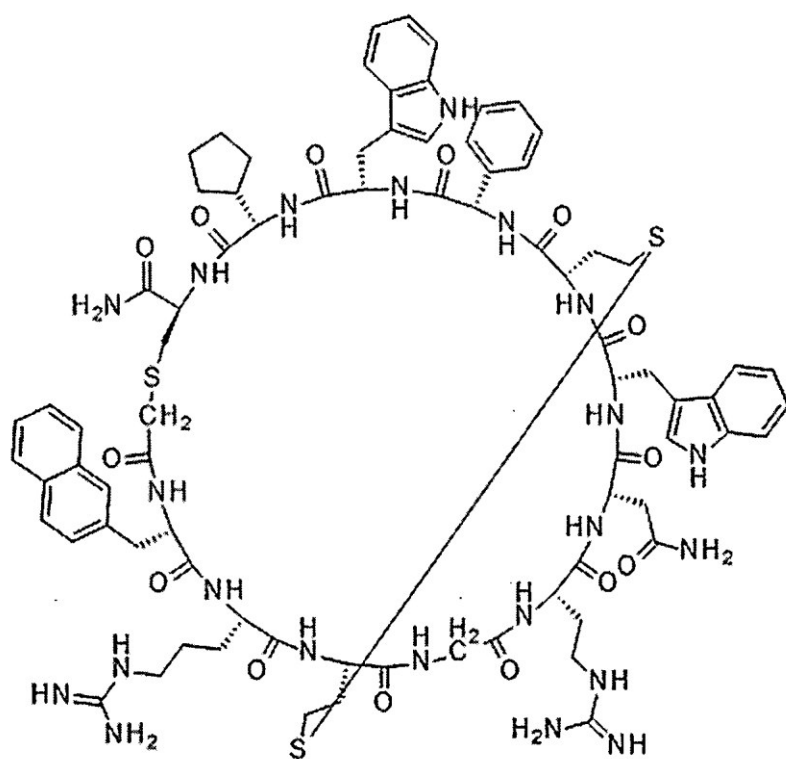


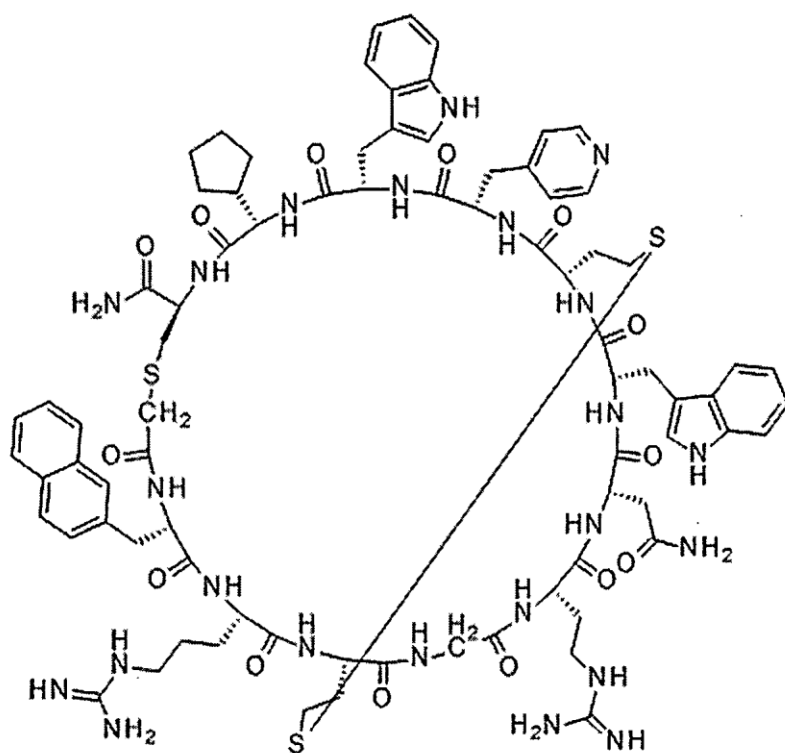
[Fórmula química 22]

[Fórmula química 24]

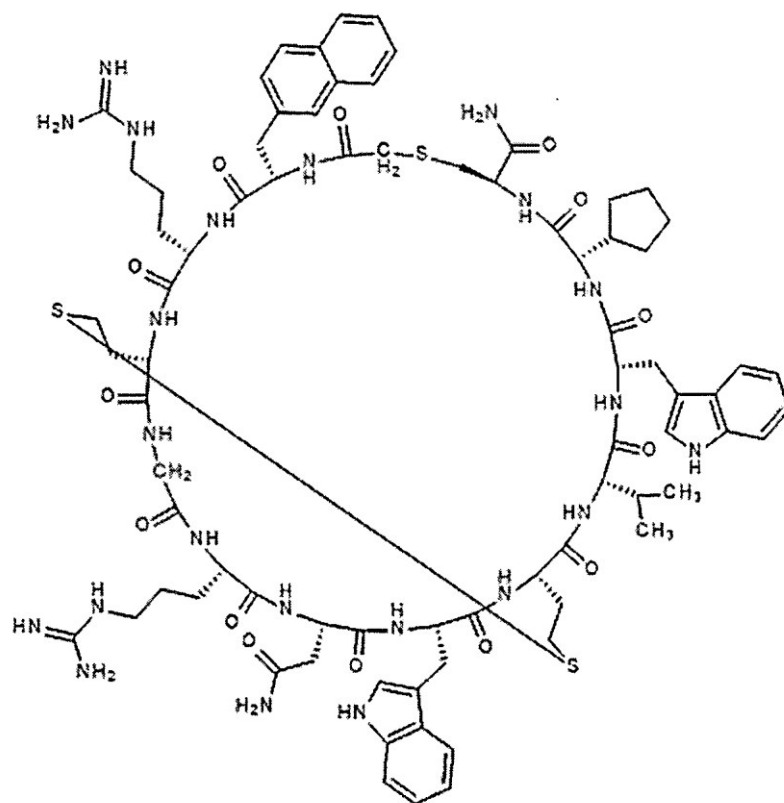


[Fórmula química 25]





[Fórmula química 27]



[Fórmula química 28]

[8] La composición farmacéutica como se establece en [7], para usarse en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad que puede tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1.

[9] La composición farmacéutica como se establece en [8], para usarse en el tratamiento o profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza

5 las extremidades.

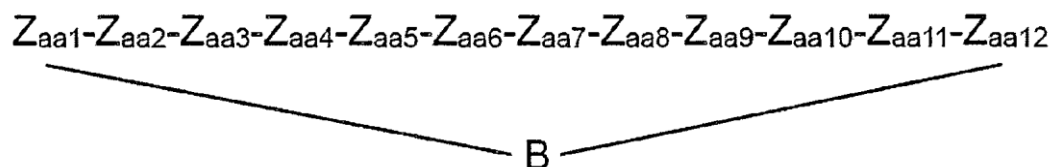
[10] Un agente mejorador de flujo sanguíneo que comprende, como un componente activo, el péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de [1] a [6].

[11] Un conjugado que comprende:

el péptido cíclico como se establece en cualquiera de [1] a [6], o

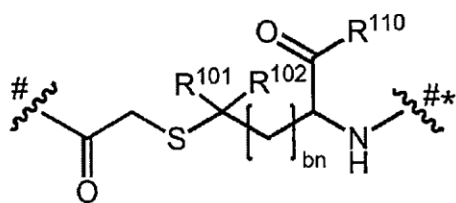
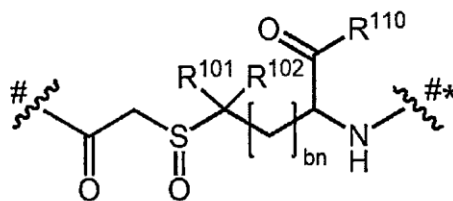
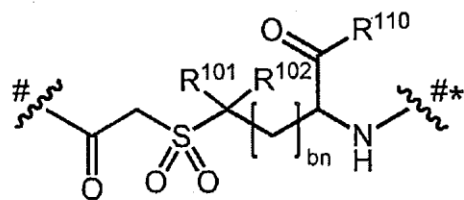
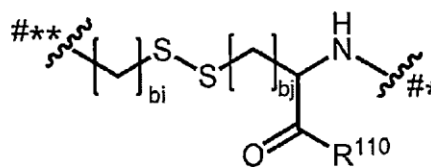
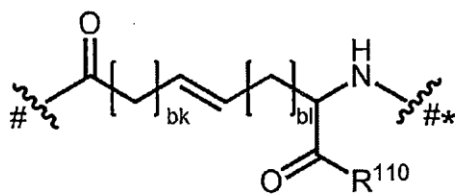
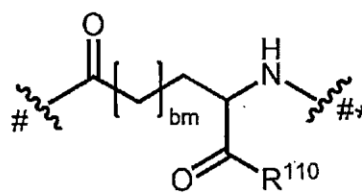
10 un péptido cíclico representado por la fórmula (X)

[Fórmula química 29]



[en el que B se selecciona de grupos formadores de anillos de fórmulas:

[Fórmula química 30]

B₁B₂B₃B₄B₅B₆

, y

en donde

[Fórmula química 31]



- 5 representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de Z_{aa1}, o en ausencia de Z_{aa1},
 representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de Z_{aa2},

[Fórmula química 32]

representa un punto de unión al grupo carbonilo C-terminal de Z_{aa12},

- 10 [Fórmula química 33]



representa un punto de unión a α carbono de Z_{aa1}, o en la ausencia de Z_{aa1}, representa un
 punto de unión a α carbono de Z_{aa2},

R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃;

- R¹¹⁰ es un amino o hidroxilo,
 bn representa un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3),
 bi y bj son cada uno independientemente un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3),
 5 bk y bl son cada uno independientemente un número entero de 0 a 3, (por ejemplo, 0, 1, 2, o 3),
 bm es un número entero de 1 a 7 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7);
 Z_{aa1} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático, un aminoácido básico, un aminoácido neutro o un aminoácido ácido, o está ausente;
 10 Z_{aa2} es un residuo de un aminoácido aromático o un aminoácido neutro;
 Z_{aa3} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático o un aminoácido básico;
 Z_{aa4} es Ser, Thr, Ala, o ^mS;
 Z_{aa5} es Gly o Ser;
 15 Z_{aa6} es un residuo de un aminoácido básico o un aminoácido ácido neutro;
 Z_{aa7} es un residuo de un aminoácido neutro o un aminoácido ácido;
 Z_{aa8} es un residuo de un aminoácido aromático;
 Z_{aa9} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido neutro o un aminoácido aromático;
 20 Z_{aa10} es un residuo de un aminoácido básico, un aminoácido alifático o un aminoácido aromático o un aminoácido neutro;
 Z_{aa11} es un residuo de un aminoácido aromático; y
 Z_{aa12} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático o un aminoácido básico,
 25 en donde el aminoácido alifático, el aminoácido aromático, el aminoácido básico, el aminoácido neutro y el aminoácido ácido son como se definen en [1]; y
 una molécula portadora unida al péptido cíclico, o
 o su sal farmacéuticamente aceptable.
 [12] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [11], en donde
 30 Z_{aa1} es un residuo de Arg, Lys, His, Gly, Ala, Asn, Thr, Ser, Met, Leu, Ile, Val, Gln, Phe, Tyr, Trp o Cys, o está ausente;
 Z_{aa2} es un residuo de Phe, Tyr, Trp, 2Nal, 4CF, o DCF;
 Z_{aa3} es un residuo de Ile, Leu, Nle, Tle, Trp, 2Nal, 4CF, o Arg;
 Z_{aa4} es un residuo de Ser;
 35 Z_{aa5} es un residuo de Gly;

Z_{aa6} es un residuo de Arg, Lys, His, Ser, Cit, o AGB;

Z_{aa7} es un residuo de Asn o Asp;

Z_{aa8} es un residuo de Trp o 2Nal;

Z_{aa9} es un residuo de Val, Nle, Ahp, o Met;

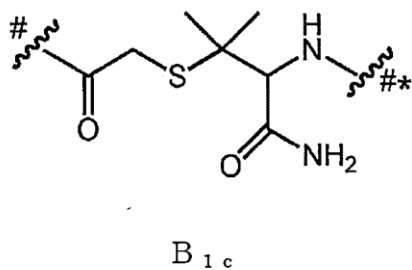
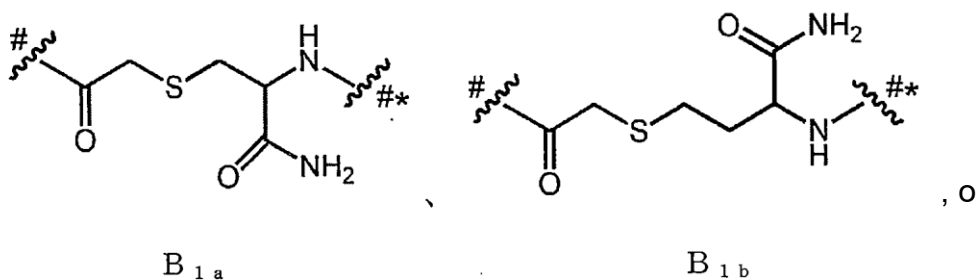
5 Z_{aa10} es un residuo de Arg, AGB, Lys, His, AMF, Phg, o Val;

Z_{aa11} es un residuo de Trp o 2Nal;

Z_{aa12} es un residuo de Val, Tle, CPTG, CHXG, o Phe; y

B es un grupo formador de anillos

[Fórmula química 34]



10

[13] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [12], en donde

Z_{aa1} está ausente;

Z_{aa2} es un residuo de 2Nal;

Z_{aa3} es un residuo de Arg o Tle;

15 Z_{aa4} es un residuo de Ser;

Z_{aa5} es un residuo de Gly;

Z_{aa6} es un residuo de Arg o AGB;

Z_{aa7} es un residuo de Asn o Asp;

Z_{aa8} es un residuo de Trp;

20 Z_{aa9} es un residuo de Val o Nle;

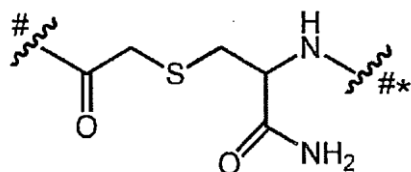
Z_{aa10} es un residuo de Arg, AGB o Val;

Z_{aa11} es un residuo de Trp;

Z_{aa12} es un residuo de Val, CPTG o CHXG; y

B es

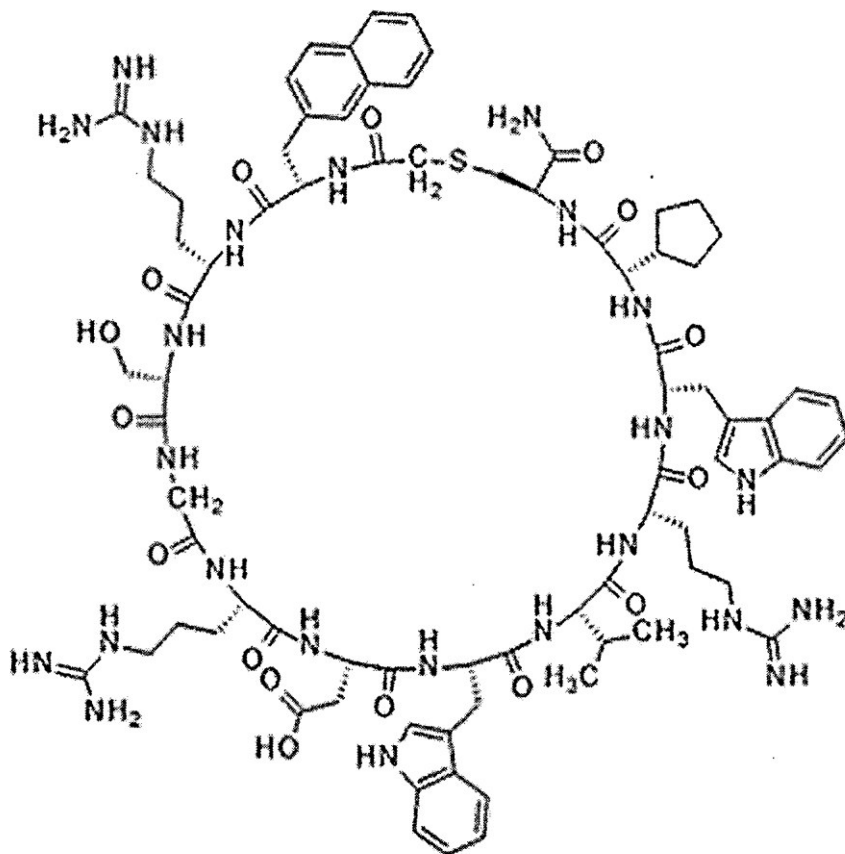
[Fórmula química 35]



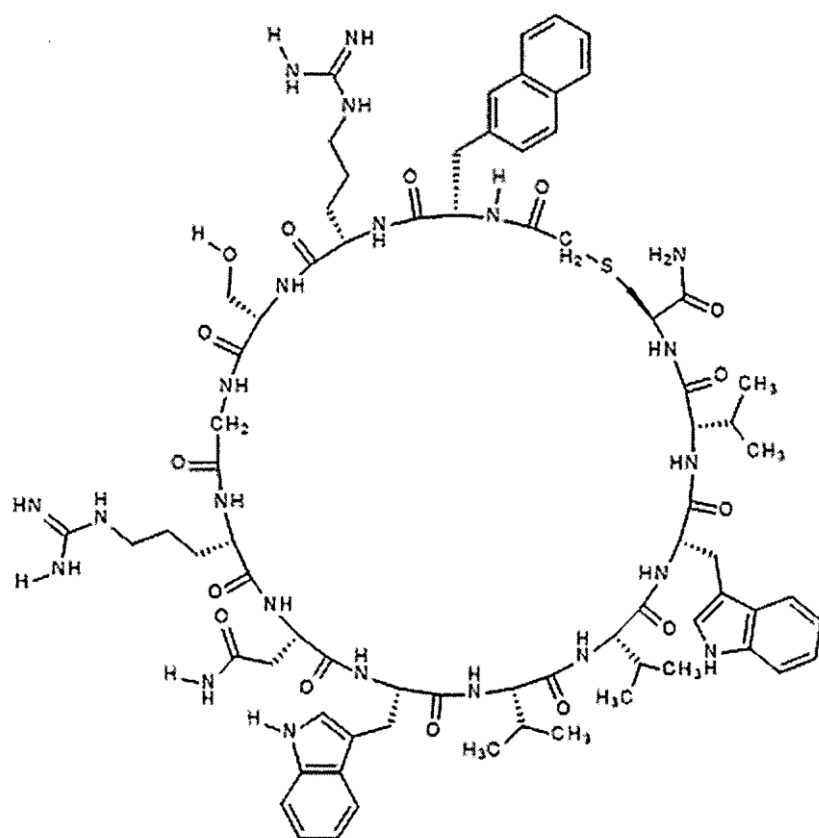
B_{1a}

- [14] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [13], en donde el péptido cíclico representado por la fórmula (X) se selecciona del grupo que consiste en compuestos representados por las fórmulas:

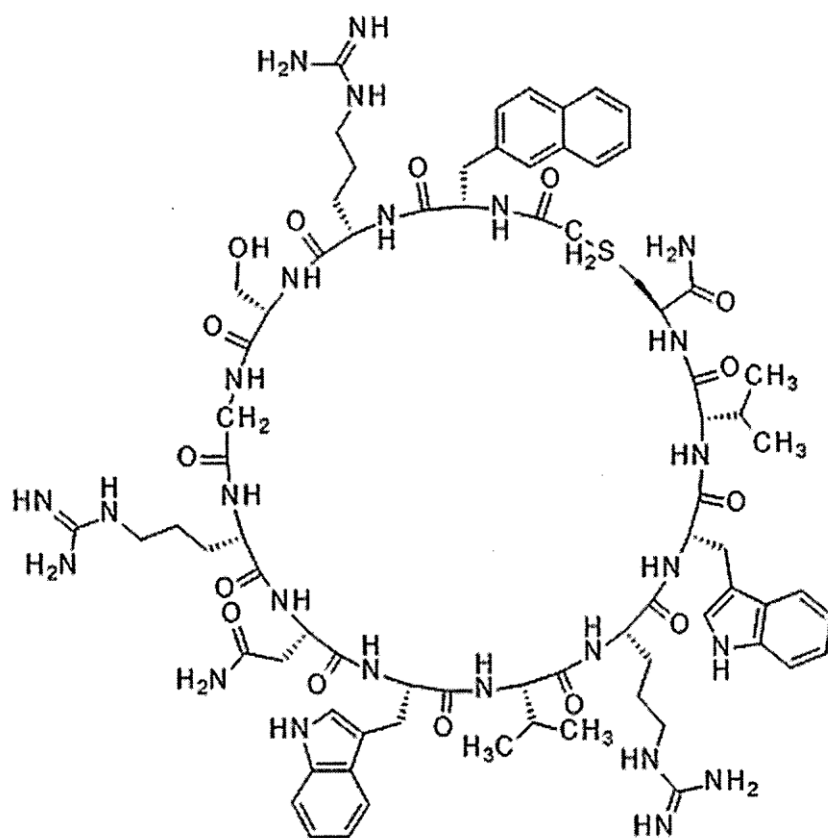
[Fórmula química 36]



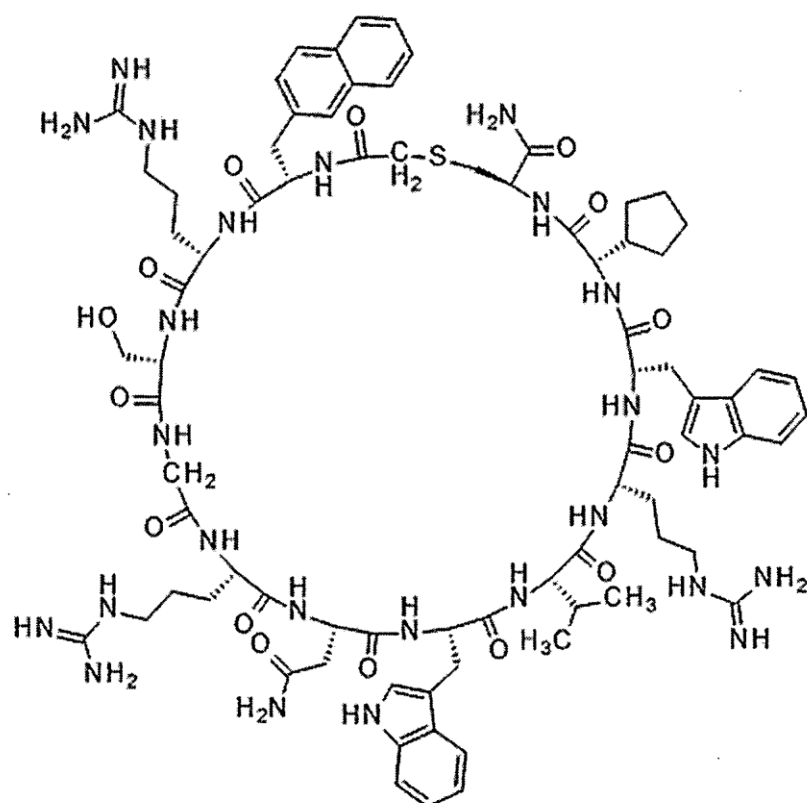
[Fórmula química 37]



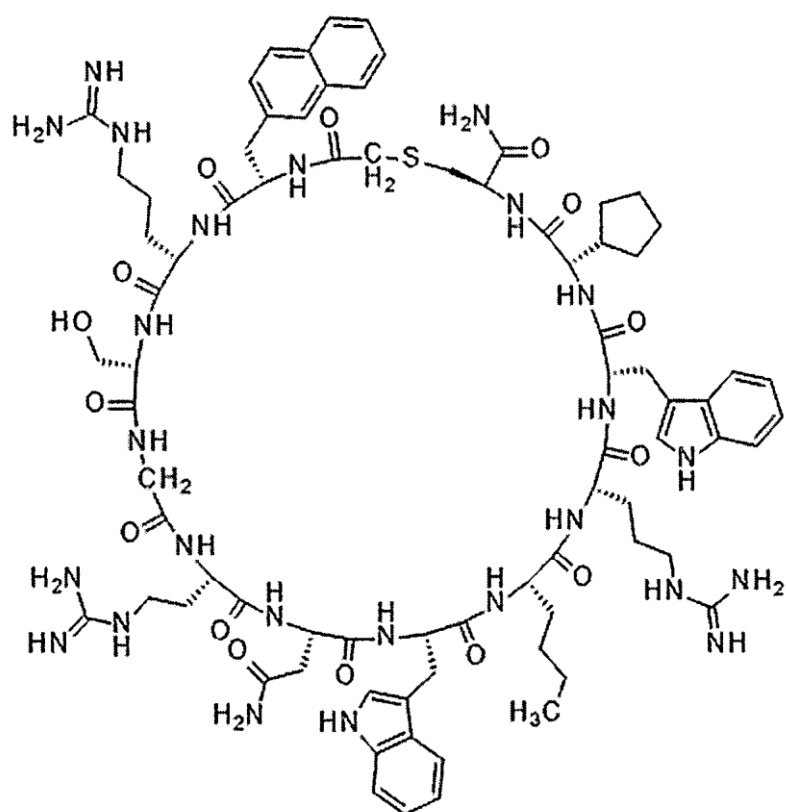
[Fórmula química 38]



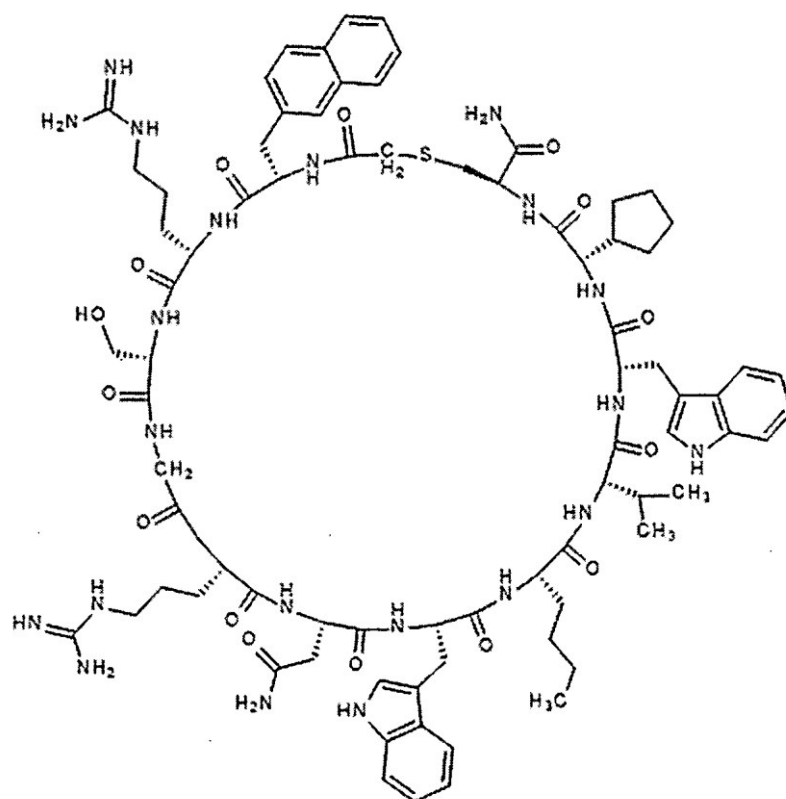
[Fórmula química 39]



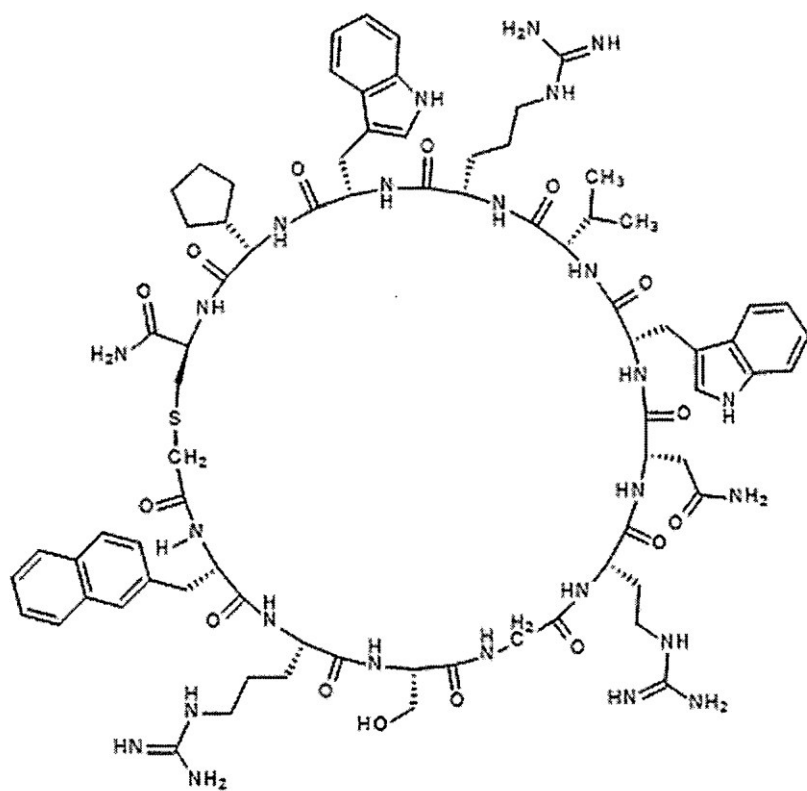
[Fórmula química 40]



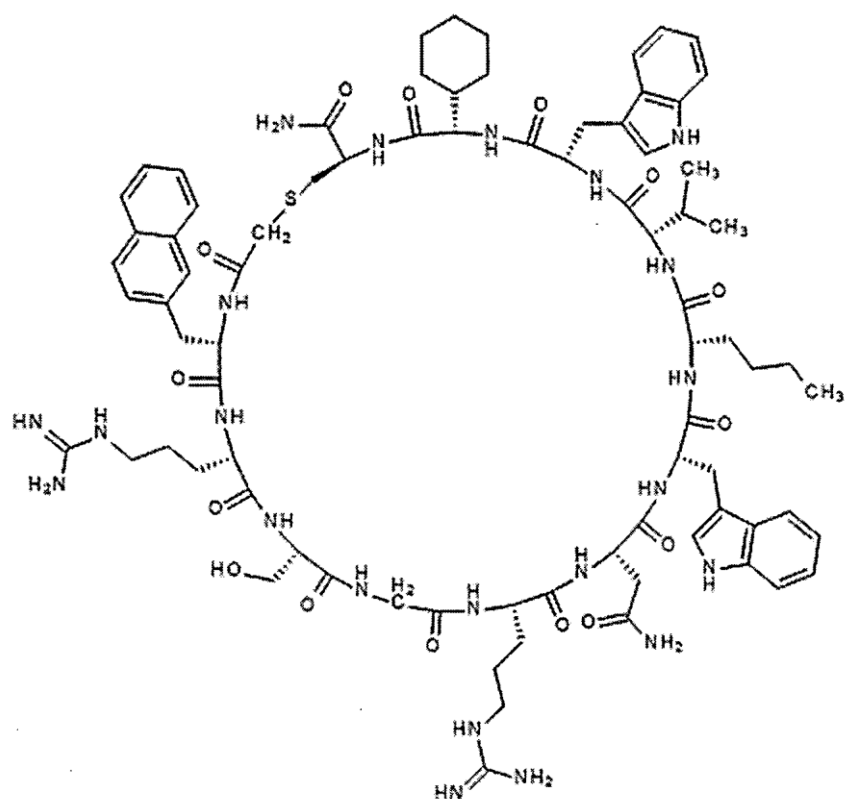
[Fórmula química 41]



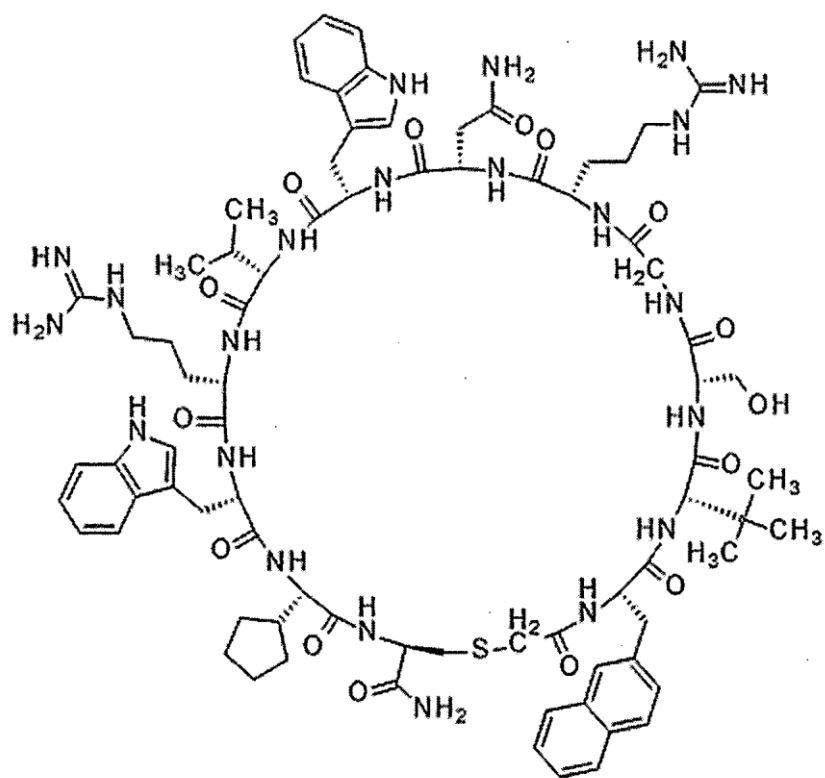
[Fórmula química 42]



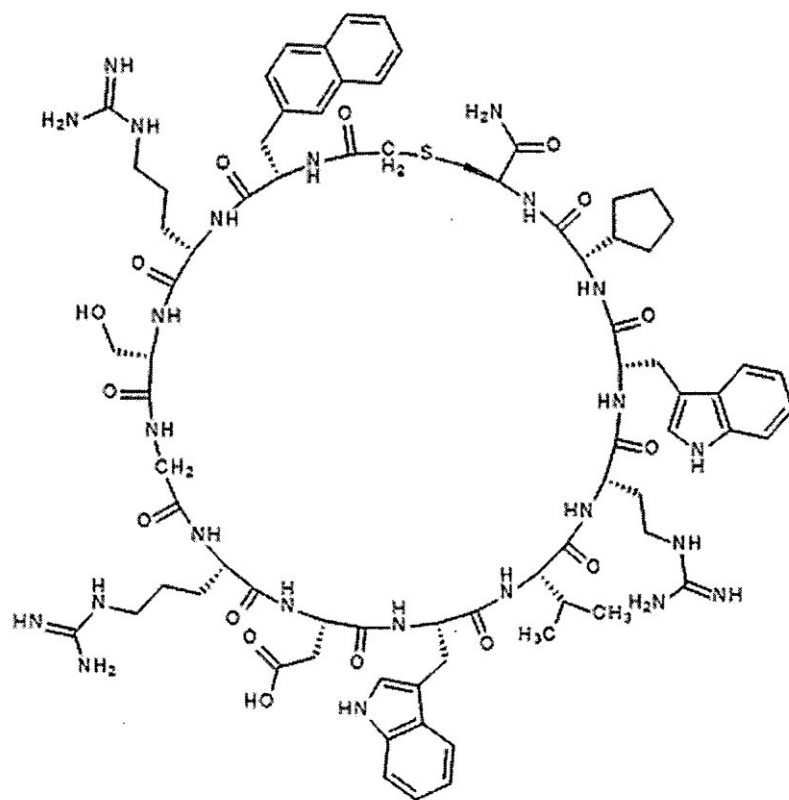
[Fórmula química 43]



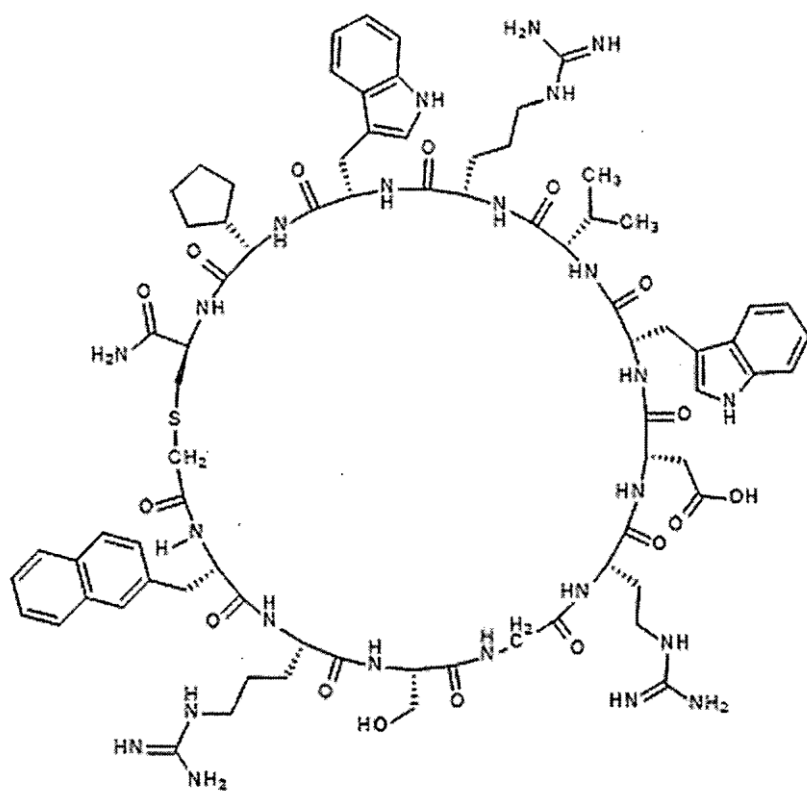
[Fórmula química 44]



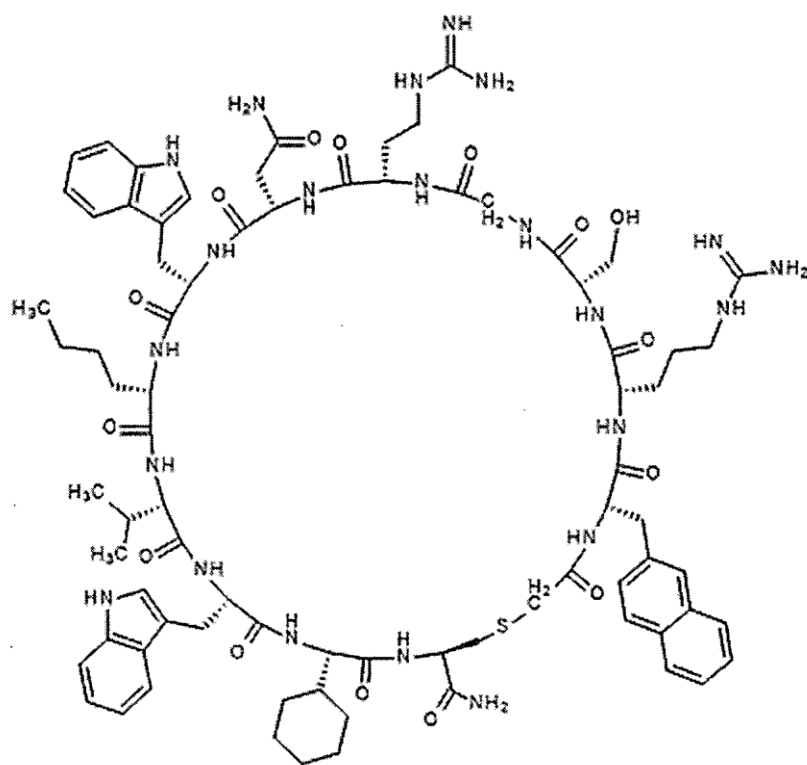
[Fórmula química 45]



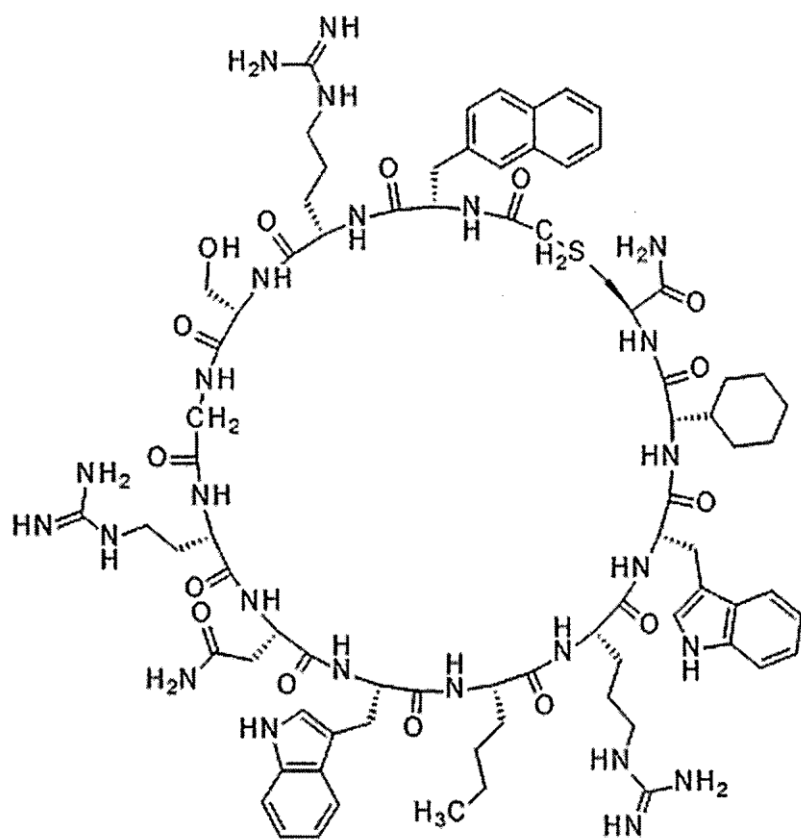
[Fórmula química 46]



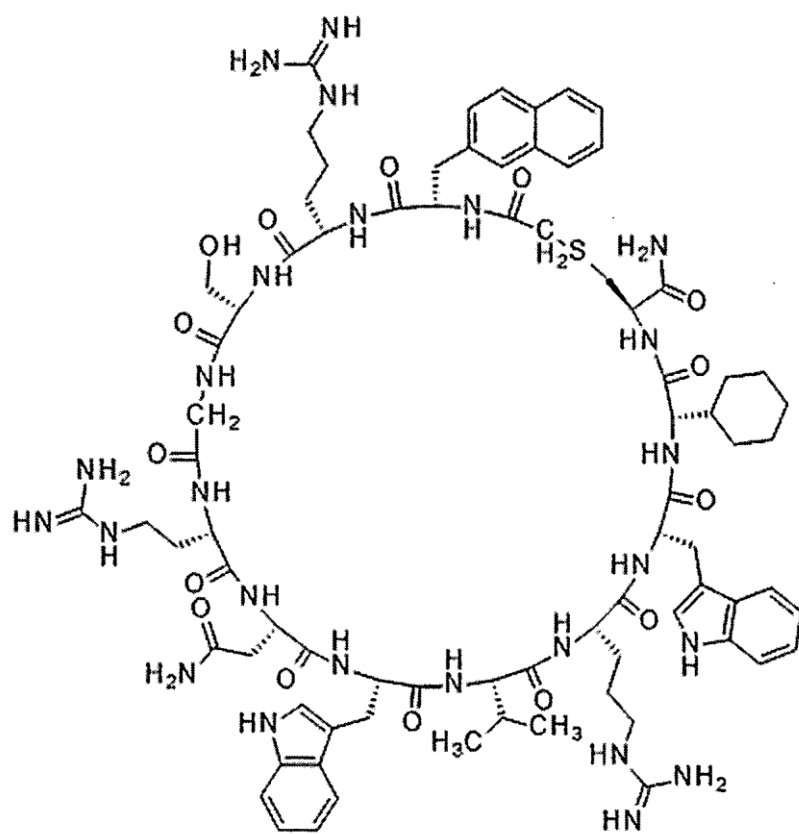
[Fórmula química 47]



[Fórmula química 48]

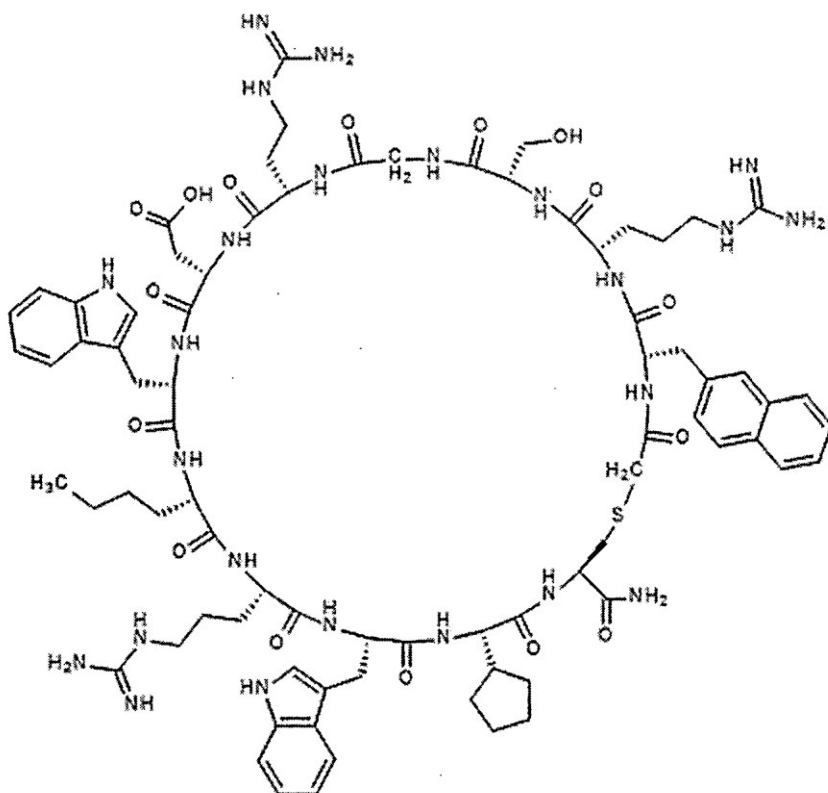


[Fórmula química 49]



y

[Fórmula química 50]



[15] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera a de de [11] a [14], en donde la molécula portadora es albúmina sérica humana o un fragmento o variante de la misma.

5 [16] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [14], en donde la molécula portadora es una molécula que contiene Fc.

[17] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16], en donde la molécula que contiene Fc es una IgG de longitud completa, una cadena pesada de IgG de longitud completa, un fragmento de IgG que comprende toda o parte de una región Fc, o una
10 variante de la misma.

[18] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16] o [17], en donde la molécula que contiene Fc comprende dominios CH2 y CH3 de una región constante de una cadena pesada de IgG.

[19] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se establece
15 en [16] a [18], en donde la molécula que contiene Fc comprende al menos un residuo de aminoácido de un residuo de cisteína correspondiente a la posición 226, un residuo de cisteína correspondiente a la posición 229 y un residuo de asparagina que corresponde a la posición 297 según el índice Eu en una cadena pesada de IgG humana.

[20] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16] a

[19], en donde la molécula que contiene Fc comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a las posiciones 221 a 230, 222 a 230, 223 a 230, 224 a 230, 225 a 230, o 226 a 230 de acuerdo con el índice EU en una cadena pesada de IgG humana.

[21] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16] a [20], en donde la molécula que contiene Fc comprende sustituciones de un residuo de leucina correspondiente a la posición 234 y un residuo de leucina correspondiente a la posición 235 según el índice Eu en una cadena pesada de IgG humana con residuos de alanina, o sustituciones de un residuo de leucina correspondiente a la posición 234, un residuo de leucina correspondiente a la posición 235 y un residuo de prolina correspondiente a la posición 329 según el índice Eu en una cadena pesada de IgG humana con residuos de alanina.

[22] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16] a [21], en donde la molécula que contiene Fc es CH que consiste en una región constante de una cadena pesada de IgG humana, CLCH que consiste en una región constante de una IgG humana, o una molécula que consiste en una región Fc de una IgG humana o un fragmento de la misma, o una variante de la misma.

[23] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [22], en donde la molécula que contiene Fc es

un anticuerpo (mAb-A) que consiste en una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 474 de SEQ ID NO: 125 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 127;

CH (CH-A) que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 129;

CH (CH-B) que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 133;

CLCH (CLCH-A) que consiste en una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 129 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 125 de SEQ ID NO: 131;

CLCH (CLCH-B) que consiste en una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 133 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 125 de SEQ ID NO: 131;

un fragmento Fc (Fc-B) que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 243 de SEQ ID NO: 135;

un fragmento Fc (Fc-A) que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 137; o

un fragmento Fc (Fc-C) que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 139;

5 o

una variante del mismo.

[24] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [16] a [23], en donde la molécula que contiene Fc comprende una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación unida a N, glicosilación unida a O, procesamiento de N-terminal, procesamiento de C-terminal, desamidación, isomerización del ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina al extremo N, amidación de un residuo de prolina y eliminación de uno o dos residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo de una cadena pesada.

[25] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [24], en donde uno o dos residuos de aminoácidos están eliminados en el extremo carboxilo de una cadena pesada de la molécula que contiene Fc.

[26] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [25], en donde un residuo de aminoácido está eliminado en el extremo carboxilo de cada una de las dos cadenas pesadas de la molécula que contiene Fc.

[27] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [24] a [26], en donde el residuo de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada de la molécula que contiene Fc está además amidada.

[28] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [11] a [27], en donde el péptido cíclico y la molécula portadora están unidos entre sí mediante una estructura de enlace.

[29] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [28], en donde la estructura de enlace comprende al menos una estructura seleccionada del grupo que consiste en una cadena de polioxialquileo, un residuo de aminoácidos y una cadena oligopeptídica que consiste en dos o más residuos de aminoácidos.

[30] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [29], en donde la cadena de polioxialquileo contenida en la estructura de enlace es una cadena de polietilenglicol (PEG).

[31] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [30], en donde el grado total de polimerización de la cadena de PEG contenida en el esqueleto de la estructura de enlace es de 6 a 100.

[32] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [29], en donde

el residuo de aminoácido contenido en la estructura de enlace es un residuo de Gly, N-metilglicina, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Lys, D-Lys, β -alanina, Ser, D-Ser, un aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileo en una cadena lateral, o un aminoácido no natural que comprende una cadena SG en una cadena lateral.

5 [33] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [29], en donde la cadena de oligopéptido contenida en la estructura de enlace consiste en 2 a 20 residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20).

10 [34] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [29], en donde la cadena de oligopéptidos contenida en la estructura de enlace comprende uno o más residuos de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, N-metilglicina, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Lys, D-Lys, β -alanina, Ser, D-Ser, un aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileo en una cadena lateral, y un aminoácido no natural que comprende una cadena SG en una cadena lateral.

15 [35] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [29], en donde un grupo amino N-terminal del residuo de aminoácido o cadena oligopeptídica contenida en la estructura de enlace forma un enlace amida con un grupo carbonilo al que R^{10} del grupo A formador de anillos o R^{110} del grupo B formador de anillos está unido, donde R^{10} o R^{110} está sustituido con NH del grupo amino N-terminal.

20 [36] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [28] a [35], en donde la estructura de enlace comprende un grupo de enlace C que se une a la molécula portadora.

[37] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [36], en donde el grupo de enlace C comprende un resto derivado del grupo maleimida en un enlace tioéter formado por reacción de un grupo maleimida con un grupo tiol o anillo de 1,2,3-triazol.

