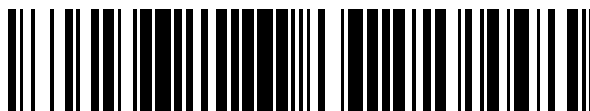


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 635**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05738454 .7**

96 Fecha de presentación: **06.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1765851**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Compuestos análogos de péptidos analgésicos derivados del veneno de serpientes Crotalus durissus terrificus, sus usos, composiciones, procedimientos de preparación y purificación**

30 Prioridad:
06.05.2004 BR PI0401702
02.05.2005 BR PI0502399

45 Fecha de publicación de la mención BOP: **29.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente: **29.03.2012**

73 Titular/es:
Laboratório Biosintética Ltda.
Av. das Nações Unidas, 22.428 Jurubatuba
04795-916 São Paulo, BR y
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo - FAPESP

72 Inventor/es:
CURY, Yara;
PICOLO, Gisele;
KONNO, Katsuhiko;
GIORGI, Renata;
BRIGATTE, Patrícia;
GUTIERREZ, Vanessa y
CAMARGO, Antônio

74 Agente/Representante:
Espiell Volart, Eduardo María

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

ES 2 377 635 T3

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a compuestos que inducen analgesia o que actúan sobre los receptores de opioides en mamíferos. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos análogos de péptidos con efecto analgésico derivados del veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, a sus usos, composiciones farmacéuticas y a procedimientos de preparación y purificación.

Antecedentes de la invención:

Según los datos de la Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor [Sociedad Brasileña para el Estudio del Dolor] (SBED, 2004 http://www.dor.org.br/dor_impactos.asp), el dolor afecta al menos al 30% de los individuos en algún momento de sus vidas, y del 10% al 40% de estos individuos, el dolor dura más de un día. El dolor es la principal causa de sufrimiento, incapacidad laboral y provoca graves consecuencias psicosociales y económicas. Aproximadamente el 40% de estos individuos pierden muchos días de trabajo. No hay estadísticas oficiales sobre el impacto de las afecciones del dolor en la población brasileña, pero su incidencia ha aumentado sustancialmente en los últimos años. Además, la incidencia del dolor crónico en el mundo oscila del 7% al 40% de la población. Como consecuencia, del 50% al 60% de aquellos individuos que padecen dolor crónico llegan a incapacitarse parcialmente o totalmente, temporalmente o permanentemente, comprometiendo significativamente la calidad de vida.

El uso terapéutico de venenos de serpiente observado en seres humanos se remonta a principios del siglo XX (Brasil, V. Biol. Med. São Paulo, 1: 7-21, 1934, Brazil, V. An. Paul. Med. Cir., 60: 398-408, 1950; Klobusitzky D. Anais do Instituto Pinheiros, 1:3-23, 1938) y la bibliografía presenta importantes revisiones del uso de estos venenos como agentes terapéuticos. Estas revisiones muestran, por ejemplo, el uso del veneno de *Crotalus adamanteus* para el tratamiento de la epilepsia y el uso del veneno de *Agkistrodon piscivorus*, *Vipera russelli* y *Notechis scutatus* como agentes hemostáticos (Klobusitzky, D. Anais do Instituto Pinheiros, 1:3-23, 1938).

Los informes sobre la propiedad analgésica de venenos de serpiente observada en seres humanos se remonta a principios de la década de los 30 (Monalessor & Taguet, 1933, apud on Brazil, V. An. Paul. Med. Cir., 60: 398-408, 1950). Con respecto al efecto analgésico del veneno de la serpiente de cascabel sudamericana (*Crotalus durissus terrificus*), denominado en lo sucesivo "CdtV", los primeros estudios se realizaron por el Dr. Vital Brazil. En estos estudios, el Dr. Vital Brazil preparó disoluciones de veneno crotálico altamente diluidas denominadas soluto crotálico. La disolución crotálica se distribuyó a varios médicos en Brasil y en el extranjero y se usó para el tratamiento de diferentes afecciones y trastornos de dolor, principalmente de origen neoplásico. Los resultados de este estudio demostraron que el veneno de la serpiente de cascabel es altamente eficaz en el tratamiento de diferentes síndromes de dolor (Brazil, V. Biol. Med. São Paulo, 1: 7-21, 1934, Brazil, V. An. Paul. Med. Cir., 60: 398-408, 1950).