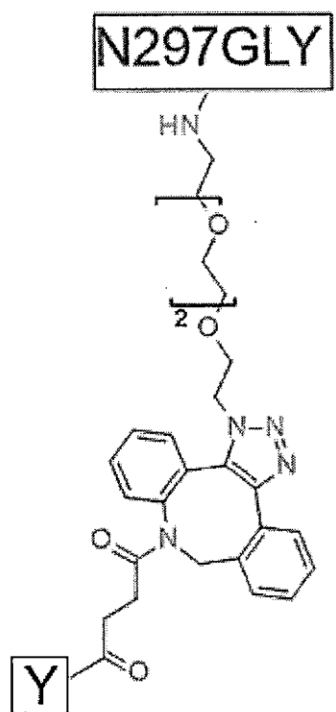
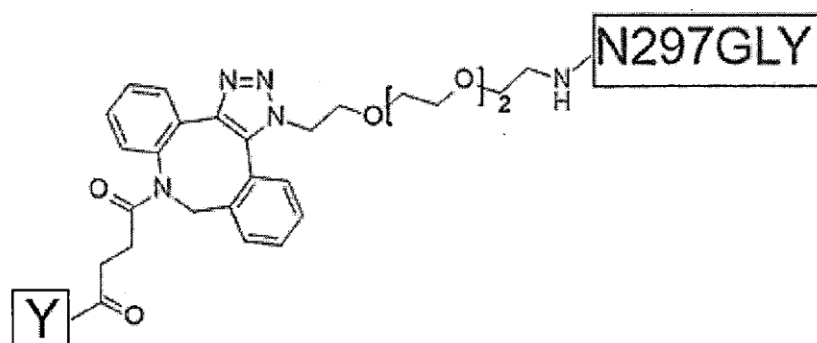
25 [38] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [37], en donde un grupo maleimida está unido a un grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula portadora para formar un enlace tioéter.

30 [39] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [37], en donde la molécula portadora es una molécula que contiene Fc, caracterizado además porque el anillo de 1,2,3-triazol contenido en el grupo de enlace C está unido a un glicano que está unido a un residuo de asparagina correspondiente a la posición 297 según el índice Eu de la molécula que contiene Fc (glicano unido a N297).

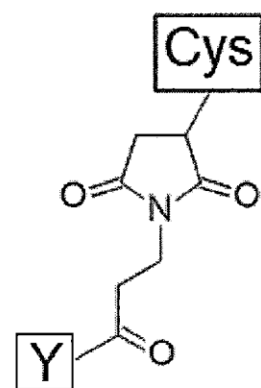
[40] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [36] a [39], en donde

el grupo de enlace C está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:

35 [Fórmula química 51]

C₁C₂

, y

C₃

(en donde

N297GLY representa la unión al extremo no reductor del glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc;

Cys representa la unión al grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula portadora; y

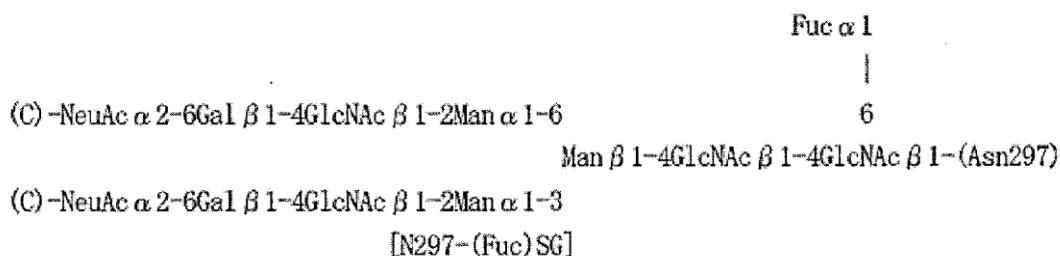
5 Y representa un punto de unión a un residuo de aminoácido adyacente en la estructura de enlace).

[41] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [39] o [40], en donde

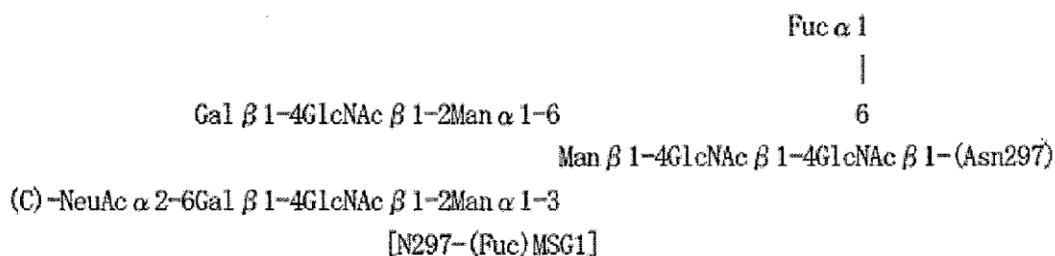
el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc es al menos uno seleccionado entre los glucanos N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2 que tiene estructuras representadas

10 por las siguientes fórmulas:

[Fórmula química 52]

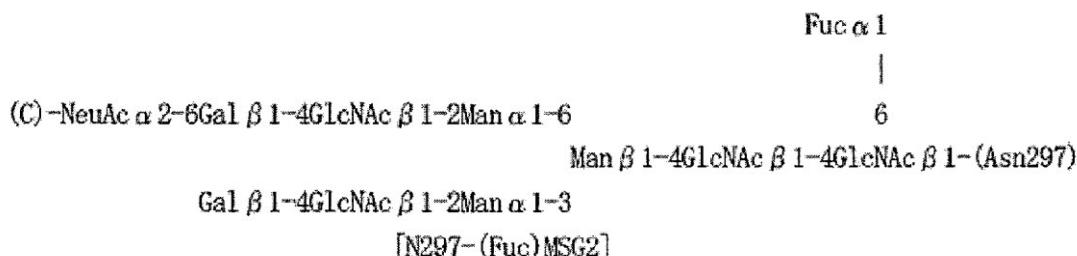


[Fórmula química 53]



15 y

[Fórmula química 54]



[donde (C) representa un punto de unión al grupo de enlace C y (Asn297) representa un punto de unión al residuo de asparagina correspondiente a la posición 297 según el índice Eu de la molécula que contiene Fc].

20

[42] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [41], en donde el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc es N297-(Fuc)SG.

[43] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [36] a [42], en donde

5 la estructura de enlace está representada por la fórmula (XX)

-L1-L2-L3-C-

[en donde

L1 es un oligopéptido que contiene de 3 a 6 residuos de aminoácidos neutros (por ejemplo, 3, 4, 5, o 6) unidos de manera lineal;

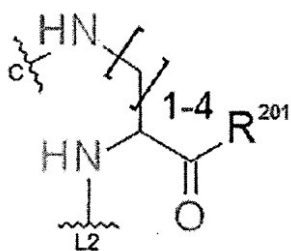
10 L2 es L2a o L2b, en donde

L2a es un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileno en la estructura principal, o un oligopéptido que comprende un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileno en la estructura principal, en donde el grado total de polimerización de la cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal de L2a es 6 a 100 (por ejemplo, 5 a 100, preferiblemente 6 a 50, más preferiblemente 10 a 50, incluso más preferiblemente 10 a 40 o 20 a 40) y

L2b es un oligopéptido que contiene de 10 a 20 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) residuos de aminoácidos α naturales o no naturales unidos de una manera lineal;

L3 es un residuo de aminoácido representado por la fórmula

20 [Fórmula química 55]



(en donde R^{201} es un grupo hidroxilo o un grupo amino,

[Fórmula química 56]



25 representa un punto de unión a un residuo de aminoácido adyacente en L2 y

[Fórmula química 57]



representa un punto de unión al grupo de unión C);

C es el grupo de enlace C;

el grupo amino N-terminal de L1 forma una unión amida con un grupo carbonilo al que se une R¹⁰ del grupo A formador de anillos o R¹¹⁰ del grupo B formador de anillos, donde R¹⁰ o R¹¹⁰ está sustituido con NH del grupo amino N-terminal;

5 L1 y L2 están unidos entre sí mediante un enlace amida; y

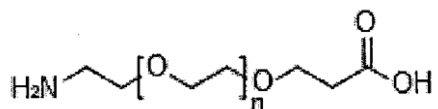
L2 y L3 están unidos entre sí mediante un enlace amida].

[44] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43], en donde el residuo de aminoácido neutro contenido en L1 es un residuo de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gly, Ser, D-Ser, N-metilglicina (NMeG) y β -alanina (bAla).

10 [45] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43] o [44], en donde la cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal que está contenida en L2 es una cadena de PEG.

[46] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [45], en donde el residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de PEG en la estructura principal, que
15 está contenido en L2a, es un residuo de un aminoácido representado por la fórmula

[Fórmula química 58]



[en donde n representa un número entero de 5 a 40 (por ejemplo, 5, 11, 23 o 35)].

[47] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [46], en donde el grado total de polimerización de la cadena de PEG es de 10 a 40 (por ejemplo, 12, 18, 24, 30, o 36).

[48] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43] o [44], en donde un α -aminoácido de L2b es glicina o N-metilglicina.

[49] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [48], en donde
25 el oligopéptido de L2b es oligo-N-metilglicina con 13 N-metilglicinas consecutivas.

[50] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43] a [49], en donde L2 comprende un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de PEG en una cadena lateral o un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena SG en una cadena lateral.

[51] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [50], en donde el aminoácido no natural que comprende una cadena de PEG en una cadena lateral es KPEG.

[52] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [50], en donde el aminoácido no natural que comprende una cadena de SG en una cadena lateral es KSG.

[53] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43] a [52], en donde un total de 1 a 3 residuos de aminoácidos ácidos estpa contenido en una o más posiciones no adyacentes al grupo A formador de anillos o del grupo B formador de anillos en la cadena principal del oligopéptido de L1 y L2.

5 [54] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [53], en donde el residuo de aminoácido ácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, D-Asp, Glu, y D-Glu.

[55] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [43] a [54], en donde la L1 es un oligopéptido que comprende o consiste en la secuencia

Gly-Gly-Gly-Gly,
10 Gly-Ser-Gly-Ser,
NMeG-NMeG-NMeG-NMeG,
bAla-bAla-bAla-bAla, o
Gly-Gly-Glu-Gly-Gly.

[56] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [55], en donde
15 L1 es un oligopéptido que consiste en una secuencia de dos residuos de aminoácidos ácidos acoplados al extremo C de

Gly-Gly-Gly-Gly,
Gly-Ser-Gly-Ser,
NMeG-NMeG-NMeG-NMeG, o
20 bAla-bAla-bAla-bAla.

[57] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [56], en donde el residuo de aminoácido ácido es un residuo Asp.

[58] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [43] a [55], en donde la L2 es un oligopéptido que consiste en la secuencia

25 Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P,
KSG-P12P-P12P,
Asp-Asp-P12P,
Asp-Asp-P12P-P12P, o
Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P.

30 [59] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [43] a [58], en donde L3 es un residuo de Lys.

[60] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [43], en donde la estructura de enlace es

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly
35 o Gly-Ser-Gly-Ser, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P, y

L3 es un residuo de Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly,

L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia KSG-P12P-P12P, y L3 es un residuo Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly,

5 L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P, y L3 es un residuo Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Ser-Gly-Ser,

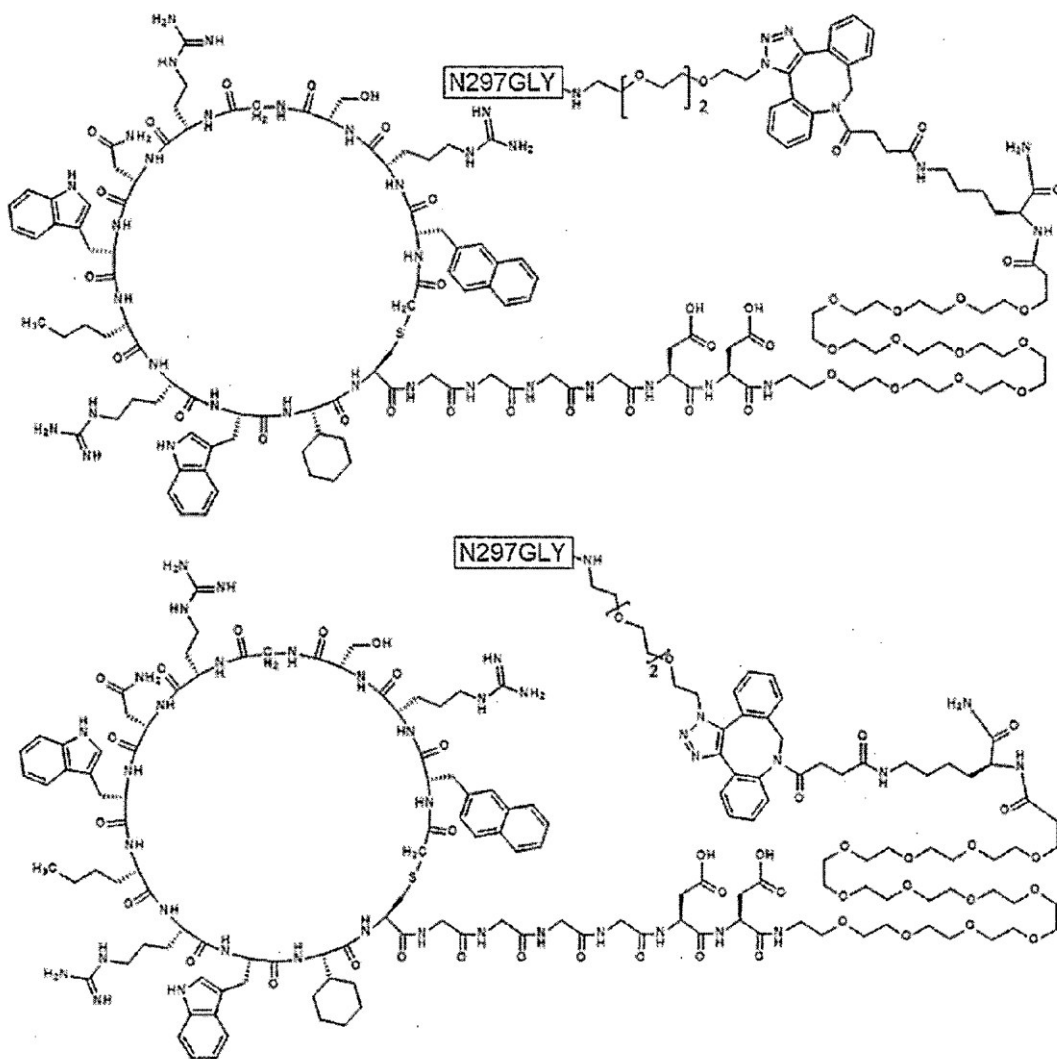
L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P-P12P, y L3 es un residuo Lys; o

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly,

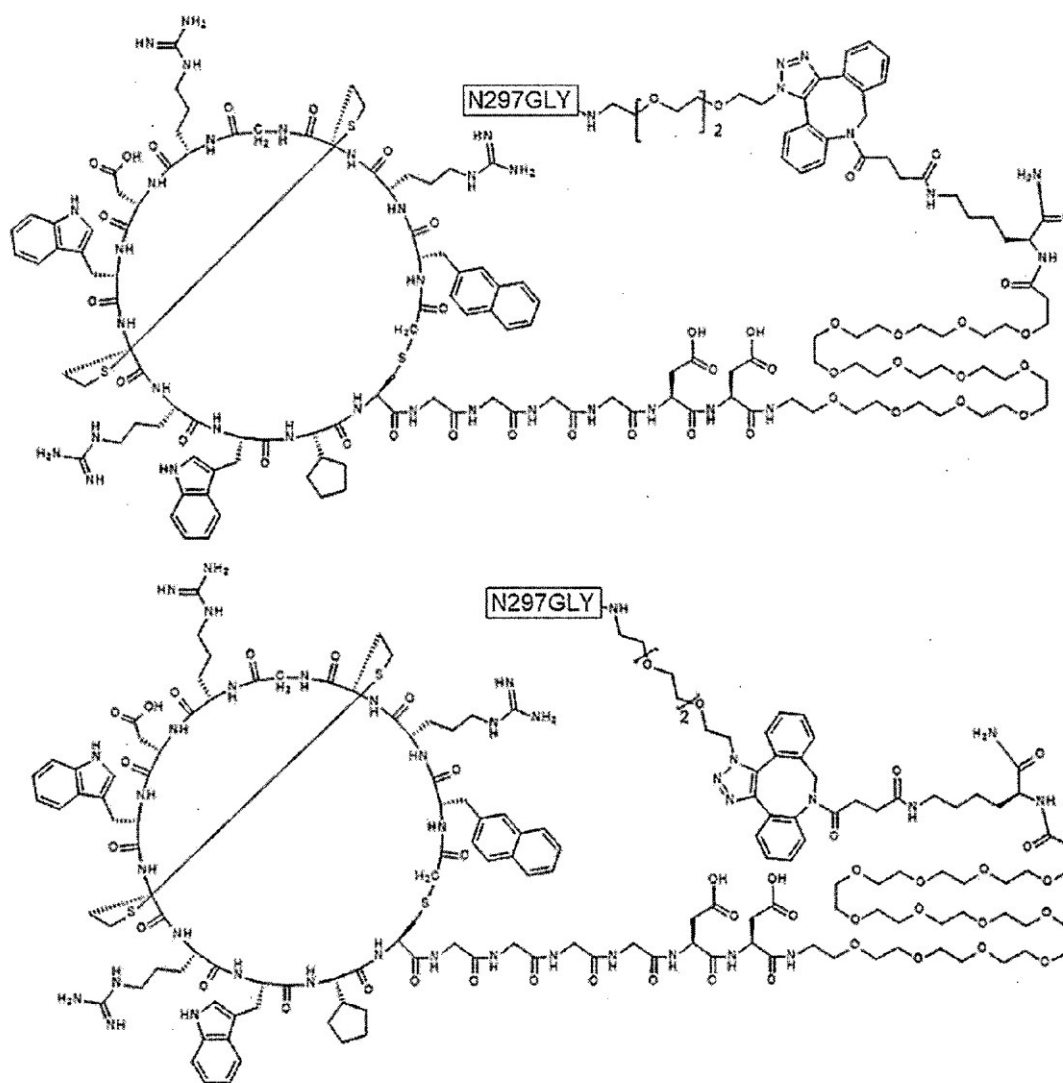
L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P, y L3 es un residuo Lys.

10 [61] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [11], en donde el péptido cíclico y la estructura de enlace se representan por medio de cualquiera de las fórmulas:

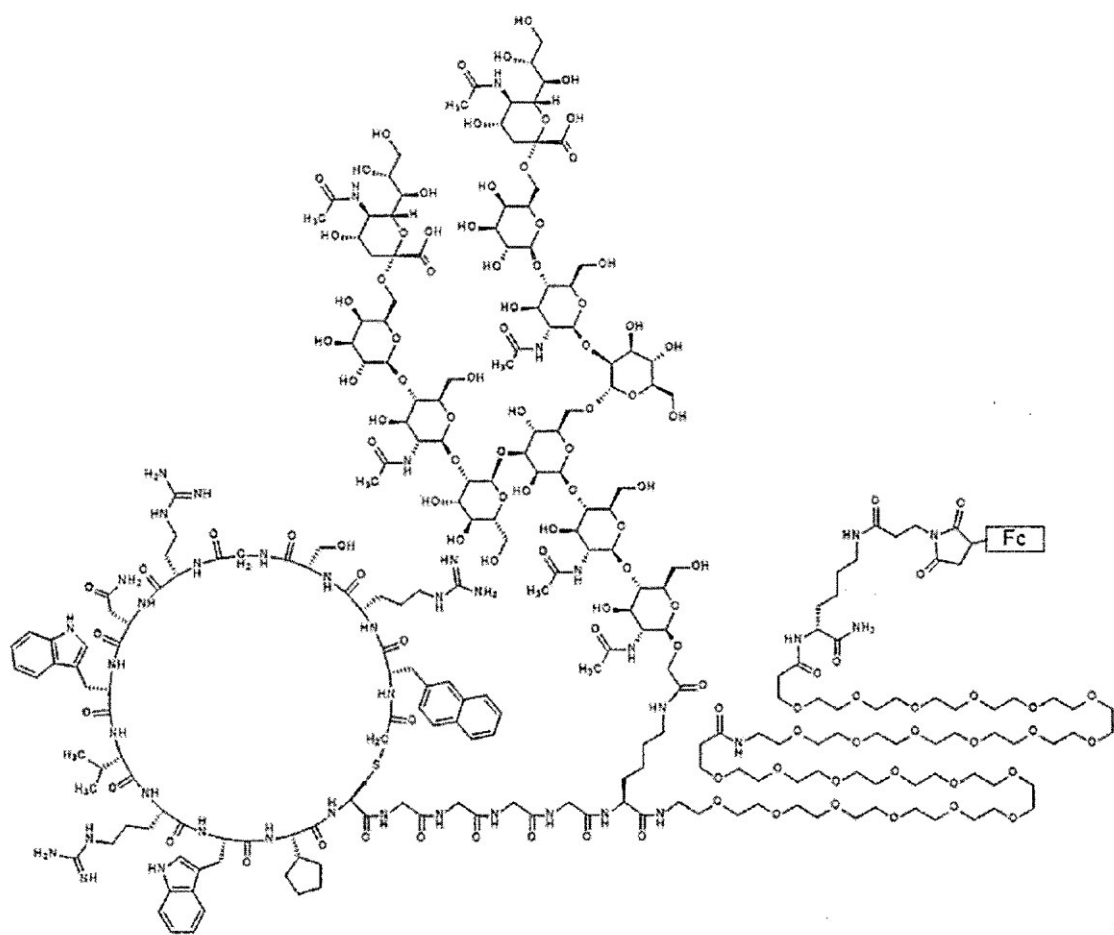
[Fórmula química 59]



[Fórmula química 60]

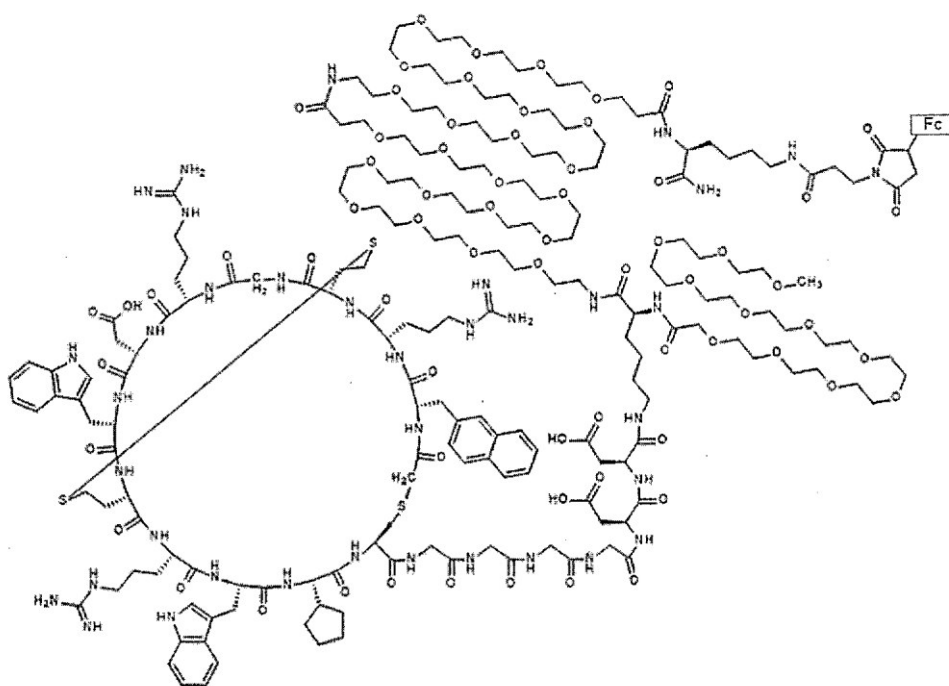


[Fórmula química 61]



y

[Fórmula química 62]



(en donde

N297GLY representa la unión del anillo de 1,2,3-triazol contenido en el grupo de enlace C al extremo no reductor de glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc; y

5 Fc representa la unión del grupo maleimida contenido en el grupo de enlace C al grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula que contiene Fc).

[62] Una composición farmacéutica que comprende, como un componente activo, el conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61].

10 [63] La composición farmacéutica como se establece en [62], para usarse en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad que puede tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1.

[64] La composición farmacéutica como se establece en [63], para usarse en el tratamiento o profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza las extremidades.

15 [65] Un agente mejorador de flujo sanguíneo que comprende, como un componente activo, el conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61].

[66] Un método para producir el conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61], en donde el método comprende los pasos de:

(1) sintetizar un oligopéptido X-A-L o Z-B-L representado por la siguiente fórmula desde el lado C-terminal mediante un método de síntesis en fase sólida:

20 $X_{aa1}-X_{aa2}-X_{aa3}-X_{aa4}-X_{aa5}-X_{aa6}-X_{aa7}-X_{aa8}-X_{aa9}-X_{aa10}-X_{aa11}-A_0-L1-L2-L3$ o

$Z_{aa1}-Z_{aa2}-Z_{aa3}-Z_{aa4}-Z_{aa5}-Z_{aa6}-Z_{aa7}-Z_{aa8}-Z_{aa9}-Z_{aa10}-Z_{aa11}-Z_{aa12}-B_0-L1-L2-L3$

en donde

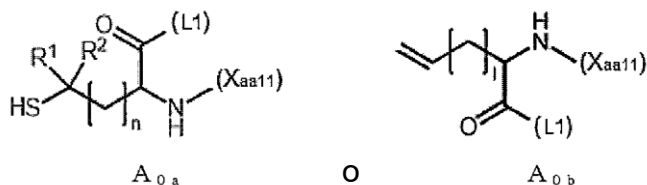
X_{aa1} a X_{aa11} son como se definen en [1] (siempre que en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , los grupos tiol permanezcan como están sin formar un enlace);

- L1 a L3 son como se definen en [43] (siempre que cuando L2 comprenda un residuo de un aminoácido no natural que comprende un glicano en una cadena lateral, el residuo se reemplaza con un residuo Lys);

Z_{aa1} a Z_{aa12} son como se definen en [11];

A_0 es un residuo representado por la fórmula

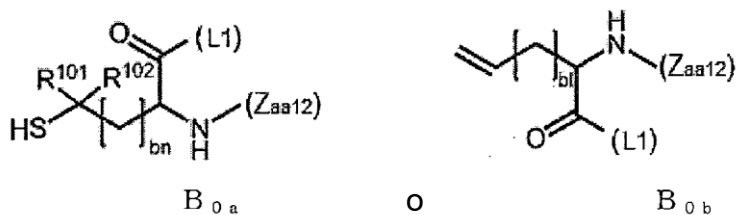
[Fórmula química 63]



- (en el que (X_{aa11}) representa un punto de unión a X_{aa11} , $(L1)$ representa un punto de unión al residuo de aminoácido N-terminal en L1, y l y n son como se definen en [1];

B_0 es un residuo representado por la fórmula

[Fórmula química 64]



- (en el que (Z_{aa12}) representa un punto de unión a Z_{aa12} , $(L1)$ representa un punto de unión al residuo de aminoácido N-terminal en L1, y bl y bn son como se definen en [11]),

(2) ciclar el oligopéptido sintetizado en la etapa (1) para producir un péptido cíclico mediante

- (a) unir el grupo amino N-terminal de X_{aa1} a A_{0a} para formar cualquiera de los grupos formadores de anillo A_1 a A_3 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{10}) en el oligopéptido X-A-L;

(b) unir el grupo amino N-terminal de X_{aa1} a A_{0b} para formar el grupo formador de anillos A_4 a A_5 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{10}) en el oligopéptido X-A-L;

- (c) unir el grupo amino N-terminal de Z_{aa1} a B_{0a} para formar cualquiera de los grupos formadores de anillos B_1 a B_4 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{110}) en el oligopéptido Z-B-L;

(d) unir el grupo amino N-terminal de Z_{aa1} a B_{0b} para formar el grupo formador de anillos B_5 a B_6 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{110}) en el oligopéptido Z-B-L;

(3) cuando el oligopéptido X-A-L se sintetiza en el paso (1), permitiendo que los grupos tiol

de X_{aa3} y X_{aa8} del oligopéptido X-A-L ciclado en el paso (2) formen un enlace representado por -S-S-, -S-CH₂-S- o -S-X-S- (donde X es como se define en [1]) para proporcionar un péptido bicíclico;

(4) cuando L2 comprende un residuo de un aminoácido no natural que comprende un glicano en una cadena lateral, que se reemplaza con un residuo Lys en el oligopéptido X-A-L o Z-B-L, introducir un glicano en el residuo Lys para formar de ese modo un residuo de un aminoácido no natural que comprende un glicano en una cadena lateral;

(5) unir un grupo reactivo capaz de formar un grupo maleimida o un anillo de 1,2,3-triazol a L3; y

(6) unir el péptido cíclico a la molécula portadora a través del grupo reactivo del paso (5).

[67] Un método para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva del péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [6].

[68] El método como se establece en [67], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse al inhibir una función de TSP1.

[69] El método como se establece en [68], en el que la enfermedad o síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

[70] Un método para mejorar el flujo sanguíneo, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva del conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [6].

[71] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [6], para usarse en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma.

[72] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [71], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse al inhibir una función de TSP1.

[73] El péptido cíclico su sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se establece en [72], en el que la enfermedad o síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

[74] El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [6], para usarse en mejorar el flujo sanguíneo.

[75] Uso del péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [1] a [6], en la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma.

[76] El uso como se establece en [75], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1.

[77] El uso como se establece en [76], en el que la enfermedad o el síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

5 [78] Uso del péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se establece en cualquiera de [1] a [6], en la producción de un agente mejorador del flujo sanguíneo.

[79] Un método para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva del conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61].

10 [80] El método como se establece en [79], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse al inhibir una función de TSP1.

[81] El método como se establece en [80], en el que la enfermedad o síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

15 [82] Un método para mejorar el flujo sanguíneo, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva del conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61].

[83] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61], para usarse en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma.

20 [84] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en [83], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse al inhibir una función de TSP1.

[85] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se establece en [84], en el que la enfermedad o síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

25 [86] El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61], para usarse en mejorar el flujo sanguíneo.

[87] Uso del conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera de [11] a [61], en la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma.

30 [88] El uso como se establece en [87], en donde la enfermedad o el síntoma es una enfermedad que puede tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1.

[89] El uso como se establece en [88], en el que la enfermedad o el síntoma es isquemia crítica de una extremidad, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza una extremidad.

35 [90] Uso del conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable como se establece en cualquiera

de [11] a [61], en la producción de un agente mejorador del flujo sanguíneo.

Efectos ventajosos de la invención

El péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención es útil para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1, tal como una isquemia crítica de extremidades. El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención puede proporcionar un medio de tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 en frecuencia inferior de administración.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

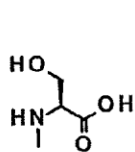
Definiciones

Como se hace referencia en el presente documento, aminoácidos naturales significan aminoácidos no modificados que se encuentran comúnmente en proteínas naturales, y más particularmente significan alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En este documento, los aminoácidos naturales pueden indicarse mediante códigos de tres letras o códigos de una letra (es decir, alanina: Ala o A; arginina: Arg o R; asparagina: Asn o N; ácido aspártico: Asp o D; cisteína: Cys o C; ácido glutámico: Glu o E; glutamina: Gln o Q; glicina: Gly o G; histidina: His o H; isoleucina: Ile o I; leucina: Leu o L; lisina: Lys o K; metionina: Met o M; fenilalanina: Phe o F; prolina: Pro o P; serina: Ser o S; treonina: Thr o T; triptófano: Trp o W; tirosina: Tyr o Y; valina: Val o V).

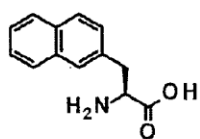
Como se hace referencia en el presente documento, aminoácidos no naturales significan otros aminoácidos además de los aminoácidos naturales, y también incluyen versiones modificadas de aminoácidos naturales. Las abreviaturas de los aminoácidos no naturales a los que se hace referencia en el presente documento se enumeran a continuación. Como se menciona en el presente documento, las letras minúsculas del alfabeto pueden sustituirse por letras mayúsculas en las abreviaturas siguientes. Por ejemplo, 2Nal, Nle, Phg, Tle y Hcy son sinónimos de 2NAL, NLE, PHG, TLE y HCY, respectivamente.

30

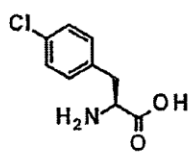
[Fórmula química 65-1]



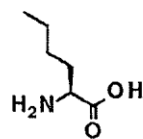
mS



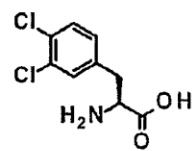
2NaI



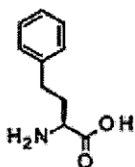
4CF



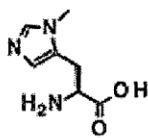
Nle



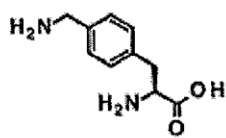
DCF



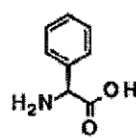
HF



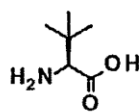
3MH



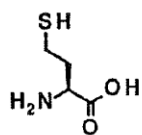
AMF



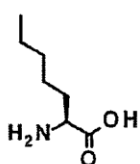
Phg



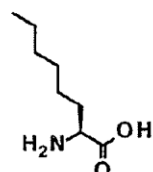
Tle



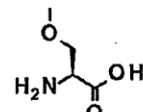
Hcy



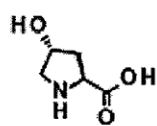
Ahp



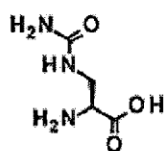
Aoc



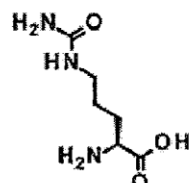
MS



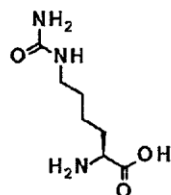
3HyP



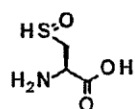
Alb



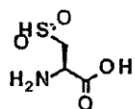
Cit



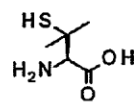
Hct



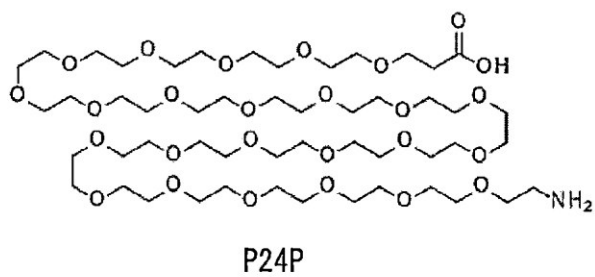
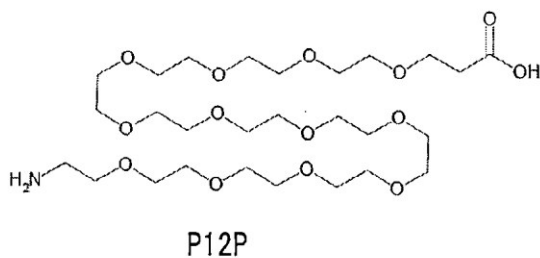
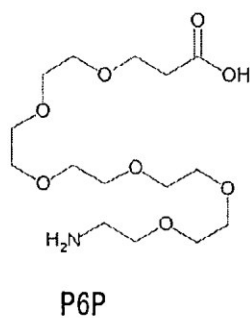
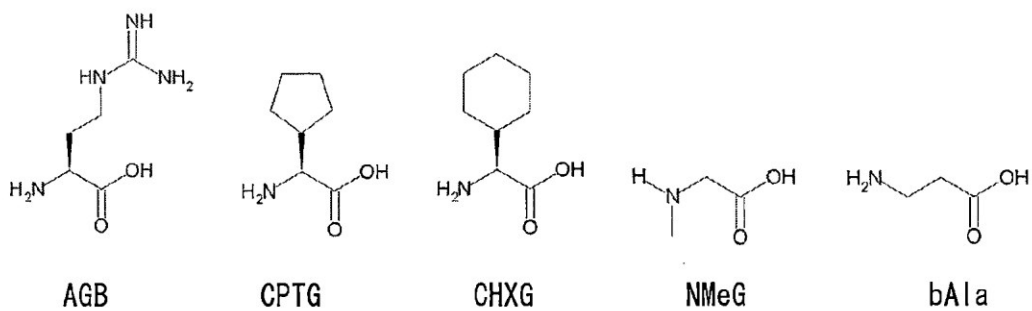
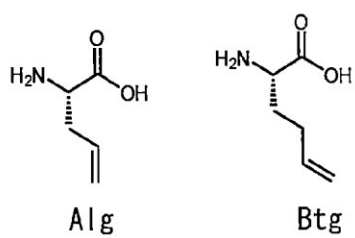
C(0)



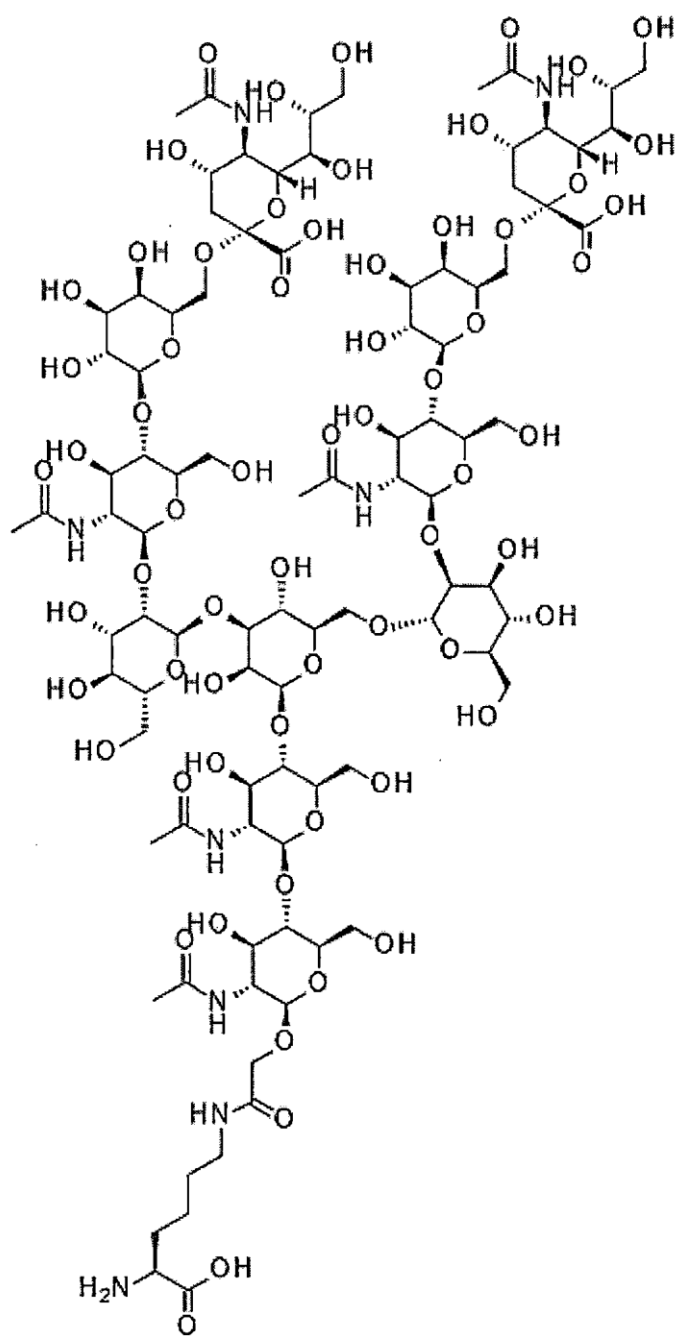
C(02)



Pen

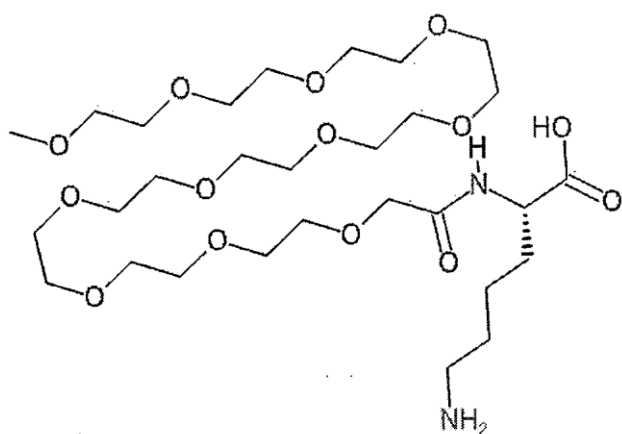


[Fórmula química 65-3]

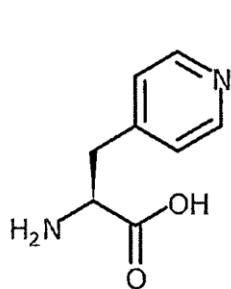


KSG

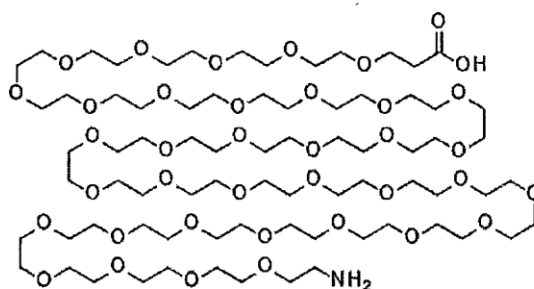
[Fórmula química 65-4]



KPEG



4PAL



P36P

^mS: N-Metil-L-serina

2NaI: 3-(2-Naftil)-L-alanina

4CF: 4-Cloro-L-fenilalanina

5

Nle: L-Norleucina

DCF: L-3,4-Diclorofenilalanina

HF: L-Homofenilalanina

3MH: 3-Metil-L-histidina

AMF: L-4-Aminometilfenilalanina

10

Phg: L-Fenilglicina

Tle: L-Tert-Leucina

Hcy: L-Homocisteína

Ahp: Ácido (2S)-2-aminoheptanoico

Aoc: Ácido (2S)-2-amino-octanoico

15

MS: L-O-Metilserina

3Hyp: L-Hidroxiprolina

Alb: Ácido L-2-Amino-3-ureidopropiónico

Cit: L-Citrulina

Hct: L-Homocitrulina

C(O): Ácido (2R)-2-amino-3-hidrosulfinil-propanoico

C(O2): Ácido (2R)-2-amino-3-hidrosulfonil-propanoico

5 Pen: L-Penicilamina

Alg: L-Alilglicina

Btg: Ácido (2S)-2-Aminohex-5-enoico

AGB: Ácido (2S)-2-Amino-4-guanidino-butanoico

CPTG: L-Ciclopentilglicina

10 CHXG: L-Alfa-ciclohexilglicina

NMeG: Sarcosina

bAla: Beta-alanina

P6P: Ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico

P12P: Ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

15 Aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico

[illegible]

KSG: Ácido (2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-[(2R,3R,4S,5R,6S)-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-5-

20 acetamido-6-[(2S,3S,4S,5S,6R)-2-[[[(2R,3R,4S,5S,6S)-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-5-acetamido-6-
 [(2R,3S,4R,5R,6R)-5-acetamido-6-[2-[[[(5S)-5-amino-5-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]-4-hidroxi-
 2-(hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]oxi-4-
 [(2R,3S,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-[(2S,3R,4S,5R,6R)-6-[[[(2R,4S,5R,6R)-5-
 acetamido-2-carboxi-4-hidroxi-6-[(1R,2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropiran-2-il]oximetil]-3,4,5-
 25 trihidroxi-tetrahidropiran-2-il]oxi-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-4,5-dihidroxi-6-
 (hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-3,5-dihidroxi-tetrahidropiran-2-il]metoxi]-4,5-dihidroxi-6-
 (hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]oxi-3,4,5-trihidroxi-
 tetrahidropiran-2-il]metoxi]-4-hidroxi-6-[(1R,2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropiran-2-carboxílico

KPEG: Ácido (2S)-6-amino-2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

30 metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoico

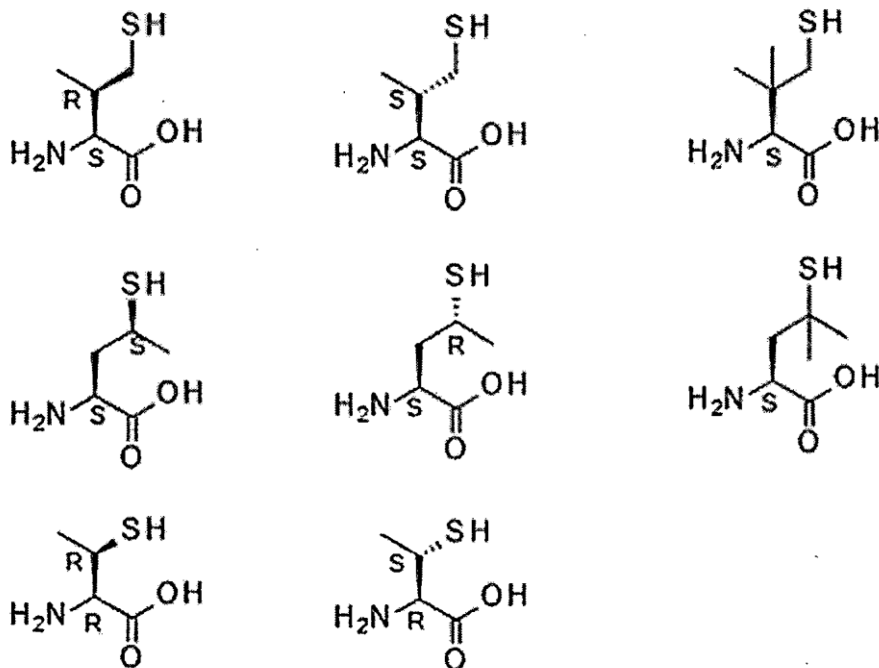
4PAL: L-4-piridilalanina

[illegible][illegible]

xi]etoxi]propanoico

Como se menciona en el presente documento, los aminoácidos no naturales también incluyen compuestos análogos de PEN representados por las siguientes fórmulas estructurales.

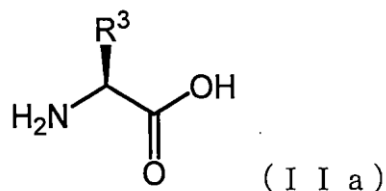
[Fórmula química 65-5]



10 Cuando el término "aminoácido(s)" se usa en el presente documento para describir uno o más aminoácidos constitucionales de un oligopéptido y un polipéptido, este término se refiere a uno o más restos de aminoácidos. A menos que se especifique lo contrario, los aminoácidos a los que se hace referencia en el presente documento son L-aminoácidos. Cuando se muestra que un aminoácido específico está en la forma D, se puede agregar "D -" a la abreviatura del aminoácido (por ejemplo, D-Asp, D-Glu, D-Lys o D-Ser). Como se hace referencia en el presente documento, D-Asp a veces se indica con "d".

Como se menciona en la presente, el aminoácido alifático es un aminoácido representado por la fórmula (IIa):

15 [Fórmula química 66]



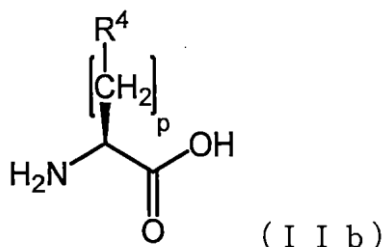
(donde R³ es alquilo de C₁₋₆, alqueno de C₂₋₆ o cicloalquilo de C₃₋₆).

Los ejemplos de aminoácidos alifáticos naturales incluyen Ala, Val, Leu e Ile. Los ejemplos

de aminoácidos alifáticos no naturales incluyen, entre otros, INle, Tle, Ahp, Aoc, Alg, Btg, CPTG y CHXG.

Como se menciona en la presente, el aminoácido alifático es un aminoácido representado por la fórmula (IIb):

[Fórmula química 67]



5

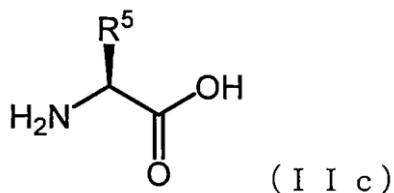
(en el que R^4 es un grupo aromático seleccionado entre fenilo, tienilo, piridilo, naftilo, indolilo, benzofuranilo y benzotienilo, en el que el grupo aromático puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de C_{1-3} , átomos de halógeno, hidroxilo y alcoxi de C_{1-3} y p es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3)).

10

Los ejemplos de aminoácidos aromáticos naturales incluyen Phe, Tyr y Trp. Los ejemplos de aminoácidos aromáticos no naturales incluyen, entre otros, 2Nal, 4CF, DCF, HF, Phg, y 4PAL.

Como se menciona en la presente, el aminoácido básico es un aminoácido representado por la fórmula (IIc):

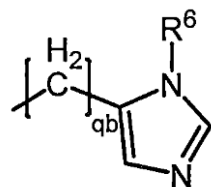
[Fórmula química 68]



15

[donde R^5 es un grupo representado por la fórmula $-(CH_2)_{qa}NH_2$ (en la que qa es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)),

[Fórmula química 69]



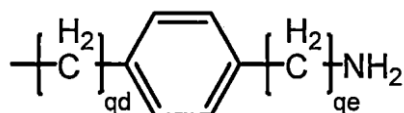
20

(donde R^6 es un átomo de hidrógeno o alquilo de C_{1-3} , y qb es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)),

la fórmula $-((CH_2)_{qc}NHC(=NH)NH_2)$ (donde qc es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)), o

la fórmula

[Fórmula química 70]

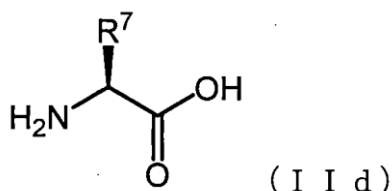


(en donde qd y qe son cada uno independientemente un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3)).

Los ejemplos de aminoácidos básicos naturales incluyen Lys, His y Arg. Los ejemplos de aminoácidos básicos no naturales incluyen, entre otros, 3MH, AMF y AGB.

Como se menciona en la presente, el aminoácido neutro es un aminoácido representado por la fórmula (IIId):

[Fórmula química 71]

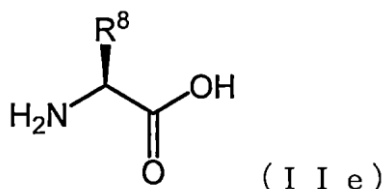


[en donde R⁷ es un grupo representado por la fórmula -(CH₂)_{ra}NHCONH₂ (en donde ra es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6)) o la fórmula -(CH₂)_{rb}SH (en donde rb es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2, o 3))], Gly, Met, Pro, 3HyP, Asn, Gln, Ser, ^mS, MS, Thr, C(O), C(O₂), Pen, o un análogo Pen.

Los ejemplos del aminoácido neutro natural incluyen Gly, Ser, Thr, Cys, Met, Pro, Asn y Gln. Los ejemplos del aminoácido neutro no natural incluyen, entre otros, 3HyP, ^mS, MS, Alb, Cit, Hct, HCY, C(O), C(O₂), Pen y un análogo de Pen.

Como se menciona en la presente, el aminoácido ácido es un aminoácido representado por la fórmula (IIe):

[Fórmula química 72]



[en donde R⁸ es un grupo representado por la fórmula -(CH₂)_sCOOH (en donde s es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6))].

Los ejemplos de aminoácidos aromáticos naturales incluyen Asp y Glu.

Como se menciona en el presente documento, alquilo de C₁₋₃ se refiere a un alquilo de cadena

lineal o ramificada que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, 1-propilo o 2-propilo.

Como se hace referencia en el presente documento, alquilo de C₁₋₆ se refiere a un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-
5 2-butilo, 3-metil-2-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 2-etil-1-butilo, 2,2-dimetil-1-butilo o 2,3-dimetil-1-butilo.

Como se hace referencia en el presente documento, alqueno de C₂₋₆ se refiere a un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y que contiene uno o más dobles enlaces, tales como vinilo, 1-propenilo, 2-propenil(alilo), 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-2-butenilo, 2 metil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo o 3-metil-2-pentenilo, con vinilo, 2-propenilo(alilo), 3-butenilo, 4-pentenilo o 5-hexenilo siendo preferidos.

Como se menciona en el presente documento, cicloalquilo de C₃₋₆ se refiere a un grupo alquilo cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, tal como un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un
15 grupo ciclopentilo o un grupo ciclohexilo.

Como se hace referencia en el presente documento, los átomos de halógeno son F, Cl, Br o I.

Como se menciona en el presente documento, alcoxi de C₁₋₃ se refiere a un grupo hidroxilo sustituido con un grupo alquilo de C₁₋₃ como se define anteriormente, tal como metoxi, etoxi, 1-propoxi o 2-propoxi.

Como se hace referencia en el presente documento, el término "glicano" significa una unidad estructural compuesta por dos o más monosacáridos unidos mediante un enlace glicosídico. Los monosacáridos y glicanos específicos a veces se abrevian, por ejemplo, como "GlcNAc-" y "SG-". Cuando cualquiera de estas abreviaturas se utiliza en una fórmula estructural, la abreviatura se muestra con la intención de que un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno involucrado en un
20 enlace glicosídico en el extremo reductor de otra unidad estructural no esté incluido en la abreviatura que indica el glicano, a menos que específicamente definido.

Como se hace referencia en el presente documento, un monosacárido como unidad básica de un glicano se indica por conveniencia de modo que en la estructura del anillo, la posición de un átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno que constituye el anillo y directamente unido a un grupo
30 hidroxilo (o átomo de oxígeno involucrado en un enlace glicosídico) se define como la posición 1 (posición 2 solo para ácidos siálicos), a menos que se especifique lo contrario.

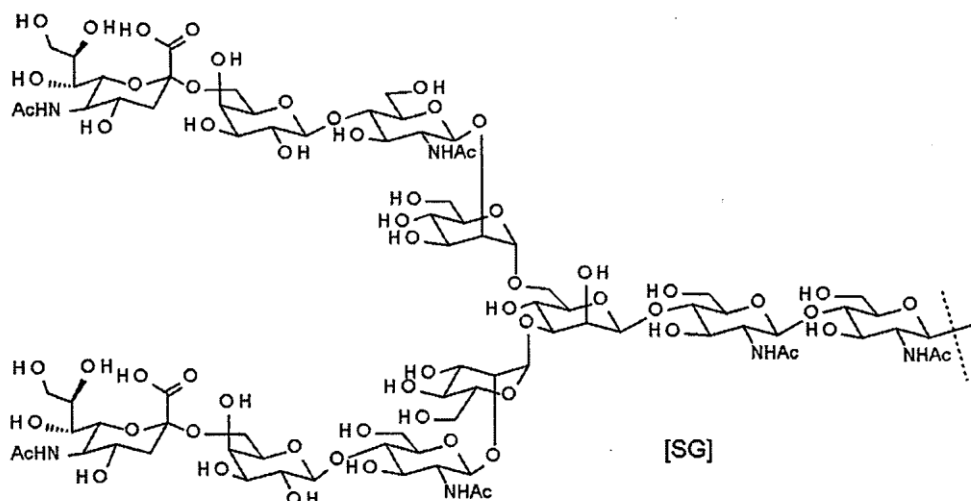
El monosacárido contenido en el glicano no está particularmente limitado siempre que tenga la estructura básica de un azúcar, y se pueden usar varios monosacáridos tales como azúcares de 6 y 5 miembros. El monosacárido puede ser un azúcar natural o un azúcar sintetizado artificialmente, y
35 se prefiere un azúcar natural. Ejemplos de monosacáridos incluyen glucosa (Glu), fructosa (Fru),

manosa (Man), galactosa (Gal), glucosamina (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido glucurónico (GlucA), ácido neuramínico (Neu), ácido siálico/ácido N-acetilneuramínico (Sia/NeuNAc/Neu5Ac), galactosamina, N-acetilgalactosamina (GalNAc), xilosa (Xyl), ácido idurónico (IdoA), fucosa (Fuc), aldotriosa, gliceraldehído, aldótetrosa, eritrosa, treosa, aldopentosa, ribosa, lixosa, arabinosa, aldohexosa, alosa, talosa, gulosa, altrosa, idosa, cetotriosa, dihidroxiacetona, cetotetrosa, eritrolusa, cetopentosa, xilulosa, ribulosa, cetohexosa, psicosa, sorbosa y tagatosa.

Cuando el glicano al que se hace referencia en el presente documento se indica como un signo (por ejemplo, GLY, SG, MSG, GlcNAc), se pretende que el signo, a menos que se defina lo contrario, incluya átomos de carbono que van hasta el extremo reductor y excluye N u O involucrado en un enlace N- u O-glucosídico.

Como se hace referencia en el presente documento, sialilglicano (en lo sucesivo denominado "SG") se refiere a un glicano complejo unido a N que se sabe que no presenta antigenicidad en el cuerpo humano, estando representado el glicano por la siguiente fórmula estructural y secuencia:

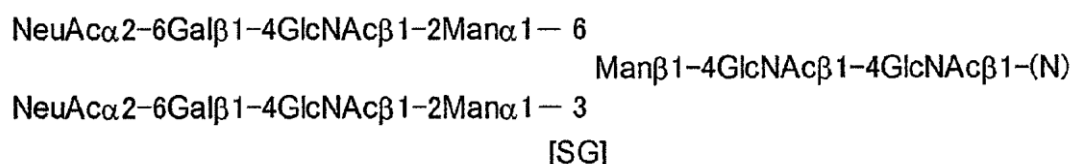
[Fórmula química 73]



15

y

[Fórmula química 74]



(donde "-(N)" representa la unión a una cadena lateral de Asn a través de un enlace N-glucosídico).

Como se hace referencia en el presente documento, la actividad inhibidora de TSP1 se refiere a la actividad para inhibir al menos un efecto de TSP1, incluido el efecto angiostático. La actividad inhibidora de TSP1 se mide mediante un ensayo de inhibición de la adhesión celular utilizando TSP1

20

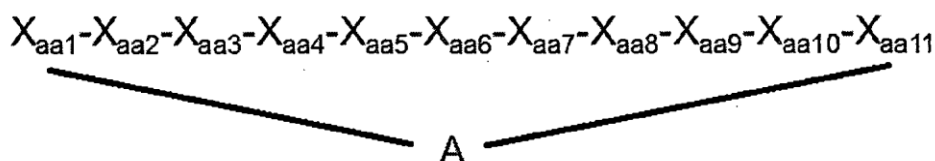
humana y células endoteliales vasculares como se describe más adelante en la sección de Ejemplos. En este ensayo, cuando la concentración inhibidora del 50% (IC_{50}) de una sustancia de prueba es 500 nM o menos, se determina que la sustancia de prueba tiene actividad inhibidora de TSP1.

5 I. Péptido cíclico

La presente invención proporciona nuevos péptidos cíclicos que tienen actividad inhibidora de TSP1 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un modo, el compuesto de la presente invención es un péptido cíclico representado por la fórmula (I)

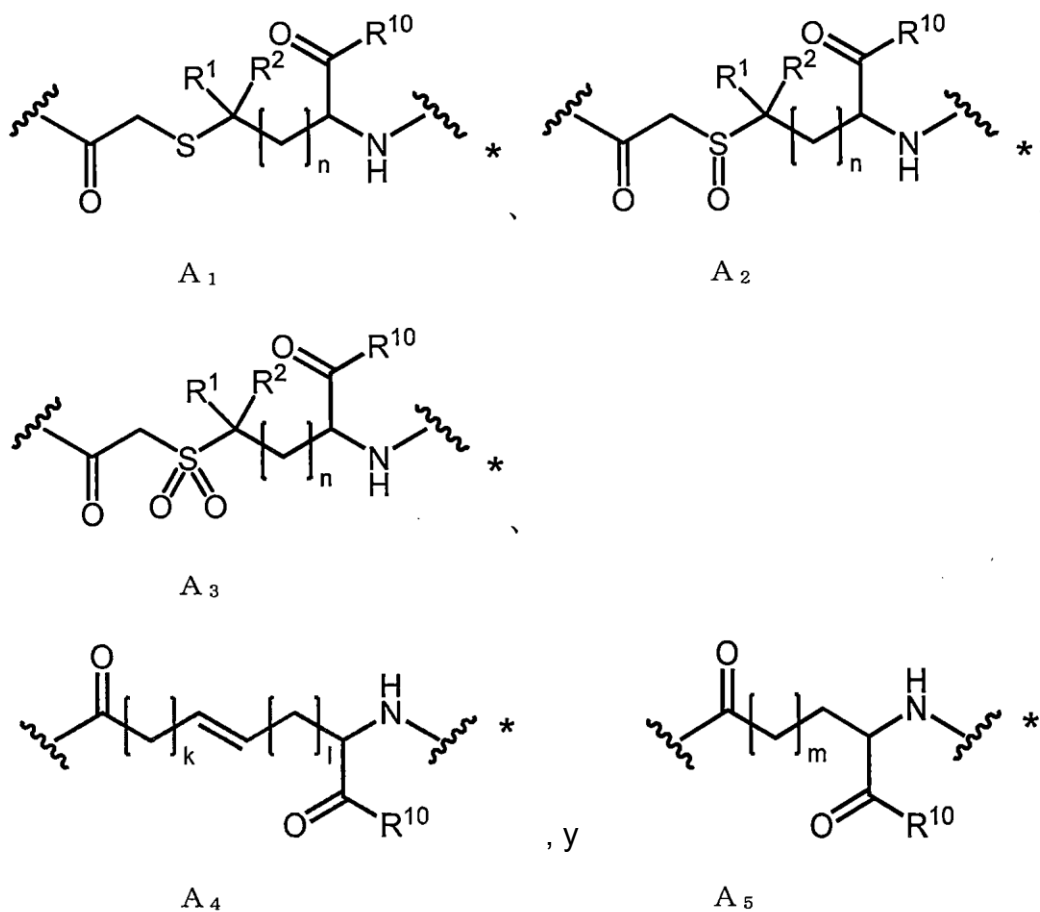
10 [Fórmula química 75]



(en lo sucesivo denominado "el péptido cíclico I de la presente (esta) invención"). El péptido cíclico I de esta invención ha formado en él una estructura cíclica en la que los aminoácidos X_{aa1} a X_{aa11} , se unen mediante enlaces amida para formar una cadena de oligopéptidos y el aminoácido N-terminal (X_{aa1}) y el aminoácido C-terminal (X_{aa11}) de la cadena de oligopeptidos se unen a través de un grupo formador de anillos A.

En la fórmula (I), A se selecciona de los siguientes grupos formadores de anillos A_1 a A_5 que tienen una estructura de aminoácidos:

[Fórmula química 76]



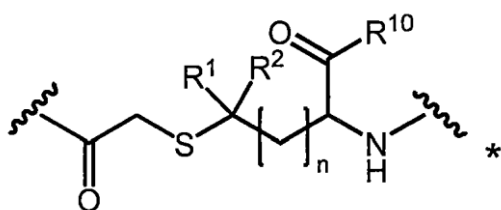
Como se encuentra en cualquiera de los extremos de A,
[Fórmula química 77]



- 5 representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de X_{aa1} , y
[Fórmula química 78]



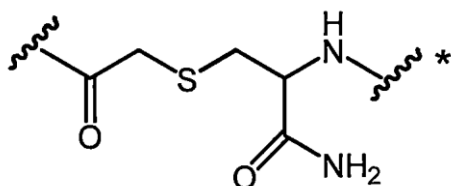
- representa un punto de unión al grupo carbonilo C-terminal de X_{aa11} , Los centros asimétricos en las estructuras de aminoácidos contenidas en los grupos formadores de anillos antes mencionados pueden tener la configuración R o S.
- 10 En un modo, A es
[Fórmula química 79]



(en adelante denominado "A₁"). En el grupo formador de anillos A₁, n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R¹ y R² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃, y R¹⁰ es amino o hidroxilo. Alquilo de C₁₋₃ es preferiblemente metilo.

- 5 Un modo preferido de A₁ es un grupo formador de anillos

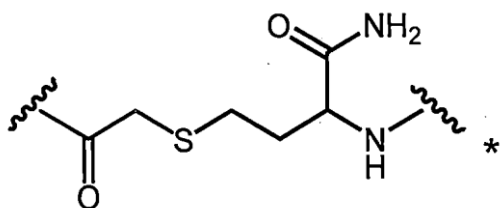
[Fórmula química 80]



- en donde R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹⁰ es amino y n es 0 (denominado en lo sucesivo "A_{1a}"). A_{1a} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de Cys (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de X_{aa11} reaccione con -COCH₂X (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de X_{aa1}. En tal grupo formador de anillos, la Cys puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos A_{1a}, donde la Cys (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de X_{aa11} es un
- 10
- 15 L-aminoácido, se denomina como "A_{1a1}".

Otro modo preferido de A₁ es un grupo formador de anillos

[Fórmula química 81]

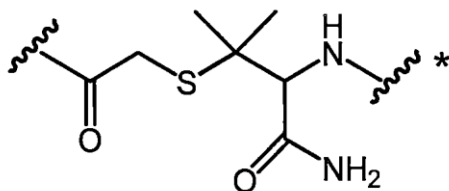


- en donde R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹⁰ es amino y n es 1 (denominado en lo sucesivo "A_{1b}"). A_{1b} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de HCY (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de X_{aa11} reaccione con -COCH₂X (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de X_{aa1}. En tal grupo formador de anillos, la HCY puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos A_{1b}, donde la HCY (siempre que
- 20

el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de X_{aa11} es un L-aminoácido, se denomina como " A_{1b1} ".

Otro modo preferido de A_1 es un grupo formador de anillos

[Fórmula química 82]



5

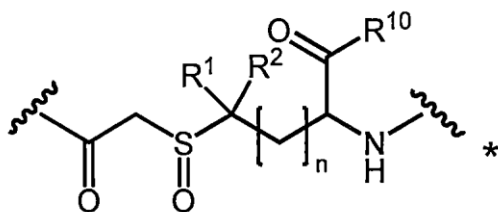
en donde R^1 y R^2 son cada uno metilo, R^{10} es amino y n es 0 (denominado en lo sucesivo " A_{1c} "). A_{1c} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de Pen (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de X_{aa11} reaccione con $-COCH_2X$ (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de X_{aa1} . En tal grupo formador de anillos, la Pen puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos A_{1c} , donde la Pen (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de X_{aa11} es un L-aminoácido, se denomina como " A_{1c1} ".

10

En otro modo, el grupo formador de anillos A es

15

[Fórmula química 83]



(en adelante denominado " A_2 "). En el grupo formador de anillos A_2 , n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R^1 y R^2 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C_{1-3} , y R^{10} es amino o hidroxil. A_2 se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos A_1 como se muestra arriba a sulfóxido.

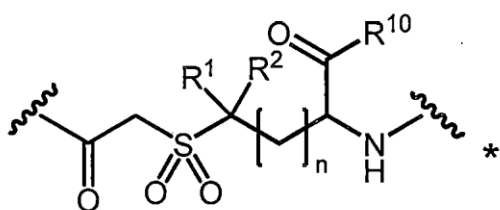
20

Un modo preferido de A_2 es esa versión de dicho grupo formador de anillos, donde R^1 y R^2 son cada uno un átomo de hidrógeno, R^{10} es amino y n es 0 (en lo sucesivo denominado " A_{2a} "). A_{2a} se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos A_{1a} como se muestra arriba a sulfóxido. En particular, el grupo formador de anillos obtenido oxidando el grupo sulfuro de A_{1a1} a sulfóxido se denomina " A_{2a1} ".

25

En otro modo, A es

[Fórmula química 84]



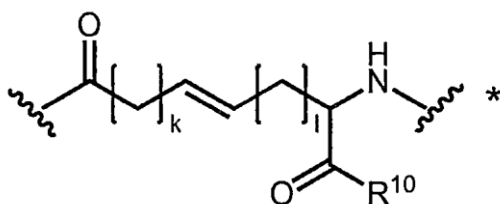
(en adelante denominado "A₃"). En el grupo formador de anillos A₃, n es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R¹ y R² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃, y R¹⁰ es amino o hidroxil. A₃ se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos A₁ como se muestra arriba a sulfona.

Un modo preferido de A₃ es esa versión de dicho grupo formador de anillos, donde R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹⁰ es amino y n es 0 (en lo sucesivo denominado "A_{3a}"). A_{3a} se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos A_{1a} como se muestra arriba a sulfona. En particular, el grupo formador de anillos obtenido oxidando el grupo sulfuro de

A_{1a1} a sulfona se denomina "A_{3a1}".

En otro modo, A es

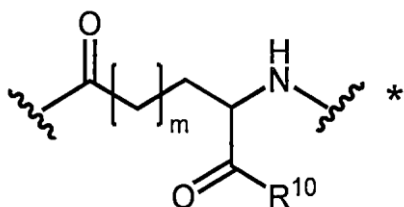
[Fórmula química 85]



(en adelante denominado "A₄"). En el grupo formador de anillos A₄, k y l son cada uno independientemente un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3), y R¹⁰ es amino o hidroxil. El grupo formador de anillos A₄ se puede obtener, por ejemplo, mediante metátesis de olefina del aminoácido (siempre que el grupo carboxi pueda convertirse en amida) que tiene el grupo (CH₂)_lCH=CH₂ en su cadena lateral y está unido por un enlace amida al extremo C de X_{aa11}, y el grupo -CO(CH₂)_kCH=CH₂ que está unido al grupo amino N-terminal de X_{aa1}. En tal grupo formador de anillos, el aminoácido que está unido por enlace amida al extremo C de X_{aa11} puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido.

En otro modo, A es

[Fórmula química 86]



(en adelante denominado "A₅"). En el grupo formador de anillos A₅, m es un número entero de 1 a 7 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7), y R¹⁰ es amino o hidroxilo. A₅ se puede obtener, por ejemplo, reduciendo el doble enlace carbono-carbono de A₄.

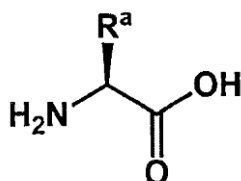
- 5 En un modo preferido, el grupo formador de anillos A es A_{1a}, A_{1b}, o A_{1c}, más preferiblemente A_{1a}.

En la fórmula (I), X_{aa1} es un residuo de un aminoácido aromático. En un modo preferido, X_{aa1} es un residuo de 2NaI.

En la fórmula (I), X_{aa2} es un residuo de un aminoácido ácido, un aminoácido básico o un aminoácido alifático. En un modo preferido, X_{aa2} es un residuo de Arg, AGB, PHG o Tle.

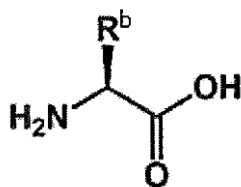
- 10 En la fórmula (I), X_{aa3} y X_{aa8} tienen cada uno una estructura seleccionada independientemente de un residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III)

[Fórmula química 87]



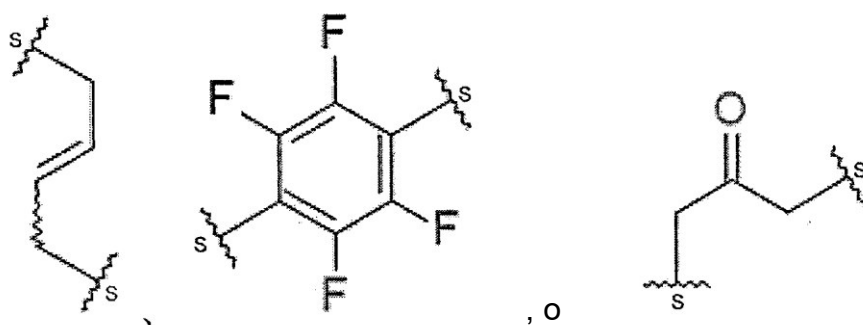
- 15 [en donde R^a es un grupo representado por la fórmula -(CH₂)_tSH (en donde t es un número entero de 1 a 3) (por ejemplo, 1, 2, o 3))] o fórmula (III')

[Fórmula química 87-1]



- 20 [en donde R^b es un grupo representado por la fórmula -CH_v(CH₃)_{2-v}CH_w(CH₃)_{2-w}SH (en donde v es un número entero de 0 a 2; cuando v es 0 o 1, w es 2 y cuando v es 2, w es 0 ó 1) o -CH_x(CH₃)_{2-x}SH (donde x es 0 o 1)], en el que los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} forman un enlace; representado por -S-S-, -S-CH₂-S-, o -S-X-S- (en el que X se selecciona de

[Fórmula química 88]



(en donde

[Fórmula química 89]



- 5 representa un punto de unión a S)), y al menos uno de X_{aa3} y X_{aa8} es un residuo del aminoácido representado por la fórmula (III). La estructura es aquella en la que los grupos tiol de las cadenas laterales de dos residuos de aminoácidos presentes en las posiciones X_{aa3} y X_{aa8} del péptido cíclico I de la presente invención están reticulados como se describió anteriormente. En una modalidad, X_{aa3} y X_{aa8} tienen una estructura en la que el residuo X_{aa3} es un residuo HCY; el residuo
- 10 X_{aa8} es un residuo HCY, un residuo Cys o un residuo Pen, preferiblemente un residuo HCY o un residuo de Cys, más preferiblemente un residuo HCY; y los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} están reticulados como se describió anteriormente, preferiblemente a través de un enlace representado por -SS- o -S-CH₂-S-, más preferiblemente a través de un enlace representado por -S-S- (es decir, enlace disulfuro). En otra modalidad, en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo X_{aa3} es un residuo de Cys; el residuo X_{aa8}
- 15 es un residuo HCY, un residuo Cys o un residuo Pen; y los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} están reticulados como se describió anteriormente, preferiblemente a través de un enlace representado por -S-S- o -S-CH₂-S-, más preferiblemente a través de un enlace representado por -S-S- (es decir, enlace disulfuro.) En otra modalidad, en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo de X_{aa3} es un residuo de Pen; el residuo X_{aa8} es un residuo HCY; y los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} pueden reticularse como se describe
- 20 anteriormente. En un modo preferido, en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III) o (III') es un residuo de HCY o un residuo de Cys; En un modo más preferido, en X_{aa3} y X_{aa8} , los grupos tiol de las cadenas laterles de dos residuos HCY presentes en las posiciones X_{aa3} y X_{aa8} del péptido cíclico I de la presente invención están reticulados como se describió anteriormente. Cabe señalar que el residuo HCY es un residuo de un aminoácido representado por
- 25 la fórmula (III), donde $t = 2$.

En un modo preferido, en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , los grupos tiol forman un enlace representado por -S-S- o -S-CH₂-S-, más preferiblemente -S-S-. En un modo preferido, en la

estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III) o (III') es un residuo de HCY y los grupos tiol forma un enlace representado por -S-S-.

En la fórmula (I), X_{aa4} es un residuo de un aminoácido neutro. En un modo preferido, X_{aa4} es un residuo de Gly.

5 En la fórmula (I), X_{aa5} es un residuo de un aminoácido básico. En un modo preferido, X_{aa5} es un residuo de Arg o AGB.

En la fórmula (I), X_{aa6} es un residuo de un aminoácido neutro o un aminoácido ácido. En un modo preferido, X_{aa6} es un residuo de Asn o Asp.

10 En la fórmula (I), X_{aa7} es un residuo de un aminoácido aromático. En un modo preferido, X_{aa7} es un residuo de Trp.

En la fórmula (I), X_{aa9} es un residuo de un aminoácido aromático, un aminoácido alifático o un aminoácido básico. En un modo preferido, X_{aa9} es un residuo de Val, Arg, PHG, 4PAL, o AGB, más preferiblemente un residuo de Val, Arg, PHG o 4PAL.

15 En la fórmula (I), X_{aa10} es un residuo de un aminoácido aromático. En un modo preferido, X_{aa10} es un residuo de Trp.

En la fórmula (I), X_{aa11} es un residuo de un aminoácido alifático. En un modo preferido, X_{aa11} es un residuo de Val, CPTG, o CHXG, más preferentemente un residuo de Val o CPTG.

Un modo preferido del péptido cíclico I de la presente invención es un péptido cíclico representado por la fórmula (I), en la que

20 X_{aa1} es un residuo 2Nal;

X_{aa2} es un residuo de Arg, AGB, PHG o Tle;

en la estructura de X_{aa3} y X_{aa8} , el residuo de un aminoácido representado por la fórmula (III) o (III') es un residuo de HCY o Cys;

X_{aa4} es un residuo de Gly;

25 X_{aa5} es un residuo de Arg o AGB;

X_{aa6} es un residuo de Asn o Asp;

X_{aa7} es un residuo de Trp;

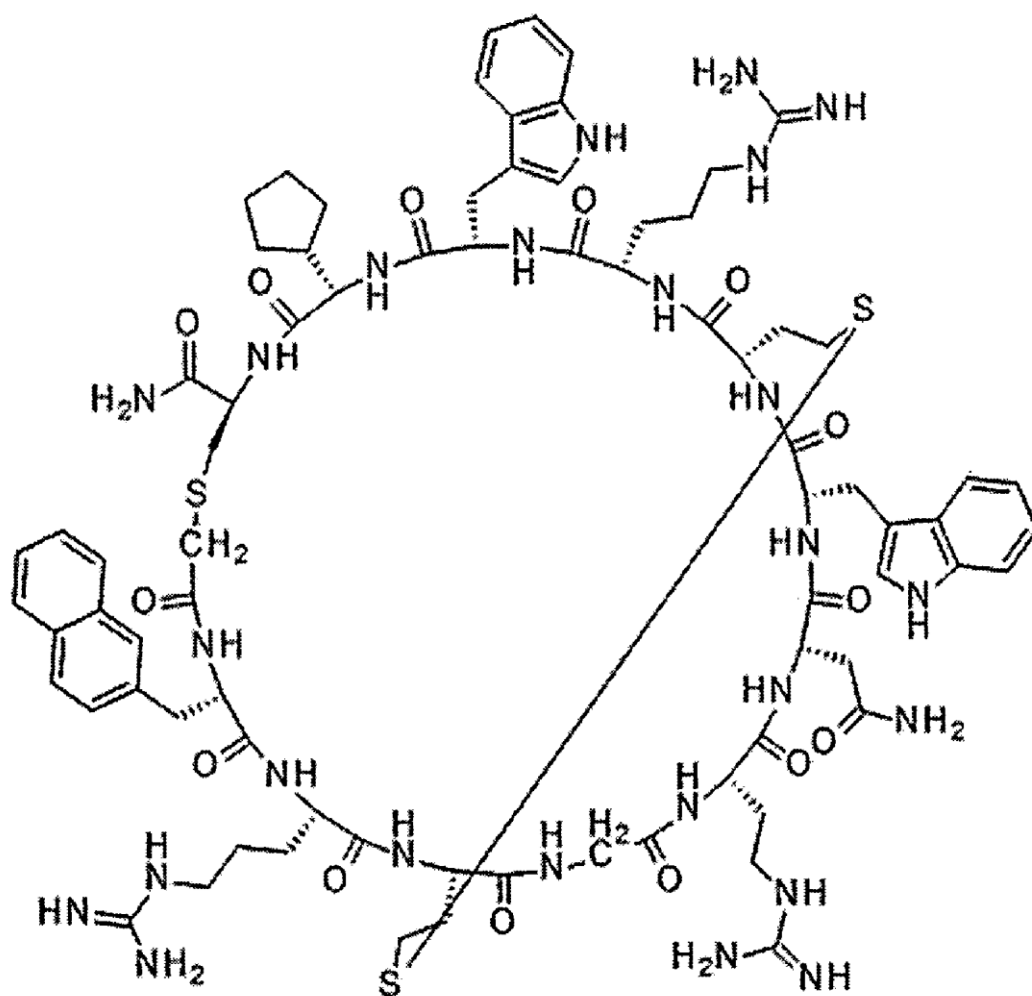
X_{aa9} es un residuo de Val, Arg, PHG, 4PAL o AGB;

X_{aa10} es un residuo de Trp; y

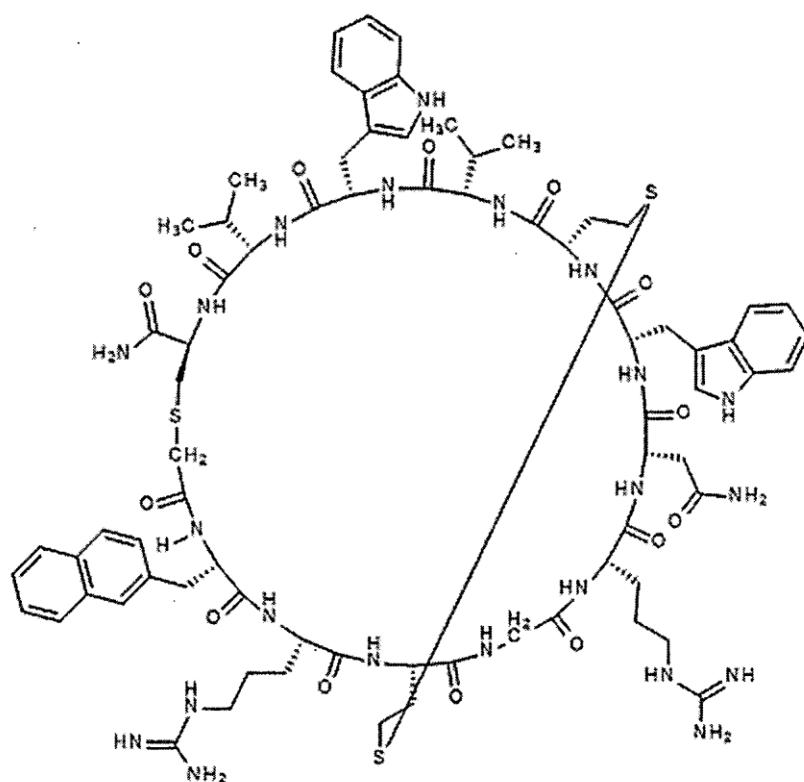
30 X_{aa11} es un residuo de Val, CPTG o CHXG.

Un modo aún más preferido del péptido cíclico I de la presente invención es un péptido cíclico seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las siguientes fórmulas:

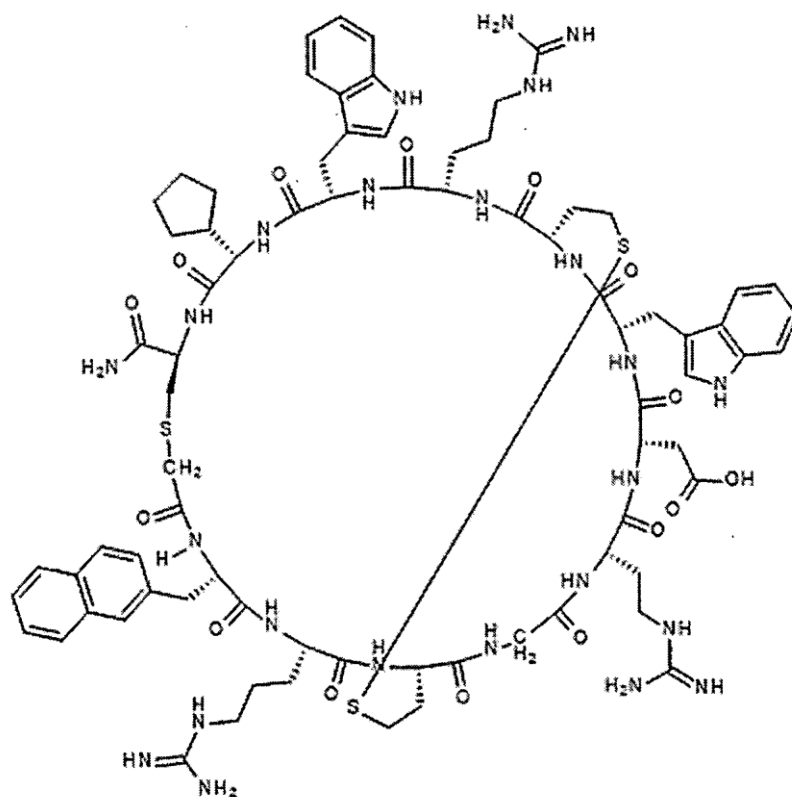
[Fórmula química 90]



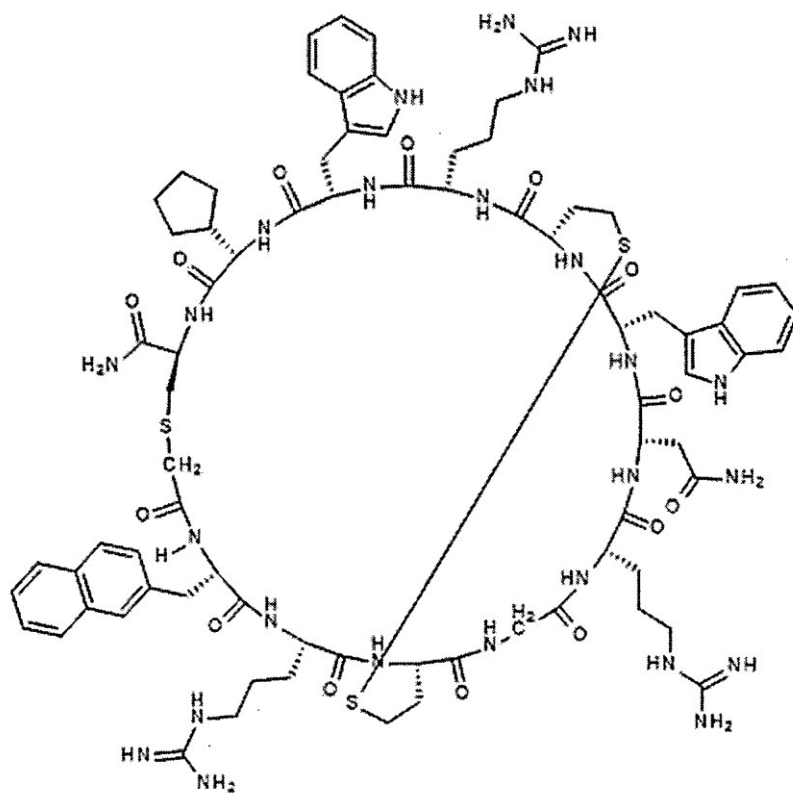
[Fórmula química 91]



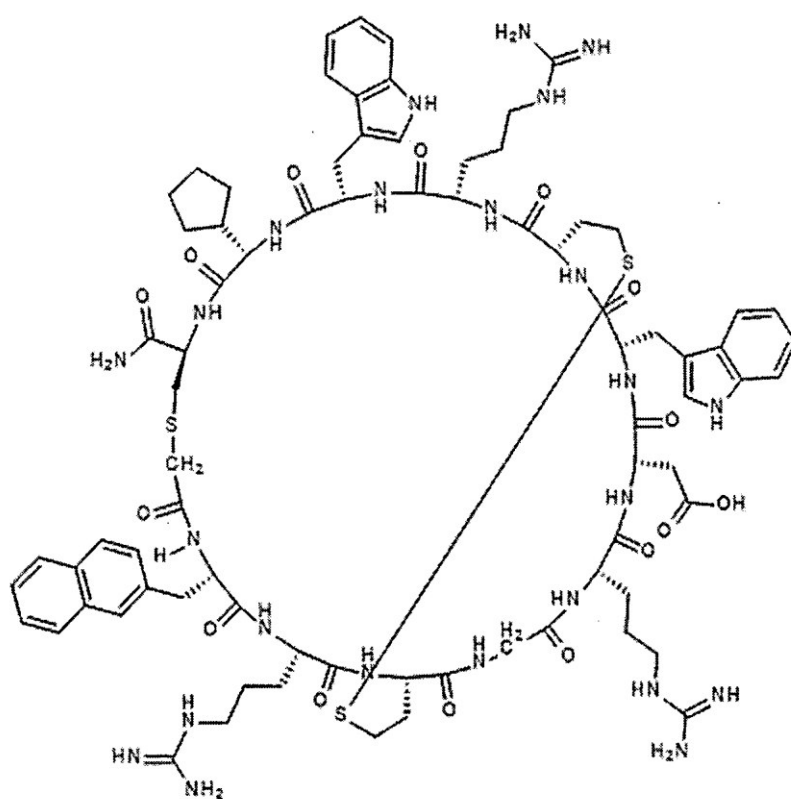
[Fórmula química 92]



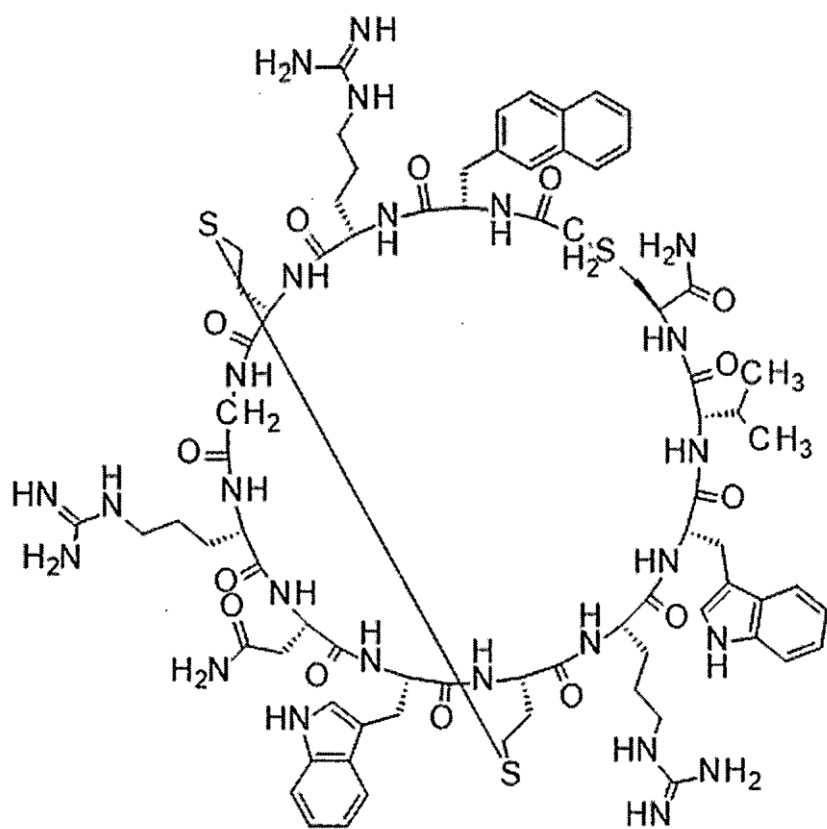
[Fórmula química 93]



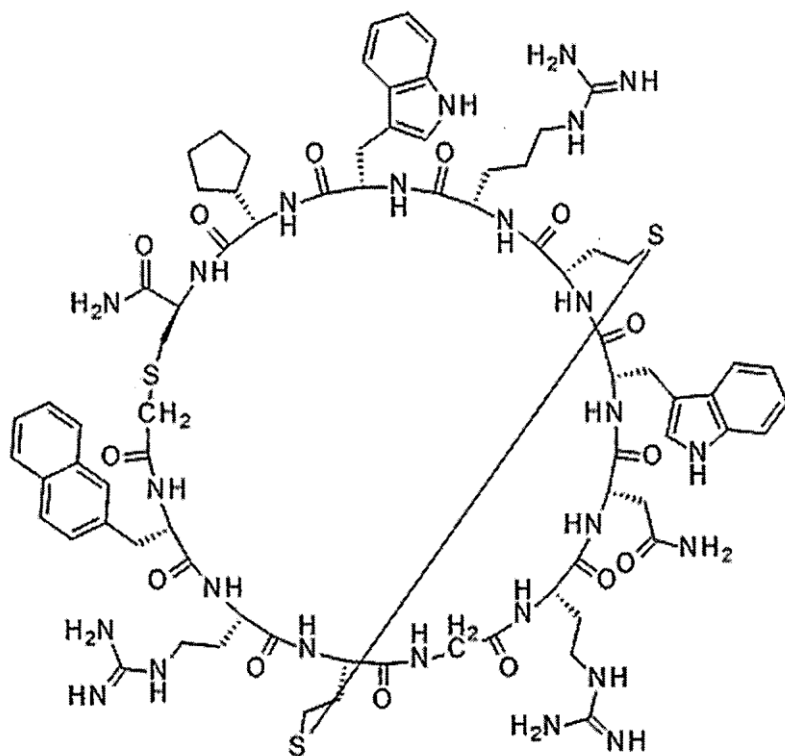
[Fórmula química 94]



[Fórmula química 95]

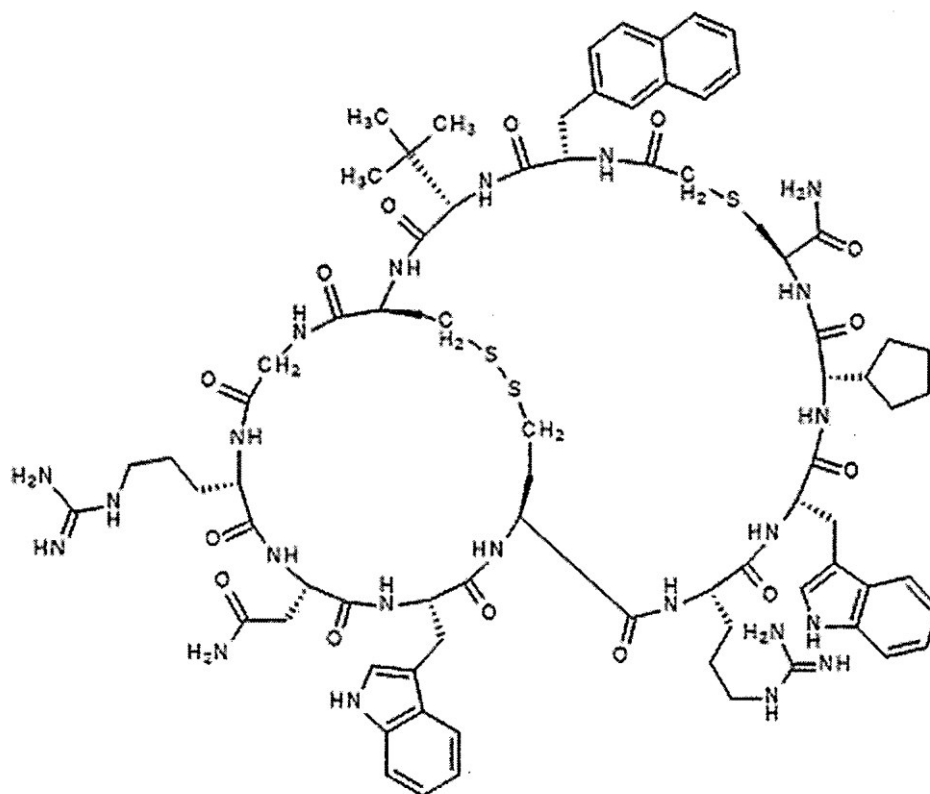


[Fórmula química 96]

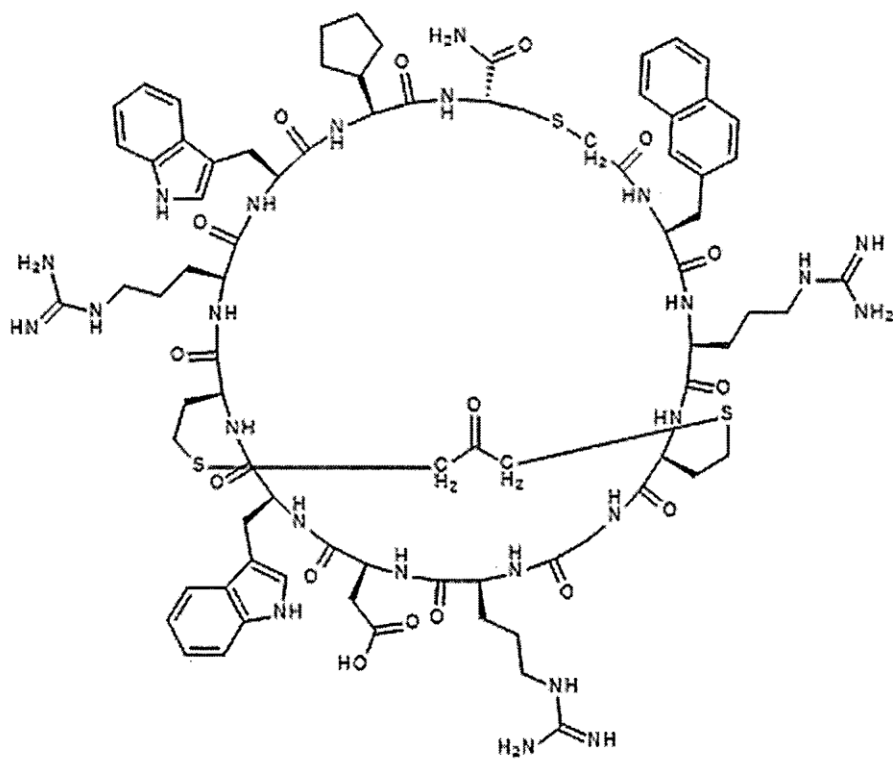


[illegible]

[Fórmula química 101]

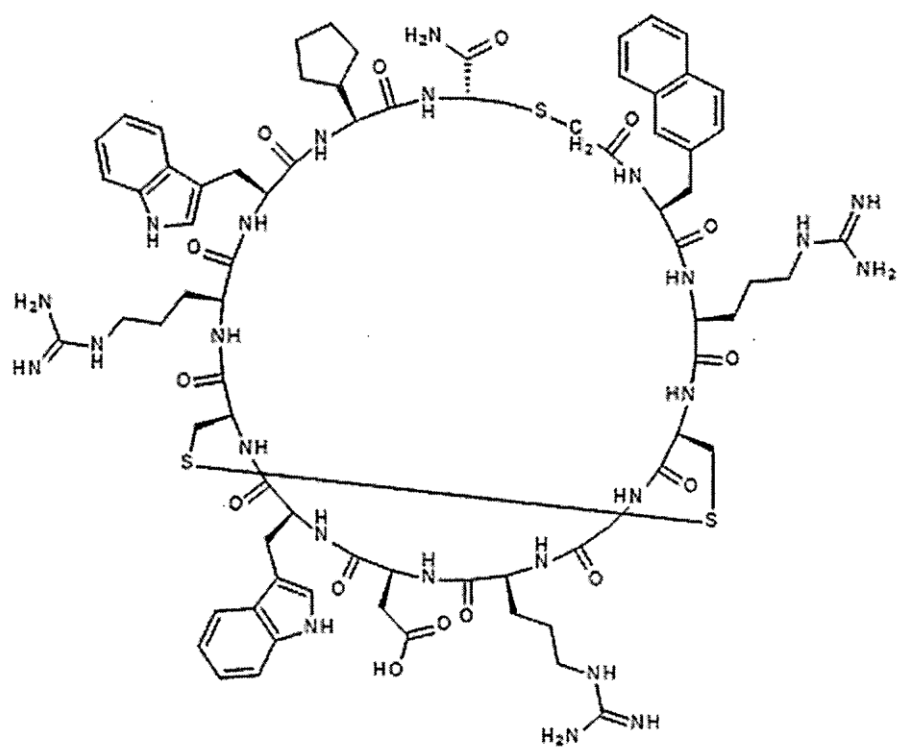


[Fórmula química 101-1]

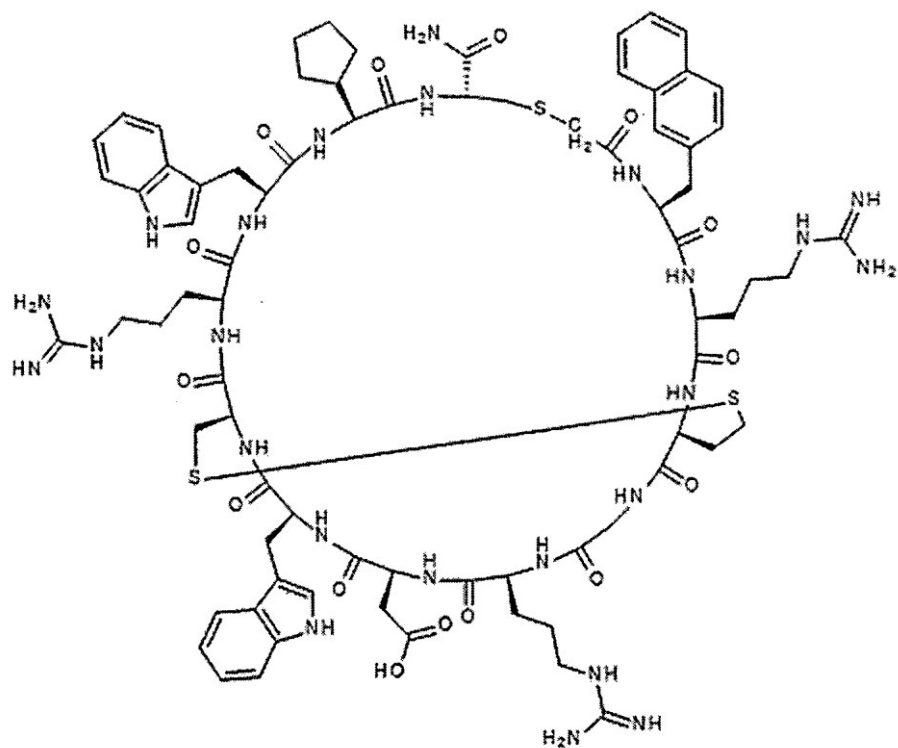


[Fórmula química 101-2]

[Fórmula química 101-4]



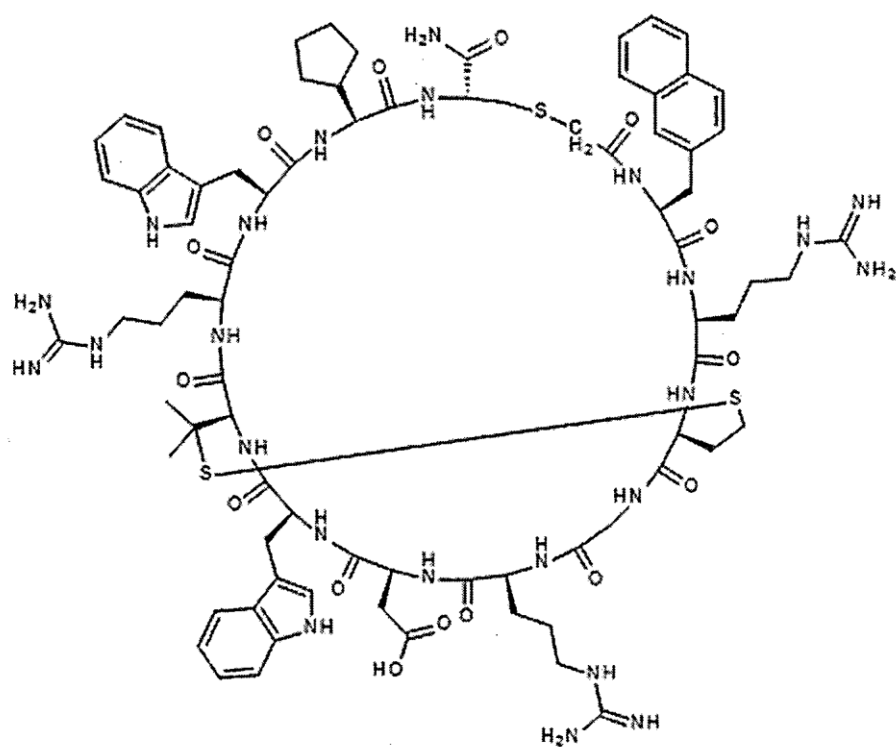
[Fórmula química 101-5]



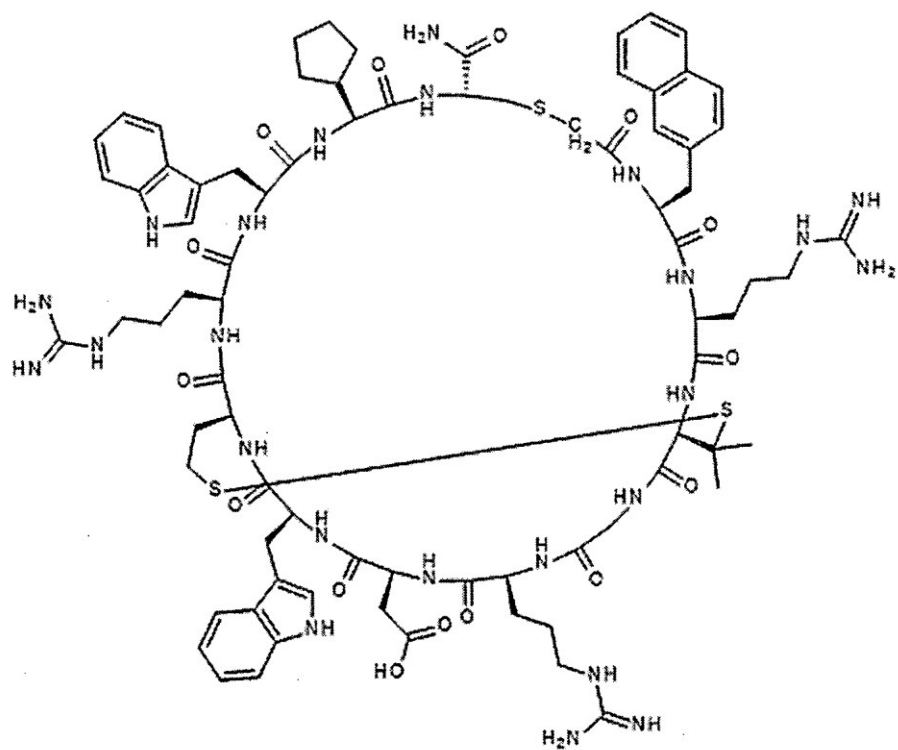
[Fórmula química 101-6]

[Fórmula química 101-8]

[Fórmula química 101-10]



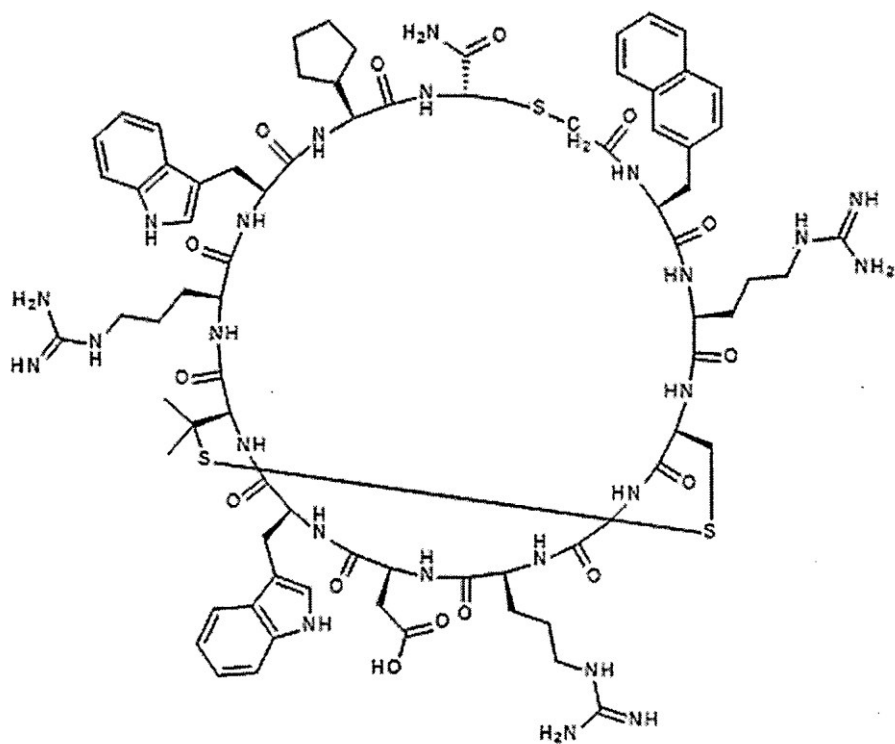
[Fórmula química 101-11]



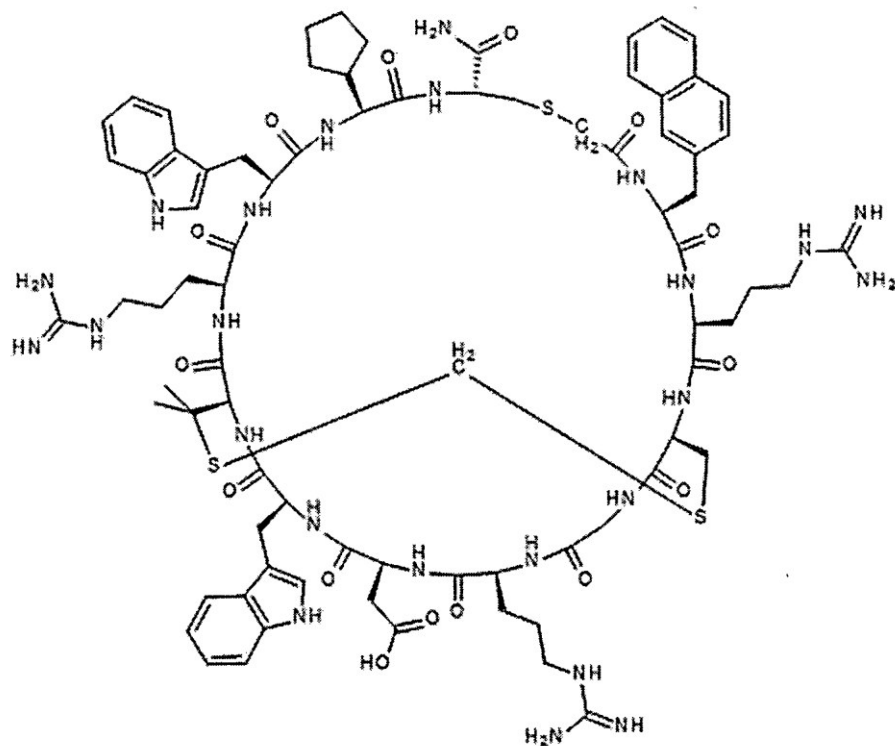
[Fórmula química 101-12]

The diagram shows a cyclic peptide structure, likely a 15-membered ring. The backbone consists of amide bonds forming a continuous cycle. The side chains are diverse, including indole, tryptophan, and guanidino groups. The structure is drawn in a circular fashion, with the backbone forming the outer ring and the side chains extending outwards. The labels 'H₂N' and 'NH' indicate the presence of amino and amide groups, respectively. The 'CH₂' label is also present, indicating a methylene group in the backbone.