Con respecto al uso de productos derivados de veneno de serpiente para el tratamiento de afecciones dolorosas, cabe destacar el desarrollo de un producto llamado anaveneno, producido en el Instituto Butantan, por la mezcla de estos venenos con formaldehído que es altamente relevante. Estos productos se indicaron para el tratamiento de diferentes afecciones dolorosas, particularmente en casos en los que los analgésicos usuales no tenían efecto. Este producto demostró potente efecto analgésico, ya que este producto podía sustituir el tratamiento con morfina. El anaveneno también demostró efecto analgésico a largo plazo, ya que los pacientes se trataron normalmente con anaveneno a intervalos de 1 a 3 días entre dosis.

A pesar de los resultados observados por el Dr. Vital Brazil, que muestran el efecto analgésico del veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, no se supo la sustancia activa presente en el veneno bruto responsable del efecto analgésico.

Los estudios de los mecanismos de la acción analgésica de este veneno usando modelos experimentales de evaluación del dolor empezaron en 1990.

Estos estudios mostraron que el CdtV, administrado en ratones, induce un efecto antinociceptivo de larga duración cuando se evalúa en la prueba de la placa caliente, sugiriendo que este veneno puede causar analgesia mediante una acción en el sistema nervioso central (Giorgi R. y col., Toxicon, 31: 1257-65, 1993; Picolo G. y col. Toxicon 36:223-227, 1998). Los estudios farmacológicos mostraron la participación de receptores de opioides κ (Giorgi R. y col., Toxicon, 31: 1257-65, 1993; Brigatte P. y col. Toxicon 39:1399-1410, 2001) en la antinocicepción observada en la prueba de la placa caliente. Tratamientos largos usando el veneno indujeron tolerancia al efecto antinociceptivo en la prueba de la placa caliente, pero no dependencia física. La tolerancia está mediada por mecanismos farmacodinámicos. No se observó tolerancia cruzada con morfina (Brigatte P. y col. Toxicon 39:1399-1410, 2001). Por otra parte, debido al efecto antinociceptivo de larga duración del veneno (5 días después de la administración de una dosis única), no hay desarrollo del fenómeno de tolerancia si el veneno se administra cada 5 días, durante hasta 65 días después de empezar el tratamiento (Brigatte P. y col. Toxicon 39:1399-1410, 2001).

Además del efecto observado en la prueba de la placa caliente, la acción analgésica se demostró para el veneno bruto en dos modelos experimentales de dolor inflamatorio: el modelo de las contorsiones abdominales

inducidas por ácido acético (Giorgi R. y col., *Toxicon*, 31: 1257-65, 1993) y en hiperalgesia inducida por carragenina (Picolo G. y col., *Eur J Pharmacol* 391:55-62, 2000). En el modelo de carragenina, el efecto analgésico del veneno también es un efecto de larga duración, persistiendo hasta 5 días después de la administración de una dosis única del veneno. Este efecto implica la participación de receptores de opioides *delta* periféricos (Picolo G. y col., *Eur J Pharmacol* 391:55-62, 2000).

Por otra parte, en el modelo de hiperalgesia inducida por prostaglandina, la acción antinociceptiva del veneno crotálico está mediada por receptores de opioides *kappa* y *delta* (Picolo G. y col. *Eur J Pharmacol* 469:57-64, 2003). En ambos modelos de hiperalgesia (carragenina y prostaglandina), la antinocicepción inducida por CdtV también implica la estimulación de la ruta de la L-arginina / óxido nítrico (NO) / cGMP, de la proteína cinasa dependiente de cGMP y la activación de canales de potasio sensibles a ATP (Picolo G. y col. *Eur J Pharmacol* 469:57-64, 2003, Picolo y Cury, *Life Science* 75:559-73, 2004).