[Fórmula química 101-14]



[Fórmula química 101-15]



Los péptidos cíclicos mostrados anteriormente son del Péptido-1 al Péptido-12 y del Péptido-
 5 125 al Péptido-139 de los Ejemplos que se muestran a continuación. En todos estos péptidos cíclicos,

el grupo A formador de anillos es A_{1a1}.

Cuando el péptido cíclico I de la presente invención contiene un grupo básico, el péptido cíclico I se puede combinar con un ácido para formar una sal del mismo, y dicha sal se incluye en esta invención. Ejemplos de dicha sal incluyen sal de ácido inorgánico, sal de ácido orgánico, sal de aminoácido y sulfonato. Ejemplos de sal de ácido inorgánico incluyen hidrocloreto, hidrobromato, sulfato, nitrato y fosfato. Los ejemplos de sal de ácido orgánico incluyen acetato, oxalato, malonato, fumarato, maleato, ftalato y trifluoroacetato. Ejemplos de sal de aminoácido incluyen glutamato y aspartato. Los ejemplos de sulfonato incluyen metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, 2,4-dimetilbencenosulfonato, 2,4,6-trimetilbencenosulfonato, 4-etilbencenosulfonato y naftalenosulfonato. Un modo preferido de sal farmacéuticamente aceptable del péptido cíclico I de esta invención es un acetato, un clorhidrato o un trifluoroacetato, más preferiblemente un acetato.

Cuando el péptido cíclico I de la presente invención contiene un grupo ácido, el péptido cíclico I se puede combinar con una base para formar una sal del mismo, y dicha sal se incluye en esta invención. Ejemplos de dicha sal incluyen sal metálica, sal de amina inorgánica, sal de amina orgánica y sal de aminoácido. Ejemplos de sales metálicas incluyen: sales de metales alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio y sal de litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio; así como sal de aluminio, sal de hierro, sal de zinc, sal de cobre, sal de níquel y sal de cobalto. Ejemplos de sal de amina inorgánica incluyen sal de amonio. Los ejemplos de sal de amina orgánica incluyen sal de morfolina, sal de glucosamina, sal de etilendiamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitohexilamina, sal de dietanolamina, sal de piperazina y sal de tetrametilamonio. Ejemplos de sal de aminoácido incluyen sal de lisina y sal de arginina.

El péptido cíclico I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención se puede utilizar en forma cristalina. Tal cristal puede formarse exclusivamente a partir del péptido cíclico I o de su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención, o el péptido cíclico I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede formarse como un cocrystal o un solvato (por ejemplo, hidrato). Un tipo del péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención se puede usar solo, o se pueden usar dos o más tipos del mismo en combinación según sea apropiado.

El péptido cíclico I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención puede formar un compuesto isotópico en el que uno o más átomos constitucionales se sustituyen con un átomo isotópico en una proporción no natural. El átomo isotópico puede ser radiactivo o no radiactivo, y ejemplos del mismo incluyen deuterio (²H; D), tritio (³H; T), carbono-14 (¹⁴C) y yodo-125 (¹²⁵I). Los compuestos marcados con un átomo isotópico radiactivo se pueden usar como agentes terapéuticos o profilácticos para diversas enfermedades, reactivos de investigación (por ejemplo, reactivo de ensayo), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agente de diagnóstico por imágenes) o

similares. Esta invención también incluye dicho compuesto isotópico radiactivo o no radiactivo.

El péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención se puede preparar mediante un método conocido en la técnica, tal como síntesis química o sistema de traducción libre de células. Por ejemplo, la síntesis química del péptido cíclico de esta invención se puede realizar de acuerdo con un método de síntesis en fase sólida común usando un grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo (grupo Fmoc) como grupo protector del grupo amino. La síntesis en fase sólida se puede realizar usando un sintetizador automático disponible comercialmente (por ejemplo, Syro II (producido por Biotage Japan), Liberty Blue (producido por CEM)).

Por ejemplo, el péptido cíclico I de la presente invención que contiene el grupo formador de anillos A₁ se puede obtener siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

Con el uso de un sintetizador automático de péptidos, los aminoácidos protegidos con un grupo protector del grupo amino (por ejemplo, grupo Fmoc) se acoplan a un soporte sólido (por ejemplo, Rink Amide Resin AM (producida por Novaviochem), resina de cloruro de 2-clorotritilo (producida por Novaviochem)) de manera gradual comenzando con el aminoácido C-terminal (el aminoácido C-terminal es un aminoácido que contiene tiol). La desprotección de grupos amino se puede realizar mediante un método conocido por los expertos (por ejemplo, usando piperidina/1-metil-2-pirrolidinona al 20% para eliminar grupos Fmoc). Después de acoplar el aminoácido N-terminal y desproteger el grupo amino de este aminoácido, se introduce un grupo para formar un grupo formador de anillos (por ejemplo, grupo clorometilcarbonilo) (por ejemplo, para permitir que el ácido cloroacético reaccione con el grupo amino N-terminal) para formar un péptido cíclico. Luego, el péptido resultante se escinde de la resina peptídica mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, usando ácido trifluoroacético/etanditiol/triisopropilsilano/agua para escindir de Rink Amide Resin AM). Después de recuperar un péptido crudo mediante precipitación con éter, el péptido de interés puede purificarse mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa).

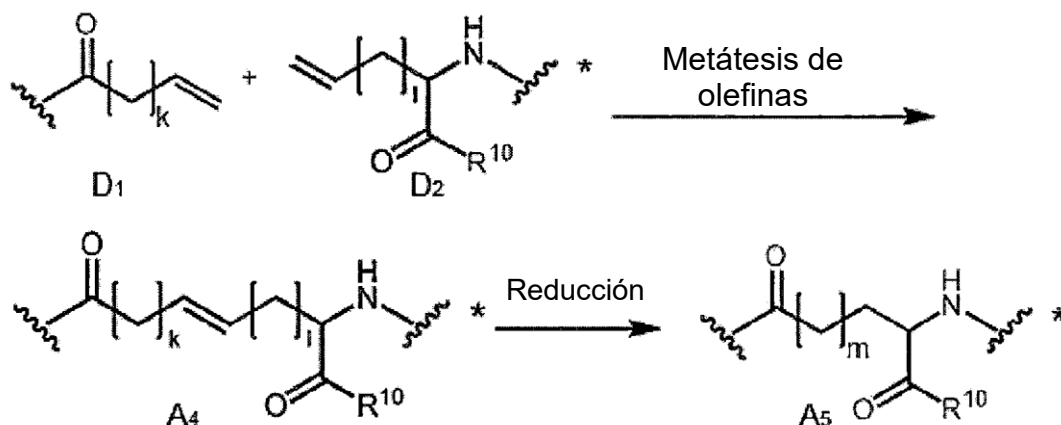
Los péptidos cíclicos obtenidos pueden someterse a un método convencional (por ejemplo, método de oxidación de yodo) para formar un enlace disulfuro entre X_{aa3} y X_{aa8}, obteniendo así un péptido bicíclico.

El péptido de interés resultante se puede convertir en una sal deseada mediante un procedimiento convencional.

El péptido cíclico I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención que contiene el grupo formador de anillos A₂ o A₃ se puede obtener, por ejemplo, oxidando el péptido cíclico I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de esta invención que contiene el grupo formador de anillos A₁ con un agente oxidante (por ejemplo, ácido m-cloroperoxibenzoico, peróxido de hidrógeno o dimetildioxirano).

Por ejemplo, el péptido cíclico I de la presente invención que contiene el grupo formador de anillos A₄ o A₅ se puede obtener siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

[Fórmula química 102]



- 5 Un oligopéptido que contiene los grupos terminales D₁ y D₂ puede prepararse usando un sintetizador de péptidos automático tomando las etapas de acoplar aminoácidos protegidos con un grupo protector de grupo amino (por ejemplo, grupo Fmoc) a un soporte sólido en un manera gradual comenzando con el aminoácido C-terminal (el aminoácido C-terminal es un aminoácido que contiene olefina), desprotegiendo el grupo amino del aminoácido N-terminal e introduciendo un grupo para formar un grupo formador de anillos (por ejemplo, grupo 2-propenilo).
- 10

Después de que se prepara el oligopéptido que contiene los grupos terminales D₁ y D₂, dicho oligopéptido se somete a una reacción de metátesis de olefinas en presencia de un catalizador apropiado (por ejemplo, catalizador de Grubbs de segunda generación), por lo que el péptido cíclico que contiene el grupo formador de anillos A₄ se puede preparar. Cuando el péptido cíclico que contiene el grupo formador de anillos A₄ se somete a una reacción de reducción en condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de hidrógeno y un catalizador de Wilkinson), se puede obtener el péptido cíclico que contiene el grupo formador de anillos A₅.

15

El péptido cíclico I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención tiene actividad inhibidora de TSP1 y tiene una IC₅₀ de 500 nM o menos, preferiblemente 200 nM o menos, medida mediante un ensayo de inhibición de la adhesión celular usando TSP1 humana y células endoteliales vasculares como se describe a continuación en la sección de Ejemplos. Por lo tanto, el péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención tiene la capacidad de bloquear la adhesión de células endoteliales vasculares a TSP1 y, por tanto, son útiles como agentes mejoradores del flujo sanguíneo.

20

Además, el péptido cíclico I de la presente invención tiene una estabilidad metabólica mejorada en comparación con el péptido monocíclico debido a su naturaleza bicíclica. Por lo tanto, el péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención es útil proporcionando un medio de

25

tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 en frecuencia inferior de administración.

5 II. Composición farmacéutica que comprende, como componente activo, el péptido cíclico I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende, como componente activo, el péptido cíclico o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención (en lo sucesivo denominada "la composición farmacéutica I de la presente (esta) invención"). La composición farmacéutica I de esta invención tiene excelente actividad inhibidora de TSP1 y es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 (por ejemplo, diversas enfermedades, incluidas enfermedades que pueden ser causadas por inhibición de la angiogénesis, enfermedades que pueden ser causada por un aumento de la trombogénesis, enfermedades inflamatorias, enfermedades que pueden ser causadas por el deterioro de la función celular renal, enfermedades que pueden ser causadas por la supresión de la vasorelajación, enfermedades isquémicas y enfermedades cancerosas y diversos síntomas, incluida la crisis vasooclusiva asociada con; anemia de células falciformes, inhibición de la angiogénesis, necrosis tisular, resistencia a la insulina y heridas comunes). Ejemplos de enfermedades que pueden ser causadas por la inhibición de la angiogénesis incluyen isquemia crítica de extremidades y trastorno vascular periférico. Ejemplos de enfermedades que pueden ser causadas por trombogénesis aumentada incluyen infarto al miocardio y trastorno vascular periférico (PAD). Ejemplos de enfermedades inflamatorias pueden incluir inflamación inducida por la obesidad e inflamación durante el desarrollo del aneurisma aórtico. Ejemplos de enfermedades que pueden ser causadas por el deterioro de la función celular renal incluyen nefropatía diabética, nefropatía por IgA, insuficiencia renal crónica e insuficiencia renal aguda. Ejemplos de enfermedades que pueden ser causadas por la supresión de la vasorelajación incluyen lesión renal y lesión por reperusión de isquemia. Ejemplos de enfermedades isquémicas incluyen el infarto de miocardio y la angina de pecho. Ejemplos de enfermedades cancerosas incluyen cáncer escamoso, cáncer de mama y cáncer de páncreas. Se informa que TSP1 promueve el avance del cáncer escamoso, el cáncer de mama y el cáncer de páncreas (consulte, por ejemplo, NPL 21, col. izquierda p.39, línea 14 de la línea 3 col. inferior a derecha y Cuadro 4).

La composición farmacéutica II de la presente invención tiene una excelente actividad inhibidora de TSP1 y puede tener un efecto de mejora del flujo sanguíneo y, por lo tanto, es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mejorando el flujo sanguíneo. Ejemplos de tales enfermedades incluyen isquemia crónica que amenaza las extremidades, isquemia crítica de las extremidades, trastorno vascular periférico, infarto de miocardio,

angina, lesión renal y lesión por reperfusión de isquemia. Ejemplos de isquemia crónica que amenaza una extremidad incluyen el pie diabético, y ejemplos de pie diabético incluyen la úlcera del pie diabético.

En un modo preferido, la composición farmacéutica I de esta invención es útil para el tratamiento o profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza las extremidades, y es, por ejemplo, útil para acelerar la cicatrización de heridas en pacientes con isquemia crítica de extremidades y para mejorar el pronóstico después del tratamiento endovascular para la isquemia crítica de extremidades.

Se sabe que la expresión de TSP1 aumenta en los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores de pacientes con isquemia crítica de las extremidades. Aunque no se desea quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la composición farmacéutica I de la presente invención bloquea la adhesión de células endoteliales vasculares a TSP1 y, por lo tanto, puede promover la angiogénesis o vasodilatación inhibida por TSP1. En virtud de esta función, la composición farmacéutica I de esta invención puede acelerar la curación de heridas en pacientes con isquemia crítica de extremidades y mejorar el pronóstico (por ejemplo, prevenir la restenosis) cuando se combina con un tratamiento endovascular con un catéter o similar.

Como se hace referencia en el presente documento, el tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas incluye la prevención de la aparición de enfermedades o la supresión o inhibición de la exacerbación o el progreso de dichas enfermedades, el alivio de uno o más síntomas encontrados en individuos que padecen enfermedades o la supresión de la exacerbación o progresión de dichos síntomas, y del tratamiento o profilaxis de enfermedades secundarias.

La composición farmacéutica I de la presente invención se puede formular en una preparación farmacéutica mezclando el péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención con cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable apropiado. Por ejemplo, la composición farmacéutica I de esta invención se puede administrar como preparaciones orales tales como tabletas, cápsulas y gránulos, o como preparaciones parenterales tales como inyectables y agentes de absorción percutánea.

Tales preparaciones farmacéuticas se preparan mediante un método bien conocido usando diferentes aditivos, incluyendo excipiente, aglutinante, desintegrante, lubricante, emulsionante, estabilizador, diluyente, disolvente inyectable, solubilizante, agente de suspensión, agente isotonizante, regulador, analgésico, antiséptico, y antioxidante.

Los ejemplos del excipiente incluyen excipientes orgánicos o excipientes inorgánicos. Ejemplos de excipientes orgánicos incluyen derivados de azúcar tales como lactosa y sacarosa; derivados del almidón tales como almidón de maíz y almidón de papa; derivados de celulosa tales como celulosa cristalina; y goma arábica. Ejemplos de excipientes inorgánicos incluyen sulfatos tales como sulfato de calcio.

Los ejemplos del aglutinante incluyen excipientes como los mencionados anteriormente; gelatina; polivinilpirrolidona; y polietilenglicol.

Los ejemplos del desintegrante incluyen excipientes como los mencionados anteriormente; derivados de celulosa o almidón modificados químicamente tales como croscarmelosa sódica y
5 carboximetilalmidón sódico; y polivinilpirrolidona reticulada.

Los ejemplos del lubricante incluyen talco; ácido esteárico; sílice coloidal; ceras tales como cera de abejas y cera de espermaceti; sulfatos tales como sulfato de sodio; laurilsulfatos tales como laurilsulfato de sodio; y tales derivados de almidón como se mencionan anteriormente como excipientes.

10 Los ejemplos del emulsionante incluyen arcillas coloidales tales como bentonita y veegum; detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio; detergentes catiónicos tales como cloruro de benzalconio; y detergentes no iónicos tales como polioxietileno alquil éter.

Los ejemplos del estabilizador incluyen ésteres p-hidroxibenzoicos tales como metilparabeno y propilparabeno; alcoholes tales como clorobutanol; y compuestos fenólicos tales como fenol y cresol.

15 Los ejemplos del diluyente incluyen agua, etanol y propilenglicol.

Los ejemplos del disolvente inyectable incluyen agua, etanol y glicerina.

Los ejemplos del solubilizante incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D manitol, benzoato de bencilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio y citrato de sodio.

Los ejemplos del agente de suspensión incluyen diversos detergentes tales como
20 esteariltrietanolamina, laurilsulfato de sodio, ácido laurilaminopropiónico, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y monoestearato de glicerilo; y polímeros hidrófilos tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa.

Los ejemplos del agente isotonzante incluyen cloruro de sodio, glicerina y D manitol.

25 Los ejemplos del regulador incluyen fosfato, acetato, carbonato, citrato y otras soluciones reguladoras.

Los ejemplos del analgésico incluyen alcohol bencílico.

Los ejemplos del antiséptico incluyen ésteres p-hidroxibenzoicos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido deshidroacético y ácido sórbico.

30 Los ejemplos del antioxidante incluyen sulfitos y ácido ascórbico.

El sujeto al que se le administrará la composición farmacéutica I de la presente invención es, por ejemplo, un animal mamífero, preferiblemente un ser humano.

La vía de administración de la composición farmacéutica I de la presente invención puede ser administración oral o parenteral, y se puede seleccionar una vía de administración adecuada
35 dependiendo de la enfermedad a tratar. Además, la vía de administración de dicha composición

farmacéutica inventiva puede ser administración sistémica o tópica. Ejemplos de administraciones parenterales incluyen administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intracutánea, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración percutánea, administración intraósea y administración intraarticular. Un modo
5 preferido de la vía de administración de dicha composición farmacéutica I de la invención es la administración intravenosa, la administración subcutánea o la administración percutánea.

El péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención se puede administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva" significa una
10 cantidad necesaria para que un agente activo muestre un efecto terapéutico o profiláctico teniendo en cuenta una enfermedad, forma de dosificación y vía de administración concretas, y se determina, según corresponda, dependiendo de la especie de un sujeto, tipo de enfermedad, síntoma, sexo, edad, condición preexistente y otros elementos.

La dosis del péptido cíclico I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente
15 invención se determina, según corresponda, dependiendo de la especie de un sujeto, tipo de enfermedad, síntoma, sexo, edad, condición preexistente y otros elementos. Los adultos humanos pueden tomar medicación con dicho péptido cíclico I de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una dosis generalmente de 0.1 a 1000 mg/kg, preferiblemente de 0.1 a 10 mg/kg, una vez cada 1 a 7 días, o dos o tres o más veces al día.

20 La composición farmacéutica I de la presente invención se puede combinar con al menos un agente terapéutico o terapia conocida. Por ejemplo, durante el tratamiento de isquemia crítica de extremidades, la composición farmacéutica I de esta invención se puede administrar antes, después o simultáneamente con el tratamiento endovascular con un catéter o similar.

El péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención se puede
25 administrar mediante un stent liberador de fármaco (DES). El stent liberador de fármaco se refiere a un stent que tiene un fármaco activo en su superficie para que pueda eludir gradualmente el fármaco activo después de colocarlo en un vaso sanguíneo.

Además, la presente invención se dirige a un método para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o síntoma, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente o
30 profilácticamente efectiva del péptido cíclico I o sal farmacológicamente aceptable del mismo de esta invención a un sujeto que lo necesita.

Como se hace referencia en la presente invención, el "sujeto" es, por ejemplo, un animal mamífero, preferiblemente un ser humano.

Como se hace referencia en la presente invención, el término "administración" incluye
35 administraciones orales y parenterales, y puede ser administraciones sistémicas o tópicas. Ejemplos

de administraciones parenterales incluyen administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intracutánea, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración percutánea, administración intraósea y administración intraarticular.

Un modo preferido de la "administración" como se menciona en esta invención es la administración intravenosa, la administración subcutánea o la administración percutánea.

Los ejemplos de "enfermedad(es) o síntoma(s)" a los que se hace referencia en la presente invención incluyen enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1. Según esta invención, se puede lograr, por ejemplo, el tratamiento o la profilaxis de la isquemia crítica de las extremidades, la enfermedad arterial periférica o la isquemia crónica que amenaza las extremidades.

III. Conjugado

La presente invención proporciona además un conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el que el péptido cíclico está unido a la molécula portadora.

1. Molécula portadora

En el conjugado de la presente invención, la molécula portadora funciona como un portador que mejora la farmacocinética uniéndose al péptido cíclico. La molécula portadora de la presente invención no se limita a una molécula particular siempre que funcione como portador para el péptido cíclico y el conjugado de esta invención pueda ejercer un efecto inhibidor de TSP-1 (es decir, tenga actividad inhibidora de TSP-1). La molécula portadora puede ser, por ejemplo, una variedad de polímeros naturales o sintéticos, y se pueden adoptar adecuadamente proteínas naturales o no naturales. Desde el punto de vista de la farmacocinética, la molécula portadora de esta invención tiene afinidad de unión con un receptor Fc neonatal (FcRn). La afinidad de unión con FcRn permite la utilización del mecanismo de reciclaje mediado por FcRn y la extensión de la vida media en sangre del conjugado de la presente invención. Por lo tanto, la molécula portadora de la presente invención es una molécula capaz de unirse a péptidos cíclicos y tiene afinidad de unión con FcRn. Cuando se adopta una proteína como molécula portadora que tiene tal afinidad de unión con FcRn, la molécula portadora puede ser, por ejemplo, albúmina sérica humana o un fragmento o variante de la misma, una proteína de unión a albúmina y una molécula que contiene Fc como se muestra a continuación.

La molécula portadora puede producirse mediante una técnica conocida tal como síntesis química, sistema de traducción libre de células y sistema de síntesis de proteínas utilizando células animales. La afinidad de unión de una molécula portadora a FcRn se puede medir mediante un método convencional usando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) o similar. La medición se puede realizar usando un instrumento disponible comercialmente, por ejemplo, Biacore (producido por GE Healthcare). La molécula portadora en la presente invención preferiblemente tiene una

afinidad de unión con FcRn que es comparable a la de moléculas que se sabe que se unen a FcRn, tales como la albúmina sérica humana y la IgG humana.

La albúmina sérica humana es la proteína más abundante en el plasma y está compuesta por tres dominios (dominios I, II y III) que tienen una alta homología, cada uno de los cuales está segmentado en dos subdominios (A y B). En particular, se sabe que el dominio III de la albúmina sérica humana es importante para la unión de la albúmina sérica humana con FcRn (JP 2019-513724 y Structure, 2013, 21, 1966-1978). Dado que la albúmina sérica humana tiene afinidad de unión con FcRn y tiene una larga vida media en sangre de aproximadamente 20 días, se prefiere la albúmina como molécula portadora para mejorar la farmacocinética y se han desarrollado tecnologías basadas en albúmina. Un método para unir albúmina sérica humana o un fragmento o variante de la misma a un péptido cíclico no está particularmente limitado siempre que funcione como una molécula portadora para el péptido cíclico y el conjugado de la presente invención pueda ejercer un efecto inhibidor de TSP-1 y se puede utilizar un método conocido. Ejemplos de dicho método incluyen un método de unión a través de un residuo de cisteína contenido en albúmina sérica humana (Org. Biomol. Chem., 2019. 17, 7870-7873), un método de unión mediante un residuo de glutamina contenido en albúmina sérica humana mediante transglutaminasa, y unión mediante un residuo de lisina contenido en albúmina sérica humana. Cuando se usa el fragmento o variante de albúmina sérica humana como molécula portadora de la presente invención, se puede usar cualquier fragmento o variante siempre que conserve la afinidad de unión con FcRn y el sitio de unión al péptido cíclico, pero preferiblemente contenga el dominio III de albúmina sérica humana y el sitio de unión al péptido cíclico. La molécula portadora de la presente invención es más preferiblemente albúmina sérica humana de longitud completa.

La molécula que contiene Fc de la presente invención se acopla a un péptido cíclico para formar un conjugado, que funciona como portador para mantener el péptido cíclico en la sangre durante un largo tiempo. La molécula que contiene Fc de la presente invención se refiere a una molécula que contiene al menos toda o parte de una región Fc derivada de IgG. Los ejemplos de la molécula que contiene Fc de la presente invención incluyen IgG de longitud completa, una cadena pesada de IgG de longitud completa, un fragmento de IgG que contiene toda o parte de la región Fc y una variante de la misma en la que la secuencia de aminoácidos se ha eliminado o modificado parcialmente. Además, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser una cadena pesada sola o puede tener una cadena ligera correspondiente a la estructura de la cadena pesada. La IgG es una proteína heterodimérica compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas mediante enlaces disulfuro y enlaces no covalentes. Cada una de las cadenas pesada y ligera tiene una región variable y una región constante y reconoce el antígeno en la región variable. También, la región constante de la cadena pesada contiene además un dominio CH1, un dominio CH2

y un dominio CH3, en los que los dominios CH1 y CH2 están conectados a través de un sitio bisagra. La IgG tiene una estructura de dominio y está compuesta por una región Fab (fragmento de unión a antígeno) que contiene una región variable y que tiene capacidad de unión a antígeno, y una región Fc (fragmento cristizable) que se une a un receptor Fc. La región Fc se refiere a una región desde el N-terminal al C-terminal del sitio bisagra, que es parte de la cadena pesada de IgG y es escindida por papaína, y se refiere a una región que consiste en una parte del sitio bisagra derivado de la región constante de la cadena pesada de IgG, un dominio CH2 y un dominio CH3. Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región Fc en la IgG1 humana incluyen las secuencias en las posiciones de aminoácidos 1 a 232, 2 a 232, 3 a 232, 4 a 232, 5 a 232, 6 a 232, 7 a 232, 8 a 232, 9 a 232, 10 a 232, o 11 a 232 de SEQ ID NO: 148 (correspondiente a las posiciones 216 a 447, 217 a 447, 218 a 447, 219 a 447, 220 a 447, 221 a 447, 222 a 447, 223 a 447, 224 a 447, 225 a 447, y 226 a 447, respectivamente, en el índice Eu (ÍNDICE Eu) especificado en Edelman et al., (Proc. Natl. Acad. USA, (1969) Vol. 63, pp. 78-85). La región Fc también tiene afinidad de unión con FcRn y participa en el mecanismo de reciclaje de IgG mediante la unión a FcRn. Esta unión a FcRn implica residuos de aminoácidos en los dominios CH2 y CH3. Por lo tanto, la molécula que contiene Fc de la presente invención tiene preferiblemente dominios CH2 y CH3 para conservar la afinidad de unión con FcRn. El término "cadena pesada" para la molécula que contiene FC de la presente invención puede incluir una cadena pesada de longitud completa, una cadena pesada de un fragmento IgG que contiene toda o parte de la región Fc y su variante en la que la secuencia de aminoácidos se ha modificado o eliminado parcialmente. También, el término "cadena ligera" para la molécula que contiene Fc de la presente invención puede incluir una cadena ligera de longitud completa y una variante en la que la secuencia de aminoácidos se ha modificado o eliminado parcialmente.

Un método para unir la molécula que contiene Fc a un péptido cíclico no está limitado particularmente mientras que sus funciones como un portador para el péptido cíclico y el conjugado de la presente invención pueda ejercer un efecto inhibidor de TS-1 y se puede usar un método conocido. Ejemplos de dicho método incluyen un método de unión a través de un glicano contenido en una molécula que contiene Fc, un método de unión a través de un residuo de cisteína contenido en una molécula que contiene Fc, un método de mutación de un residuo de aminoácido en una posición específica para un residuo de cisteína y unión a través del residuo de cisteína, un método de unión a través de un residuo de glutamina contenido en una molécula que contiene Fc mediante transglutaminasa, y un método para mutar un residuo de aminoácido en una posición específica a un residuo de glutamina y unión a través de la glutamina residuo por transglutaminasa. En un modo preferido, la molécula que contiene Fc de la presente invención está unida a un péptido cíclico a través de un glicano unido a la cadena lateral de un residuo de asparagina (denominado "Asn297" (Asn en la posición 297 en el índice Eu)) que sufre modificación por un glicano unido a N bien conservado en

la región Fc de la cadena pesada de IgG (denominado "glicano unido a N297") o mediante grupos tiol bien conservados de Cys226 (Cys en la posición 226 en el índice Eu) y/o Cys229 (Cys en la posición 229 en el índice Eu) en el sitio bisagra de la región Fc de la cadena pesada de IgG. Por lo tanto, la molécula que contiene Fc de la presente invención tiene preferiblemente al menos un residuo de aminoácido en la región Fc de la IgG humana correspondiente a Asn297 o un residuo de aminoácido en el sitio bisagra de la IgG humana correspondiente a Cys226 o Cys229.

Cuando la molécula que contiene Fc de la presente invención se usa como molécula portadora de la presente invención, la secuencia no está particularmente limitada siempre que conserve la afinidad de unión con FcRn y el sitio de unión al péptido cíclico. La molécula que contiene Fc preferiblemente contiene secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios CH2 y CH3 y los residuos de aminoácidos en la región Fc de la IgG humana correspondiente a Asn297 o residuos de aminoácidos en el sitio bisagra de la IgG humana correspondiente a Cys226 o Cys229. Los ejemplos de tal molécula que contiene Fc incluyen IgG humana de longitud completa, una cadena pesada de IgG humana de longitud completa, un fragmento de IgG humana que contiene toda o parte de la región Fc y una variante de la misma en la que la secuencia de aminoácidos se ha eliminado o modificado parcialmente. Además, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser una cadena pesada sola o puede tener una cadena ligera correspondiente a la estructura de la cadena pesada.

La molécula que contiene Fc de la presente invención también incluye una molécula que contiene Fc modificada que ha sido modificada biológicamente. Las modificaciones biológicas incluyen modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación unida a N o unida a O, procesamiento de N- o C-terminal, desamidación, isomerización de aspartato y oxidación de metionina) y la adición de un residuo de metionina en el extremo N mediante expresión usando una célula huésped procariota.

En el caso de anticuerpos producidos en células animales, se sabe que un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada está eliminado (Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995)) y que dos residuos de aminoácidos, glicina y lisina, en el extremo carboxilo de la cadena pesada también se eliminan y un residuo de prolina recién posicionado en el extremo carboxilo se amida (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, la eliminación y modificación de estas secuencias de cadenas pesadas no afecta la capacidad de unión al antígeno ni la función efectora (activación del complemento, efecto de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, la molécula que contiene Fc de la presente invención también incluye una molécula que contiene Fc con tal modificación y un fragmento funcional de la molécula que contiene Fc, un mutante de delección en el que uno o dos residuos de aminoácidos están eliminados en el extremo carboxilo de una cadena pesada y un mutante de delección en el que un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo está amidado (por ejemplo, una cadena pesada en la que un residuo de prolina

en el extremo carboxilo está amidado). Siempre que funcione como portador para el péptido cíclico y el conjugado de la presente invención puede ejercer un efecto inhibidor de TSP-1, sin embargo, el mutante de delección en el extremo carboxilo de la cadena pesada de la molécula que contiene Fc según la presente invención no se limita a los tipos anteriores. Cuando la molécula que contiene Fc según la presente invención incluye dos cadenas pesadas, pueden ser cualquiera de las cadenas pesadas seleccionadas del grupo que consiste en cadenas pesadas sin una delección en el extremo carboxilo y el mutante eliminado anteriormente mencionado, o una combinación de cualquiera de los dos. La proporción cuantitativa de cada mutante de delección puede verse afectada por el tipo y las condiciones de cultivo de las células animales que producen la molécula que contiene Fc de la presente invención, pero la molécula que contiene Fc de esta invención es preferiblemente aquella en la que un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo está eliminado en cada una de las dos cadenas pesadas.

En un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede incluir una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación unida a N, glicosilación unida a O, procesamiento de N-terminal, procesamiento de C-terminal, desamidación, isomerización del ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina al extremo N, amidación de un residuo de prolina y eliminación de uno o dos residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo de una cadena pesada.

La subclase de IgG que sirve como origen de la molécula que contiene Fc de la presente invención no está particularmente limitada y se puede seleccionar cualquier subclase. La subclase es preferentemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, más preferentemente IgG1, incluso más preferentemente IgG1 humana. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de IgG están bien conservadas y cada aminoácido se identifica mediante el índice EU proporcionado por Edelman et al. (Proc. Natl. Acad. USA, (1969) Vol. 63, pp. 78-85). Por ejemplo, Asn297 al que está unido un glicano unido a N en la región Fc corresponde a la posición 297 en el índice Eu, y Cys226 y Cys229 a los que está unido una estructura de enlace en el sitio bisagra corresponden a las posiciones 226 y 229 en el índice Eu, respectivamente. Además, la región Fc, el sitio bisagra y la región constante de cadena pesada derivadas de IgG humana que pueden adoptarse en la molécula que contiene Fc de la presente invención corresponden a regiones de las secuencias de aminoácidos en las posiciones 216 a 447, 216 a 230 y de 118 a 447 en el índice de la Eu, respectivamente. Ejemplos de secuencias de aminoácidos específicas correspondientes a la región Fc, región bisagra, región constante de cadena ligera y región constante de cadena pesada derivadas de IgG1 humana que pueden adoptarse en la molécula que contiene Fc de la presente invención incluyen la secuencia de aminoácidos en posiciones de aminoácidos 118 a 349 de SEQ ID NO: 129 (secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana; la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 128) (siempre que el extremo N pueda acortarse a la posición de aminoácido

128), la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 118 a 132 de SEQ ID NO: 129, la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 25 de SEQ ID NO: 131 (secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de IgG1 humana; la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 130) (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 20), y la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 129 (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 19), respectivamente. El aminoácido se identifica inequívocamente mediante visualización según el índice UE, incluso si la posición real del aminoácido varía debido a fragmentación molecular o deficiencia regional. Con respecto a las regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana que pueden adoptarse en la molécula que contiene Fc de la presente invención, se ha informado de una pluralidad de secuencias alotípicas en Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación NIH. No. 91-3242, todos los cuales pueden adoptarse en la molécula que contiene Fc de la presente invención. Por ejemplo, en la secuencia de IgG1 humana, las secuencias de aminoácidos en las posiciones 356 y 358 indicadas por el índice Eu incluyen D y E, y L y M, respectivamente, las cuales pueden adoptarse en la molécula que contiene Fc de la presente invención.

En el caso de adoptar IgG de longitud completa como la molécula que contiene Fc de esta invención, es suficiente si la IgG de longitud completa funciona como portador para el péptido cíclico y el conjugado de la presente invención puede ejercer un efecto inhibidor de TSP-1. En un modo, se pueden adoptar IgG que no reconocen sustancias normalmente presentes en el cuerpo humano como antígenos en la región variable. Dado que la IgG dirigida a una proteína animal no humana como antígeno podría presentar reactividad cruzada con moléculas humanas en presencia de una molécula humana correspondiente o relacionada, se prefiere seleccionar un anticuerpo monoclonal contra un antígeno libre de moléculas humanas correspondientes o relacionadas. Incluso se puede adoptar IgG que podría reconocer un componente del cuerpo humano como antígeno si el reconocimiento del antígeno no afecta negativamente al efecto inhibidor de TSP-1 ejercido por el conjugado de la presente invención. Por otro lado, incluso si el reconocimiento del antígeno afecta negativamente al efecto inhibidor de TSP-1 ejercido por el conjugado de la presente invención, esas moléculas pueden adoptarse como moléculas que contienen Fc de esta invención cuando la capacidad de reconocimiento del antígeno está atenuada o eliminada introduciendo una mutación en la región variable mediante una técnica de ingeniería genética. La IgG de longitud completa para usarse como molécula que contiene Fc de la presente invención es preferentemente dirigida por IgG a una molécula derivada de un organismo no mamífero como antígeno, más preferentemente dirigida por IgG a una molécula derivada de un microbio como antígeno. Ejemplos de IgG dirigida a la molécula derivada de microbio como antígeno incluyen lipopolisacárido (LPS) como antígeno. Un anticuerpo monoclonal de este tipo se describe, por ejemplo, en el documento WO 2015/046505. Los ejemplos específicos de los mismos

incluyen mAb-A que consiste en una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 474 de SEQ ID NO: 125 (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 19; la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 124) y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 127 (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 20; la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 126).

En el caso de adoptar un fragmento de anticuerpo que incluye toda o una parte de la región Fc como la molécula que contiene Fc de esta invención, es suficiente si el fragmento de anticuerpo funciona como un portador para el péptido cíclico y el conjugado de la presente invención puede ejercer un efecto inhibidor de TSP-1. Por ejemplo, se puede adoptar un CH que consiste en una región constante obtenida eliminando una región variable de la cadena pesada de IgG, una molécula que consiste en la región Fc de IgG o una molécula que consiste en una parte de la región Fc de IgG.

Los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos de CH que consiste en la región constante obtenida eliminando la región variable de una cadena pesada de IgG1 humana incluyen la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 129 (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 19; la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 128). Cuando se selecciona CH como molécula que contiene Fc de esta invención, se puede adoptar CH solo o como CLCH en combinación con CL que consiste en la región constante de la cadena ligera. Los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos del CL de la cadena ligera de IgG1 incluyen posiciones de aminoácidos 21 a 125 de SEQ ID NO: 131 (aminoácidos en posiciones de aminoácidos 1 a 20 constituyen un péptido señal; secuencia de nucleótidos que codifica el CL se muestra en SEQ ID NO: 130), y los ejemplos de CLCH incluyen CLCH formado en combinación del CH representado por SEQ ID NO: 129 y el CL representado por SEQ ID NO: 131.

Los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos de una molécula que consiste en una parte de la región Fc de la IgG1 humana incluyen la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 243 de SEQ ID NO: 135 (péptidos señal en las posiciones de aminoácidos 1 a 20; la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que corresponde a la región Fc se muestra en SEQ ID NO: 134).

En el caso de adoptar IgG de longitud completa, una cadena pesada de IgG de longitud completa, o un fragmento de IgG que contiene toda o parte de la región Fc, y una variante de la misma, en el que la secuencia de aminoácidos se ha eliminado parcialmente o modificado, como molécula que contiene Fc de esta invención, se puede usar cualquier molécula siempre que conserve la afinidad de unión con FcRn y el sitio de unión a un péptido cíclico. Cuando la molécula que contiene

Fc de esta invención deriva de una molécula de anticuerpo que tiene toda o parte de la región variable mientras conserva una capacidad de reconocimiento de antígeno para un componente en el cuerpo humano, y cuando el reconocimiento del antígeno afecta negativamente el efecto inhibitor de TSP-1 ejercido por el conjugado de la presente invención, la capacidad de reconocimiento de antígeno se atenúa o elimina preferiblemente introduciendo una mutación en la región variable mediante una técnica de ingeniería genética. En otras palabras, la molécula que contiene Fc de la presente invención en un modo puede ser una variante en la que la región variable de IgG se ha eliminado o modificado de manera que la capacidad de reconocimiento de antígeno se atenúa o se elimina. Los ejemplos de dicha variante incluyen CH que consiste únicamente en la región constante obtenida al eliminar la región variable de la cadena pesada de IgG1 humana, CLCH obtenido combinando CL y CH que consiste solo en la región constante de la cadena ligera, y un fragmento de IgG que contiene todos o parte de la región Fc. Los ejemplos de la variante que tiene una secuencia de aminoácidos parcialmente modificada adoptada como la molécula que contiene Fc de la presente invención incluyen moléculas que tienen una secuencia de aminoácidos con alta homología (*por ejemplo*, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, o 99% o más) a la secuencia de aminoácidos antes de la modificación, o una secuencia de aminoácidos en la que uno a varios (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) residuos de aminoácidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos mientras se conserva la afinidad de unión con FcRn y el sitio de unión a un péptido cíclico.

En el caso de adoptar el fragmento de IgG que contiene toda o parte de la región Fc o su variante en la que la secuencia de aminoácidos se ha eliminado parcialmente o modificado como molécula que contiene Fc de esta invención, se puede usar cualquier molécula siempre que conserve la afinidad de unión con FcRn y el sitio de unión a un péptido cíclico. Para conservar la afinidad de unión con FcRn, el fragmento de IgG o su variante tiene preferiblemente dominios CH2 y CH3, y además contiene todo o parte del sitio bisagra desde el punto de vista de aumentar la libertad estructural de la molécula que contiene Fc. Así, un fragmento que consiste en el dominio CH2, el dominio CH3 y parte del sitio bisagra de IgG puede adoptarse como tal molécula que contiene Fc, por ejemplo. Cuando el sitio bisagra no se adopta como sitio de unión entre la molécula que contiene Fc y el péptido cíclico, la longitud de la secuencia correspondiente al sitio bisagra se puede ajustar apropiadamente e incluirse en la molécula que contiene Fc, pero CPPC (secuencia de aminoácido correspondiente a las posiciones 226 a 229 en el índice Eu; por ejemplo, las posiciones de aminoácidos 128 a 131 de SEQ ID NO: 129) se incluye preferiblemente. Los ejemplos del sitio bisagra contenido en la molécula que contiene Fc de esta invención incluyen las secuencias de aminoácidos de los sitios bisagra correspondientes a las posiciones 221 a 230, 222 a 230, 223 a 230, 224 a 230, 225 a 230 y 226 a 230 en el índice de Eu. En la IgG1 humana, estas secuencias son cada una de ellas DKTHTCPPCP, KTHTCPPCP, THTCPPCP, HTCCPPCP, TCPPCP, y CPPCP (secuencias en las posiciones de

aminoácidos 123 a 132, 122 a 132, 123 a 132, 124 a 132, 125 a 132, 126 a 132, 127 a 132, y 128 a 132 de SEQ ID NO: 129, respectivamente.) Ejemplos de fragmentos de anticuerpo que contienen dicho sitio bisagra que se derivan de IgG1 humana incluyen una molécula que contiene Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 10 aminoácidos consecutivos del extremo N pueden eliminarse en la secuencia de aminoácidos de Glu en la posición 118 a Lys en la posición 349 de SEQ ID NO: 129 o una variante en la que se ha modificado la secuencia de aminoácidos, y preferiblemente una molécula que contiene Fc que consiste en Asp en la posición 123 a Lys en la posición 349, Lys en la posición 124 a Lys en la posición 349, Thr en la posición 125 a Lys en la posición 349, His en la posición 126 a Lys en la posición 349, Thr en la posición 127 a Lys en la posición 349, o Cys en la posición 128 a Lys en la posición 349 de SEQ ID NO: 129. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo derivado de IgG1 humana incluyen una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 22 a 243 de SEQ ID NO: 135; una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 247 de SEQ ID NO: 137 (los residuos de Leu (Leu234) correspondientes a la posición 234 y (Leu235) correspondientes a la posición 235 en el índice Eu se sustituyen por Ala); una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 26 a 247 de SEQ ID NO: 139 (los residuos Leu (Leu234) correspondientes a la posición 234 y (Leu235) correspondientes a la posición 235 en el índice Eu se sustituyen con Ala, y un residuo Pro (Pro329) correspondiente a la posición 329 se sustituye con Ala); o moléculas que contienen Fc que comprenden secuencias de aminoácidos con T, HT, THT, KTHT o DKTHT añadidos al extremo N de las mismas, o variantes en las que se han modificado las secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser un polipéptido (también denominado en el presente documento "Fc-B") que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 243 de SEQ ID NO: 135; un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 25 a 247 de SEQ ID NO: 137; un polipéptido (también mencionado como "Fc-A") que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 137; un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 25 a 247 de SEQ ID NO: 139; un polipéptido (también mencionado como "Fc-C") que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 139 o una variante del mismo. Asn297 en estos fragmentos Fc es Asn en la posición 93 en SEQ ID NO: 135, Asn en la posición 97 en SEQ ID NO: 137 y Asn en la posición 97 en SEQ ID NO: 139. Cys226 en estos fragmentos Fc es Cys en la posición 22 en SEQ ID NO: 135, Cys en la posición 26 en SEQ ID NO: 137 y Cys en la posición 26 en SEQ ID NO: 139. Cys229 en estos fragmentos Fc es Cys en la posición 25 en SEQ ID NO: 135, Cys en la posición 29 en SEQ ID NO: 137 y Cys en la posición 29 en SEQ ID NO: 139.

En el caso de diseñar un fragmento o variante de anticuerpo como la molécula que contiene Fc de la presente invención, una variante que tiene la sustitución, delección, inserción y/o adición de 1

a varios (preferiblemente 20 o menos, más preferiblemente 15 o menos, incluso más preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, por sitio de ingeniería) aminoácidos en 1 a varios sitios (preferiblemente 5 o menos sitios, más preferiblemente 3, 2, o 1 sitio(s)) sin perjudicar las funciones como proteína portadora, siempre que se mantengan Cys226, Cys229 o Asn297 que contribuye a la unión a péptidos cíclicos y sus aminoácidos vecinos. En cuanto al sitio de ingeniería en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, la sustitución, delección, inserción y/o adición de aminoácidos se puede realizar en el extremo N y en el extremo C. En particular, los aminoácidos N-terminal pueden influir en la producción de la molécula que contiene Fc mediante un enfoque de bioingeniería y pueden modificarse en una secuencia de aminoácidos adecuada para el sistema de producción deseado. Ejemplos de tales variantes de secuencia de aminoácidos incluyen variantes en las que uno o dos residuos de aminoácidos han sido eliminados en el extremo carboxilo de una cadena pesada de IgG humana (*por ejemplo*, una cadena pesada en la que el residuo de lisina correspondiente a la posición 447 según el índice Eu en el extremo carboxilo ha sido eliminado, o una cadena pesada en la que se han eliminado el residuo de lisina y el residuo de glicina correspondiente a la posición 446 según el índice Eu). Los aminoácidos Leu234 y Leu235 o Pro329 en el índice EU se conocen como sitios que influyen en la exhibición de actividad efectora mediante la activación de células T a través de la unión del anticuerpo a un receptor Fc. En algunos casos, esta actividad efectora se puede eliminar para reducir el riesgo de reacción adversa sustituyendo Leu234 y Leu235 por Ala (el mutante resultante se denomina "forma LALA") o sustituyendo además Pro329 por Ala (el mutante resultante se denomina "forma LALA-PA") (US 5885573A para la forma LALA). Esta ingeniería podrá llevarse a cabo, si fuera necesario. CLCH-B (fragmento de anticuerpo que consta de una región constante de cadena pesada que consta de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133, y una región constante de cadena ligera correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131) es la forma LALA de CLCH-A (fragmento de anticuerpo que consta de una región constante de cadena pesada que consta de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129, y una región constante de cadena ligera correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131), y Fc-A es la forma LALA de Fc-B. Se ha confirmado que la forma LALA funciona correctamente como molécula portadora en un conjugado con péptidos (WO 2018/003983). Por lo tanto, en un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede incluir sustituciones de un residuo de leucina correspondiente a la posición 234 y un residuo de leucina correspondiente a la posición 235 según el índice Eu en una cadena pesada de IgG humana con residuos de alanina, o sustituciones de un residuo de leucina correspondiente a la posición 234, un residuo de leucina correspondiente a la posición 235 y un residuo de prolina correspondiente a la posición 329 según el índice Eu en una cadena pesada de IgG humana con residuos de alanina.

A la molécula que contiene Fc de esta invención también se le pueden añadir modificaciones

químicas tales como la unión de restos químicos al esqueleto de aminoácidos, cadenas de carbohidratos unidas por N u O. Alternativamente, se puede añadir a la misma una secuencia señal, una secuencia de reconocimiento de peptidasa o una secuencia Tag tal como GST con el fin de mejorar la expresión o la eficacia de purificación de la molécula de interés.

5 En un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser un anticuerpo compuesto por una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(A) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 474 de SEQ ID NO: 125;

10 (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con la secuencia de (a);

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10 (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de (a); y

(d) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de 15 aminoácidos C-terminal están eliminados en la secuencia de (a), y

una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:

(e) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 234 de SEQ ID NO: 127;

20 (f) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con la secuencia de (e);

(g) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10 (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de (e); y

(h) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de 25 aminoácidos C-terminal están eliminados en la secuencia de (e).

En un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser un anticuerpo compuesto por una combinación de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

30 (A) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 129;

(b) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO: 133;

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con la secuencia de (a) o (b);

35 (d) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10

(*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de (a) o (b); y

(e) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de aminoácidos C-terminal están eliminados en la secuencia de (a) o (b), y

una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
5 consiste en SEQ ID NO:

(f) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO:
131;

(g) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con la secuencia de (f);

10 (h) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10 (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de (f); y

(i) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de aminoácidos C-terminal están eliminados en la secuencia de (f).

En un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser CH que consiste
15 en una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO:
129;

(b) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 349 de SEQ ID NO:
133;

20 (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con la secuencia de (a) o (b);

(d) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10 (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de (a) o (b); y

(e) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de
25 aminoácidos C-terminal están eliminados en la secuencia de (a) o (b).

En un modo, la molécula que contiene Fc de la presente invención puede ser un fragmento de Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 243 de SEQ ID NO:
135;

30 (b) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO:
137;

(c) una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO:
139;

(d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% o más (*por ejemplo*, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más) de homología con las secuencias de (a) a (c);
35

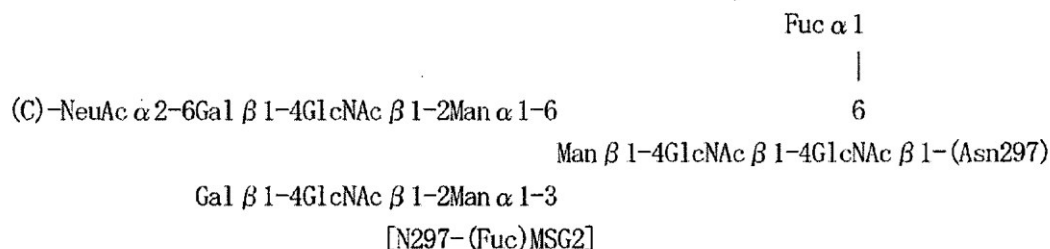
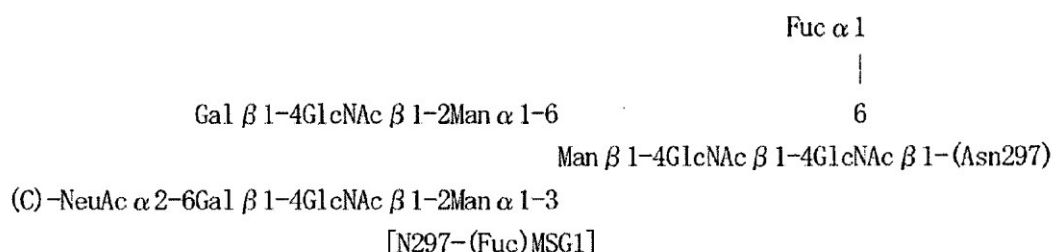
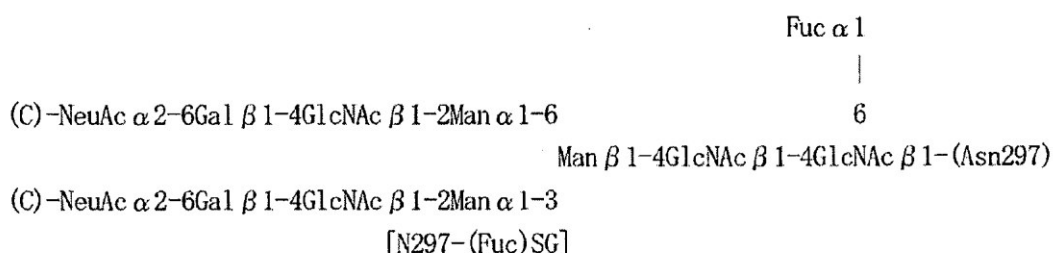
(e) una secuencia de aminoácidos que tiene una eliminación, sustitución o adición de 1 a 10 (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en las secuencias de (a) a (c); y

(f) una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 3 (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) residuos de aminoácidos C-terminal están eliminados en las secuencias de (a) a (c).

- 5 (1) Molécula que contiene Fc que se une al péptido cíclico mediante glicano unido a N297

En un modo, el conjugado de la presente invención puede ser un compuesto unido a un péptido cíclico mediante un glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc. Cuando la molécula que contiene Fc utilizada en la presente invención se produce utilizando células animales, se pueden unir glicanos heterogéneos a Asn297 de la molécula que contiene Fc mediante modificación postraduccional en el curso de la producción. En un modo preferido, la molécula que contiene Fc puede tener un glicano unido a N297 que se remodela en un glicano de tipo SG que tiene cualquiera de las estructuras que se indican a continuación (glicano unido a N297 de tipo SG).

[Fórmula química 103]



- 15 (en donde (C) representa la unión del grupo de enlace C a un grupo carbonilo unido a la posición 2 de un ácido siálico, y (Asn297) representa la unión a la cadena lateral de Asn297 de la molécula que contiene Fc a través de un enlace N-glucosídico.)

En un modo preferido, el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc puede ser al menos uno seleccionado entre N297-(Fuc)SG, N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2. Más

preferiblemente, el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc incluye N297-(Fuc)SG. Incluso más preferiblemente, el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc puede ser N297-(Fuc)SG.

Normalmente, los glicanos están unidos a Asn297 en ambos monómeros que constituyen un dímero durante la producción a partir de células animales para producir una forma normal que tiene dos glicanos unidos a N297 por molécula dimérica que contiene Fc. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de producción o de la estructura de la molécula que contiene Fc, se puede utilizar un mutante de delección de glicano en el que un glicano unido a N297 está unido a sólo uno de los monómeros (molécula que tiene un glicano unido a N297 por molécula dimérica que contiene Fc) puede producirse a un ritmo determinado. Incluso una molécula que contiene Fc y que contiene un mutante de delección de glicano puede usarse en la presente invención.

Cuando el glicano unido a N297 en el conjugado de la presente invención es N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2, el conjugado es una molécula que tiene dos estructuras enlazadoras y dos péptidos cíclicos unidos a la misma (conjugado divalente) porque la molécula que contiene Fc es un dímero que generalmente tiene el glicano unido a N297 en ambos monómeros (cuando la molécula que contiene Fc es un mutante de delección de glicano, N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2 está unido solo a uno de los monómeros para formar un conjugado monovalente). Por otro lado, cuando el glicano unido a N297 es N297-(Fuc)SG, el conjugado es una molécula que tiene cuatro estructuras enlazadoras y cuatro péptidos cíclicos unidos a la misma (conjugado tetravalente) porque la molécula que contiene Fc es un dímero (cuando la molécula que contiene Fc es un mutante por delección de glucano, N297-(Fuc)SG está unido solo a uno de los monómeros para formar un conjugado divalente). El conjugado de la presente invención puede ser una mezcla de formas normales y mutantes de delección de glicano (en la presente invención, dicha mezcla se indica como un conjugado en forma normal por conveniencia).

El conjugado de esta invención puede ser una mezcla de moléculas que tienen varios tipos de glicanos unidos a N297 o una molécula que tiene glicanos unidos a N297 que tiene una estructura cualquiera. En un modo preferido, el conjugado de esta invención es una molécula que tiene un glicano unido a N297 de tipo SG que tiene una estructura cualquiera, más preferiblemente un conjugado tetravalente que tiene N297-(Fuc)SG como glicano unido a N297 con cuatro péptidos cíclicos unidos al mismo (o un conjugado divalente para un mutante por delección de glucano).

Además, cuando una molécula del conjugado de la presente invención contiene una pluralidad de péptidos cíclicos, pueden ser un único (un tipo de) péptido cíclico o una combinación de una pluralidad de péptidos cíclicos. El conjugado de esta invención contiene preferentemente un único péptido cíclico, más preferentemente un único péptido bicíclico.

Además, los ácidos siálicos del glicano unido a N297 de tipo SG pueden permanecer sin

reaccionar en la reacción de síntesis del conjugado. En el conjugado de esta invención, siempre que al menos un péptido cíclico esté unido a una molécula que contiene Fc, el glicano puede contener ácido siálico sin reaccionar. Por ejemplo, el ácido siálico de N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2 en una molécula que contiene Fc que constituye el dímero puede permanecer sin reaccionar, dando como resultado un conjugado con un péptido cíclico unido al mismo (conjugado monovalente). El conjugado de esta invención puede ser un conjugado monovalente o una mezcla de un conjugado monovalente y un conjugado divalente. Por ejemplo, uno o ambos ácidos siálicos de N297-(Fuc)SG (forma disialo) en una de las moléculas que contienen Fc que constituye el dímero puede permanecer sin reaccionar, dando como resultado un conjugado con uno a tres péptidos cíclicos unidos al mismo (conjugado monovalente a trivalente). El conjugado de esta invención puede ser cualquiera de conjugados monovalentes a tetravalentes o una mezcla de los mismos.

En la estructura de glicano unido a N297 de tipo SG, GlcNAc(Fuc α 1,6)GlcNAc fucosilada en el extremo reductor se deriva de la molécula que contiene Fc producida en una célula animal y, por lo tanto, remodela un glicano en el lado terminal no reductor en una estructura de glicano similar a la de SG.

Dicha molécula que contiene Fc que tiene el glicano unido a N297 de tipo SG se puede producir según un método descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2013/120066 y WO 2018/003983. Cuando la molécula que contiene Fc se produce como una proteína recombinante genética usando células animales según un método conocido, el glicano unido a N297 tiene una estructura de glicano unido a N fucosilado como estructura básica. En este caso, la molécula que contiene Fc se obtiene como una mezcla de anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen glicanos de diversas estructuras con diversas modificaciones en la estructura en el extremo no reductor o azúcares constituyentes. Una molécula que contiene Fc de este tipo producida en una célula animal se trata con hidrolasa como EndoS para que el enlace glicosídico entre GlcNAc β 1 y 4GlcNAc de una estructura de quitobiosa en el extremo reductor se pueden hidrolizar para obtener una molécula que contiene Fc que tiene una estructura de glicano única con solo (Fuc α 1,6)GlcNAc como el glicano unido a N297 (denominado "molécula que contiene (Fuc α 1,6)GlcNAc-Fc").

Por ejemplo, EndoS o una enzima mutante de la misma que mantiene la actividad hidrolítica se puede usar como tal enzima para usar en la reacción de hidrólisis del glicano unido a N297. La molécula que contiene (Fuc α 1,6)GlcNAc-Fc obtenida mediante la reacción de hidrólisis se puede hacer reaccionar como una molécula aceptora de glicano con una molécula donadora de glicano de tipo SG usando una glicosiltransferasa tal como un mutante EndoS D233Q para obtener una molécula que contiene Fc que tiene un glicano unido a N297 de tipo SG que tiene la estructura descrita anteriormente.

Cuando el compuesto de interés es un conjugado que tiene un péptido cíclico tetravalente, se usa una molécula donadora de glicano que tiene SG(10) (glicano que carece de una GlcNAc en el

extremo reductor del resto glicano de SG) como glicano en una reacción de transglicosilación del mismo. Dicho glicano SG(10) usado puede obtenerse mediante hidrólisis o similar a partir, por ejemplo, de sialil glicopéptido (en lo sucesivo, denominado "SGP") contenido en la yema de huevo de gallina o puede ser un glicano SG(10) solo tal como un disialoocsacárido disponible comercialmente (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.).

5 Cuando el compuesto de interés es un conjugado que tiene un péptido cíclico divalente, una molécula donadora de glicano que tiene MSG1(9) (estructura de glicano que carece de ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-6 del glicano de SG(10) β -Man y que tiene ácido siálico solo en la cadena ramificada 1-3 del glicano) o MSG2(9) (estructura de glicano que carece de
10 ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-3 del glicano de SG(10) β -Man y que tiene ácido siálico solo en la cadena ramificada 1-6 del glicano) se puede utilizar como glicano. Dicho glicano puede adoptarse mediante separación según un método descrito en el documento WO 2018/003983 usando monosialo-Asn libre disponible comercialmente (1S2G/1G2S-10NC-Asn, GlyTech, Inc.) como material de partida o puede adoptarse como una mezcla sin separación.

15 La GlcNAc en el extremo reductor del glicano de tipo SG contenido en la molécula donante se usa preferiblemente después de ser activada, por ejemplo, en forma de oxazolina mediante tratamiento con 2-cloro-1,3-dimetil-1H-benzimidazol-3-io-cloruro, pero no tiene que activarse en el caso de utilizar dos tipos de enzimas, como se muestra a continuación, al mismo tiempo.

La molécula donadora de glicano puede tener un grupo funcional (*p. ej.*, grupo azida) en el
20 extremo no reductor para formar un enlace entre una estructura conectora y la molécula que contiene Fc. Por ejemplo, el glicano tipo SG contenido en la molécula donadora de glicano puede tener un grupo funcional (*p. ej.*, grupo azida) en un ácido carboxílico contenido en el ácido siálico en el extremo no reductor para formar un enlace entre una estructura de enlace y la molécula que contiene Fc.

Se pueden adoptar varias enzimas como tales un enzima para usarse en la reacción de
25 transglicosilación siempre que la enzima tenga actividad para transferir un glicano complejo al glicano unido a N297. Se prefiere EndoS D233Q, que es una variante de EndoS que suprime la reacción de hidrólisis mediante la sustitución de Asp en la posición 233 por Gln. La reacción de transglicosilación utilizando EndoS D233Q se describe en el documento WO 2013/120066. Alternativamente, se puede usar una enzima diseñada tal como un mutante adicional de EndoS D233Q, es decir, se puede usar
30 EndoS D233Q/Q303L, EndoS D233Q/E350A, EndoS D233Q/E350Q, EndoS D233Q/E350D, EndoS D233Q/E350N, o EndoS D233Q/D405A. Una reacción de transglicosilación utilizando tal una variante de EndoS D233Q se describe en el documento WO 2017/010559.

La operación de purificación de la molécula que contiene Fc o intermedio de la misma después de la remodelación de glicano (hidrólisis de azúcar y reacción de transglicosilación) de la molécula que
35 contiene Fc tiene como objetivo separar la molécula que contiene Fc de los compuestos de bajo peso

molecular y las enzimas utilizadas en la reacción. Dicha purificación normalmente emplea cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares. Se puede realizar además la purificación usando una columna de hidroxapatita y, desde el punto de vista de mejorar la eficiencia de la reacción de transglicosilación, se usa particularmente
 5 preferiblemente una columna de hidroxapatita en la operación de purificación del intermedio después de la hidrólisis del azúcar (ver WO 2018/003983).

Las reacciones de transglicosilación habituales requieren activar el extremo reductor del donante de glucano, y dicho donante activo requiere mucho tiempo y es costoso. Usando dos enzimas al mismo tiempo, SGP, (SG-)Asn (estructura en la que SG está unida a la cadena lateral de
 10 Asn) o similares que tienen un extremo reductor inactivado pueden transglicosilarse directamente como donador de glicano al glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc (ver WO 2018/003983), por lo que un glicopéptido que se puede obtener de forma natural o disponible comercialmente o similar se puede usar directamente en la reacción de transglicosilación, permitiendo así una remodelación eficiente de glicano.

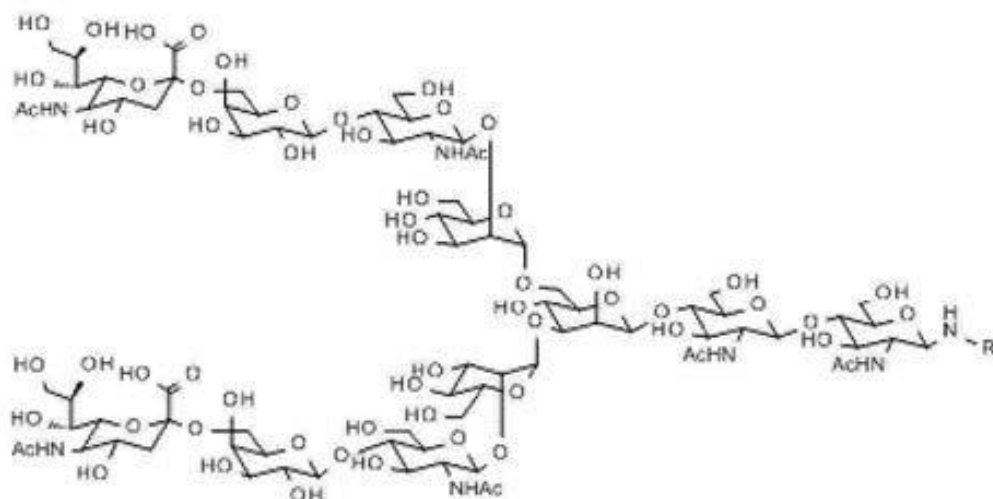
15 Para los dos tipos de enzimas Endo utilizadas, es importante combinar adecuadamente la enzima A (enzima similar a EndoM) para una amplia gama de glicanos complejos como sustratos y la enzima B (enzima similar a EndoS) para el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc como sustrato.

Los ejemplos de la enzima A incluyen EndoM, EndoOm, EndoCC y mutantes de EndoM,
 20 EndoOm y EndoCC con actividad hidrolítica reducida. La enzima A es preferiblemente EndoM N175Q, EndoCC N180H o EndoOm N194Q.

Los ejemplos de la enzima B incluyen EndoS, EndoS2 (EndoS49), y mutantes de EndoS and EndoS2 (EndoS49) con actividad hidrolítica reducida. Los ejemplos preferidos de la enzima B incluyen EndoS D233Q, EndoS D233Q/Q303L, EndoS D233Q/E350A, EndoS D233Q/E350Q, EndoS
 25 D233Q/E350D, EndoS D233Q/E350N y EndoS D233Q/D405A.

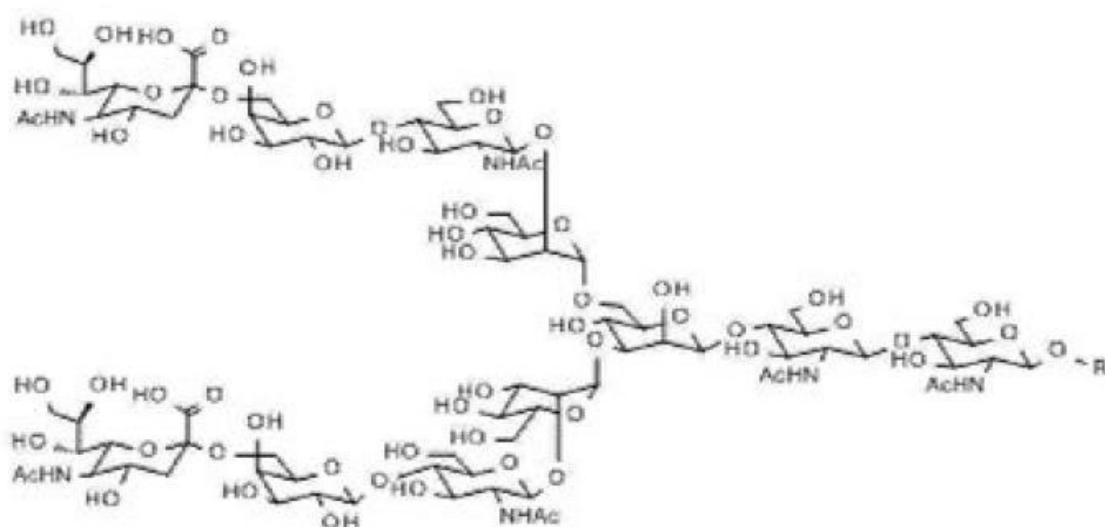
La estructura del donante de glicano no está particularmente limitada siempre que el donante de glicano tenga una estructura de glicano que sea reconocida por la enzima A que se adopta. Se pueden utilizar diversas moléculas, tales como moléculas obtenidas de forma natural y moléculas sintetizables en combinación con una reacción química o una reacción enzimática. Puede usarse
 30 cualquier sustituyente distinto a R=H como sustituyente R en el sitio del anómero. En el caso de una estructura de glicano unido a N (véanse las fórmulas dadas a continuación; el sustituyente R del sitio anómero es R en el extremo reductor de la siguiente fórmula estructural), sus ejemplos incluyen estructuras de amida y azida.

[Fórmula química 104]



- En el caso de una estructura de glicano unido a O (ver las fórmulas dadas a continuación; el sustituyente R del sitio anómero es R en el extremo reductor de la siguiente fórmula estructural),
 5 ejemplos de la misma incluyen estructuras de etilenglicol, estructuras de ácido glicólico y un grupo bencilo, un grupo alilo y un grupo p-nitrofenilo utilizados como grupos protectores para el grupo hidroxilo anómero.

[Fórmula química 105]



- 10 La estructura en el extremo no reductor del donante de glicano no está particularmente limitada siempre que la estructura sea reconocida por la enzima A. Se pueden usar diversas estructuras tales como estructuras de glicano naturales, mutantes de delección de glicano terminal no reductor de estructuras de glicano natural, estructuras en las que un grupo hidroxilo arbitrario se modifica con ácido fosfórico y estructuras unidas químicamente a una estructura enlazadora. Los ejemplos preferidos

del donante de glicano incluyen SGP, (SG-)Asn y $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$.

La molécula aceptora no está particularmente limitada siempre que la molécula aceptora sea una molécula que contiene Fc y que tiene el glicano unido a N297. Pueden seleccionarse y usarse apropiadamente varios tipos tales como fragmentos mAb, CLCH y Fc. La temperatura de reacción en la reacción de transglicosilación se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con las temperaturas óptimas de las enzimas que se van a utilizar y normalmente es de 15 a 50°C, preferiblemente de 25 a 40°C. En un método que utiliza dos enzimas, es posible que la reacción de transferencia no se desarrolle adecuadamente si una de las enzimas se desactiva a la temperatura óptima de la otra enzima. Por lo tanto, se prefiere seleccionar una combinación de enzimas similares en condiciones tales como la temperatura óptima de reacción.

(2) Molécula que contiene Fc que se une al péptido cíclico mediante el grupo tiol

En un modo, el conjugado de la presente invención puede ser un compuesto unido a un péptido cíclico mediante un grupo tiol de la molécula que contiene Fc. La molécula que contiene Fc que tiene un grupo tiol se puede obtener mediante un método conocido por los expertos (Hermanson, GT, Bioconjugate Techniques, páginas 56-136, páginas 456-493 Academic Press (1996)). Los ejemplos incluyen, entre otros; el reactivo de Traut reacciona con el grupo amino; los S-acetiltoalcanoatos de N-succinimidilo se hacen reaccionar con el grupo amino de la molécula que contiene Fc seguido de la reacción con hidroxilamina; después de reaccionar con 3-(piridilditio)propionato de N-succinimidilo, la molécula que contiene Fc se hace reaccionar con un agente reductor; la molécula que contiene Fc se hace reaccionar con un agente reductor como ditiotreitolo, 2-mercaptoetanol y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro en una parte bisagra de la molécula que contiene Fc para formar un grupo tiol. En un modo preferido, el grupo tiol de la molécula que contiene Fc puede ser un grupo tiol producido por reducción del enlace disulfuro en una parte bisagra de la molécula que contiene Fc.

En un ejemplo, usando de 0.3 a 3 equivalentes molares de TCEP como agente reductor por disulfuro en la parte bisagra de la molécula que contiene Fc y reaccionando con la molécula que contiene Fc en una solución reguladora que contiene un agente quelante, se puede obtener la molécula que contiene Fc con disulfuro reducido parcialmente o completamente en la parte bisagra de la molécula que contiene Fc. Ejemplos de agente quelante incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Se puede utilizar en concentraciones de 1 mM a 20 mM. Ejemplos de solución reguladora que se pueden usar incluyen una solución de fosfato de sodio, borato de sodio o acetato de sodio. Como ejemplo específico, la molécula que contiene Fc puede hacerse reaccionar con TCEP a 4°C a 37°C durante 1 a 4 horas para obtener una molécula que contiene Fc que tiene un grupo tiol reducido parcialmente o completamente. Las moléculas que contienen Fc resultantes se pueden purificar apropiadamente mediante diversas cromatografías,

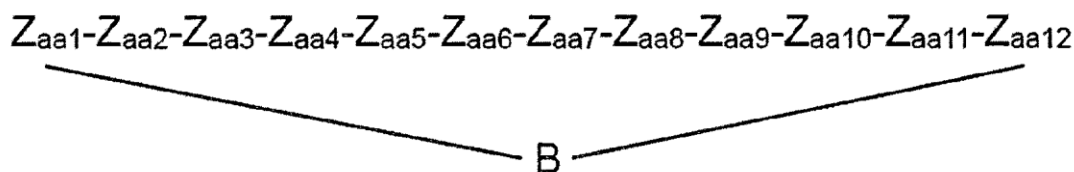
ultrafiltración y similares. En particular, desde el punto de vista de prevenir la reducción del enlace disulfuro en el péptido cíclico, es preferible purificar la molécula que contiene Fc mediante ultrafiltración o similar para eliminar el agente reductor.

- 5 Se puede realizar una reacción que añade un grupo tiol al resto enlazador a péptido cíclico (*por ejemplo*, reacción de adición de Michael con un grupo maleimida) para unir el resto enlazador a péptido cíclico mediante un enlace tioéter.

2. Péptido cíclico

- El péptido cíclico en el conjugado de la presente invención es el péptido cíclico I de esta invención como se establece en I anterior o un péptido cíclico representado por la siguiente fórmula (X):

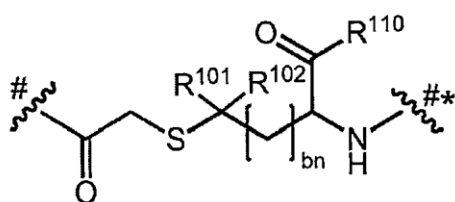
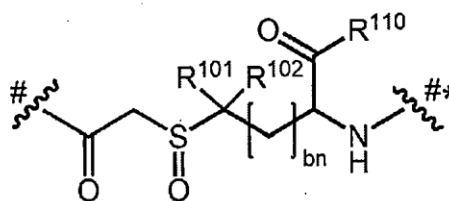
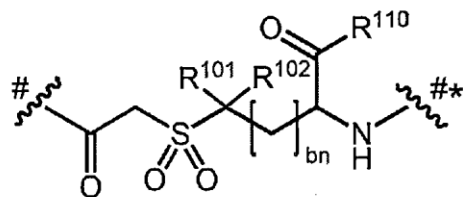
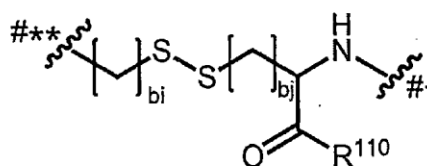
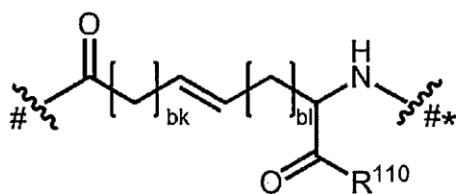
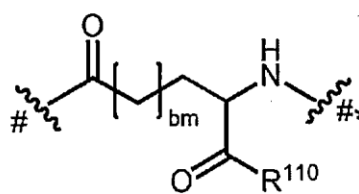
[Fórmula química 106]



- (en lo sucesivo denominado "el péptido cíclico II de la presente (esta) invención"). El péptido cíclico II de esta invención ha formado en él una estructura cíclica en la que los aminoácidos Z_{aa1} a Z_{aa12} , o si Z_{aa1} está ausente, los aminoácidos Z_{aa2} a Z_{aa12} están unidos entre sí mediante enlaces amida para formar una cadena de oligopéptidos, y el aminoácido N-terminal (Z_{aa1} o Z_{aa2}) y el aminoácido C-terminal (Z_{aa12}) de la cadena de oligopeptidos se unen a través de un grupo formador de anillo B.

En la fórmula (X), B se selecciona de los siguientes grupos formadores de anillos B_1 a B_6 que tienen una estructura de aminoácidos:

- 20 [Fórmula química 107]

B₁B₂B₃B₄B₅B₆

Como se encuentra en cualquiera de los extremos de B,

[Fórmula química 108]



- 5 representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de Z_{aa1}, o en ausencia de Z_{aa1}, representa un punto de unión al grupo amino N-terminal de Z_{aa2},

[Fórmula química 109]



representa un punto de unión al grupo carbonilo C-terminal de Z_{aa12}, y

- 10 [Fórmula química 110]

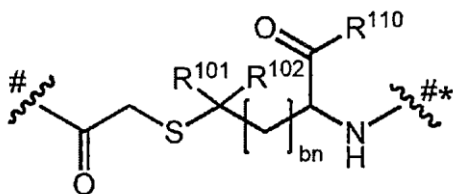


representa un punto de unión a α carbono de Z_{aa1}, o en la ausencia de Z_{aa1}, representa un punto de unión a α carbono de Z_{aa2}, Los centros asimétricos en las estructuras de aminoácidos contenidas en

los grupos formadores de anillos antes mencionados pueden tener la configuración R o S.

En un modo, B es

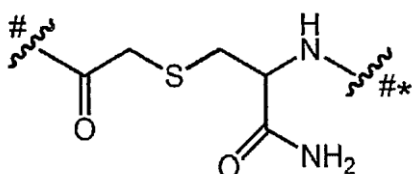
[Fórmula química 111]



- 5 (en adelante denominado "B₁"). En el grupo formador de anillos B₁, bn es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃, y R¹¹⁰ es amino o hidroxilo. Alquilo de C₁₋₃ es preferiblemente metilo.

Un modo preferido de B₁ es un grupo formador de anillos

[Fórmula química 112]



10

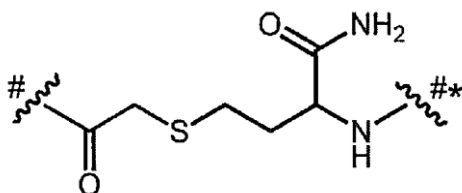
en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹¹⁰ es amino y bn es 0 (denominado en lo sucesivo "B_{1a}"). B_{1a} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de Cys (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} reaccione con -COCH₂X (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de Z_{aa1} o Z_{aa2}. En tal grupo formador de anillos, la Cys puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos B_{1a}, donde la Cys (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} es un L-aminoácido, se denomina como "B_{1a1}".

15

Otro modo preferido de B₁ es un grupo formador de anillos

20

[Fórmula química 113]

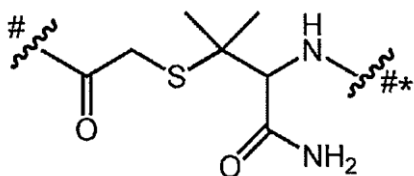


en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹¹⁰ es amino y bn es 1 (denominado en lo sucesivo "B_{1b}"). B_{1b} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de HCY (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de Z_{aa12}

reaccione con $-\text{COCH}_2\text{X}$ (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de Z_{aa1} o Z_{aa2} . En tal grupo formador de anillos, la HYC puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos B_{1b} , donde la HCY (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} es un L-aminoácido, se denomina como " B_{1b1} ".

Otro modo preferido de B_1 es un grupo formador de anillos

[Fórmula química 114]

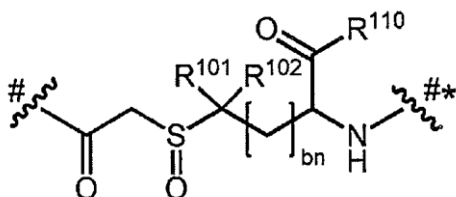


en donde R^{101} y R^{102} son cada uno metilo, R^{110} es amino y bn es 0 (denominado en lo sucesivo " B_{1c} ").

- B_{1c} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo $-\text{SH}$ de Pen (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unido por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} reaccione con $-\text{COCH}_2\text{X}$ (en el que X es un grupo saliente tal como Cl) que está unido al grupo amino N-terminal de Z_{aa1} o Z_{aa2} . En tal grupo formador de anillos, la Pen puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos B_{1c} , donde la Pen (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} es un L-aminoácido, se denomina como " B_{1c1} ".

En otro modo, el grupo formador de anillo B es

[Fórmula química 115]



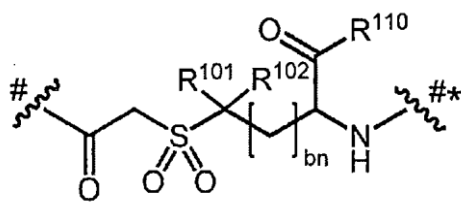
- (en adelante denominado " B_2 "). En el grupo formador de anillos B_2 , bn es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R^{101} y R^{102} son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C_{1-3} , y R^{110} es amino o hidroxilo.

Un modo preferido de B_2 es esa versión de dicho grupo formador de anillos, donde R^{101} y R^{102} son cada uno un átomo de hidrógeno, R^{110} es amino y bn es 0 (en lo sucesivo denominado " B_{2a} ").

- B_{2a} se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos B_{1a} como se muestra arriba a sulfóxido. En particular, el grupo formador de anillos obtenido oxidando el grupo sulfuro de B_{1a1} a sulfóxido se denomina " B_{2a1} ".

En otro modo, B es

[Fórmula química 116]

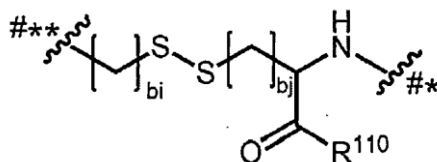


(en adelante denominado "B₃"). En el grupo formador de anillos B₃, bn es un número entero de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3), R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo de C₁₋₃, y R¹¹⁰ es amino o hidroxilo.

Un modo preferido de B₃ es esa versión de dicho grupo formador de anillos, donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno un átomo de hidrógeno, R¹¹⁰ es amino y bn es 0 (en lo sucesivo denominado "B_{3a}"). B_{3a} se puede obtener, por ejemplo, oxidando el grupo sulfuro del grupo formador de anillos B_{1a} como se muestra arriba a sulfona. En particular, el grupo formador de anillos obtenido oxidando el grupo sulfuro de B_{1a1} a sulfona se denomina "B_{3a1}".

En otro modo, B es

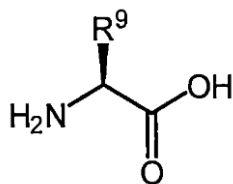
[Fórmula química 117]



(en adelante denominado "B₄"). En el grupo formador de anillos B₄, bi y bj son cada uno independientemente un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3), y R¹¹⁰ es amino o hidroxilo.

Cuando B es B₄, Z_{aa1} o Z_{aa2} es un residuo de un aminoácido representado por

[Fórmula química 118]



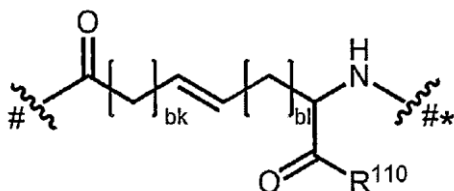
[en donde R⁹ es un grupo representado por la fórmula -(CH₂)_tSH (en donde t es un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3))].

En un modo preferido de B₄, bi y bj son cada uno 1, y R¹¹⁰ es amino (en lo sucesivo, denominado "B_{4a}"). B_{4a} se puede obtener, por ejemplo, permitiendo que el grupo -SH de Cys (siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por amida al extremo C de Z_{aa12} para reaccionar con el grupo -SH de Z_{aa1} o Z_{aa2}. En tal grupo formador de anillos, la Cys puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En particular, esa versión del grupo formador de anillos B_{4a}, donde la Cys

(siempre que el grupo carboxi se convierta en amida) que está unida por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} es un L-aminoácido, se denomina como "B_{4a1}".

En otro modo, B es

[Fórmula química 119]

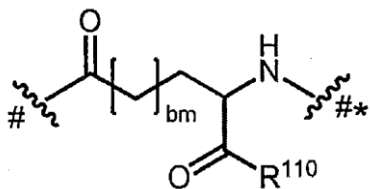


5

(en adelante denominado "B₅"). En el grupo formador de anillos B₅, bi y bj son cada uno independientemente un número entero de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3), y R¹¹⁰ es amino o hidroxilo. El grupo formador de anillos B₅ se puede obtener, por ejemplo, mediante metátesis de olefina del aminoácido (siempre que el grupo carboxi pueda convertirse en amida) que tiene el grupo - (CH₂)_{bl}CH=CH₂ en su cadena lateral y está unido por un enlace amida al extremo C de Z_{aa12}, y el grupo -CO(CH₂)_{bk}CH=CH₂ que está unido al grupo amino N-terminal de Z_{aa1} o Z_{aa2}. En tal grupo formador de anillos, el aminoácido que está unido por enlace amida al extremo C de Z_{aa12} puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido.

En otro modo, B es

15 [Fórmula química 120]



(en adelante denominado "B₆"). En el grupo formador de anillos b₆, bm es un número entero de 1 a 7 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7), y R¹¹⁰ es amino o hidroxilo. B₆ se puede obtener, por ejemplo, reduciendo el doble enlace carbono-carbono de B₅.

20 En la fórmula (X), Z_{aa1} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático, un aminoácido básico, un aminoácido neutro o un aminoácido ácido, o está ausente. En un modo preferido, Z_{aa1} es un residuo de Arg, Lys, His, Gly, Ala, Asn, Thr, Ser, Met, Leu, Ile, Val, Gln, Phe, Tyr, Trp o Cys, o está ausente y más preferiblemente está ausente.

En la fórmula (X), Z_{aa2} es un residuo de un aminoácido aromático o un aminoácido neutro. En un modo preferido, Z_{aa2} es un residuo de un aminoácido ácido, más preferentemente un residuo de Phe, Tyr, Trp, 2NaI, 4CF o DCF, incluso más preferentemente un residuo 2NaI.

25 En la fórmula (X), Z_{aa3} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático o un aminoácido básico. En un modo preferido, Z_{aa3} es un residuo de Ile, Leu, Nle, Tle, Trp, 2NaI, 4CF o

Arg, más preferentemente un residuo de Arg o Tle.

En la fórmula (X), Z_{aa4} es un residuo de Ser, Thr, Ala o mS . En un modo preferido, Z_{aa4} es un residuo de Ser.

En la fórmula (X), Z_{aa5} es un residuo de Gly o Ser. En un modo preferido, Z_{aa5} es un residuo
5 de Gly.

En la fórmula (X), Z_{aa6} es un residuo de un aminoácido básico o un aminoácido ácido neutro. En un modo preferido, Z_{aa6} es un residuo de IArg, Lys, His, Ser, Cit, o AGB, más preferentemente un residuo de Arg o AGB.

En la fórmula (X), Z_{aa7} es un residuo de un aminoácido neutro o un aminoácido ácido. En un
10 modo preferido, Z_{aa7} es un residuo de Asn o Asp

En la fórmula (X), Z_{aa8} es un residuo de un aminoácido aromático. En un modo preferido, Z_{aa8} es un residuo de Trp o 2Nal, más preferiblemente un residuo de Trp.

En la fórmula (X), Z_{aa9} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido neutro o un aminoácido aromático. En un modo preferido, Z_{aa9} es un residuo de Val, Nle, Ahp, o Met, más
15 preferentemente un residuo de Val o Nle.

En la fórmula (X), Z_{aa10} es un residuo de un aminoácido básico, un aminoácido alifático, un aminoácido aromático o un aminoácido neutro. En un modo preferido, Z_{aa10} es un residuo de Arg, AGB, Lys, His, AMF, Phg, o Val, más preferiblemente un residuo de Arg, AGB, o Val.

En la fórmula (X), Z_{aa11} es un residuo de un aminoácido aromático. En un modo preferido,
20 Z_{aa11} es un residuo de Trp o 2Nal, más preferiblemente un residuo de Trp.

En la fórmula (X), Z_{aa12} es un residuo de un aminoácido alifático, un aminoácido aromático o un aminoácido básico. En un modo preferido, Z_{aa12} es un residuo de Val, Tle, CPTG, CHXG, o Phe, más preferiblemente un residuo de Val, CPTG, o CHXG.

Un modo preferido del péptido cíclico II de la presente invención es un péptido cíclico
25 representado por la fórmula (X), en la que

B es el grupo formador de anillos B_{1a} , B_{1b} o B_{1c} ;

Z_{aa1} es un residuo de Arg, Lys, His, Gly, Ala, Asn, Thr, Ser, Met, Leu, Ile, Val, Gln, Phe, Tyr, Trp o Cys, o está ausente;

Z_{aa2} es un residuo de Phe, Tyr, Trp, 2Nal, 4CF, o DCF;

30 Z_{aa3} es un residuo de Ile, Leu, Nle, Tle, Trp, 2Nal, 4CF, o Arg;

Z_{aa4} es un residuo de Ser;

Z_{aa5} es un residuo de Gly;

Z_{aa6} es un residuo de Arg, Lys, His, Ser, Cit, o AGB;

Z_{aa7} es un residuo de Asn o Asp;

35 Z_{aa8} es un residuo de Trp o 2Nal;

Z_{aa9} es un residuo de Val, Nle, Ahp, o Met;

Z_{aa10} es un residuo de Arg, AGB, Lys, His, AMF, Phg, o Val;

Z_{aa11} es un residuo de Trp o 2Nal; y

Z_{aa12} es un residuo de Val, Tle, CPTG, CHXG, o Phe.

- 5 Un modo preferido del péptido cíclico II de la presente invención es un péptido cíclico representado por la fórmula (X), en la que

B es el grupo formador de anillos B_{1a};

Z_{aa1} está ausente;

Z_{aa2} es un residuo de 2Nal;

- 10 Z_{aa3} es un residuo de Arg o Tle;

Z_{aa4} es un residuo de Ser;

Z_{aa5} es un residuo de Gly;

Z_{aa6} es un residuo de Arg o AGB;

Z_{aa7} es un residuo de Asn o Asp;

- 15 Z_{aa8} es un residuo de Trp;

Z_{aa9} es un residuo de Val o Nle;

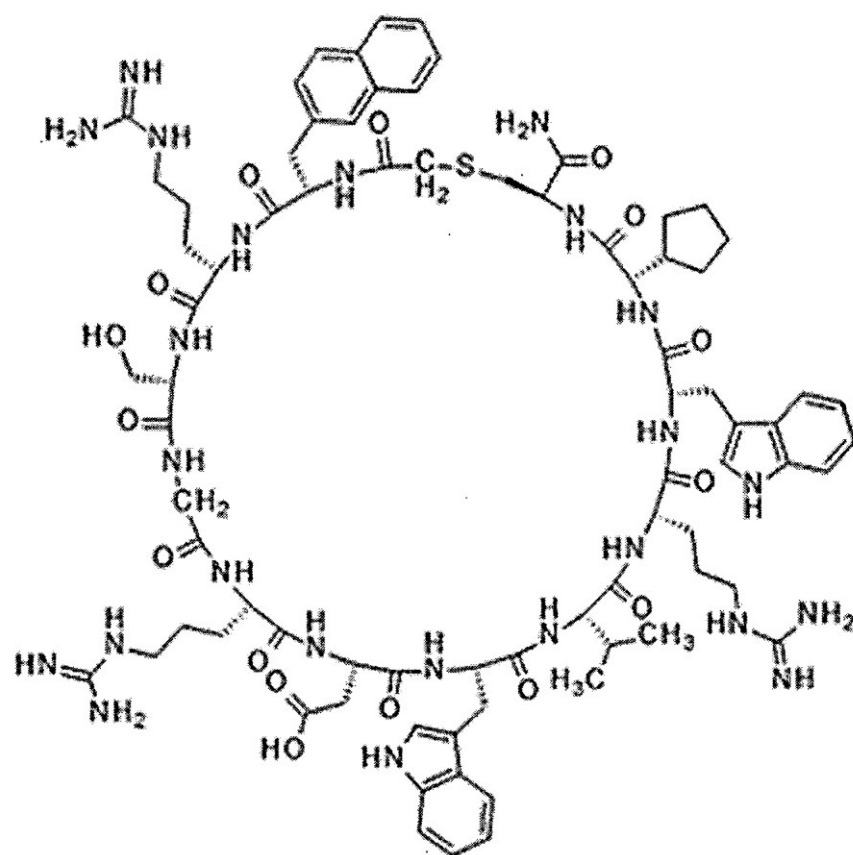
Z_{aa10} es un residuo de Arg, AGB o Val;

Z_{aa11} es un residuo de Trp y

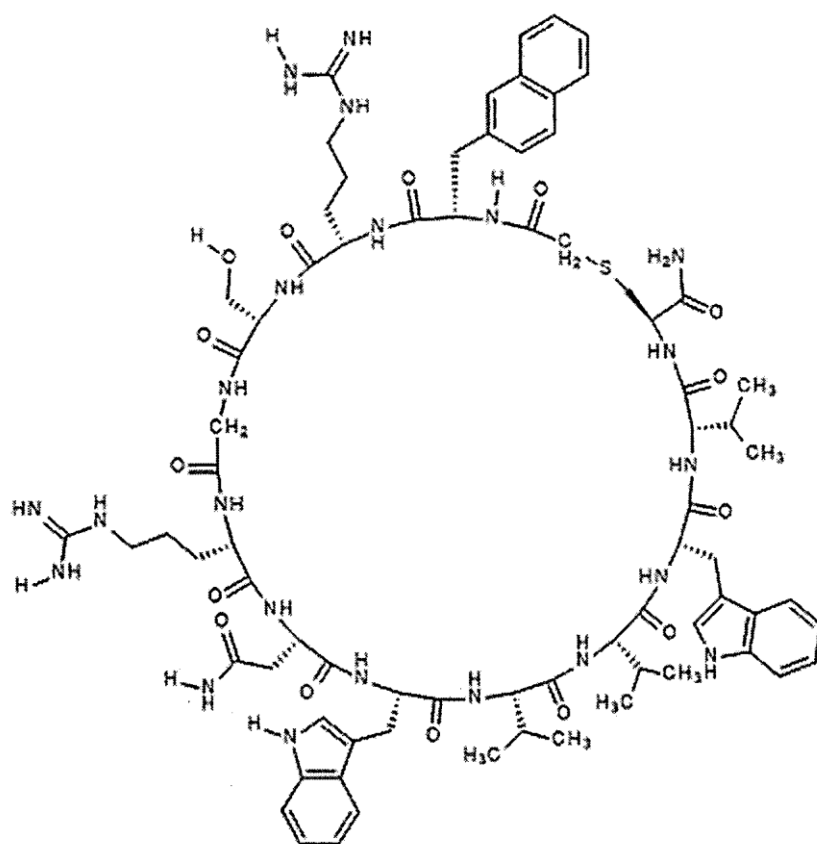
Z_{aa12} es un residuo de Val, CPTG o CHXG.

- 20 Un modo aún más preferido del péptido cíclico II de la presente invención es un péptido cíclico seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las fórmulas:

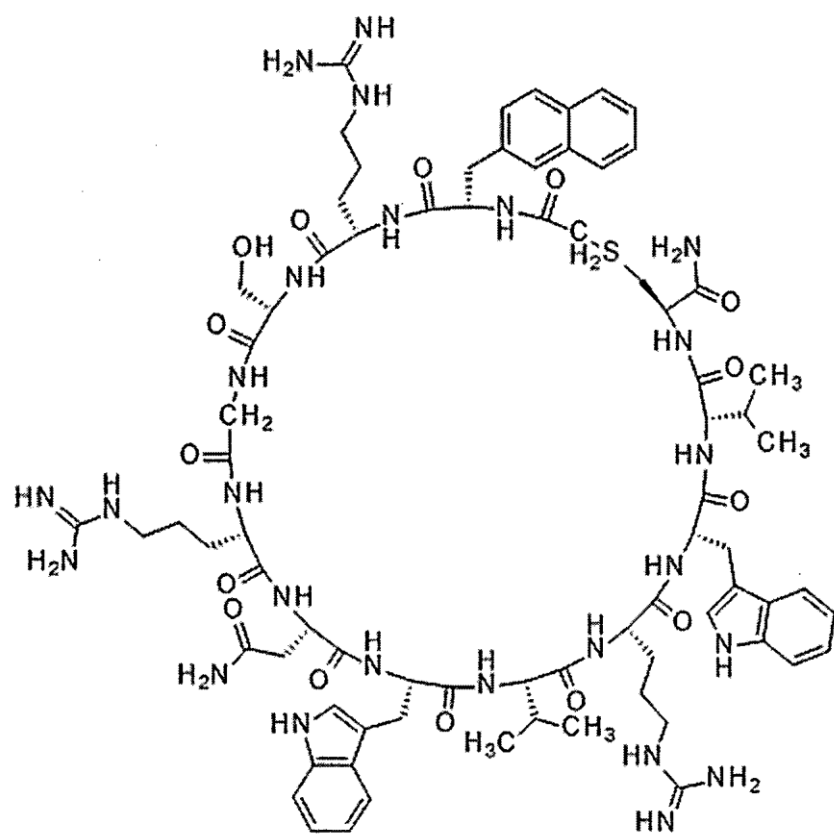
[Fórmula química 121]



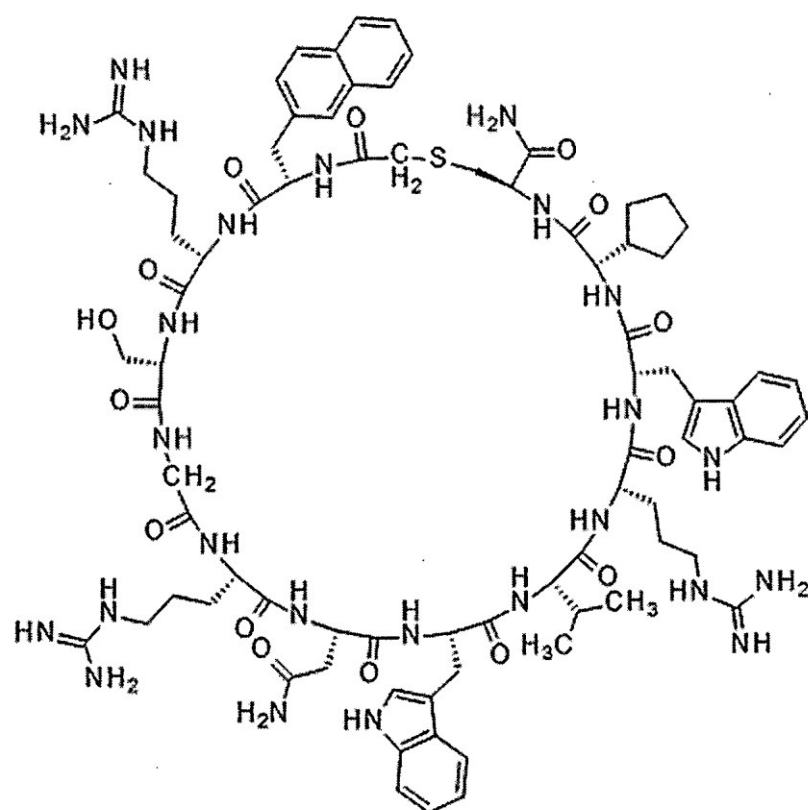
[Fórmula química 122]



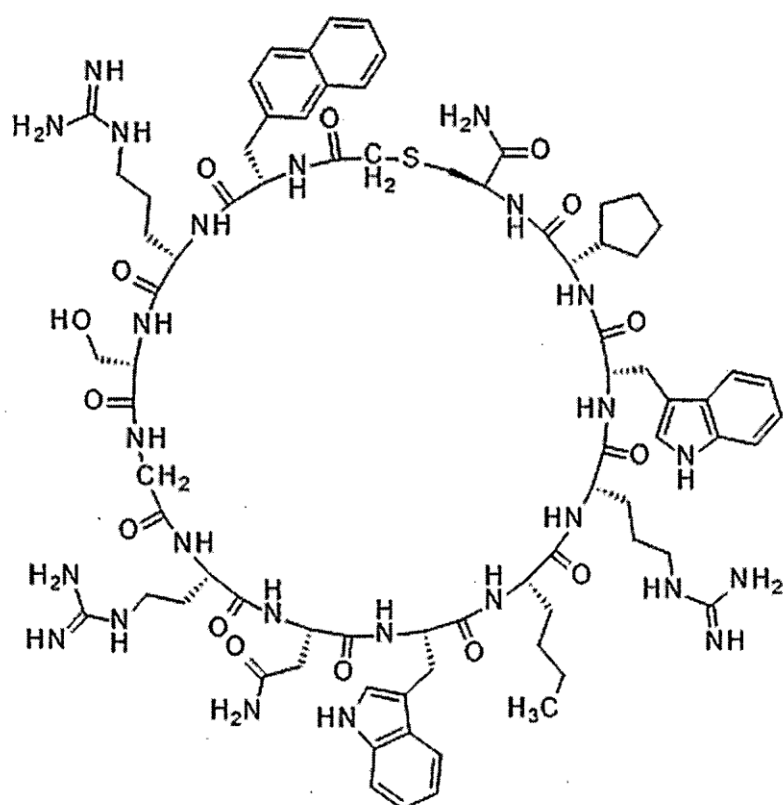
[Fórmula química 123]



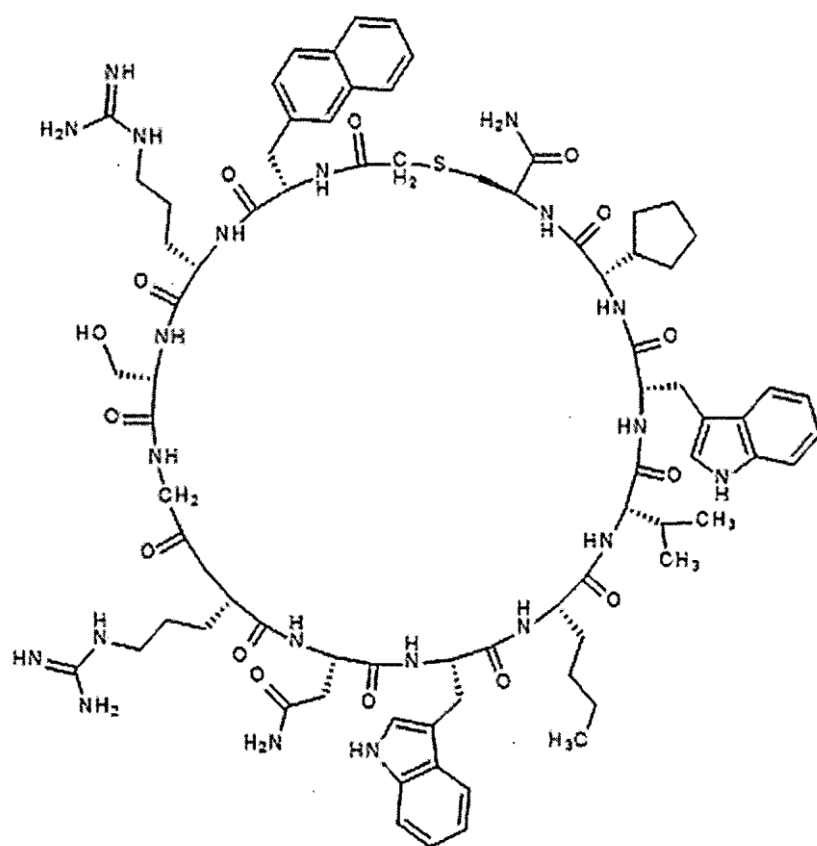
[Fórmula química 124]



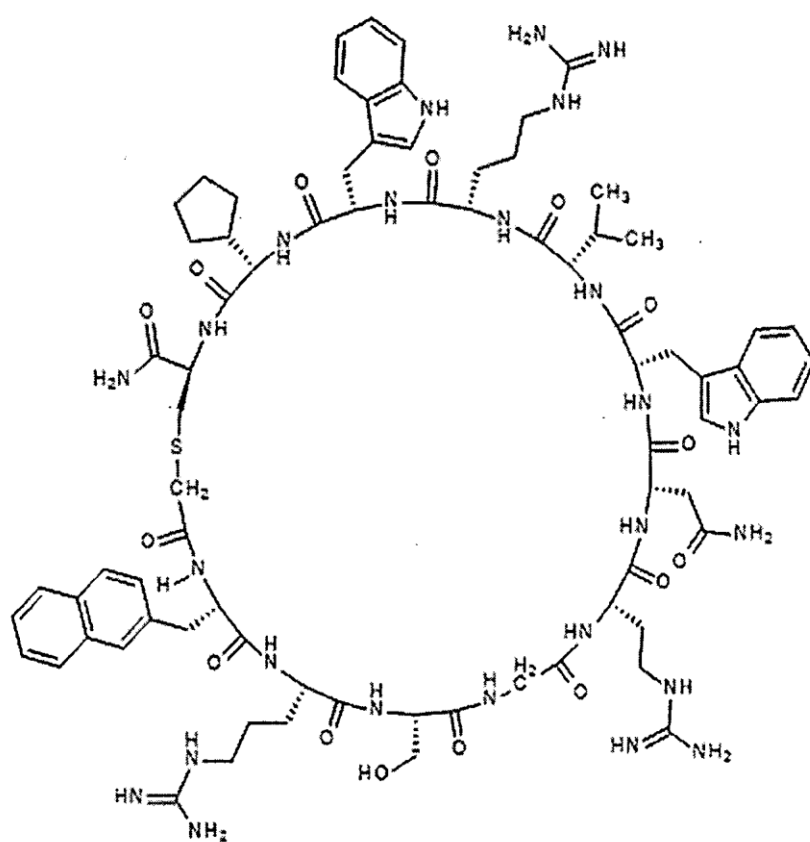
[Fórmula química 125]



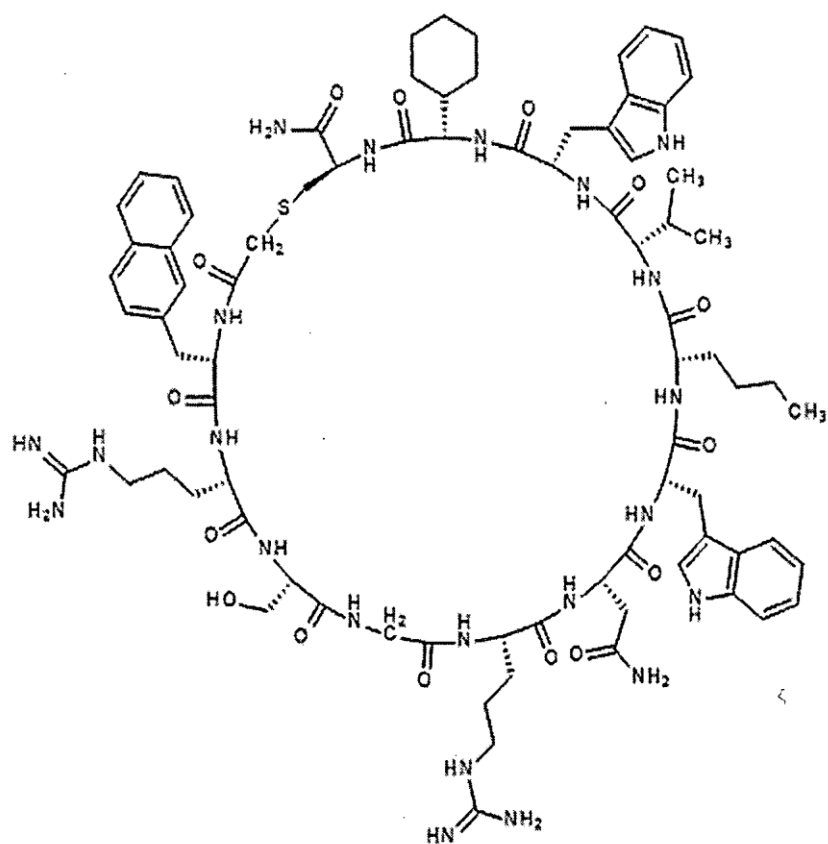
[Fórmula química 126]



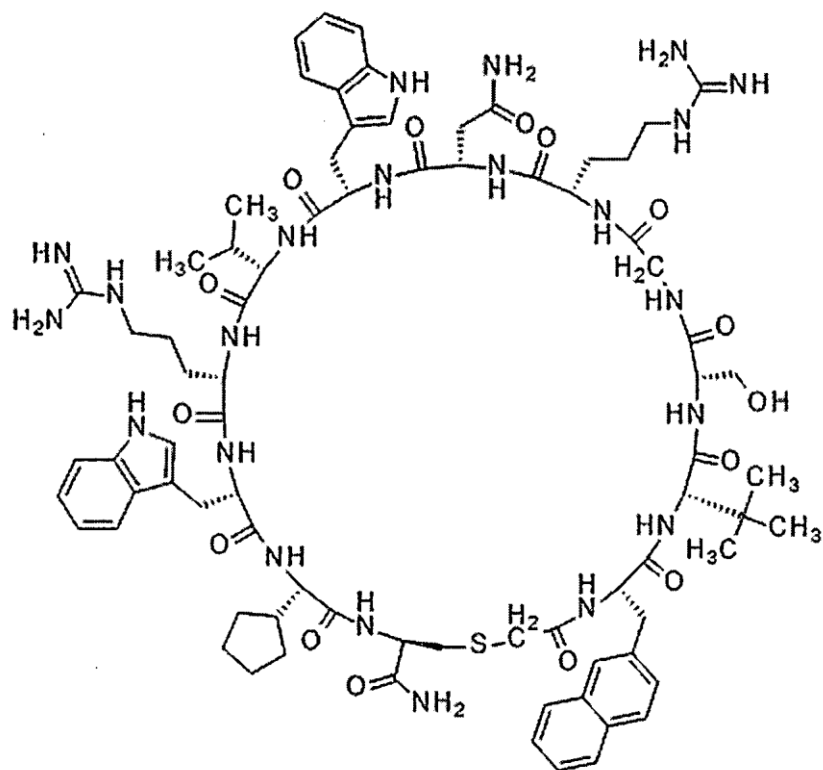
[Fórmula química 127]



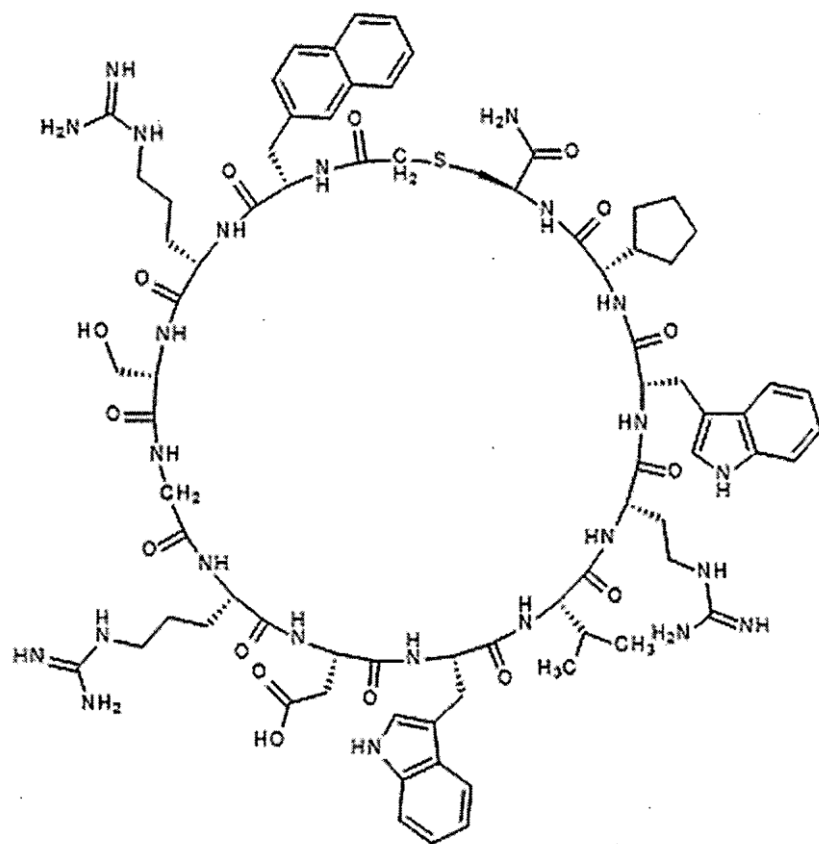
[Fórmula química 128]



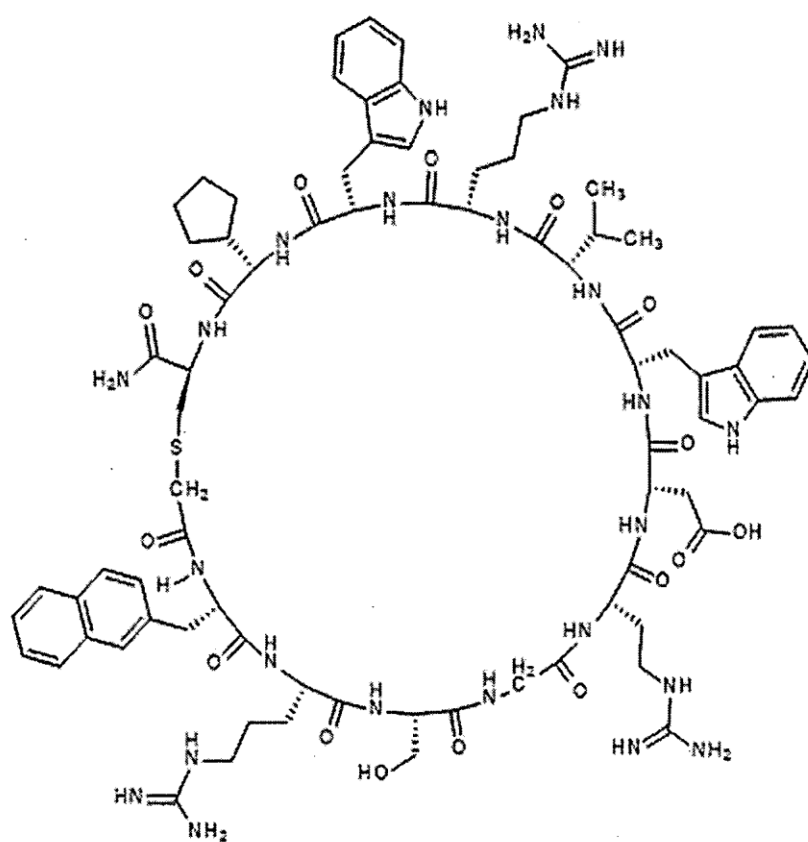
[Fórmula química 129]



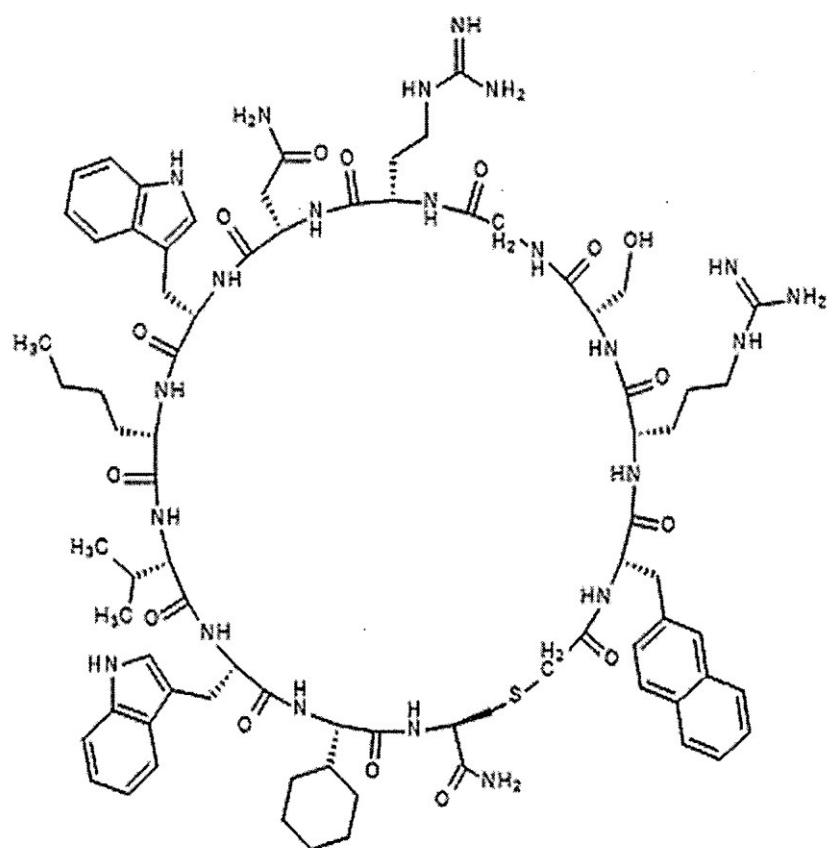
[Fórmula química 130]



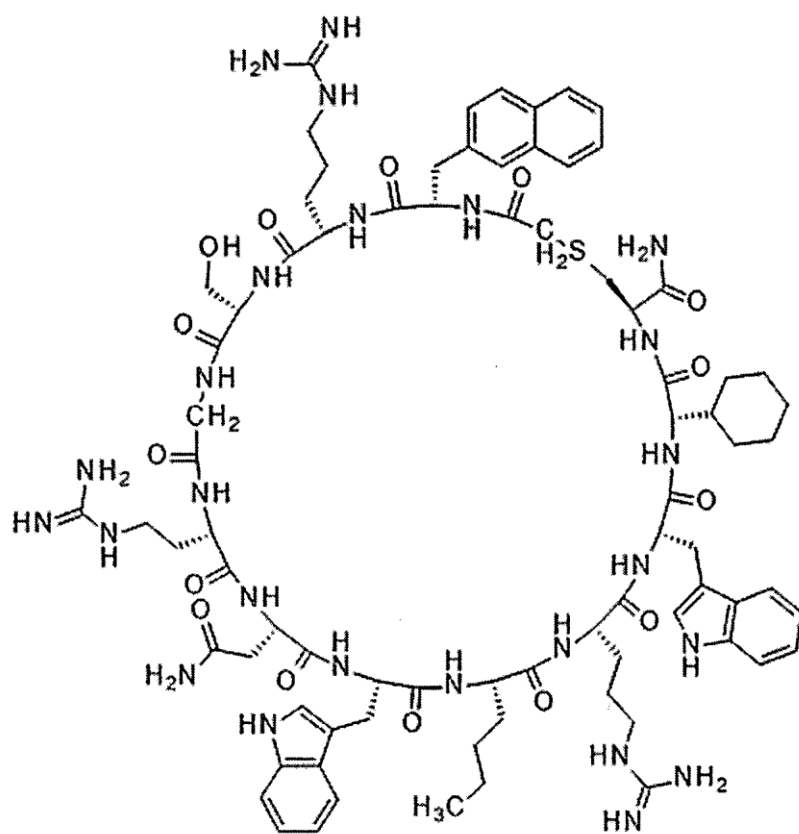
[Fórmula química 131]



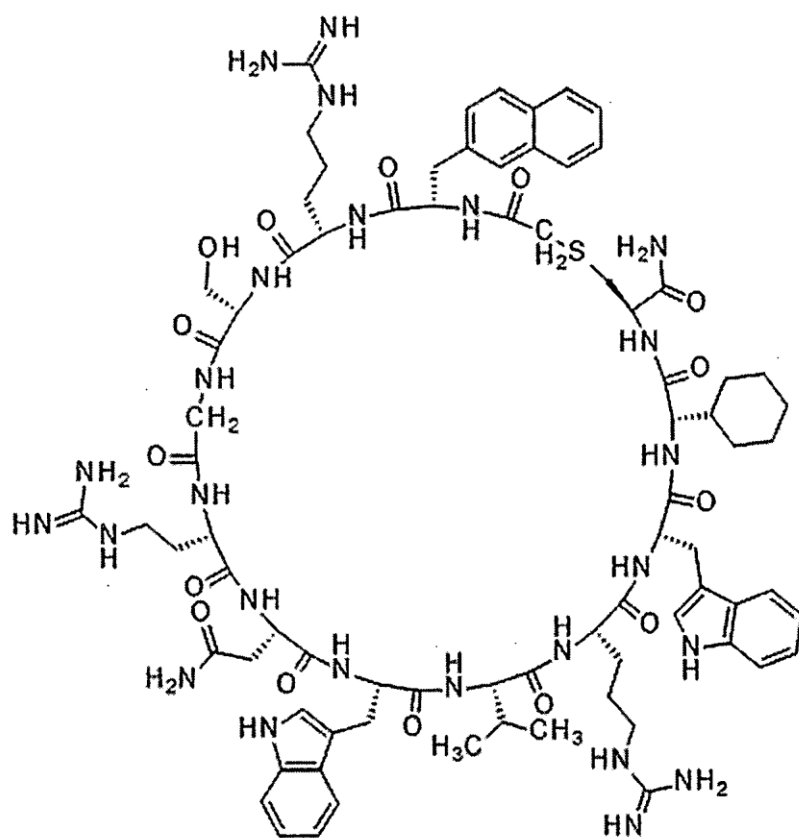
[Fórmula química 132]



[Fórmula química 133]

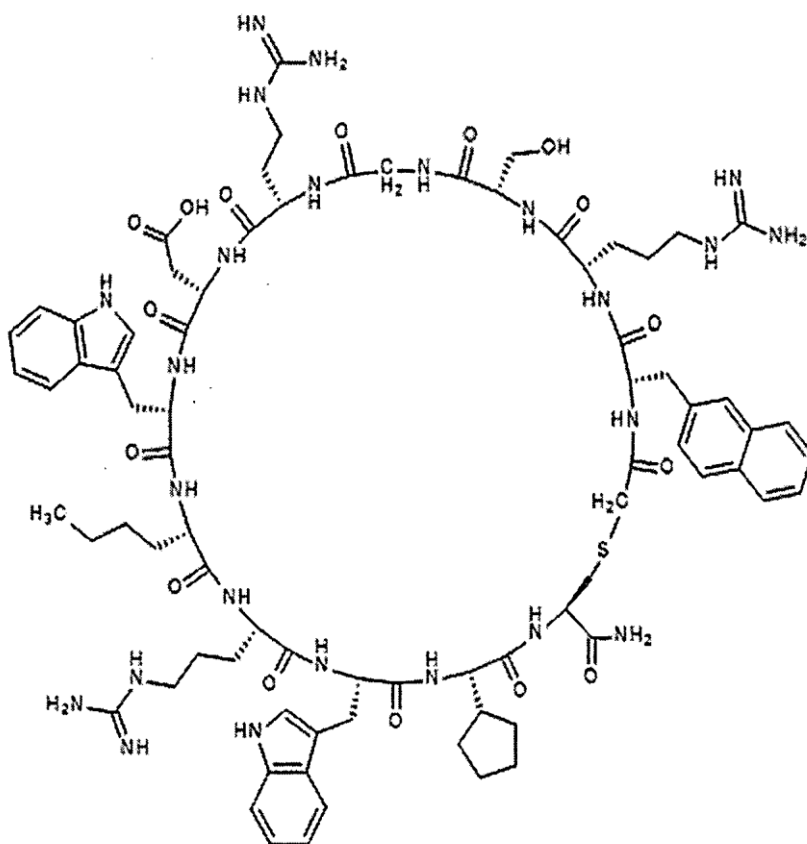


[Fórmula química 134]



y

[Fórmula química 135]



Los oligopéptidos mostrados arriba son péptidos cíclicos en el Conjugado-13 al Conjugado-63, el Conjugado-67 al Conjugado-71, el Conjugado-73, el Conjugado-75 al Conjugado-79, el Conjugado-83 al Conjugado-86, el Conjugado-88 al Conjugado-95, y el Conjugado-97 de los Ejemplos como se muestra a continuación. En todos estos oligopéptidos, el grupo B formador de anillos es B_{1a1}.

El péptido cíclico II de esta invención se puede preparar mediante un método conocido en la técnica, tal como síntesis química y sistema de traducción libre de células de la misma manera que el péptido cíclico I de esta invención (consulte el documento WO 2018/052002).

En un modo preferido, el péptido cíclico en el conjugado de la presente invención puede ser el péptido cíclico I de esta invención.

3. Estructura de enlace

En el conjugado de la presente invención, el péptido cíclico se acopla a una molécula portadora a través de una cadena lateral de un residuo de aminoácido que constituye el péptido cíclico o un grupo carbonilo al que R¹⁰ del grupo formador de anillos A o R¹¹⁰ del grupo B formador de anillos está unido. En un modo, el péptido cíclico está acoplado a una molécula portadora a través de un grupo carbonilo al que R¹⁰ del grupo formador de anillos A o R¹¹⁰ del grupo formador de anillos B está unido. En un modo, el conjugado de esta invención puede ser un compuesto en el que el péptido cíclico y la molécula portadora están acoplados mediante una estructura de enlace. La unión del

péptido cíclico a la estructura de enlace o molécula portadora se puede llevar a cabo según un procedimiento convencional.

La estructura de enlace puede ser cualquier estructura siempre que el conjugado de la presente invención pueda ejercer un efecto inhibidor de TSP-1. En un modo preferido, la estructura de enlace puede incluir al menos una estructura seleccionada del grupo que consiste en una cadena de polioxialquileno, un residuo de aminoácidos y una cadena oligopeptídica que consiste en dos o más residuos de aminoácidos.

Como se hace referencia en el presente documento, una molécula de la que se deriva una estructura de enlace puede denominarse "molécula de enlace".

El término "estructura principal" en la estructura de enlace se refiere a una porción lineal que es esencial para unir el péptido cíclico y la molécula portadora, mientras que el término "cadena lateral" en la estructura de enlace se refiere a una porción ramificada desde la estructura principal. Incluso para los residuos de aminoácidos individuales que constituyen la estructura de enlace, la porción de enlace que es esencial para unir el péptido cíclico y la molécula portadora se denomina "estructura principal", mientras que la porción ramificada desde la estructura principal se denomina cadena lateral. Por ejemplo, una cadena lateral en un residuo de aminoácido generalmente se refiere a un grupo unido a un carbono α distinto a un grupo amino, un grupo carboxilo y un hidrógeno unido directamente al carbono α (aunque el hidrógeno es la cadena lateral en un residuo de glicina), pero la porción de dicha cadena lateral puede ser "estructura principal" en la estructura de enlace de la presente invención (por ejemplo, si se incluye KPEG en la estructura de enlace, el grupo ϵ amino de KPEG es la "estructura principal" y el grupo α amino y la cadena de PEG unida al mismo son las "cadenas laterales".)

La cadena de polioxialquileno contenida en la estructura de enlace no está particularmente limitada siempre que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos de la misma incluyen una cadena de polimetilenglicol, una cadena de polietilenglicol, una cadena de polipropilenglicol, una cadena de polibutilenglicol, una cadena de polipentilenglicol, una cadena de polihexilenglicol y una cadena de polioxialquileno en la que un grupo etilenglicol y un grupo propilenglicol están acoplados en forma de bloque o aleatoria. En un modo preferido, la cadena de polioxialquileno puede ser una cadena de polietilenglicol (PEG), en la que

la cadena de polioxialquileno contenida en la cadena principal (es decir, la porción lineal que es esencial para unir el péptido cíclico y la molécula portadora) en la estructura de enlace se puede usar para regular la distancia entre el péptido cíclico y la molécula portadora. La cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal de dicha estructura de enlace puede estar contenida en la estructura de enlace como parte de aminoácidos no naturales que contienen una cadena de polioxialquileno tal como P6P, P12P, P24P y P36P.

El grado de polimerización de cada cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal de la estructura de enlace puede ser, pero no se limita particularmente a, 2 a 50, 6 a 50, 6 a 30 o 6 a 12, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 o 36, preferiblemente 6, 12, 24 o 36, más preferiblemente 6, 12 o 24. Además, el grado total de polimerización de las cadenas de polioxialquileno contenidas en la estructura principal de la estructura de enlace (es decir, el grado de polimerización de sólo una cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal de una estructura de enlace, o el grado total de polimerización de todas las cadenas de polioxialquileno contenidas en la estructura principal) puede ser de 6 a 100, más preferiblemente de 6 a 50, por ejemplo, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 o 50. En un modo preferido, la cadena de polioxialquileno contenida en la estructura principal de la estructura de enlace es una cadena de PEG, y el grado total de polimerización puede ser de 6 a 100, más preferiblemente de 6 a 50, por ejemplo, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 o 50.

El residuo de aminoácido contenido en la estructura de enlace puede ser un residuo de un aminoácido natural o un residuo de aminoácido no natural y puede ser la forma D o la forma L. En un modo preferido, el residuo de aminoácido contenido en la estructura de enlace puede ser un residuo de Gly, N-metilglicina (NMeG), Asp, D-Asp (d), Glu, D-Glu, Lys, D-Lys, β -alanina (bAla), Ser, D-Ser, un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno en una cadena lateral (es decir, un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace, por ejemplo, KPEG), o un aminoácido no natural que contiene un glicano tal como una cadena SG en una cadena lateral (es decir, un aminoácido no natural que contiene un glicano en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace; por ejemplo, KSG).

El residuo de aminoácido que constituye la cadena de oligopéptidos contenida en la estructura de enlace puede ser un residuo de un aminoácido natural o un residuo de aminoácido no natural y puede ser de forma D o forma L. La cadena de oligopéptidos puede constar de 2 a 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aminoácidos, sin limitación particular. En un modo preferido, la cadena de oligopéptidos contenida en la estructura de enlace puede contener uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gly, N-metilglicina (NMeG), Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Lys, D-Lys, β -alanina (bAla), Ser, D-Ser, un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno en una cadena lateral (es decir, un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace, por ejemplo, KPEG), o un aminoácido no natural que contiene un glicano tal como una cadena SG en una cadena lateral (es decir, un aminoácido no natural que contiene un glicano en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace; por ejemplo, KSG).

La estructura de enlace puede acoplarse al péptido cíclico en el grupo carbonilo al que se une R^{10} del grupo formador de anillos A o R^{110} del grupo formador de anillos B. Se pueden aplicar diversos métodos conocidos en el campo de la química sintética orgánica a la unión entre la estructura de enlace y el péptido cíclico, sin limitaciones particulares. Cuando la estructura de enlace incluye un residuo aminoácido o una cadena de oligopéptidos, el grupo amino N-terminal del residuo de aminoácido o la cadena de oligopéptidos preferiblemente forma un enlace amida con el grupo carbonilo al que se une R^{10} del grupo A formador de anillos o R^{110} del grupo B formador de anillos, donde R^{10} o R^{110} está sustituido con NH del grupo amino N-terminal.

Se pueden aplicar diversos métodos conocidos en el campo de la química sintética orgánica a la unión entre la estructura de enlace y la molécula portadora, sin limitaciones particulares. En general, esta unión se puede llevar a cabo con referencia a un método de conjugación aplicable a la síntesis de conjugados anticuerpo-fármaco (Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2198-2215). Ejemplos de métodos de formación de anillos mediante la reacción de Huisgen de un grupo azida con un grupo acetileno incluyen una reacción de cicloadición para formar un anillo de 1,2,3-triazol [cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC)] y una reacción de cicloadición para formar un anillo de 1,2,3-triazol mediante una reacción de un grupo azida con dibencilcicloocteno (DBCO) [cicloadición azida-alquino promovida por cepa (SPAAC)]. En este contexto, otros compuestos tales como un compuesto que tiene una estructura de ciclooctina retorcida, el biciclo[6.1.0]non-4-eno (BCN) (Angew. Chem. En t. Ed. 2010, 49, 9422-9425), y un cicloalquino que contiene un heteroátomo en una estructura de anillo media (Angew. Chem. En t. Ed. 2015, 54, 1190-1194) también se puede utilizar de la misma manera. Otros ejemplos de reacción de formación de anillos incluyen una reacción de cicloadición de Diels-Alder de un anillo de 1,2,4,5-tetrazina con un alqueno retorcido (Curr. Opin. Chem. Biol., 2014, 21, 89-95). Ejemplos de ciclocondensación basada en una reacción de Pictet-Spengler con un grupo aldehído incluyen la ligadura de Hydrazino-Pictet-Spengler (Bioconjugate Chem. 2013, 24, 846-851.) y ligadura de Pictet-Spengler basada en Oxiamina (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 110, 46-51). Ejemplos adicionales de los mismos incluyen un enlace amida entre un grupo amino y un grupo carboxilo, la adición de Michael de un grupo tiol a un grupo maleimida, la reacción de un grupo tiol con un grupo metilsulfonilfeniloxadiazol (Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 12592-6), un enlace entre un grupo tiol y un grupo yodoacetilo, formación cruzada de disulfuro de un grupo tiol con disulfuro activado, condensación de hidrazona de un grupo aldehído con hidrazida y condensación de oxima de un grupo aldehído con un grupo aminooxi. La molécula de enlace adoptada en la presente invención puede seleccionarse apropiadamente como una molécula que tenga un grupo funcional que se ajuste a cualquiera de estos patrones de unión y usarse para la formación de la estructura de enlace.

En dicha reacción de unión, se pueden formar estereoisómeros, isómeros ópticos, isómeros geométricos o similares dependiendo del patrón de unión. Estos isómeros pueden usarse por

separado mediante un método conocido o como una mezcla. Dado que el conjugado final es una macromolécula, es probable que las diferencias estructurales isoméricas en estas subestructuras casi no tengan influencia en el conjugado.

5 En un modo preferido, la estructura de enlace incluye un grupo de enlace C que se une a la molécula portadora. Más preferiblemente, el grupo de enlace C puede incluir un resto derivado del grupo maleimida en un enlace tioéter formado por reacción de un grupo maleimida con un grupo tiol o anillo de 1,2,3-triazol.

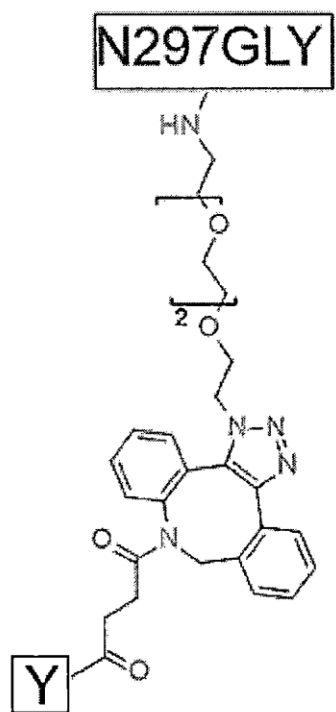
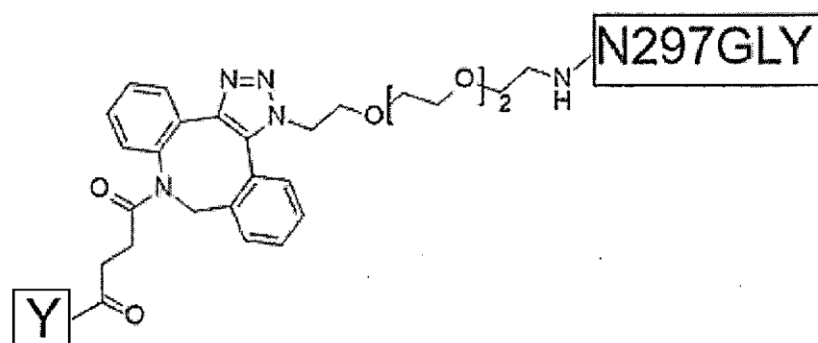
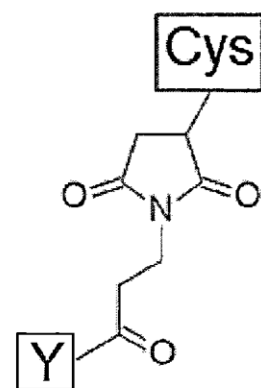
10 Cuando el grupo de enlace C contiene un resto derivado del grupo maleimida, el grupo maleimida se une preferiblemente a un grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula portadora mediante condensación de maleimida para formar un enlace tioéter. En este caso, el grupo tiol es preferiblemente un grupo tiol producido por reducción del enlace disulfuro en una parte bisagra en la molécula que contiene Fc.

15 Cuando el grupo de enlace C incluye un anillo de 1,2,3-triazol, el anillo de 1,2,3-triazol se une preferiblemente a un glicano que está unido a un residuo de asparagina correspondiente a la posición 297 según el índice Eu de la molécula que contiene Fc (glicano unido a N297). Tal estructura de enlace puede ser, por ejemplo, una estructura con un anillo de 1,2,3-triazol formado por una reacción Click entre un grupo azida introducido en el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc y un grupo DBCO unido a la molécula de enlace. En esta estructura se puede formar un isómero geométrico en el que la molécula que contiene Fc está unida a la posición 1 o 3 del anillo de triazol.

20 Cuando la reacción se produce con dos a cuatro grupos azida por molécula que contiene Fc, se pueden mezclar estructuras isoméricas geométricas en una molécula del conjugado.

En un modo preferido, el grupo de enlace C tiene una estructura representada por cualquiera de las siguientes fórmulas:

[Fórmula química 136]

C₁C₂C₃

, y

(en donde

N297GLY representa la unión al extremo no reductor del glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc;

Cys representa la unión al grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula portadora; y

5 Y representa un punto de unión a un residuo de aminoácido adyacente.)

En un modo, la estructura de enlace se puede representar mediante la fórmula (XX):

-L1-L2-L3-C-

[en donde

10 L1 es un oligopéptido que contiene de 3 a 6 residuos de aminoácidos neutros unidos de manera lineal;

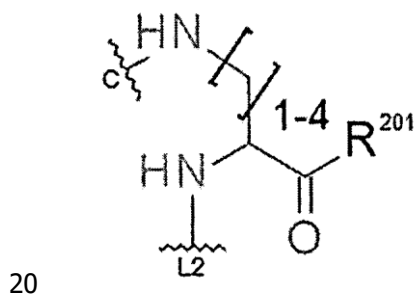
L2 es L2a o L2b, en donde

L2a es un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileno en la estructura principal, o un oligopéptido que comprende un residuo de aminoácido no natural que comprende una cadena de polioxialquileno en la estructura principal, en donde el grado total de
15 polimerización de la cadena de polioxialquileno contenida en la cadena principal de L2a es 6 a 100;

L2b es un oligopéptido que contiene de 10 a 20 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) residuos de aminoácidos α naturales o no naturales unidos de una manera lineal;

L3 es un residuo de aminoácido representado por la fórmula

[Fórmula química 137]



(en donde R^{201} es un grupo hidroxilo o un grupo amino,

[Fórmula química 138]



representa un punto de unión a un residuo de aminoácido adyacente en L2 y

25 [Fórmula química 139]



representa un punto de unión al grupo de unión C);

C es el grupo de enlace C;

el grupo amino N-terminal de L1 forma una unión amida con un grupo carbonilo al que se une R¹⁰ del grupo A formador de anillos o R¹¹⁰ del grupo B formador de anillos, donde R¹⁰ o R¹¹⁰ está sustituido con NH del grupo amino N-terminal;

5 L1 y L2 están unidos entre sí mediante un enlace amida; y

L2 y L3 están unidos entre sí mediante un enlace amida.

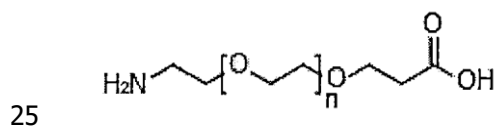
Se puede determinar que los residuos de aminoácidos presentes entre L1 y L2 están presentes en L1 o L2 adyacente, pero si la estructura de enlace en su conjunto coincide con la estructura de enlace de fórmula (XX) anterior, entonces la estructura de enlace se incluye en la fórmula (XX) anterior.

Con respecto a la estructura de enlace, los residuos de aminoácidos "unidos de manera lineal" significa que los residuos de aminoácidos están unidos entre sí para constituir una porción esencial que es esencial para unir el péptido cíclico y la molécula portadora. Los residuos de aminoácidos neutros no necesitan ser contiguos.

15 En un modo preferido, el residuo de aminoácido neutro contenido en L1 es un residuo de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gly, Ser, D-Ser, N-metilglicina (NMeG) y β-alanina (bAla). L1 puede ser un oligopéptido que consta de 3 a 6 (por ejemplo, 3, 4, 5 ó 6) residuos de aminoácidos, preferiblemente un oligopéptido que consta de 4 o 5 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente un oligopéptido que consta de 4 residuos de aminoácidos.

20 En un modo preferido, la cadena de polioxilalquileo contenida en la estructura principal de L2a puede ser una cadena de PEG. En este caso, el residuo de aminoácido no natural que contiene una cadena de PEG en la estructura principal puede ser un residuo de un aminoácido representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula química 140]



[en donde n representa un número entero de 5 a 40 (por ejemplo, 5, 11, 23 o 35)]. El grado total de polimerización de la cadena de PEG contenida en la estructura principal de L2a puede ser, por ejemplo, de 5 a 100, preferiblemente de 6 a 50, más preferiblemente de 10 a 50, incluso más preferiblemente de 10 a 40 o de 20 a 40. Alternativamente, el grado total de polimerización de la

30 cadena de PEG contenida en la estructura principal de L2a puede ser, por ejemplo, 5 o más, preferiblemente 6 o más, más preferiblemente 10 o más o 20 o más, y también, por ejemplo, 100 o menos, preferiblemente 50 o menos, más preferiblemente 40 o menos (por ejemplo, 6, 12, 18, 24, 30 o 36). El residuo de aminoácido no natural contenido en L2a, que contiene una cadena de

polioxialquileno en la estructura principal, puede ser un residuo de P6P, P12P, P24P o P36P, o una combinación de dichos residuos de aminoácidos no naturales. En un modo preferido, el residuo de aminoácido no natural contenido en L2a, que contiene una cadena de polioxialquileno en la estructura principal, puede ser un residuo de P6P, P12P, P24P o P24P, o una combinación de dichos residuos de aminoácidos no naturales.

En un modo preferido, el α -aminoácido de L2b puede ser glicina o N-metilglicina, más preferiblemente N-metilglicina. El oligopéptido de L2b puede ser oligo-N-metilglicina (también denominada en el presente documento "NMeG13") con 10 a 50, preferiblemente 10 a 20, más preferiblemente 10 a 15 e incluso más preferiblemente 13 N-metilglicinas consecutivas.

L2 puede contener además un residuo de un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno o glicano en una cadena lateral. Los ejemplos del aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno en una cadena lateral incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales que contienen PEG en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace, tal como KPEG, y ejemplos de los aminoácidos no naturales que contienen un glicano en una cadena lateral incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales que contienen un sialil glicano en una porción que sirve como cadena lateral en la estructura de enlace, tal como KSG. L2 puede contener dos o más residuos de aminoácidos no naturales que contienen una cadena de polioxialquileno o glicano en una cadena lateral, y preferiblemente contiene un residuo de un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileno o glicano en una cadena lateral. En un modo preferido, L2 puede contener un residuo de KPEG o un residuo de KSG.

En un modo preferido, las estructuras principales de los oligopéptidos de L1 y L2 pueden contener además de 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3), más preferiblemente 2 residuos de aminoácidos ácidos en total en una o más posiciones no adyacentes al grupo formador de anillos A o el grupo formador de anillos B. El término "estructura principal" en el presente documento significa una porción lineal que es esencial para unir el péptido cíclico y la molécula portadora. Los residuos de aminoácidos ácidos no necesitan ser contiguos. La posición del residuo de aminoácido ácido no está particularmente limitada siempre que no sea una posición adyacente al grupo formador de anillos A o al grupo formador de anillos B, pero el residuo de aminoácido ácido existe preferiblemente entre L1 y L2. Si un residuo de aminoácido ácido está presente entre L1 y L2, se puede determinar que el residuo de aminoácido ácido está presente en L1 o L2. El residuo de aminoácido ácido puede ser un residuo de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Asp, D-Asp, Glu y D-Glu, preferiblemente un residuo de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Asp, D-Asp y Glu, más preferiblemente un residuo de Asp. Lo más preferiblemente, dos residuos Asp están presentes en posiciones adyacentes a L1 y L2.

El número de residuos de aminoácidos ácidos contenidos en L1 y L2 se puede determinar

teniendo en cuenta el equilibrio de cargas de los residuos de aminoácidos contenidos en el péptido cíclico y la estructura de enlace. En este caso, una carga de un residuo de aminoácido ácido se define como + 1 si el residuo de aminoácido es monovalente y + 2 si el residuo de aminoácido es divalente. La carga de un residuo de aminoácido básico se define como -1 si el residuo de aminoácido es monovalente y -2 si el residuo de aminoácido es divalente. El número de residuos de aminoácidos ácidos contenidos en L1 y L2 se puede determinar de modo que las cargas de residuos de aminoácidos contenidas en el péptido cíclico y la estructura de enlace son más preferiblemente -4 a +1, más preferiblemente -2 a 0. Cuando las cargas de los residuos de aminoácidos contenidos en el péptido cíclico y la estructura de enlace están en el rango numérico anterior, el conjugado tiende a tener un excelente efecto inhibidor de TSP-1.

En un modo preferido, L1 puede ser un oligopéptido que contiene o consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser, NMeG-NMeG-NMeG-NMeG, bAla-bAla-bAla-bAla, o Gly-Gly-Glu-Gly-Gly. L1 es más preferiblemente un oligopéptido que contiene o consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly o Gly-Ser-Gly-Ser, incluso más preferiblemente un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly.

Si L1 contiene un residuo de aminoácido ácido, L1 puede ser un oligopéptido que consiste en una secuencia de dos residuos de aminoácidos ácidos, preferiblemente un residuo de Asp, unido al extremo C de Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser, NMeG-NMeG-NMeG-NMeG, o bAla-bAla-bAla-bAla.

En un modo preferido, L2 puede ser un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P, KSG-P12P-P12P, Asp-Asp-P12P, Asp-Asp-P12P-P12P, o Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P. L2 es más preferentemente un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P.

En un modo más preferido, L3 puede ser un residuo Lys. El grupo carboxilo del residuo Lys en L3 puede ser un grupo aminocarbonilo.

En un modo preferido, la estructura de enlace puede ser una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly o Gly-Ser-Gly-Ser, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P, y L3 es un residuo de Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia KSG-P12P-P12P, y L3 es un residuo de Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P, y L3 es un K de residuo de Lys;

una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia o Gly-Ser-Gly-Ser, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P-P12P, y L3 es un residuo de Lys; o

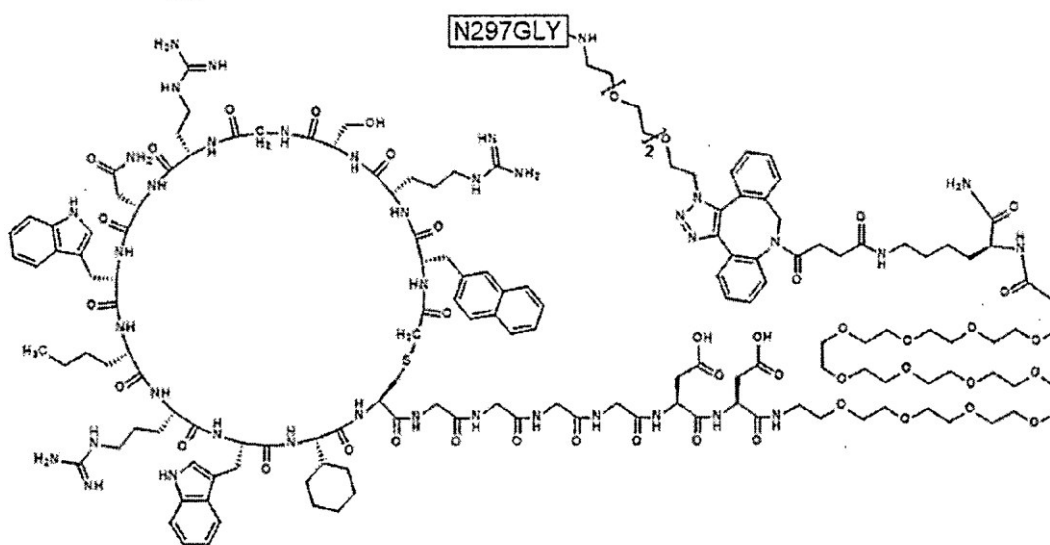
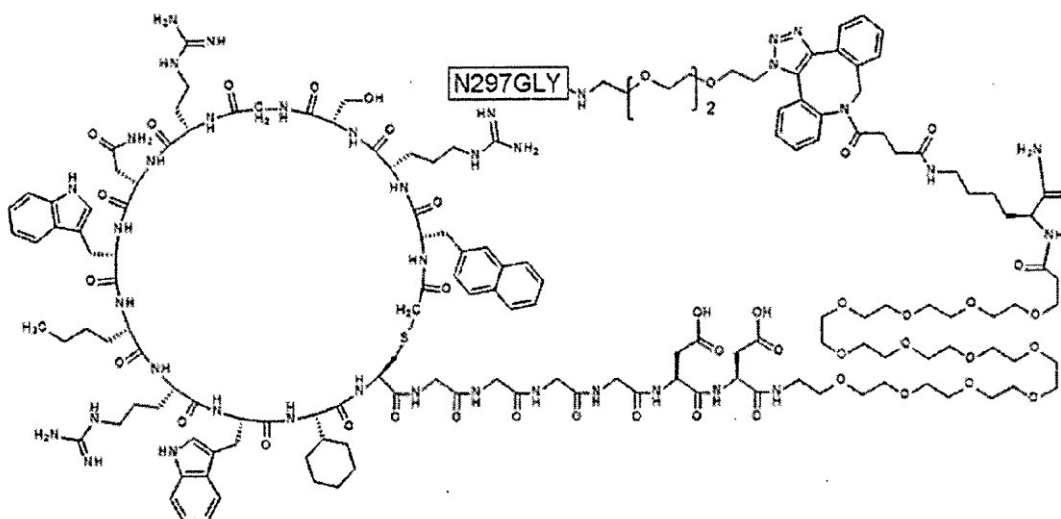
una estructura en la que L1 es un oligopéptido que consiste en la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly, L2a es un oligopéptido que consiste en la secuencia Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P, y L3 es un residuo de

Lys.

En la estructura anterior, el grupo carboxilo del residuo de Lys en L3 puede ser un grupo aminocarbonilo.

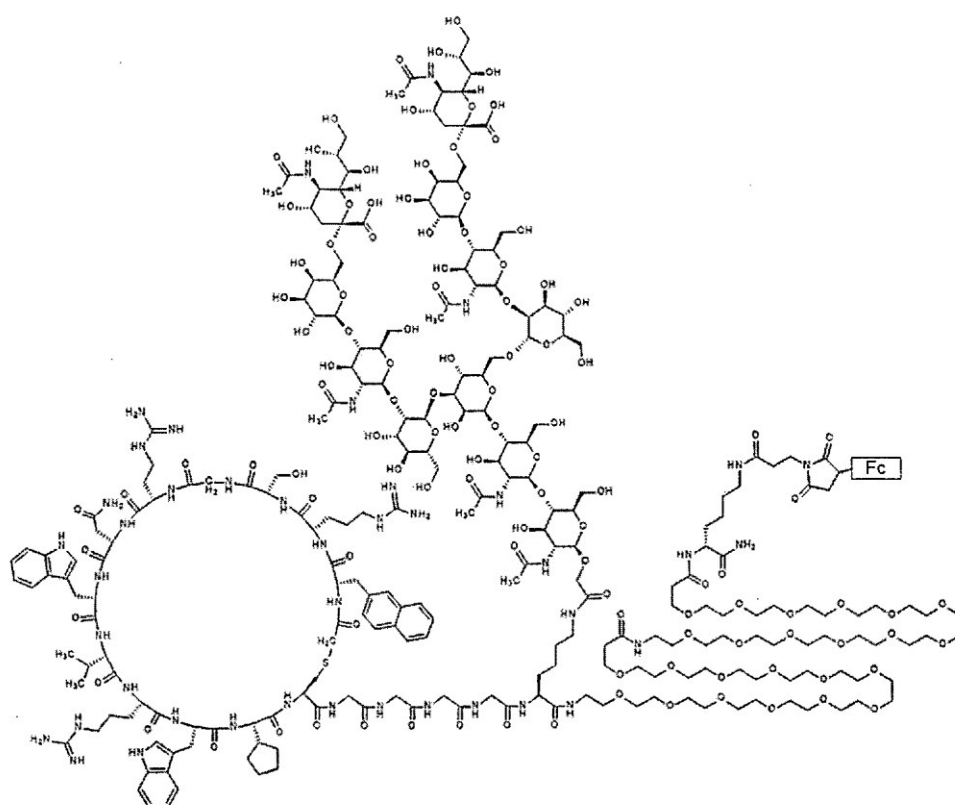
- 5 Un modo aún más preferido de la estructura del péptido cíclico y de la estructura de enlace está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:

[Fórmula química 141]



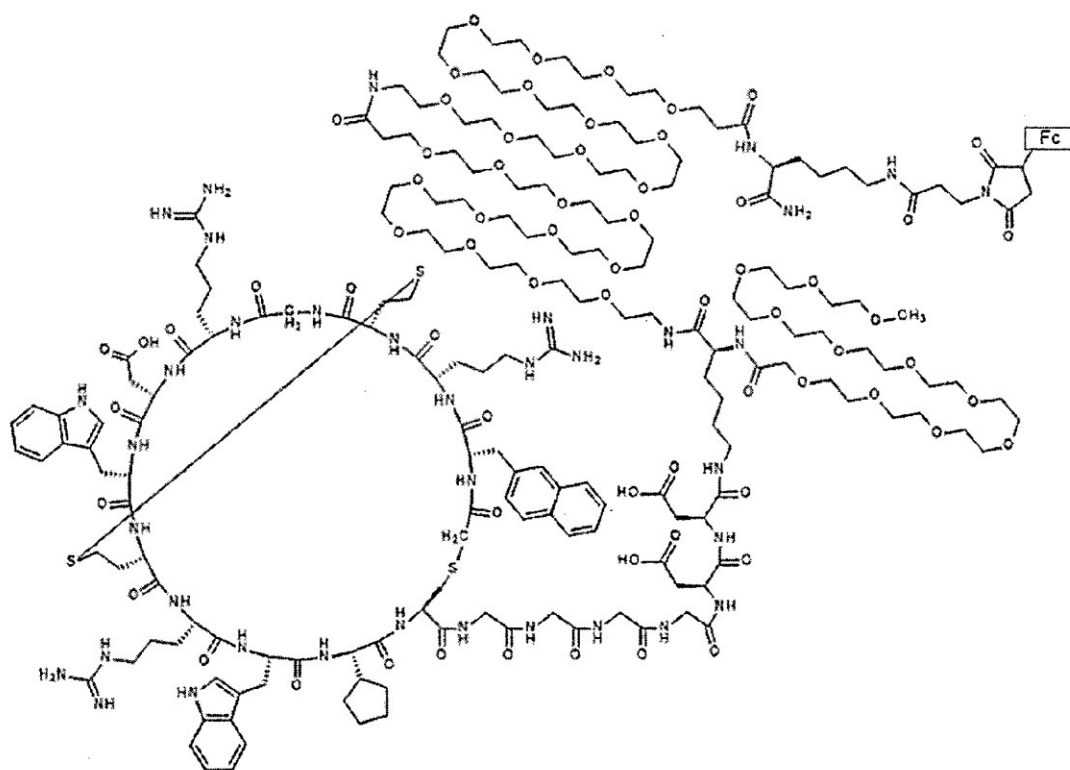
[Fórmula química 142]

[Fórmula química 143]



y

[Fórmula química 144]



en donde

N297GLY representa la unión al extremo no reductor del glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc; y

5 Fc representa la unión al grupo tiol de un residuo de cisteína de la molécula que contiene Fc.) Las estructuras que se muestran arriba son estructuras de péptidos y de enlace en el Conjugado-67, el Conjugado-64, el Conjugado-56 y el Conjugado-4, cada uno de los cuales se describe en los Ejemplos siguientes.

10 El conjugado de la presente invención puede ser de cualquier combinación del péptido cíclico, de la molécula portadora y de la estructura de enlace descritos anteriormente. En un modo preferido, el péptido cíclico y la estructura de enlace se pueden seleccionar de cualquier combinación del péptido cíclico y de las estructuras de enlace descritas anteriormente, y la molécula portadora se puede seleccionar de un fragmento Fc.

En un modo más preferido, el péptido cíclico es el Péptido-11, el Péptido-115 o el Péptido-121 en los ejemplos, y la estructura de enlace puede ser
 15 Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P,
 Gly-Gly-Gly-Gly-KSG-P12P-P12P,
 Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Asp-P12P,
 Gly-Ser-Gly-Ser-Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P,
 20 Gly-Ser-Gly-Ser-Asp-Asp-P12P-P12P, o

Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P.

En un modo más preferido, la estructura del péptido cíclico y de enlace es cualquiera seleccionada del Péptido-13 al Péptido-109 en los Ejemplos, y la molécula portadora puede ser Fc-A o Fc-C.

5 En un modo más preferido, el péptido cíclico y la estructura de enlace es cualquiera seleccionada del Péptido-39, Péptido-75, Péptido-76 y Péptido-79 en los Ejemplos, y la molécula portadora puede ser Fc-A.

En un modo más preferido, el péptido cíclico y la estructura de enlace es cualquiera seleccionada del Péptido-16, Péptido-22, Péptido-46, Péptido-55 y Péptido-68 en los Ejemplos, y la
10 molécula portadora puede ser Fc-C.

Cuando el conjugado de la presente invención contiene un grupo básico, el conjugado se puede combinar con un ácido para formar una sal del mismo, y dicha sal se incluye en esta invención. Ejemplos de dicha sal incluyen sal de ácido inorgánico, sal de ácido orgánico, sal de aminoácido y sulfonato. Ejemplos de sal de ácido inorgánico incluyen hidrocloreuro, hidrobromato, sulfato, nitrato
15 y fosfato. Los ejemplos de sal de ácido orgánico incluyen acetato, oxalato, malonato, fumarato, maleato, ftalato y trifluoroacetato. Ejemplos de sal de aminoácido incluyen glutamato y aspartato. Los ejemplos de sulfonato incluyen metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, 2,4-dimetilbencenosulfonato, 2,4,6-trimetilbencenosulfonato, 4-etilbencenosulfonato y naftalenosulfonato. Una forma preferida de sal farmacéuticamente aceptable del conjugado de esta invención es un
20 acetato, un clorhidrato o un trifluoroacetato, más preferiblemente un acetato.

Cuando el conjugado de la presente invención contiene un grupo ácido, el conjugado se puede combinar con una base para formar una sal del mismo, y dicha sal se incluye en esta invención. Ejemplos de dicha sal incluyen sal metálica, sal de amina inorgánica, sal de amina orgánica y sal de aminoácido. Ejemplos de sales metálicas incluyen: sales de metales alcalinos tales como sal de sodio,
25 sal de potasio y sal de litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio; así como sal de aluminio, sal de hierro, sal de zinc, sal de cobre, sal de níquel y sal de cobalto. Ejemplos de sal de amina inorgánica incluyen sal de amonio. Los ejemplos de sal de amina orgánica incluyen sal de morfina, sal de glucosamina, sal de etilendiamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitohexilamina, sal de dietanolamina, sal de piperazina y sal de
30 tetrametilamonio. Ejemplos de sal de aminoácido incluyen sal de lisina y sal de arginina.

El conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención se puede utilizar en forma cristalina. Tal cristal puede formarse exclusivamente a partir del conjugado o de su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención, o el conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede formarse como un cocrystal o un solvato (por ejemplo, hidrato). Un tipo de
35 conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención se puede usar solo, o se pueden

usar dos o más tipos del mismo en combinación según sea apropiado.

El conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención puede formar un compuesto isotópico en el que uno o más átomos constitucionales se sustituyen con un átomo isotópico en una proporción no natural. El átomo isotópico puede ser radiactivo o no radiactivo, y ejemplos del mismo incluyen deuterio (^2H ; D), tritio (^3H ; T), carbono-14 (^{14}C) y yodo-125 (^{125}I). Los compuestos marcados con un átomo isotópico radiactivo se pueden usar como agentes terapéuticos o profilácticos para diversas enfermedades, reactivos de investigación (por ejemplo, reactivo de ensayo), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agente de diagnóstico por imágenes) o similares. Esta invención también incluye dicho compuesto isotópico radiactivo o no radiactivo.

4. Método para producir conjugado

El conjugado de la presente invención se puede producir uniendo apropiadamente los intermedios tales como el péptido cíclico, la molécula de enlace y la molécula portadora descritos anteriormente mediante el uso de reacciones conocidas en el campo de la química sintética orgánica. El orden de producción de los mismos no está particularmente limitado y se pueden adoptar varios métodos mediante un procedimiento convencional según las estructuras de los intermedios y el compuesto de interés. Un grupo funcional transportado por cada intermedio puede activarse, inactivarse, protegerse con un grupo protector y desprotegerse adecuadamente, por ejemplo, mediante un procedimiento convencional según las etapas de producción.

Los intermedios o el producto final en cada etapa de reacción se separan y purifican adecuadamente y se someten a la siguiente reacción o se utilizan como un producto farmacéutico a granel o un reactivo.

El conjugado de esta invención se puede preparar mediante, por ejemplo, un método que incluye las etapas (1) a (6) de la siguiente manera:

(1) sintetizar un oligopéptido X-A-L o Z-B-L representado por la siguiente fórmula desde el lado C-terminal mediante un método de síntesis en fase sólida:

$$\text{X}_{\text{aa}1}-\text{X}_{\text{aa}2}-\text{X}_{\text{aa}3}-\text{X}_{\text{aa}4}-\text{X}_{\text{aa}5}-\text{X}_{\text{aa}6}-\text{X}_{\text{aa}7}-\text{X}_{\text{aa}8}-\text{X}_{\text{aa}9}-\text{X}_{\text{aa}10}-\text{X}_{\text{aa}11}-\text{A}_0-\text{L1}-\text{L2}-\text{L3}$$

$$\text{Z}_{\text{aa}1}-\text{Z}_{\text{aa}2}-\text{Z}_{\text{aa}3}-\text{Z}_{\text{aa}4}-\text{Z}_{\text{aa}5}-\text{Z}_{\text{aa}6}-\text{Z}_{\text{aa}7}-\text{Z}_{\text{aa}8}-\text{Z}_{\text{aa}9}-\text{Z}_{\text{aa}10}-\text{Z}_{\text{aa}11}-\text{Z}_{\text{aa}12}-\text{B}_0-\text{L1}-\text{L2}-\text{L3}$$

en donde

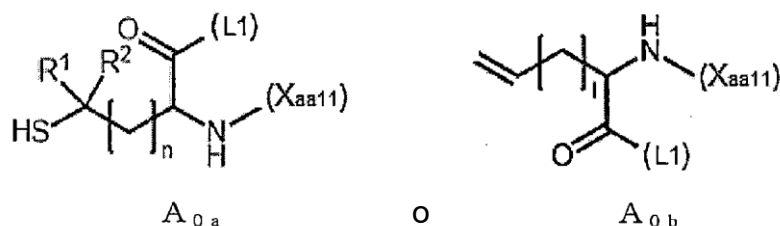
$\text{X}_{\text{aa}1}$ a $\text{X}_{\text{aa}11}$ son como se definen en la fórmula 1 (siempre que en la estructura de $\text{X}_{\text{aa}3}$ y $\text{X}_{\text{aa}8}$, los grupos tiol permanezcan como están sin formar un enlace);

L1 a L3 son como se definen en la fórmula (XX) (siempre que cuando L2 comprenda un residuo de un aminoácido no natural que comprende un glicano en una cadena lateral, el residuo se reemplace con un residuo de Lys);

$\text{Z}_{\text{aa}1}$ a $\text{Z}_{\text{aa}12}$ son como se definen en la fórmula (X);

A_0 es un residuo representado por la fórmula

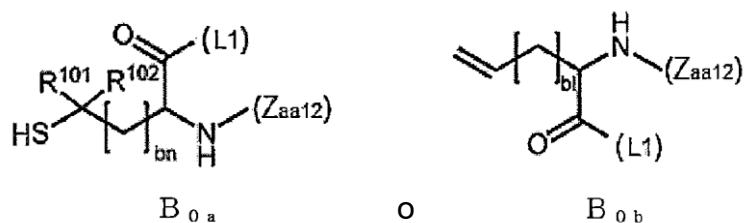
[Fórmula química 145]



(en el que (X_{aa11}) representa un punto de unión a X_{aa11} , $(L1)$ representa un punto de unión al residuo de aminoácido N-terminal en $L1$, y l y n son como se definen con respecto a la fórmula (I);

- 5 B_0 es un residuo representado por la fórmula

[Fórmula química 146]



(en el que (Z_{aa12}) representa un punto de unión a Z_{aa12} , $(L1)$ representa un punto de unión al residuo de aminoácido N-terminal en $L1$, y bl y bn son como se definen con respecto a la fórmula

- 10 (X),

(2) ciclar el oligopéptido sintetizado en la etapa (1) para producir un péptido cíclico mediante

(a) unir el grupo amino N-terminal de X_{aa1} a A_{0a} para formar cualquiera de los grupos formadores de anillo A_1 a A_3 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{10}) en el oligopéptido X-A-L;

- 15 (b) unir el grupo amino N-terminal de X_{aa1} a A_{0b} para formar el grupo formador de anillos A_4 a A_5 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{10}) en el oligopéptido X-A-L;

(c) unir el grupo amino N-terminal de Z_{aa1} a B_{0a} para formar cualquiera de los grupos formadores de anillos B_1 a B_4 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{110}) en el oligopéptido Z-B-L;

- 20 (d) unir el grupo amino N-terminal de Z_{aa1} a B_{0b} para formar el grupo formador de anillos B_5 a B_6 (que están acoplados a $L1$ en la posición de R^{110}) en el oligopéptido Z-B-L;

(3) cuando el oligopéptido X-A-L se sintetiza en el paso (1), permitiendo que los grupos tiol de X_{aa3} y X_{aa8} del oligopéptido X-A-L ciclado en el paso (2) formen un enlace representado por -S-S-, -S-CH₂-S- o -S-X-S- (donde X es como se define en la fórmula (I) para proporcionar un péptido bicíclico;

- 25 (4) cuando $L2$ comprende un residuo de un aminoácido no natural que comprende un glicano en una cadena lateral, que se reemplaza con un residuo de Lys en el oligopéptido X-A-L o Z-B-L, introducir un glicano en el residuo de Lys para formar de ese modo un residuo de un aminoácido no

natural que comprende un glicano en una cadena lateral;

(5) unir un grupo maleimida o un grupo reactivo que contiene un anillo 1,2,3-triazol a L3; y

(6) unir el péptido cíclico a la molécula portadora a través del grupo reactivo del paso (5).

En la etapa (1), un oligopéptido que sirve como origen del péptido cíclico y un oligopéptido
 5 que sirve como origen de la estructura de enlace se sintetizan desde el lado C-terminal como un oligopéptido. La síntesis del oligopéptido se puede llevar a cabo según un método de síntesis en fase sólida común usando, por ejemplo, un grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo (grupo Fmoc) como grupo protector del grupo amino. La síntesis en fase sólida se puede realizar usando un sintetizador automático disponible comercialmente (por ejemplo, Syro II (producido por Biotage Japan), Liberty
 10 Blue (producido por CEM)). Con el uso de un sintetizador automático de péptidos, por ejemplo, los aminoácidos protegidos con un grupo protector del grupo amino (por ejemplo, grupo Fmoc) se acoplan a un soporte sólido (por ejemplo, Rink Amide Resin AM (producida por Novaviochem), resina de cloruro de 2-clorotritilo (producida por Novaviochem)) de manera gradual comenzando con el aminoácido C-terminal (el aminoácido C-terminal es Y_{aa10}). La desprotección de grupos amino se puede realizar
 15 mediante un método conocido por los expertos (por ejemplo, usando 20% de piperidina/1-metil-2-pirrolidinona para eliminar grupos Fmoc). Los aminoácidos hasta el extremo N se acoplan para producir el oligopéptido X-A-L o Z-B-L.

En el oligopéptido X-A-L o Z-B-L, donde L2 contiene un residuo de un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileo en una cadena lateral, el residuo se puede acoplar
 20 mediante un procedimiento convencional. Por ejemplo, primero se acopla un residuo de Lys a una porción sintetizada, y un compuesto que contiene una cadena de polioxialquileo (por ejemplo, PEG O11A como se describe en el Procedimiento de Síntesis 3 en los Ejemplos) se une a un grupo amino de una porción del residuo de Lys que es una cadena lateral en la estructura de enlace (por ejemplo, grupo α amino del residuo de Lys en el Procedimiento de Síntesis 3 en los Ejemplos), mediante el cual
 25 se puede acoplar un residuo de un aminoácido no natural que contiene una cadena de polioxialquileo en una cadena lateral.

En el paso (2), el oligopéptido sintetizado en el paso (1) se cicla formando grupos formadores de anillos A_1 a A_5 o B_1 a B_6 para producir un péptido cíclico. Para formar un grupo formador de anillos, primero se desprotege el grupo amino del residuo de aminoácido N-terminal del oligopéptido y, si es
 30 necesario, se puede introducir un grupo para formar un grupo formador de anillos en el grupo amino para formar un péptido cíclico.

En el paso (2) (a) o (c), cuando se forma cualquiera de los grupos formadores de anillos A_1 a A_3 y B_1 a B_3 , por ejemplo, $-\text{COCH}_2\text{X}$ (donde X es un grupo saliente tal como Cl) se introduce en el grupo amino N-terminal. Específicamente, se puede hacer reaccionar ácido cloroacético con el grupo
 35 amino N-terminal para introducir un grupo clorometilcarbonilo o similar en el grupo amino. $-\text{COCH}_2\text{X}$

se hace reaccionar con el grupo tiol de A_{0a} o B_{0a} para producir un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos A_1 o B_1 . Además, la oxidación de un grupo sulfuro del grupo formador de anillos A_1 o B_1 produce un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos A_2 , A_3 , B_2 o B_3 .

En el paso (2) (b), cuando se forma el grupo formador de anillos A_4 o A_5 , por ejemplo, se introduce $-\text{CO}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ en el grupo amino N-terminal. La metátesis de olefinas de $-\text{CO}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ y la cadena lateral $-(\text{CH}_2)_l\text{CH}=\text{CH}_2$ de A_{0b} produce un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos A_4 . Además, la reducción del doble enlace carbono-carbono en el grupo formador de anillos A_4 produce un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos A_5 .

En el paso (2) (c), cuando se forma el grupo formador de anillos B_4 , se hace reaccionar un grupo tiol de Z_{aa1} o Z_{aa2} con un grupo tiol de B_{0a} , obteniendo así un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos B_4 . Se puede formar un enlace disulfuro mediante un método convencional (por ejemplo, método de oxidación de yodo).

En el paso (2) (b), cuando se forma el grupo formador de anillos B_5 o B_6 , por ejemplo, se introduce $-\text{CO}(\text{CH}_2)_{bk}\text{CH}=\text{CH}_2$ en el grupo amino N-terminal. La metátesis de olefinas de $-\text{CO}(\text{CH}_2)_{bk}\text{CH}=\text{CH}_2$ y la cadena lateral $-(\text{CH}_2)_bl\text{CH}=\text{CH}_2$ de B_{0b} produce un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos B_5 . Además, la reducción del doble enlace carbono-carbono en el grupo formador de anillos B_5 produce un péptido cíclico que tiene el grupo formador de anillos B_6 .

Luego, el péptido resultante se escinde de la resina peptídica mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, condiciones que usan ácido trifluoroacético/etanoditiol/triisopropilsilano/agua para escindir de Rink Amide Resin AM). Después de recuperar un péptido crudo mediante precipitación con éter, el péptido de interés puede purificarse mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa).

El paso (3) consiste en formar un péptido bicíclico cuando el oligopéptido X-A-L se sintetiza en el paso (1). Los péptidos cíclicos obtenidos en el paso (2) pueden someterse a un método convencional (por ejemplo, método de oxidación de yodo) para formar un enlace tal como un enlace disulfuro entre X_{aa3} y X_{aa8} , obteniendo así un péptido bicíclico. Después de recuperar un péptido crudo mediante precipitación con éter, el péptido de interés puede purificarse mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa).

El paso (4) es formar un residuo de un aminoácido no natural que contiene un glicano en una cadena lateral del oligopéptido X-A-L o Z-B-L cuando el residuo del aminoácido no natural que contiene el glicano en una cadena lateral de L2 se reemplaza con un residuo de Lys. La conversión del residuo de Lys se puede llevar a cabo uniendo un compuesto que contiene un glicano (por ejemplo, SGA como se describe en el Procedimiento de síntesis 5 en los Ejemplos) a un grupo ϵ amino del residuo de Lys mediante un procedimiento convencional. Después de la reacción, el péptido de interés puede

purificarse mediante un procedimiento convencional (por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa).

En el paso (5), un grupo reactivo capaz de formar un grupo maleimida o un anillo de 1,2,3-triazol para unir el oligopéptido X-A-L o Z-B-L a la molécula portadora se une a L3. La unión del grupo maleimida al oligopéptido se puede llevar a cabo mediante un procedimiento convencional usando un reactivo tal como 3-maleimidopropionato de N-succinimidilo. Para formar el anillo de 1,2,3-triazol, se puede utilizar una reacción de cicloadición como CuAAC y SPAAC. Dependiendo de la reacción a utilizar, se selecciona un grupo reactivo que incluye un grupo acetileno o DBCO como grupo reactivo capaz de formar un anillo de 1,2,3-triazol. En un modo preferido, se utiliza SPAAC para formar un anillo de 1,2,3-triazol y, en este caso, el grupo reactivo que incluye DBCO puede seleccionarse como un grupo reactivo capaz de formar un anillo de 1,2,3-triazol. La unión del grupo de reacción que incluye DBCO al oligopéptido se puede llevar a cabo mediante un procedimiento convencional, por ejemplo, usando un reactivo tal como éster de dibenzociclooctin-N-hidroxisuccinimidilo.

Las moléculas portadoras en el paso (6) se preparan de acuerdo con el método descrito en III anterior en "1. Molécula portadora". Dependiendo de un grupo reactivo unido al oligopéptido en el paso (5), la molécula portadora se puede preparar para que tenga un grupo reactivo apropiado. Por ejemplo, en el caso del acoplamiento con un oligopéptido que tiene un grupo maleimida, se puede preparar una molécula portadora que tiene un grupo tiol. En el caso del acoplamiento con un oligopéptido que tiene un grupo reactivo capaz de formar un anillo de 1,2,3-triazol, por ejemplo, se puede introducir un grupo reactivo que contiene un grupo azida en la posición 2 del ácido siálico en el extremo no reductor de la molécula que contiene Fc remodelada con glicano. Las moléculas que tienen un grupo reactivo tal como un grupo azida en el extremo no reductor de los glicanos unidos a N297 pueden sintetizarse en el paso de remodelación de glicanos de las moléculas que contienen Fc. Por ejemplo, la remodelación de glicano se puede realizar usando una molécula donadora de glicano en la que un grupo azida está unido a la posición 2 del ácido siálico en el extremo no reductor.

Un método conocido tal como el método descrito en III anterior bajo "3. Estructura de enlace" se puede aplicar a un enlace del péptido cíclico a la molécula portadora, lo que se puede llevar a cabo, por ejemplo, según los Procedimientos de Síntesis 8 a 10 en los Ejemplos.

El conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención tiene actividad inhibidora de TSP1 y tiene una IC₅₀ de 500 nM o menos, preferiblemente 200 nM o menos, medida mediante un ensayo de inhibición de la adhesión celular usando TSP1 humana y células endoteliales vasculares como se describe a continuación en la sección de Ejemplos. Por lo tanto, el conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención tiene la capacidad de bloquear la adhesión de células endoteliales vasculares a TSP1 y, por tanto, son útiles como agentes mejoradores del flujo sanguíneo. Cuando la molécula portadora es una molécula que contiene Fc, y

dos moléculas que contienen Fc están reticuladas para formar una molécula conjugada (es decir, dímero), la concentración molar en el cálculo de IC_{50} se determina usando el peso molecular del dímero. Cuando la molécula portadora es una molécula que contiene Fc, la molécula que contiene Fc no está reticulada y el conjugado permanece monomérico (por ejemplo, unido a un péptido cíclico a través de un grupo tiol generado por reducción de un enlace disulfuro en la parte bisagra de la molécula que contiene Fc), la concentración molar en el cálculo de IC_{50} se determina utilizando el doble del peso molecular del monómero. Además, cuando la molécula portadora es una molécula que contiene Fc que está unida a un péptido cíclico mediante un grupo tiol generado al reducir el enlace disulfuro en la parte bisagra, varios glicanos pueden unirse a la molécula que contiene Fc. En este caso, la concentración molar en el cálculo de IC_{50} se calcula utilizando el peso molecular del producto desglicosilado.

5. Composición farmacéutica

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende, como componente activo, el conjugado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención (en lo sucesivo denominada "la composición farmacéutica II de la presente (esta) invención"). La composición farmacéutica II de esta invención tiene excelente actividad inhibidora de TSP1 y una IC_{50} de 500 nM o menos, preferiblemente 200 nM o menos, medida mediante un ensayo de inhibición de la adhesión celular usando TSP1 humana y células endoteliales vasculares como se describe a continuación en la sección de Ejemplos. Por lo tanto, la composición farmacéutica II de esta invención es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 (por ejemplo, diversas enfermedades, incluidas enfermedades que pueden ser causadas por inhibición de la angiogénesis, enfermedades que puede ser causada por un aumento de la trombogénesis, enfermedades inflamatorias, enfermedades que pueden ser causadas por el deterioro de la función celular renal, enfermedades que pueden ser causadas por la supresión de la vasorelajación, enfermedades isquémicas y enfermedades cancerosas y diversos síntomas, incluida la crisis vasooclusiva asociada con; anemia de células falciformes, inhibición de la angiogénesis, necrosis tisular, resistencia a la insulina y heridas comunes). Ejemplos específicos de enfermedades o síntomas son los descritos para la composición farmacéutica I de la presente invención.

La composición farmacéutica II de la presente invención tiene una excelente actividad inhibidora de TSP1 y puede tener un efecto de mejora del flujo sanguíneo y, por lo tanto, es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mejorando el flujo sanguíneo. Ejemplos de tales enfermedades incluyen isquemia crónica que amenaza las extremidades, isquemia crítica de las extremidades, trastorno vascular periférico, infarto de miocardio, angina, lesión renal y lesión por reperusión de isquemia. Ejemplos de isquemia crónica que amenaza una extremidad incluyen el pie diabético, y ejemplos de pie diabético incluyen la úlcera del pie diabético.

En un modo preferido, la composición farmacéutica II de esta invención es útil para el tratamiento o profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza las extremidades, y es, por ejemplo, útil para acelerar la cicatrización de heridas en pacientes con isquemia crítica de extremidades y para mejorar el pronóstico después del
5 tratamiento endovascular para la isquemia crítica de extremidades.

Se sabe que la expresión de TSP1 aumenta en los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores de pacientes con isquemia crítica de las extremidades. Aunque no se desea quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la composición farmacéutica II de la presente invención bloquea la adhesión de células endoteliales vasculares a TSP1 y, por lo tanto, puede promover la angiogénesis o
10 vasodilatación inhibida por TSP1. En virtud de esta función, la composición farmacéutica II de esta invención puede acelerar la curación de heridas en pacientes con isquemia crítica de extremidades y mejorar el pronóstico (por ejemplo, prevenir la reestenosis) cuando se combina con un tratamiento endovascular con un catéter o similar.

La composición farmacéutica II de la presente invención se puede formular en una preparación
15 farmacéutica mezclando el péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención con cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable apropiado. Por ejemplo, la composición farmacéutica II de esta invención se puede administrar como preparaciones orales tales como tabletas, cápsulas y gránulos, o como preparaciones parenterales tales como inyectables y agentes de absorción percutánea.

20 Tales preparaciones farmacéuticas se preparan mediante un método bien conocido usando diferentes aditivos, incluyendo excipiente, aglutinante, desintegrante, lubricante, emulsionante, estabilizador, diluyente, disolvente inyectable, solubilizante, agente de suspensión, agente isotonizante, regulador, analgésico, antiséptico, y antioxidante. Ejemplos específicos de aditivos son como se describen para la composición farmacéutica I de la presente invención.

25 El sujeto al que se le administrará la composición farmacéutica II de la presente invención es, por ejemplo, un animal mamífero, preferiblemente un ser humano.

La vía de administración de la composición farmacéutica II de la presente invención puede ser administración oral o parenteral, y se puede seleccionar una vía de administración adecuada dependiendo de la enfermedad a tratar. Además, la vía de administración de dicha composición
30 farmacéutica inventiva puede ser administración sistémica o tópica. Ejemplos de administraciones parenterales incluyen administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intracutánea, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración percutánea, administración intraósea y administración intraarticular. Un modo preferido de la vía de administración de dicha composición farmacéutica II de la invención es la
35 administración intravenosa, la administración subcutánea o la administración percutánea.

El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención se puede administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva. La expresión "cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva" significa una cantidad necesaria para que un agente activo muestre un efecto terapéutico o profiláctico teniendo en cuenta una enfermedad, forma de dosificación y vía de administración concretas, y se determina, según corresponda, dependiendo de la especie de un sujeto, tipo de enfermedad, síntoma, sexo, edad, condición preexistente y otros elementos.

La dosis del péptido cíclico I o II o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención se determina, según corresponda, dependiendo de la especie de un sujeto, tipo de enfermedad, síntoma, sexo, edad, condición preexistente y otros elementos. Los adultos humanos pueden tomar medicación con dicho péptido cíclico I o II de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una dosis generalmente de 0.1 a 1000 mg/kg, preferiblemente de 0.1 a 10 mg/kg, una vez cada 1 a 7 días, o dos o tres o más veces al día.

La composición farmacéutica II de la presente invención se puede combinar con al menos un agente terapéutico o terapia conocida. Por ejemplo, durante el tratamiento de isquemia crítica de extremidades, la composición farmacéutica II de esta invención se puede administrar antes, después o simultáneamente con el tratamiento endovascular con un catéter o similar.

El conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención se puede administrar mediante un stent liberador de fármaco (DES). El stent liberador de fármaco se refiere a un stent que tiene un fármaco activo en su superficie para que pueda eludir gradualmente el fármaco activo después de colocarlo en un vaso sanguíneo.

Además, la presente invención se dirige a un método para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o síntoma, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del conjugado o sal farmacológicamente aceptable del mismo de esta invención a un sujeto que lo necesita.

Como se menciona en la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva" significa una cantidad necesaria para que un agente activo muestre un efecto terapéutico o profiláctico teniendo en cuenta una enfermedad, forma de dosificación y vía de administración concretas, y se determina, según corresponda, dependiendo de la especie de un sujeto, tipo de enfermedad, síntoma, sexo, edad, condición preexistente y otros elementos.

Como se hace referencia en la presente invención, el "sujeto" es, por ejemplo, un animal mamífero, preferiblemente un ser humano.

Como se hace referencia en la presente invención, el término "administración" incluye administraciones orales y parenterales, y puede ser administraciones sistémicas o tópicas. Ejemplos de administraciones parenterales incluyen administración intravenosa, administración intraarterial,

administración intramuscular, administración intracutánea, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración percutánea, administración intraósea y administración intraarticular. Un modo preferido de la "administración" como se menciona en esta invención es la administración intravenosa, la administración subcutánea o la administración percutánea.

5 Los ejemplos de "enfermedad(es) o síntoma(s)" a los que se hace referencia en la presente invención incluyen enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1. Ejemplos específicos de enfermedades o síntomas son los descritos para la composición farmacéutica I de la presente invención. En un modo preferido, el método para el tratamiento o la profilaxis de esta invención es útil para el tratamiento o la profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza las extremidades, y es, por ejemplo, útil para acelerar la cicatrización de heridas en pacientes con isquemia crítica de extremidades y para mejorar el pronóstico después del tratamiento endovascular para la isquemia crítica de extremidades.

10 El conjugado de la presente invención puede tener un perfil PK-PD mejorado en comparación con el péptido cíclico I o II de la presente invención. Por lo tanto, según el método para el tratamiento o la profilaxis con la composición farmacéutica II de esta invención y el conjugado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma de esta invención permite el tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 a una menor frecuencia de administración.

20 A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos de trabajo y de prueba, pero el alcance de esta invención no se limita a estos ejemplos.

EJEMPLOS

[Ejemplo de síntesis]

25 1. Síntesis del Péptido-1 al Péptido-12 y síntesis del Péptido-115, Péptido-119 y Péptido-125 al Péptido-139

30 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-1 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 19%) y Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 16%) como se muestra a continuación. El rendimiento indica el resultado para un compuesto representativo de cada procedimiento de síntesis.

También se sintetizaron del Péptido-2 al Péptido-12 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-115 y el Péptido-119 se sintetizaron según el Procedimiento de síntesis 1 como se muestra a continuación.

35 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-125 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1, el procedimiento de síntesis 11 y el procedimiento de síntesis 14 como se

muestran a continuación.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-126, Péptido-128, Péptido-129, Péptido-134, Péptido-135 y Péptido-138 se sintetizaron según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1, el procedimiento de síntesis 11 y el procedimiento de síntesis 12 como se muestran a continuación.

- 5 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-127, Péptido-130 a Péptido-133, Péptido-136, Péptido-137 y Péptido-139 se sintetizaron según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1, el procedimiento de síntesis 11 y el procedimiento de síntesis 13 como se muestran a continuación.

CUADRO 1

Péptido	PM	Proc. 1	Proc. 2	Proc. 3	Condición. LC-MS	Valor medido MS	Valencia MS	Rt (min)
1	1713.02	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	856.88	2	1.51
2	1699.00	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	849.87	2	1.52
3	1689.98	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	845.35	2	2.09
4	1689.98	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	845.35	2	1.72
5	1705.00	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	852.86	2	1.50
6	1643.96	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	822.36	2	1.55
7	1669.99	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	835.37	2	1.66
8	1684.02	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	842.38	2	1.57
9	1714.01	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	857.37	2	1.53
10	1727.05	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	863.87	2	1.52
11	1728.03	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	864.38	2	1.53
12	1701.01	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4		Condición 1	850.88	2	2.07
125	1784.10	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 14	Condición 1	892.39	2	1.78
126	1714.01	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	857.37	2	1.77
127	1742.06	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	871.39	2	1.78
128	1699.98	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	850.36	2	1.70
129	1714.01	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	857.37	2	1.80
130	1714.01	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	857.37	2	1.74
131	1728.03	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	864.38	2	1.75
132	1728.03	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	864.38	2	1.72
133	1756.09	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	878.39	2	1.81
134	1742.06	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	871.39	2	1.85
135	1742.06	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	871.39	2	1.82
136	1756.09	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	878.39	2	1.83
137	1742.06	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	871.39	2	1.80
138	1728.03	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 12	Condición 1	864.38	2	1.77
139	1742.06	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 11	Procedimiento de síntesis 13	Condición 1	871.39	2	1.81
115	1666.91	Procedimiento de síntesis 1			Condición 1	1666.91	1	1.47
119	1667.89	Procedimiento de síntesis 1			Condición 1	834.40	2	1.48

Los residuos que constituyen los péptidos bicíclicos Péptido-1 a Péptido-12 se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. Los residuos de HCY en las posiciones 3 y 8 tienen enlaces disulfuro formados en ellos.

- 5 Los residuos que constituyen el péptido-115 y péptido-119 se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico.

- 10 Los residuos que constituyen el péptido bicíclico péptido-125 se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. Los residuos HCY en las posiciones 3 y 8 también tienen grupos tiol que forman un enlace representado por $-S-CH_2-CO-CH_2-S-$ (también denominado "puente de acetona").

- 15 Los residuos que constituyen los péptidos bicíclicos Péptido-126, Péptido-128, Péptido-129, Péptido-134, Péptido-135 y Péptido-138 se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. Los residuos de cisteína, los residuos de HCY o los residuos de Pen en las posiciones 3 y 8 también tienen enlaces disulfuro formados en los mismos.

- 20 Los residuos que constituyen los péptidos bicíclicos Péptido-127, Péptido-130 a Péptido-133, Péptido-136, Péptido-137 y Péptido-139 se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. Los residuos de cisteína, los residuos de HCY o los residuos de Pen en las posiciones 3 y 8 también tienen grupos tiol que forman un enlace representado por $-S-CH_2-S-$ (también denominado "puente de metileno").

CUADRO 2-1

Péptido	Grupo formador de anillos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	IC50 (nM)
1	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	12.6
2	A _{1a1}	2NAL	AGB	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	20.0
3	A _{1a1}	2NAL	PHG	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	29.9
4	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	PHG	W	CPTG	C	33.8
5	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	4PAL	W	CPTG	C	23.6
6	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	V	W	V	C	32.1
7	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	V	W	CPTG	C	31.1
8	A _{1a1}	2NAL	TLE	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	12.6
9	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	22.4
10	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	14.3
11	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	26.0
12	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	V	C	18.6
125	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	305.2
126	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	10.8

CUADRO 2-2

127	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	11.6
128	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	8.4
129	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	43.7
130	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	7.7
131	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	14.2
132	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	7.0
133	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	125.3
134	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	102.0
135	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	207.7
136	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	161.6
137	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	80.6
138	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	92.5
139	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	30.9
115	B _{1a1}	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	17.5
119	B _{1a1}	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	22.0

2. Síntesis de Péptido-13 a Péptido-24

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-13 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 6%), Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 44%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 50%) como se muestra a continuación.

5 También se sintetizó el Péptido-14 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-15 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 2 (rendimiento: 3%), Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 84%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 60%) como se muestra a continuación.

10 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-16 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 3 (rendimiento: 13%), Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 28%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 53%) como se muestra a continuación.

También se sintetizaron del Péptido-17 al Péptido-24 utilizando el mismo procedimiento.

CUADRO 3

Péptido	PM	Proc. 1	Proc. 2	Proc. 3	Cond. LC-MS	Valor medido MS	Valenci a MS	Rt (min)
13	3165.49	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1055.46	3	1.45
14	3051.39	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1017.45	3	1.51
15	2937.29	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1468.65	3	1.49
16	4305.88	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1435.37	3	2.10
17	4365.94	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1455.38	3	1.57
18	4305.88	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1435.37	3	1.59
19	4305.88	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1435.37	3	2.10
20	4361.99	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1454.06	3	1.92
21	4361.99	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1454.06	3	1.65
22	4365.94	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1455.37	3	1.58
23	4365.94	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1455.37	3	1.57
24	4361.99	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1454.05	3	1.63

15 Los residuos que constituyen los péptidos bicíclicos Péptido-13 a Péptido-24, que tienen una estructura de enlace se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que el residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. El grupo formador de anillos forma un enlace amida con la estructura de enlace en un grupo aminocarbonilo, y el NH₂ en el grupo aminocarbonilo se ha sustituido con NH del grupo amino N-terminal del residuo de aminoácido N-terminal en la estructura de enlace. Los residuos de HCY en las posiciones 3 y 8 tienen enlaces disulfuro formados en ellos. El residuo de lisina C-terminal ha sido maleimidado mediante el Procedimiento de Síntesis 6.

20

CUADRO 4

Péptido	Grupo formador de anillos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
13	A1a1	2NAL	R	H CY	G	AGB	N	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K	
14	A1a1	2NAL	R	H CY	G	AGB	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
15	A1a1	2NAL	R	H CY	G	AGB	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
16	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
17	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
18	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
19	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
20	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
21	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
22	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
23	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
24	A1a1	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	P12P	KPEG	K

3. Síntesis del Péptido-25 a Péptido-72

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-25 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 13%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 71%) como se muestra a continuación.

5 También se sintetizaron el Péptido-26 al Péptido-35, el Péptido-37 al Péptido-50 y el Péptido-57 al Péptido-59 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-36 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 2 (rendimiento: 6%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 71%) como se muestra a continuación.

10 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-51 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 3 (rendimiento: 9%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 32%) como se muestra a continuación. Se usó Fmoc-Lys(Boc)-OH como Lys C-terminal, y se usó Fmoc-Lys(ivDde)-OH como el otro Lys (convertido a KPEG).

15 También se sintetizaron el Péptido-52 al Péptido-56, el Péptido-70 al Péptido-72 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-60 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 15%), Procedimiento de Síntesis 5 (rendimiento: 23%) y Procedimiento de Síntesis 6 (rendimiento: 50%) como se muestra a continuación. Se usó Fmoc-Lys(ivDde)-OH como Lys C-terminal, y se usó Fmoc-Lys(Boc)-OH como el otro Lys (convertido a KSG).

20 También se sintetizaron del Péptido-61 al Péptido-69 utilizando el mismo procedimiento.

CUADRO 5-1

Péptido	PM	Proc. 1	Proc. 2	Proc. 3	Cond. LC-MS	Valor medido MS	Valencia MS	Rt (min)
25	2705.05	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1353.18	2	1.48
26	2762.11	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1381.69	2	1.42
27	3004.29	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1001.81	3	1.49
28	2774.11	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	925.13	3	1.47
29	3004.29	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1001.81	3	1.47
30	3060.39	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1020.49	3	1.46
31	3004.29	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1001.81	3	1.46
32	3060.39	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1020.48	3	1.45
33	2759.14	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1379.68	2	1.69
34	2989.31	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1494.72	2	1.65
35	2890.19	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	963.80	3	1.48
36	2776.08	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	925.79	3	1.49
37	2745.11182	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	915.4669	3	1.703
38	2975.28662	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	992.1473	3	1.661
39	3032.34131	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1011.1617	3	1.565
40	2904.21216	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	968.4718	3	1.533
41	3018.3147	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1006.474	3	2.081
42	2904.21216	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	968.4725	3	1.532
43	3560.972	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1187.2642	3	2.097
44	3632.0499	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1210.9423	3	2.1
45	3688.1563	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1229.6301	3	1.823
46	3692.1019	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1230.9509	3	1.596
47	3660.1031	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1220.2886	3	1.598
48	3632.0499	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1210.942	3	1.591
49	3632.0499	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1210.9407	3	1.599
50	3632.0499	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1210.9404	3	1.59
51	4272.8105	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1424.4027	3	1.684
52	4272.8105	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1424.4024	3	1.68
53	4272.8105	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1424.396	3	1.685
54	4244.7573	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1415.0577	3	1.568
55	4244.7573	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1415.056	3	1.533
56	4244.7573	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1415.0559	3	1.534

CUADRO 5-2

57	3075.3661	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1025.4912	3	1.444
58	3075.3661	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1025.4925	3	1.445
59	3075.3661	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1025.4922	3	1.443
60	6024.2405	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1506.1701	4	1.476
61	6024.2405	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1506.1697	4	1.468
62	5794.0657	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1931.2051	3	1.486
63	5794.0657	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1448.6553	4	1.489
64	5794.0657	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1931.2045	3	1.495
65	5996.1874	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1499.1625	4	2.071
66	5996.1874	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1499.1659	4	2.07
67	5996.1874	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1998.5501	3	1.408
68	5766.0126	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1441.6496	4	1.421
69	5766.0126	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 5	Procedimiento de síntesis 6	Condición 1	1441.6473	4	1.412
70	4328.9168	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1443.0842	3	1.666
71	4332.8624	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1444.4025	3	1.647
72	4332.8624	Procedimiento de síntesis 3	Procedimiento de síntesis 6		Condición 1	1444.4083	3	1.984

Los residuos que constituyen los péptidos cíclicos Péptido-25 a Péptido-72, que tienen una estructura de enlace se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que en el siguiente cuadro, los residuos de aminoácidos del 1er al 11o de los péptidos cíclicos Péptido-25 a Péptido-72 corresponden a Z_{aa2} a Z_{aa12} en el péptido cíclico II de la presente invención, y Z_{aa1} está ausente. El 12o residuo de cisteína se ha convertido en un grupo formador de anillos en el péptido cíclico. El grupo formador de anillos forma un enlace amida con la estructura de enlace en un grupo aminocarbonilo, y el NH₂ en el grupo aminocarbonilo se ha sustituido con NH del grupo amino N-terminal del residuo de aminoácido N-terminal en la estructura de enlace. El residuo de lisina C-terminal ha sido maleimidado mediante el Procedimiento de Síntesis 6.

CUADRO 6-1

Péptido	Grupo formador de anillos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
25	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K				
26	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K				
27	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
28	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K				
29	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	D	K		
30	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	D	D	P12P	K		
31	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	d	d	P12P	k		
32	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	d	d	P12P	k		
33	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	K				
34	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
35	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
36	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K				
37	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	K				
38	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
39	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
40	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
41	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	D	K		
42	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	K			
43	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P24P	K		

CUADRO 6-2

44	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	NMeG	G	D	D	P12P	P12P	K	
45	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	P12P	K		
46	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	P12P	K	
47	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	E	G	E	E	P12P	P12P	K	
48	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	P12P	D	P12P	K	
49	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	P12P	P12P	D	D	K	
50	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	P12P	D	P12P	D	D	K	
51	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K	
52	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K	
53	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K	
54	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K	
55	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K	
56	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K	
57	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	P6P	D	P6P	D	K	
58	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	P6P	D	D	P6P	D	K	
59	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	P6P	D	P6P	D	D	K	
60	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	KSG	P12P	P12P	K	
61	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	P12P	KSG	P12P	K	
62	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	KSG	P12P	P12P	K			
63	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	P12P	KSG	P12P	K			
64	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	P12P	P12P	KSG	K			
65	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	KSG	P12P	P12P	K	

CUADRO 6-3

66	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KSG	P12P	K
67	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KSG	K
68	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	KSG	P12P	P12P	K		
69	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	KSG	P12P	K		
70	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
71	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	S	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
72	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	KPEG	P12P	K

4. Síntesis de Péptido-73 a Péptido-109

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-73 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 13%) y Procedimiento de Síntesis 7 (rendimiento: 76%) como se muestra a continuación.

5 Péptido-74, Péptido-75, Péptido-79 a Péptido-83, Péptido-85, Péptido-87 a Péptido-91, Péptido-95, Péptido-96, Péptido-98, Péptido-100 a Péptido-106 y Péptido-109 también se sintetizaron utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-76 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 1 (rendimiento: 20%), Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 14%) y
10 Procedimiento de Síntesis 7 (rendimiento: 73%) como se muestra a continuación.

También se sintetizaron el Péptido-77, Péptido-78, Péptido-84, Péptido-86 y el Péptido-92 al Péptido-94 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-97 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 2 (rendimiento: 6%) y Procedimiento de Síntesis 7 (rendimiento: 60%) como
15 se muestra a continuación.

También se sintetizó el Péptido-107 utilizando el mismo procedimiento.

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Péptido-99 se sintetizó según cualquiera del Procedimiento de síntesis 2 (rendimiento: 20%), Procedimiento de Síntesis 4 (rendimiento: 14%) y
Procedimiento de Síntesis 7 (rendimiento: 73%) como se muestra a continuación.

20 También se sintetizó el Péptido-108 utilizando el mismo procedimiento.

CUADRO 7

Péptido	PM	Proc. 1	Proc. 2	Proc. 3	Condición LC-MS	Valor medido MS	Valenci a MS	Rt (min)
73	2841.24	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1421.21	2	1.90
74	2910.31	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1455.23	2	1.78
75	3140.48	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1047.17	3	1.74
76	3201.61	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1067.48	3	1.77
77	3301.68	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1100.83	3	1.75
78	3187.58	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1062.81	3	1.76
79	3168.53	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1056.51	3	1.79
80	3186.50	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1593.25	2	1.72

CUADRO 8

Péptido	PM	Proc. 1	Proc. 2	Proc. 3	LC-MS condition	Valor medido MS	Valenci a MS	Rt (min)
81	2924.33	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	975.49	3	1.74
82	3165.54	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1582.77	2	1.61
83	2911.29	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1455.72	2	1.74
84	2887.36	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1443.68	2	1.76
85	2881.30	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	960.82	3	1.85
86	2956.42	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	985.80	3	1.78
87	2881.30	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	960.82	3	1.78
88	3370.66	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1123.86	3	1.72
89	3255.5681	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1085.5172	3	1.727
90	3025.3933	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1008.8277	3	1.746
91	3154.5073	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1051.8421	3	1.749
92	3186.5954	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1062.481	3	1.759
93	3071.508	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1024.1387	3	1.765
94	3186.5954	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1062.48	3	1.747
95	3154.5073	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1051.8465	3	1.726
96	3040.4046	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1013.8938	3	1.75
97	3040.4046	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1013.8308	3	1.755
98	3182.5604	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1061.1877	3	1.732
99	3201.6067	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1067.4832	3	1.767
100	3140.4807	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1047.173	3	1.731
101	3196.587	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1065.8611	3	1.731
102	3140.4807	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1047.172	3	1.74
103	3196.587	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1065.8563	3	1.729
104	2895.331	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	965.491	3	1.885
105	3125.5058	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1042.1788	3	1.852
106	3026.378	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1009.1514	3	1.744
107	2912.2754	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	971.142	3	1.764
108	3073.4775	Procedimiento de síntesis 2	Procedimiento de síntesis 4	Procedimiento de síntesis 7	Condición 1	1024.7938	3	1.778
109	3154.5073	Procedimiento de síntesis 1	Procedimiento de síntesis 7		Condición 1	1051.8419	3	1.772

Los residuos que constituyen los péptidos cíclicos Péptido-73 a Péptido-109, que tienen una estructura de enlace se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que en el siguiente cuadro, del 1er al 11o residuos de aminoácidos de los péptidos cíclicos Péptido-73 a Péptido-75, Péptido-79 a Péptido-83, Péptido-85, Péptido-87 a Péptido-91, Péptido-95 a Péptido-98, Péptido-100 a Péptido-107 y Péptido-109 corresponden a Z_{aa2} a Z_{aa12} en el péptido cíclico II de la presente invención y Z_{aa1} está ausente. El residuo de cisteína en la posición 12 se ha convertido en un grupo formador de anillos

en el péptido cíclico. El grupo formador de anillos forma un enlace amida con la estructura de enlace en un grupo aminocarbonilo, y el NH_2 en el grupo aminocarbonilo se ha sustituido con NH del grupo amino N-terminal del residuo de aminoácido N-terminal en la estructura de enlace. Los residuos HCY en las posiciones 3 y 8 en Péptido-76 a Péptido-78, Péptido-84, Péptido-86, Péptido-92 a Péptido-94, Péptido-99 y Péptido-108 también tienen enlaces disulfuro formados en ellos. El residuo de lisina C-terminal se ha sometido a modificación de DBCO mediante el Procedimiento de Síntesis 7.

CUADRO 9

Péptido	Grupo formador de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
73	anillos B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K			
74	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K			
75	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
76	A1a1	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
77	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K
78	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
79	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
80	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K

CUADRO 10-1

Péptido	Grupo formador de anillos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
81	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
82	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	G	NMeG13	K			
83	B1a1	2NAL	R	S	G	R	D	W	V	AGB	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
84	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	N	W	Hcy	V	W	V	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
85	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
86	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
87	B1a1	2NAL	TLE	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
88	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K
89	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K
90	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	D	K	
91	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
92	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
93	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
94	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	D	K	
95	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
96	B1a1	2NAL	R	S	G	R	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
97	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
98	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	E	G	G	E	P12P	K	
99	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
100	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	D	D	K	

CUADRO 10-2

101	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	D	D	P12P	K	
102	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	d	d	P12P	k	
103	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	d	d	P12P	k	
104	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	K			
105	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
106	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K		
107	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K			
108	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K		
109	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	

5. Preparación de molécula que contiene Fc

(1) Preparación de Fc-A (forma LALA)

Fc-A se preparó según la descripción en el Ejemplo 2-5 del documento WO 2018/003983. Fc-A es una forma LALA de Fc-B (SEQ ID NO: 135), que es una molécula de anticuerpo parcial que
 5 consiste en el fragmento Fc de IgG1, con una extensión N-terminal (SEQ ID NO: 137).

(2) Preparación de Fc-C (forma LALA-PA)

(i) Construcción del vector de expresión de la cadena Fc-CH

Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 138) que contiene la secuencia de nucleótidos que
 10 codifica la secuencia de aminoácidos de Fc-C, que era un anticuerpo parcial que consiste en el
 fragmento Fc de IgG1 humana, se sintetizó como molécula portadora (Thermo Fisher Scientific).
 Usando el fragmento de ADN sintetizado, el vector pCMA-LK descrito en el documento WO
 2015/046505 se digirió con XbaI y PmeI y luego se unió usando un kit de clonación por PCR In-Fusion
 HD (producido por Takara Bio USA, Inc.) para construir un vector de expresión Fc-C. El vector de
 expresión resultante se denominó "pCMA/Fc-C". La secuencia de nucleótidos que codifica la
 15 secuencia de aminoácidos de Fc-C está en las posiciones de nucleótidos 61 a 741 de SEQ ID NO: 165
 (las posiciones de nucleótidos 1 a 60 codifican la secuencia señal). La secuencia de aminoácidos de
 Fc-C es la secuencia en las posiciones de aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 139 (las posiciones de
 aminoácidos 1 a 20 son secuencias señal).

(ii) Producción de Fc-C

20 Se pasaron células FreeStyle 293F (producidas por Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron
 en un matraz giratorio a 37°C y 8% de CO₂ usando un dispositivo de cultivo de células animales tipo
 BCP (producido por Biott Corporation). El cultivo posterior se realizó utilizando WAVE BIOREACTOR
 (producido por GE Healthcare) según las instrucciones. Se diluyeron células FreeStyle 293F en una
 fase de crecimiento logarítmico con un medio de expresión FreeStyle 293 (producido por Thermo
 25 Fisher Scientific), ajustado de 2.0 a 2.4×10^6 células/mL, y se transfirió a un volumen de 6 L a una
 bolsa WAVE de cultivo de 50 L (producida por Cytiva). Posteriormente, también se transfirieron 6
 litros de medio de expresión FreeStyle 293 y se cultivaron durante la noche con agitación a 37°C y CO₂
 al 8%. Se añadieron 37.5 mg de polietilenimina (producida por Polysciences, Inc.) a 400 ml de medio
 Opti-Pro SFM (producido por Thermo Fisher Scientific). Luego, se agregaron 12.5 mg del vector de
 30 expresión pCMA/Fc-C a 400 ml del medio Opti-Pro SFM. La mezcla de vector de expresión/Opti-Pro
 SFM se añadió a la mezcla de polietilenimina/Opti-Pro SFM, se agitó suavemente y se dejó reposar
 durante otros 5 minutos antes de agregarla por completo a la bolsa de cultivo WAVE de 50 litros en la
 que se cultivaron células FreeStyle 293F. Después de 4 horas de cultivo con agitación a 37°C y CO₂
 al 8%, se añadieron 12 l de medio EX-CELL VPRO (producido por SAFC Biosciences) y 500 ml de BD
 35 Recharge CD de 43.4 g/l (producido por BD Biosciences) y se cultivaron con agitación a 37°C y CO₂ al

8% durante 6 días. El sobrenadante del cultivo resultante se pasó a través de un filtro profundo (tamaño de poro: 5 μm , producido por GE Healthcare), seguido de filtración a través de un filtro de cartucho de cápsulas (tamaño de poro: 0.45 μm , producido por ADVANTEC TOYO KAISHA, LTD.).

(iii) Producción de Fc-C

- 5 La purificación de Fc-C se llevó a cabo de la misma manera que el método de purificación de Fc-B descrito en el Ejemplo 2-4 (2-4C) del documento WO 2018/003983 mediante un proceso de dos pasos de cromatografía de afinidad de Proteína A e hidroxapatita cerámica.

6. Síntesis del conjugado-1 al conjugado-12

- 10 Como se muestra en el siguiente cuadro, el Conjugado-1 al Conjugado-12 se sintetizaron según el Péptido-13 a Péptido-24 de acuerdo con el Procedimiento de síntesis 8 como se muestra a continuación. En el Conjugado-1 al Conjugado-12, el Péptido-13 al Péptido-24 se unieron cada uno a Cys226 y Cys229 (Cys en las posiciones 226 y 229 del índice Eu, respectivamente) de la molécula que contiene Fc. En los Cuadros 11 a 14, dos moléculas que contienen Fc conjugadas con péptidos cíclicos se entrecruzaron mediante un enlace disulfuro para formar una molécula en los conjugados de glicano Conjugado-61 a Conjugado-97, mientras que las moléculas que contienen Fc (monómeros) no se entrecruzaron en los conjugados de maleimida Conjugado-1 a Conjugado-60. Aunque cada conjugado de maleimida existe como una mezcla en la que varios glicanos están unidos de forma heterogénea a moléculas que contienen Fc, los glicanos de las moléculas que contienen Fc se excluyen del cálculo del peso molecular del conjugado de maleimida y de la medición por LC-MS en los Cuadros
- 15 11 al 14. En otras palabras, el peso molecular del glicano no se considera en el cálculo del peso molecular del conjugado de maleimida, y en la medición de MS, la desglicosilación se realiza antes de la medición de LC-MS.
- 20

CUADRO 11

Conjugado	Precursor	Portador	Grupo de enlace C	PM	Procedim	Cond. LC-MS	MS (deconvolución)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
1	Péptido ·13	Fc-A	C3	31663.4	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	31662.30	2.21	205.5
2	Péptido ·14	Fc-A	C3	31435.2	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	31434.13	2.32	207
3	Péptido ·15	Fc-A	C3	31207	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	31205.80	2.36	116
4	Péptido ·16	Fc-C	C3	33949.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	33949.09	2.39	20.1
5	Péptido ·17	Fc-C	C3	34069.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34069.23	2.37	28.75
6	Péptido ·18	Fc-C	C3	33949.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	33948.96	2.39	38.15
7	Péptido ·19	Fc-C	C3	33949.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	33949.19	2.38	21.95
8	Péptido ·20	Fc-C	C3	34061.9	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34061.42	2.43	38.2
9	Péptido ·21	Fc-C	C3	34061.9	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34061.50	2.42	43.55
10	Péptido ·22	Fc-C	C3	34069.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34069.45	2.36	12.75
11	Péptido ·23	Fc-C	C3	34069.7	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34069.38	2.36	17.0
12	Péptido ·24	Fc-C	C3	34061.9	Procedimiento de síntesis 8	Condición 4	34061.25	2.42	44.65

7. Síntesis del conjugado-13 al conjugado-97

Como se muestra en el siguiente cuadro, el Conjugado-13 al Conjugado-97 se sintetizaron usando el Péptido-25 a Péptido-109 (compuestos formados por un péptido cíclico y una estructura de enlace) de acuerdo con el Procedimiento de síntesis 9 o el Procedimiento de síntesis 10 como se muestra a continuación. En el Conjugado-13 al Conjugado-60, el Péptido-25 al Péptido-72 se unieron cada uno a Cys226 y Cys229 (Cys en las posiciones 226 y 229 del índice Eu, respectivamente) de la molécula que contiene Fc. Además, los glicanos unidos a N297 de las moléculas que contienen Fc en el Conjugado-61 al Conjugado-97 se someten cada uno a remodelación de glicanos en N297-(Fuc)SG. Cabe señalar que el péptido cíclico correspondiente a los restos peptídicos cíclicos de los conjugados 65, 74 y 80 a 82 es el Péptido-1. El péptido cíclico correspondiente a un resto de péptido cíclico del Conjugado-64 es el Péptido-11. El péptido cíclico correspondiente a restos de péptidos cíclicos de los Conjugados 66 es el Péptido-9. El péptido cíclico correspondiente a un resto de péptido cíclico del Conjugado-72 es el Péptido-6. El péptido cíclico correspondiente a un resto de péptido cíclico del Conjugado-87 es el Péptido-10. Los péptidos cíclicos correspondientes a restos de péptidos cíclicos de otros conjugados se denominan Péptidos 110 a 124, como se muestra a continuación.

15	Conjugado-13, 61, 68, 70: Péptido-110
	Conjugado-14: Péptido-111
	Conjugado-69, 83, 85, 86: Péptido-112
	Conjugado-29, 97: Péptido-113
20	Conjugado-73: Péptido-114
	Conjugado-15 a 20, 42 a 47, 53 a 57, 62, 63, 76 a 78, 88 a 91: Péptido-115
	Conjugado-21, 22, 92, 93: Péptido-116
	Conjugado-75: Péptido-117
	Conjugado-71: Péptido-118
25	Conjugado-23, 24, 94, 95: Péptido-119
	Conjugado-25, 26: Péptido-120
	Conjugado-27, 31 a 41, 48 a 52, 58 a 60, 67: Péptido-121
	Conjugado-79: Péptido-122
	Conjugado-28, 30: Péptido-123
30	Conjugado-84: Péptido-124

CUADRO 12-1

Conjugado	Precursor	Portador	Grupo de enlace C	PM	Proced.	Cond. LC-MS	MS (deconvolución)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
13	Péptido -25	Fc-A	C3	30742.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30741.70	2.19	36.5
14	Péptido -26	Fc-A	C3	30856.6	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30855.70	2.06	12.8
15	Péptido -27	Fc-A	C3	31341	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31340.20	2.09	23.7
16	Péptido -28	Fc-A	C3	30880.6	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30880.00	2.11	11.7
17	Péptido 29	Fc-A	C3	31341	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31340.00	2.21	24.9
18	Péptido 30	Fc-A	C3	3145.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31452.00	2.2	23.5
19	Péptido -31	Fc-A	C3	31341	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31340.00	2.21	52.6
20	Péptido -32	Fc-A	C3	31453.2	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31452.60	2.18	31.9
21	Péptido -33	Fc-A	C3	30860.6	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30849.70	2.53	41.0
22	Péptido -34	Fc-A	C3	31311	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31310.20	2.5	43.8
23	Péptido -35	Fc-A	C3	31112.8	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31111.80	2.23	34.9
24	Péptido -36	Fc-A	C3	30884.6	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30883.70	2.27	56.5
25	Péptido -37	Fc-A	C3	30822.6	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	30821.5	2.56	40.6
26	Péptido 38	Fc-A	C3	31283	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31282.6	2.53	115.0
27	Péptido -39	Fc-A	C3	31397	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31396	2.38	79.8
28	Péptido -40	Fc-A	C3	31141	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31140.1	2.32	97.3
29	Péptido -41	Fc-A	C3	31371	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31368	2.3	30.3
30	Péptido -42	Fc-A	C3	31140.8	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31140	2.34	36.5
31	Péptido -43	Fc-C	C3	32459.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32459.4	2.34	44.2

CUADRO 12-2

32	Péptido 44	Fc-C	C3	32601.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32601.4	2.31	35.2
33	Péptido 45	Fc-C	C3	32713.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32713.8	2.31	27.3
34	Péptido 46	Fc-C	C3	32721.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32721.6	2.27	25.2
35	Péptido 47	Fc-C	C3	32657.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32657.5	2.28	31.2
36	Péptido 48	Fc-C	C3	32601.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32601.6	2.29	24.7
37	Péptido 49	Fc-C	C3	32601.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32601.5	2.3	22.0
38	Péptido 50	Fc-C	C3	32601.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	32601.6	2.28	16.5
39	Péptido 51	Fc-C	C3	33833.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33883	2.41	31.6
40	Péptido 52	Fc-C	C3	33833.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33883	2.4	30.1
41	Péptido 53	Fc-C	C3	33833.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33883	2.41	28.6
42	Péptido 54	Fc-C	C3	33827.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33827	2.26	16.9
43	Péptido 55	Fc-C	C3	33827.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33827	2.25	15.9
44	Péptido 56	Fc-C	C3	33827.5	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33826.9	2.26	20.1
45	Péptido 57	Fc-C	C3	31488.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31488.1	2.05	16.2
46	Péptido 58	Fc-C	C3	31488.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31288.2	2.05	14.5
47	Péptido 59	Fc-C	C3	31488.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	31488.2	2.05	11.8
48	Péptido 60	Fc-C	C3	37386.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	37385.7	2.21	27.0
49	Péptido 61	Fc-C	C3	37386.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	37385.7	2.21	26.9
50	Péptido 62	Fc-C	C3	36926.1	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	36925.2	2.25	21.2
51	Péptido 63	Fc-C	C3	36926.1	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	36925.2	2.28	15.7
52	Péptido 64	Fc-C	C3	36926.1	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	36925.1	2.28	26.7
53	Péptido 65	Fc-C	C3	37330.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	37329.5	2.09	12.2

CUADRO 12-3

54	Péptido 66	Fc-C	C3	37330.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	37329.6	2.08	11.3
55	Péptido 67	Fc-C	C3	37330.3	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	37329.5	2.1	14.0
56	Péptido 68	Fc-C	C3	36869.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	36869.2	2.12	6.4
57	Péptido 69	Fc-C	C3	36869.9	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	36869.4	2.1	6.9
58	Péptido 70	Fc-C	C3	33995.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	33995.4	2.42	23.7
59	Péptido 71	Fc-C	C3	34003.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	34003.2	2.39	22.1
60	Péptido 72	Fc-C	C3	34003.7	Procedimiento de síntesis 9	Condición 4	34003.2	2.38	21.9

I

CUADRO 13

Conjugado	Precursor	Portador	Grupo de enlace C	PM	Proced.	Cond. LC-MS	MS (deconvoluci3n)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
61	P3ptido -73	Fc-A	C1,C2	67770.8	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 3	33767.81	2.17	25.1
62	P3ptido 74	Fc-A	C1,C2	67804.2	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	67804.21	2.17	7.1
63	P3ptido -75	Fc-A	C1,C2	68724.9	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	68724.88	2.17	14.0
64	P3ptido 76	Fc-A	C1,C2	68970.4	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	68968.15	2.26	15.8
65	P3ptido -77	Fc-A	C1,C2	69369.8	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	69370.16	2.25	26.3
66	P3ptido -78	Fc-A	C1,C2	68914.3	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	68912.06	2.48	36.5
67	P3ptido -79	Fc-A	C1,C2	68838	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 2	68837.88	2.53	44.6
68	P3ptido 80	Fc-A	C1,C2	68909	Procedimiento de s3ntesis 10	Condici3n 3	34459.22	2.11	451.1

CUADRO 14-1

Conjugado	Precursor	Portador	Grupo de enlace C	PM	Proced.	Cond. LC-MS	MS (deconvolución)	Rt (min)	IC ₅₀ (nM)
69	Péptido -81	Fc-A	C1,C2	67860.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67860.70	2.17	5.1
70	Péptido -82	Fc-A	C1,C2	68825	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68824.60	2.19	32.1
71	Péptido -83	Fc-A	C1,C2	67809.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67807.50	2.22	9.3
72	Péptido -84	Fc-A	C1,C2	67712.6	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67712.80	2.36	14.3
73	Péptido -85	Fc-A	C1,C2	67688.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67688.13	2.56	13.3
74	Péptido -86	Fc-A	C1,C2	67988.6	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67989.11	2.35	15.8
75	Péptido -87	Fc-A	C1,C2	67688.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67689.11	2.34	11.4
76	Péptido -88	Fc-A	C1,C2	69645	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	69646.95	2.16	14.5
77	Péptido -89	Fc-A	C1,C2	69185.4	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	69185.945	2.18	26.9
78	Péptido -90	Fc-A	C1,C2	68725	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68725.5	2.17	9.2
79	Péptido -91	Fc-A	C1,C2	68781	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68780.859	2.2	17.1
80	Péptido -92	Fc-A	C1,C2	68909.4	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68908.984	2.25	11.2
81	Péptido -93	Fc-A	C1,C2	68449	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68449.875	2.27	10.2
82	Péptido -94	Fc-A	C1,C2	68909.4	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68910.289	2.25	10.2
83	Péptido -95	Fc-A	C1,C2	68782	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68780.68	2.08	9.5
84	Péptido -96	Fc-A	C1,C2	68326	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68325.148	2.15	8.1
85	Péptido -97	Fc-A	C1,C2	68326	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68323.922	2.16	7.1
86	Péptido -98	Fc-A	C1,C2	68894	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68893.117	2.1	8.5
87	Péptido -99	Fc-A	C1,C2	68970	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68969.18	2.26	15.7

CUADRO 14-2

88	Péptido -100	Fc-A	C1,C2	68726	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68724.961	2.27	17.3
89	Péptido -101	Fc-A	C1,C2	68950.4	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68948.516	2.26	18.3
90	Péptido -102	Fc-A	C1,C2	68726	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68724.57	2.26	41.5
91	Péptido -103	Fc-A	C1,C2	68950.4	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68948.234	2.24	22.9
92	Péptido 104	Fc-A	C1,C2	67745.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67743.961	2.67	35.6
93	Péptido -105	Fc-A	C1,C2	68666	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68664.492	2.63	73.4
94	Péptido -106	Fc-A	C1,C2	68269.6	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68269.688	2.38	31.4
95	Péptido -107	Fc-A	C1,C2	67813.2	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	67812.203	2.42	28.1
96	Péptido -108	Fc-A	C1,C2	68458	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68457.031	2.53	44.8
97	Péptido -109	Fc-A	C1,C2	68782	Procedimiento de síntesis 10	Condición 2	68781.586	2.45	47.2

Procedimiento de síntesis 1

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el sintetizador automático Syro II (producido por Biotage Japón) según un método de síntesis en fase sólida común utilizando un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (grupo Fmoc) como un grupo protector del grupo α -amino.

- 5 El equivalente a 88 μ mol de Rink Amide Resin AM (producida por Novaviochem) se añadió a un recipiente de reacción, y 3 equivalentes de cada uno de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), N,N-diisopropilamina y un aminoácido protegido con grupo Fmoc y se hicieron reaccionar juntos en 1-metil-2-pirrolidinona.

- 10 La eliminación de los grupos Fmoc se llevó a cabo usando piperidina/1-metil-2-pirrolidinona al 20%.

Después de acoplar el aminoácido N-terminal y eliminar el grupo Fmoc de este aminoácido, se añadieron 3 equivalentes de cada uno de N,N-diisopropilcarbodiimida, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y ácido cloroacético y se hicieron reaccionar juntos en 1-metil-2-pirrolidinona.

- 15 Una resina peptídica producida se lavó tres veces con 1-metil-2-pirrolidinona y tres veces con diclorometano, seguido de secado. Se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético/etanoditiol/triisopropilsilano/agua (92,5:2.5:2.5:2.5 en volumen) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 20 Se recuperó un péptido bruto escindido mediante precipitación con éter, se lavó dos veces con éter terc-butilmetílico, se secó y luego se disolvió en dimetilsulfóxido (8 ml). Después de la adición de n-propilamina (80 μ L), la mezcla se dejó reposar durante la noche. Además, después de la adición de ácido acético (80 μ L), la solución de reacción se concentró usando V10 (producida por Biotage Japan) y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 2

- 30 Resina de cloruro de 2-clorotritilo (malla 100 - 200) y el equivalente a 88 μ mol de DVB al 1% (producido por MERCK) se agregó a un recipiente de reacción y la mezcla se suspendió en 2 ml de diclorometano para permitir el hinchamiento de la resina. Después de la filtración con succión, se añadieron 1.5 ml de 1.5 equivalentes de aminoácidos protegidos con un grupo Fmoc soportado sobre la resina en diclorometano, seguido de la adición de 5 equivalentes de N,N-diisopropilamina y la mezcla se agitó. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano/metanol/N,N-diisopropilamina = 17/2/1. El alargamiento de aminoácidos subsecuente se realizó usando el sintetizador automático Syro II (producido por Biotage Japan) según un método
- 35

de síntesis en fase sólida común utilizando un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (grupo Fmoc) como un grupo protector del grupo α -amino. En 1-metil-2-pirrolidinona, 3 equivalentes de cada uno de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), N,N-diisopropilamina y un aminoácido protegido por el grupo Fmoc se añadieron y se hicieron reaccionar juntos.

La eliminación de los grupos Fmoc se llevó a cabo usando piperidina/1-metil-2-pirrolidinona al 20%.

Después de acoplar el aminoácido N-terminal y eliminar el grupo Fmoc de este aminoácido, se añadieron 3 equivalentes de cada uno de N,N-diisopropilcarbodiimida, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y ácido cloroacético y se hicieron reaccionar juntos en 1-metil-2-pirrolidinona.

Una resina peptídica producida se lavó tres veces con 1-metil-2-pirrolidinona y tres veces con diclorometano, seguido de secado. Se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético/etanoditiol/triisopropilsilano/agua (92,5:2.5:2.5:2.5 en volumen) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.

Se recuperó un péptido bruto escindido mediante precipitación con éter, se lavó dos veces con éter terc-butilmetílico, se secó y luego se disolvió en dimetilsulfóxido (8 ml). Después de la adición de n-propilamina (80 μ L), la mezcla se dejó reposar durante la noche. Además, después de la adición de ácido acético (80 μ L), la solución de reacción se concentró usando V10 (producida por Biotage Japan) y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 3

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el sintetizador automático Syro II (producido por Biotage Japan) según un método de síntesis en fase sólida común utilizando un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (grupo Fmoc) como un grupo protector del grupo α -amino.

El equivalente a 88 μ mol de Rink Amide Resin AM (producida por Novaviochem) se añadió a un recipiente de reacción, y 3 equivalentes de cada uno de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), N,N-diisopropilamina y un aminoácido protegido con grupo Fmoc o PEG O11A se agregaron e hicieron reaccionar en 1-metil-2-pirrolidinona.

La eliminación de los grupos Fmoc se llevó a cabo usando piperidina/1-metil-2-pirrolidinona al 20%.

Después de que O11A se introdujo en el grupo α -amino de Lys que tiene un grupo ε -amino protegido con un grupo (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (grupo ivDde), el grupo

ivDde se desprotegió según el siguiente método.

La escisión del grupo ivDde en la fase sólida se llevó a cabo usando 3% de hidrazina/dimetilformamida. Se añadió 1 ml de hidrazina al 3 %/dimetilformamida a 100 mg de resina peptídica y la mezcla se agitó. Este procedimiento se repitió tres veces para eliminar el grupo ivDde.

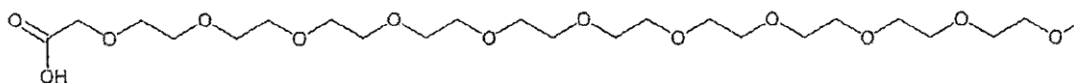
- 5 Posteriormente, la cadena peptídica se extendió de la misma manera que anteriormente.

Después de acoplar el aminoácido N-terminal y eliminar el grupo Fmoc de este aminoácido, se añadieron 3 equivalentes de cada uno de N,N-diisopropilcarbodiimida, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y ácido cloroacético y se hicieron reaccionar juntos en 1-metil-2-pirrolidinona.

- 10 Una resina peptídica producida se lavó tres veces con 1-metil-2-pirrolidinona y tres veces con diclorometano, seguido de secado. Se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético/etanoditol/triisopropilsilano/agua (92,5:2.5:2.5:2.5 en volumen) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.

- Se recuperó un péptido bruto escindido mediante precipitación con éter, se lavó dos veces con éter terc-butilmetílico, se secó y luego se disolvió en dimetilsulfóxido (8 ml). Después de la adición de n-propilamina (80 μ L), la mezcla se dejó reposar durante la noche. Además, después de la adición de ácido acético (80 μ L), la solución de reacción se concentró usando V10 (producida por Biotage Japan) y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

[Fórmula química 147]



PEG 011A

Procedimiento de síntesis 4

- 25 Primero, 5 μ moles del péptido se disolvieron en 1.4 ml de ácido acético. 300 μ l de 25 mg/ml de solución de yodo/ácido acético se agregaron a la misma y se agitó la mezcla. Después de que la desaparición de las materias primas fuera confirmada por HPLC, se agregaron 300 μ l de una solución acuosa de ácido ascórbico de 200 mg/ml para detener la reacción. La solución de reacción se concentró usando V10 (producida por Biotage Japan) y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

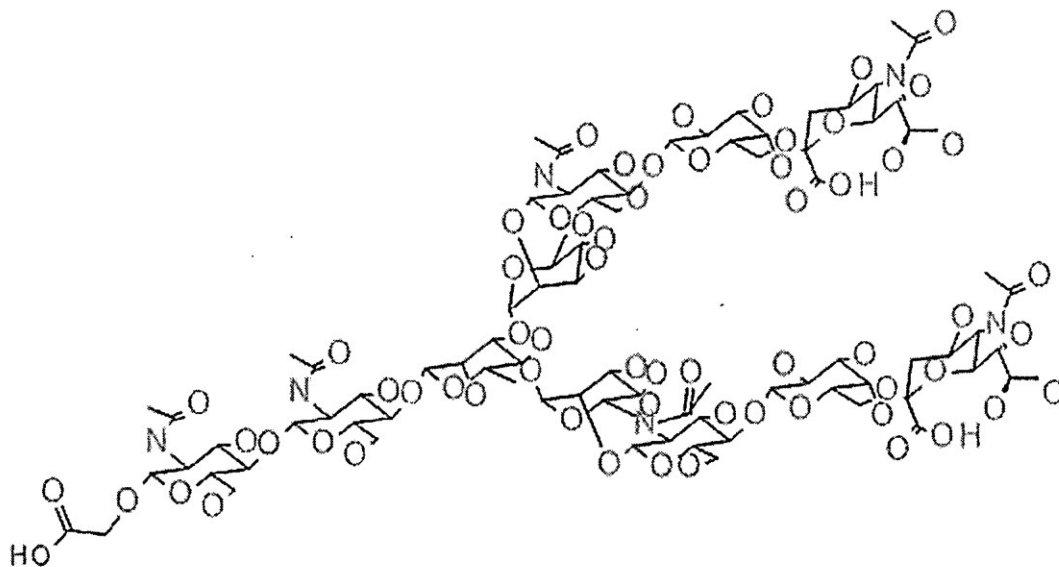
Procedimiento de síntesis 5

Primero, se disolvieron 1.15 equivalentes de SGA en 300 μ l de dimetilformamida y se agregaron a la misma 1.15 equivalentes de tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio y 4.6 equivalentes de N,N-diisopropiletilamina, seguido de agitación durante 1 hora.

5 5 μ mol del péptido se disolvió en 200 μ l de dimetilformamida y se añadieron 4.6 equivalentes de N,N-diisopropiletilamina. Se añadió a esto la solución de reacción de SGA, seguido de agitación. Después de que se confirmó la desaparición de las materias primas mediante HPLC, se agregaron 18.5 μ l de monohidrato de hidrazina y la mezcla se agitó. Después de confirmar la desaparición de la materia prima mediante HPLC, se purificó la solución de reacción mediante cromatografía líquida de alta

10 resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

[Fórmula química 148]



SGA

15

Procedimiento de síntesis 6

Primero, 5 μ moles del péptido se disolvieron en 250 μ L de dimetilformamida. A continuación, se disolvieron 1.5 equivalentes de 3-maleimidopropionato de N-succinimidilo en 400 μ L de dimetilformamida y la mezcla se añadió a la solución de péptidos. Finalmente, se añadieron 2 μ l

20 de N,N-diisopropiletilamina y se hicieron reaccionar juntos. Después de confirmar la desaparición de la materia prima mediante HPLC, se purificó la solución de reacción mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex)

para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 7

5 Primero, 5 μ moles del péptido se disolvieron en 250 μ L de dimetilformamida. A continuación, se disolvieron 1.5 equivalentes de éster de dibenzociclooctin-N-hidroxisuccinimidilo en 800 μ L de dimetilformamida y la mezcla se añadió a la solución de péptidos. Finalmente, se añadieron 2 μ L de N,N-diisopropiletilamina y se hicieron reaccionar juntos. Después de confirmar la desaparición de la materia prima mediante HPLC, se purificó la solución de reacción mediante cromatografía líquida
10 de alta resolución de fase inversa usando Kinetex 5u XB-C18 (150 $\times$ 21.2 mm, producido por Phenomenex) para producir el producto de interés. Como fase móvil se usó agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 8

15 Primero, una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) de 10 mg/ml (sorbitol al 5 %/solución reguladora de acetato 10 mM (pH 5.5)) (28 μ L) se añadió a una solución de Fc de 10.2 mg/ml (sorbitol al 5 %/solución reguladora de acetato 10 mM (pH 5.5) (1.2 ml) para reducir el enlace disulfuro en la región bisagra. Una vez completada la reacción, la TCEP que no había reaccionado se eliminó con NAP25 (producido por GE Healthcare) y solución reguladora de sorbitol al
20 5 %/acetato 10 mM (pH 5.5). Luego, se añadió una solución de dimetilsulfóxido del péptido maleimidado (8 equivalentes) y se incubó a 30°C durante 1 hora. La solución de reacción se sometió a purificación cruda con NAP25 (producido por GE Healthcare) y solución reguladora de sorbitol al 5 %/acetato 10 mM (pH 5.5). Después de que se confirmó el progreso de la reacción mediante cromatografía de interacción hidrófoba en las siguientes condiciones, se realizó el intercambio regulador con Amicon Ultra-15 (30K) (producido por MERCK) para eliminar el péptido sin reaccionar.
25

Procedimiento de síntesis 9

 Primero, una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina de 10 mg/ml (sorbitol al 5 %/solución reguladora de acetato 10 mM (pH 5.5)) (28 μ L) se añadió a una solución de Fc de 10.2 mg/ml (sorbitol al 5 %/solución reguladora de acetato 10 mM (pH 5.5) (1.2 ml) para reducir el enlace
30 disulfuro en la región bisagra. Luego de terminar la reacción, se añadió una solución de dimetilsulfóxido del péptido maleimidado (8 equivalentes) y se incubó a 30°C durante 1 hora. La solución de reacción se sometió a purificación cruda con NAP25 (producido por GE Healthcare) y solución reguladora de sorbitol al 5 %/acetato 10 mM (pH 5.5). Después de que se confirmó el avance de la reacción mediante cromatografía de interacción hidrófoba en las siguientes condiciones,
35 se realizó el intercambio regulador con Amicon Ultra-15 (30K) para eliminar el péptido sin reaccionar.

Procedimiento de síntesis 10

Se añadió una solución de dimetilsulfóxido (1.93 ml) de un péptido modificado con DBCO (7 equivalentes) a una solución (5.00 mg/ml) (solución reguladora de sorbitol al 5 %/acetato 10 mM (pH 5.5)) (7.74 ml) que contiene Fc con un glicano unido a N297 de tipo SG añadido (donde se introdujo un grupo azida al ácido siálico en el extremo no reductor), que se había sometido a remodelación de glicano según el documento WO 2018/003983, y se había incubado a 30°C durante 16 horas. La solución de reacción se sometió a purificación cruda con NAP25 (producido por GE Healthcare) y solución reguladora de sorbitol al 5 %/acetato 10 mM (pH 5.5). Después de que se confirmó el avance de la reacción mediante cromatografía de interacción hidrófoba en las siguientes condiciones, se realizó el intercambio regulador con Amicon Ultra-15 (30K) para eliminar el péptido sin reaccionar. Cabe señalar que el glicano unido a N297 de la molécula que contiene Fc en el conjugado obtenido mediante el Procedimiento de Síntesis 10 es N297-(Fuc)SG.

Procedimiento de síntesis 11

Primero, 44 μ moles del péptido se disolvieron en 29.17 L de agua. Se añadieron 292 mg de acetato de plata a la misma, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que se confirmó la desaparición de las materias primas mediante LC/MS, se agregaron 40.44 ml de una solución mezclada de agua/acetonitrilo (1:1) que contiene 10 mg/ml ($\pm$)-ditiotretitol y ácido trifluoroacético al 0.1% para detener la reacción. La suspensión resultante se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugó (2500 rpm, 5 min). Después de recuperar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 10 ml de una solución mezclada de agua/acetonitrilo (1:1) que contiene ácido trifluoroacético al 0.1 % y se centrifugó (2500 rpm, 5 min) para recuperar el sobrenadante. Esta operación de lavado y recuperación se realizó una vez más. Los sobrenadantes recuperados se liofilizaron colectivamente y el producto bruto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida de fase inversa de presión media para purificar el producto de interés. La columna utilizada fue la Columna Universal ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, Yamazen Corporation), y la fase móvil utilizada fue agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 12

Primero, 5 μ moles del péptido se disolvieron en 5.24 de una solución mezclada de agua/acetonitrilo (1:1). Se añadieron 14.5 μ L de trietilamina a la misma y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Después de que se confirmó la desaparición de las materias primas mediante LC/MS y HPLC, la solución de reacción se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa de presión media. La columna utilizada fue la Columna Universal ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, Yamazen Corporation), y la fase móvil utilizada fue agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto

de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 13

Primero, 6 μ moles del péptido se disolvieron en una solución mezclada de 5.95 L de agua y 1.19 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 16.5 μ L de trietilamina y 3.8 μ L de diiodometano a la
 5 misma y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Después de que se confirmó la desaparición de las materias primas mediante LC/MS y HPLC, la solución de reacción se liofilizó. El producto crudo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida de fase inversa de presión media para purificar el producto de interés. La columna utilizada fue la Columna Universal ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, Yamazen Corporation), y la fase móvil utilizada fue agua/acetonitrilo que contiene
 10 ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de síntesis 14

Primero, 9 μ moles del péptido se disolvieron en 8.96 de una solución acuosa de bicarbonato de amonio de 50 mM. Se disolvieron 3.4 mg de 1,3-dicloroacetona en 1 ml de DMF y se añadieron
 15 a la solución de péptido y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que se confirmó la desaparición de las materias primas mediante LC/MS, la solución de reacción se liofilizó. El producto crudo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida de fase inversa de presión media para purificar el producto de interés. La columna utilizada fue la Columna Universal ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, Yamazen Corporation), y la fase móvil utilizada fue
 20 agua/acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0.1%. Se liofilizó una fracción del producto de interés para producir el producto de interés como una sal de ácido trifluoroacético.

Condición de LC-MS 1

El análisis LC-MS se realizó utilizando Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (producido por Agilent Technology).

25 Columna: Kinetex 1.7u XB-C18 (50 $\times$ 2.1 mm)

Fase móvil: A: 0.1% TFA/agua, B: TFA/acetonitrilo al 0.1%

Temperatura: 40°C

Caudal: 0.6 mL/min.

Gradiente: 0.01 min. (B 10%), 0.33 min. (B 10%), 0.34 min. (B 20%), 0.66 min. (B 20%),
 30 0.67 min. (B 30%), 0.99 min. (B 30%), 1.00 min. (B 40%), 1.33 min. (B 40%), 1.34 min. (B 50%), 1.66 min. (B 50%), 1.67 min. (B 80%), 2.50 min. (B 80%)

Condición de LC-MS 2

El análisis LC-MS se realizó mediante LC: Ultimate 3000 (producido por Thermo Fisher) y MS: Q-Exactive (producido por Thermo Fisher). Antes del análisis, se añadió 8M-Guanidina-HCl en la
 35 misma cantidad que la solución de muestra, se hizo reaccionar a 37°C durante 30 minutos y luego se

midió.

Columna: PLRP-S 1000A 8 μ m 2.1 $\times$ 50 mm (Agilent)

Fase móvil: A: H₂O (0.02% TFA, 0.1% HCO₂H), B: Acetonitrilo

Temperatura: 60°C

5 Caudal: 0.6 mL/min.

Gradiente: 0 min. (B 20%), 4 min. (B 50%), 4.2 min. (B 50%)

Condición de LC-MS 3

El análisis LC-MS se realizó mediante LC: Ultimate 3000 (producido por Thermo Fisher) y MS: Q-Exactive (producido por Thermo Fisher). Antes del análisis, 8M-Guanidina-HCl y TCEP (concentración final: 10 mM) se agregaron en la misma cantidad que la solución de muestra, reaccionó a 37°C durante 30 minutos, y después se midió.

Columna: PLRP-S 1000A 8 μ m 2.1 $\times$ 50 mm (Agilent)

Fase móvil: A: H₂O (0.02% TFA, 0.1% HCO₂H), B: Acetonitrilo

Temperatura: 60°C

15 Caudal: 0.6 mL/min.

Gradiente: 0 min. (B 20%), 4 min. (B 50%), 4.2 min. (B 50%)

Condición de LC-MS 4

El análisis LC-MS se realizó mediante LC: Ultimate 3000 (producido por Thermo Fisher) y MS: Q-Exactive (producido por Thermo Fisher). Antes del análisis, se agregaron 4 μ L de regulador Rapid PNGaseF (formato no reductor) a 16 μ L de la solución de muestra y la mezcla se hizo reaccionar a 90°C durante 3 minutos. Posteriormente se añadió 1 μ L de Rapid PNGaseF, se hizo reaccionar a 50°C durante 10 minutos y luego se midió.

Columna: PLRP-S 1000A 8 μ m 2.1 $\times$ 50 mm (Agilent)

Fase móvil: A: H₂O (0.02% TFA, 0.1% HCO₂H), B: Acetonitrilo

25 Temperatura: 60°C

Caudal: 0.6 mL/min.

Gradiente: 0 min. (B 20%), 4 min. (B 50%), 4.2 min. (B 50%)

EJEMPLO DE PRUEBA 1

30

Ensayo de inhibición de la adhesión celular

1. Materiales y reactivos

- Microplaca no tratada de poliestireno de fondo plano negro con brida baja de 384 pocillos (Corning, 3573)

35

- Proteosave(marca registrada) SS 15 mL (Sumitomo Bakelite, MS-52150)

- Placa humana de trombospondina (Calbiochem, 605225)
- HUVEC (KURABO, KE-4109P10)
- EGM-2 MV (Lonza, CC-3202): para paso de HUVEC
- Cápsula recubierta de colágeno (IWAKI, 4020-010): para paso HUVEC
- 5 - Lipidure (marca registrada)-BL802 (NOF Corporation), solución al 5%
- Glucosa baja en DMEM (GIBCO, 11054-020)
- Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 30% (Sigma A9205)
- CellTiter-Glo 2.0 (Promega G9242)

2. Ensayo

10 <Cubierta de placa>

Trombospondina 1 vial (25 μg) se disolvió en solución salina regulada con Tris (TBS) (CaCl_2 +2 mM; lo mismo se aplicará a continuación) para preparar una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se diluyó con TBS a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tubo de 15 ml de Proteosave(marca registrada). La solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se dispensó en una placa de 384 pocillos a un volumen de 12 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ y se dejó reposar la placa a 4°C durante la noche.

15

<Bloqueo de placa>

Se diluyó Lipidure (marca registrada) 10 veces con TBS para preparar una solución al 0.5%. Después de desechar un regulador de la placa que había sido recubierta en la etapa de<Cubierta de placa> como se describió anteriormente, la solución al 0.5% se dispensó en todos los pocillos para su uso en un volumen de 25 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

20

<Dilución de muestra>

Una solución de 0.2 μM de cada muestra se preparó utilizando un regulador de dilución (DMEM + BSA al 0.5%). Se diluyeron 2 μL de la solución de 0.2 μM con 500 μL del regulador de dilución para preparar una muestra diluida. Como control de vehículo, se diluyó DMSO de la misma forma que las muestras.

25

<Suministro de la muestra>

Se descartó una solución bloqueadora de la placa que había sido tratada en la etapa de<Bloqueo de placa> como se describió anteriormente, y la placa se lavó tres veces con 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de TBS. Se eliminó la solución de lavado utilizada para el tercer lavado y la muestra diluida se dispensó en la placa en un volumen de 10 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$. Luego, la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos.

30

<Propagación HUVEC>

Para mantener las células endoteliales de la vena umbilical humana, se utilizaron HUVEC, EGM2-MV y una placa recubierta de colágeno (las células dejaron de usarse después del décimo o

35

undécimo pase ya que la tasa de proliferación celular disminuyó en esta etapa). Las células se dispersaron con tripsina al 0.05 %/EDTA, se recogieron en DMEM/BSA al 0.5 % y se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos. Después de retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en un regulador DMEM, se contó el número de células y se diluyeron hasta 6000 células/10 μ L. La suspensión celular se dispensó en un volumen de 10 μ L/pocillo en la placa en la que se había dispensado la muestra, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 2.5 horas.

<Lavado y detección>

Se eliminó el medio de cultivo y la placa se lavó dos veces con 30 μ L/pocillo de HBSS/Hepes 0.5% BSA. 20 μ L/pocillo de CellTiter-Glo 2.0 (marca registrada) diluido 2 veces con HBSS/Hepes 0.5% de BSA en un volumen de 20 μ L/pocillo se dispensaron y la solución se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La emisión de fluorescencia se detectó utilizando EnVision Xcite Multilabel Reader (producido por Perkin Elmer).

3. Resultados

Con base en los valores de fluorescencia medidos, se calcularon los valores de IC₅₀ (nM) de los diferentes péptidos cíclicos y conjugados para la inhibición de la adhesión celular. Debe observarse que dos moléculas que contienen Fc conjugados con péptidos cíclicos se entrecruzaron mediante un enlace disulfuro para formar una molécula en los conjugados de glicano Conjugado-61 a Conjugado-97, mientras que las moléculas que contienen Fc (monómeros) no se entrecruzaron en los conjugados de maleimida Conjugado-1 a Conjugado-60. Por lo tanto, las concentraciones molares de los conjugados de maleimida en el cálculo de los valores de IC₅₀ (nM) se determinaron duplicando los pesos moleculares de los monómeros para compararlos con los conjugados de glicano. Dado que cada conjugado de maleimida existe como una mezcla en la que varios glicanos están unidos de forma heterogénea a moléculas que contienen Fc, los cálculos se realizaron utilizando los pesos moleculares de los productos desglicosilados.

Se muestran resultados obtenidos en los Cuadros 2 y 11 a 14. Los resultados de las pruebas anteriores demostraron que del Péptido-1 al Péptido-12, del Péptido-115, del Péptido-119, del Péptido-125 al Péptido-139 y del Conjugado-1 al Conjugado-97 tienen la capacidad de bloquear la adhesión de TSP1 a las células endoteliales vasculares y son útiles para el tratamiento o profilaxis de isquemia crítica de extremidades, enfermedad arterial periférica o isquemia crónica que amenaza las extremidades.

EJEMPLO DE PRUEBA 2

Pruebas de medición de mejora del flujo sanguíneo.

Se adquirieron ratones C57BL/6 de seis a siete semanas de edad de Charles River

- Laboratories Japan Inc. y se aclimataron durante seis días alimentándolos con una dieta sólida FR-2 (producida por Funabashi Farm Co., Ltd.). Las instalaciones de cría cambiaron entre los modos claro y oscuro en un ciclo de 12 horas con la luz encendiéndose a las 7 am y apagándose a las 7 pm. Bajo anestesia por inhalación de isoflurano, se diseccionaron los muslos izquierdos de los ratones y las
- 5 arterias y venas femorales superficiales (desde justo debajo de las arterias femorales profundas hasta la arteria y vena poplíteas) se ligaron y extirparon. Después de crear modelos animales, se disolvieron las sustancias de prueba (Conjugado-4, Conjugado-10, Conjugado-27, Conjugado-34, Conjugado-43, Conjugado-56, Conjugado-63, Conjugado-64 y Conjugado-67) en una solución de regulador de acetato 10 mM, sorbitol al 5% (pH 5.5), y administrado por vía intravenosa en una dosis única de 5 ml/kg.
- 10 Se utilizaron cinco ratones para cada grupo de tratamiento.
- (Prueba 1)
- Grupo tratado con vehículos
- Grupo tratado con conjugado-63 (0.3, 1, 3 mg/kg)
- Duración de la prueba: 20 días
- 15 (Prueba 2)
- Grupo tratado con vehículos
- Grupo tratado con conjugado-64 (0.3, 1, 3 mg/kg)
- Duración de la prueba: 16 días
- (Prueba 3)
- 20 Grupo tratado con vehículos
- Grupo tratado con conjugado-67 (0.3, 1 mg/kg)
- Duración de la prueba: 13 días
- (Prueba 4)
- Grupo tratado con vehículos
- 25 Grupo tratado con conjugado-27 (1, 3 mg/kg)
- Duración de la prueba: 13 días
- (Prueba 5)
- Grupo tratado con vehículos
- Grupo tratado con conjugado-34 (0.3, 1 mg/kg)
- 30 Grupo tratado con conjugado-43 (0.3, 1 mg/kg)
- Duración de la prueba: 15 días
- (Prueba 6)
- Grupo tratado con vehículos
- Grupo tratado con conjugado-56 (0.3, 1 mg/kg)
- 35 Grupo tratado con conjugado-4 (0.3, 1 mg/kg)

Grupo tratado con conjugado-10 (0.3, 1 mg/kg)

Duración de la prueba: 14 días

- Se midieron los flujos sanguíneos en extremidades isquémicas (izquierda) y no isquémicas (derecha) usando un generador de imágenes de perfusión láser Doppler (PeriScan PIM III, Moor LD12-HR). La
- 5 mejora del flujo sanguíneo se evaluó mediante la relación entre el flujo de la extremidad isquémica y el flujo de la extremidad no isquémica. Los valores se expresan como error estándar $\pm$ promedio de 5 medidas. Además, se calculó el AUC del flujo sanguíneo para determinar la relación (%) del valor medio del grupo tratado con la sustancia de prueba con respecto al valor medio del grupo tratado con vehículo.
- 10 Los valores del flujo sanguíneo de los ratones fueron los más bajos inmediatamente después de la cirugía y luego se recuperaron con el tiempo. En comparación con el tratamiento con vehículos, el tratamiento con las sustancias de prueba investigadas en los modelos animales de este estudio mejoró la recuperación del flujo sanguíneo después de la cirugía. Los resultados del flujo sanguíneo (%) el último día de la medición y el AUC del flujo sanguíneo desde el principio hasta el final de la
- 15 medición (frente al grupo tratado con vehículo) se muestran en el Cuadro 15.

CUADRO 15

		% , isquemia / no isquemia			% de cambio AUC (vs. vehículo)
Prueba 1	Grupo tratado con vehículo	19.8	±	3.2	
	Grupo tratado con Conjugado-63 (0.3 mg/kg)	38.3	±	9.9	201.4
	Grupo tratado con Conjugado-63 (1 mg/kg)	54.6	±	15.9	304.4
	Grupo tratado con Conjugado-63 (3 mg/kg)	89.8	±	13.9	371.4
Prueba 2	Grupo tratado con vehículo	22.2	±	5.7	
	Grupo tratado con Conjugado-64 (0.3 mg/kg)	43.2	±	4.6	217.2
	Grupo tratado con Conjugado-64 (1 mg/kg)	70.5	±	3.7	319.2
	Grupo tratado con Conjugado-64 (3 mg/kg)	67.6	±	10.9	338.6
Prueba 3	Grupo tratado con vehículo	19.1	±	4.6	
	Grupo tratado con Conjugado-67 (0.3 mg/kg)	86.4	±	21.3	244.4
	Grupo tratado con Conjugado-67 (1 mg/kg)	75.5	±	5.2	304.3
Prueba 4	Grupo tratado con vehículo	20.6	±	2.5	
	Grupo tratado con Conjugado-27 (1 mg/kg)	23.4	±	4.4	110.2
	Grupo tratado con Conjugado-27 (3 mg/kg)	41.8	±	4.7	174.8
Prueba 5	Grupo tratado con vehículo	20.0	±	2.5	
	Grupo tratado con Conjugado-34 (0.3 mg/kg)	46.3	±	4.9	199.0
	Grupo tratado con Conjugado-34 (1 mg/kg)	71.9	±	6.2	349.0
	Grupo tratado con Conjugado-43 (0.3 mg/kg)	50.5	±	4.2	227.0
	Grupo tratado con Conjugado-43 (1 mg/kg)	70.7	±	10.1	347.7
Prueba 6	Grupo tratado con vehículo	15.2	±	3.0	
	Grupo tratado con Conjugado-56 (0.3 mg/kg)	40.2	±	5.6	187.6
	Grupo tratado con Conjugado-56 (1 mg/kg)	74.8	±	11.0	318.4
	Grupo tratado con Conjugado-4 (0.3 mg/kg)	54.5	±	10.2	263.9
	Grupo tratado con Conjugado-4 (1 mg/kg)	76.1	±	11.2	346.8
	Grupo tratado con Conjugado-10 (0.3 mg/kg)	42.3	±	7.2	241.8
	Grupo tratado con Conjugado-10 (1 mg/kg)	51.6	±	2.5	324.1

EJEMPLO DE PRUEBA 3Pruebas de estabilidad del suero

I. Materiales y reactivos

- 5 - Suero de ratón (BALB/c CrSlc, macho, Japan SLC, Inc.)
 - Suero de mono (mono cynomolgus, macho, Japan SLC, Inc.)
 - Suero humano (caucásico, grupo de 5 machos y 5 hembras, KAC Co., Ltd.)
 - Fenacetina (Nacalai Tesque, Inc.)
 - Ácido niflúmico (Nacalai Tesque, Inc.)
 10 - Furosemida (Nacalai Tesque, Inc.)
 - Acetonitrilo (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
 - Metanol (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
 - Ácido fórmico (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
 - Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

15 II. Evaluación

<Solución estándar interna (IS)>

- Se prepararon soluciones de fenacetina, ácido niflúmico y furosemida en DMSO a 10 µg/ml, 150 µg/ml y 200µg/ml, respectivamente. Se disolvieron 10 µg/ml de fenacetina en DMSO, 150 µg/ml de ácido niflúmico en DMSO, y 200 µg/ml de furosemida en DMSO en una mezcla de acetono/metanol
 20 (75/25, v/v) (concentraciones finales: fenacetina; 1 ng/ml, ácido niflúmico: 15 ng/ml y furosemida 20 ng/ml) y se añadió ácido fórmico a la solución de prueba preparada (concentración final: 1% (v/v)) para preparar una solución IS que contiene ácido fórmico.

<Solución de sustancia de prueba>

- Las sustancias de prueba se prepararon en DMSO a una concentración de 10 mM cada una.
 25 Además, la solución se diluyó con DMSO hasta una concentración de 2 mM para preparar una solución de sustancia de prueba.

<Prueba>

- Cada suero fue preincubado a 37°C durante 5 minutos y luego se añadió la solución de sustancia de prueba a una concentración final de 20 µM para iniciar la reacción. El suero agregado
 30 a la sustancia de prueba se incubó a 37°C. A las 0 y 4 horas después del inicio de la reacción, se extrajo una porción del suero y se añadió a la solución IS que contiene ácido fórmico para detener la reacción, que se utilizó como muestra de medición.

<Medición>

- La sustancia de prueba y el IS (fenacetina, ácido niflúmico y furosemida) en la muestra de
 35 medición se midieron mediante LC-MS/MS, y se calculó la relación del área pico (relación IS) de la

sustancia de prueba a IS (cualquiera de fenacetina, ácido niflúmico, y furosemida). Cabe señalar que para cada prueba se seleccionó el IS con el valor medido más estable.

III. Resultados

El porcentaje de la relación IS a las 4 horas después del inicio de la reacción con respecto al de las 0 horas después del inicio de la reacción se usó como relación residual para evaluar la estabilidad del suero. Se muestran resultados obtenidos en el Cuadro 16. Los péptidos bicíclicos Péptido-1, Péptido-9, Péptido-11, Péptido-126 a Péptido-128, Péptido-130 y Péptido-131 exhibieron una alta estabilidad sérica.

El Péptido-115 y el Péptido-119 son péptidos monocíclicos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren del Péptido-1 y del Péptido-9, respectivamente, sólo en los residuos de las posiciones 3 y 8. El Péptido-1 y el Péptido-9 exhibieron una mayor estabilidad sérica que el Péptido-115 y el Péptido-119, respectivamente. Estos resultados indican que la estabilidad metabólica de los péptidos bicíclicos aumenta en comparación con la de los péptidos monocíclicos y también sugieren que los péptidos bicíclicos tienen una mayor retención de sangre en comparación con los péptidos monocíclicos y, por lo tanto, son adecuados para la producción de medicamentos más sostenidos.

CUADRO 16

Peptide-	Estabilidad en suero de ratón (A 4 horas)	Estabilidad en suero de rmono (A 4 horas)	Estabilidad en suero humano (A 4 horas)
1	100.8	90.6	93.9
9	95.8	93	117.5
11	88	89.9	105.1
126	98.3	100.4	99.6
127	90	95.1	97.5
128	98.1	98.6	99
130	98	93.5	88
131	89.2	89.2	100.9
115	64.5	14.9	78.2
119	70.9	21.1	88.5

Aplicabilidad industrial

El péptido cíclico I de la presente invención puede unirse a TSP1 para bloquear la adhesión de células tales como células endoteliales vasculares a TSP1. Por lo tanto, el péptido cíclico I o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención es útil para el tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1. Además, el péptido cíclico o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención es útil como agente mejorador del flujo sanguíneo. Por lo tanto, el conjugado o su sal farmacéuticamente aceptable de esta invención es útil proporcionando un medio de tratamiento o profilaxis de enfermedades o síntomas que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo una función de TSP1 en frecuencia inferior de administración. El conjugado o sus sales farmacéuticamente aceptables de esta invención también son útiles como un agente mejorador del flujo sanguíneo.

Texto libre del listado de secuencias

SEQ ID Nos: 1 a 123: Péptido-1 a Péptido-123

15 SEQ ID No: 124: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del mAb-A anti-LPS

SEQ ID No: 126: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del mAb-A anti-LPS

SEQ ID No: 128: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del CLCH-A

SEQ ID No: 130: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del CLCH-A

20 SEQ ID No: 132: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del CLCH-B (forma LALA)

SEQ ID No: 134: Secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento Fc (tipo natural)

SEQ ID No: 136: Secuencia de nucleótidos que codifica Fc-A (forma LALA)

SEQ ID No: 138: Fragmento de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica

25 Fc-C (forma LALA-PA)

SEQ ID NOs: 140 a 144: Enlazador L1

SEQ ID NOs: 145 a 147: Enlazador L2a

SEQ ID No: 148: Polipéptido que consta de bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de la cadena pesada de IgG humana.

30 SEQ ID No: 149: Péptido-124

SEQ ID Nos: 150 a 164: Péptido-125 a Péptido-139

SEQ ID No: 165: Secuencia de nucleótidos que codifica Fc-C (forma LALA-PA)

SEQ ID No: 166: Secuencia de aminoácidos Fc-C (forma LALA-PA)