Es importante enfatizar que el veneno también puede inducir antinocicepción en modelos de dolor persistente, como en el modelo de dolor neuropático inducido por constricción crónica del nervio ciático de ratas (Gutierrez, V. P., Chacur, M., Sampaio, S.C., Picolo, G., Cury, Y. *Memórias do Instituto Butantan* vol. 60, pág. 50, 2003) y en el modelo de dolor por cáncer inducido por la inyección intraplantar de células del carcinoma Walker 256 en ratas (Brigatte, P., Sampaio S.C., Gutierrez, V., Curi, R. Rangel-Santos, A.C., Guerra, J.L., Cury Y., XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Programa e Resumos, pág. 195, 2004). El efecto del veneno en el modelo de dolor neuropático también es largo, ya que se detectó durante hasta 3 días después de la administración de una dosis única del veneno. Como se ha observado en los modelos de hiperalgesia inducida por carragenina o prostaglandina, los receptores de opioides *kappa* y *delta*, la ruta de la L-arginina / NO / cGMP y la apertura de canales de potasio sensibles a ATP son responsables del efecto del veneno en este modelo (Gutierrez, V. P., Chacur, M., Sampaio, S.C., Picolo, G., Cury, Y. *Memórias do Instituto Butantan*, vol. 60, pág. 50, 2003).

Los venenos de serpiente están constituidos por una compleja mezcla de proteínas y péptidos biológicamente activos. De estos venenos ya se aislaron varias sustancias activas con diferentes indicaciones terapéuticas. Como ejemplos, los inventores tienen la patente US5182260 (Maraganore, J.H., 1993), en la que un inhibidor de polipéptidos de la activación de plaquetas se aisló del veneno de la serpiente *Water Moccasin* norteamericana, o la patente US5763403 (Lyan, E.C.Y., 1998), en la que se obtuvo una proteína anticoagulante lúpica del veneno de serpientes *Agkistrodon halys brevicaudus*, o la patente US6489451 (Li, B.X., 2002), en la que una enzima antitrombótica se purificó a partir del veneno de serpientes *Agkistrodon acutus*. En relación con los productos usados en el tratamiento del dolor, la patente americana US6555109 (Shulov, A., 2003) describe una fracción no tóxica aislada del veneno de serpientes *Vipera xanthina palestinae*, y sus productos derivados se usaron para controlar diversos tipos de dolor, que incluyen el dolor crónico. Además, la patente americana US6613745 (Gopalakrishnakone, P., 2003) presenta péptidos con secuencias de aminoácidos derivadas o basadas en la secuencia de aminoácidos de un factor analgésico presente en el veneno de la cobra real (*Ophiophagus hannah*).

La actividad analgésica de la crotamina, una toxina presente en el veneno de serpientes *Crotalus durissus terrificus*, también se encuentra en la bibliografía. Los estudios demostraron que hay una relación dosis-respuesta analgésica cuando la crotamina purificada se inyecta por vías s.c. o i.p. en ratones. El efecto analgésico se inhibió por naloxona, sugiriendo la participación de receptores de opioides (Mancin C. A. y col., *Toxin* 36:12, 1927-1937, 1998).

El opio y sus productos derivados son potentes analgésicos que también tienen otros efectos farmacológicos. Los opioides endógenos y exógenos están entre los analgésicos más usados para el control del dolor, particularmente dolor crónico o incoercible, por ejemplo, dolor por cáncer, dolor neuropático y dolor inflamatorio crónico. Estos fármacos, que actúan sobre receptores específicos, inducen la analgesia en seres humanos y en animales, modificando la respuesta patofisiológica a estímulos químicos, mecánicos o térmicos nocivos (Yaksh, T.L. *Acta Anaesth. Scand.* 41,:94-111, 1997).

Se identificaron al menos tres familias distintas de péptidos opioides endógenos: las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. Cada familia se deriva de un precursor de polipéptidos distinto y tiene una distribución anatómica característica. Estos precursores, denominados proencefalina, proopiometanocortina y prodinorfina, tienen la secuencia de aminoácidos Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu (en la que Tyr, Gly, Phe, Met y Leu se corresponden con el aminoácido tirosina, glicina, fenilalanina, metionina y leucina, respectivamente), localizada en la porción del extremo N de los péptidos opioides (Przewlocki R. y Przewlocka B. *Eur. J. Pharmacol.* 429:79-91, 2001, Reisine T. y Pasternak, G. en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman J.G. e Limbird L.E. eds, 9ª ed, Nueva York, McGraw-Hill, pág. 521-555, 1996).

Los opioides, que actúan sobre terminaciones nerviosas aferentes, inhiben la adenililciclase, disminuyendo la producción de cAMP (Schultz, J.E.J. y Gross, G.J. *Pharmacol. Ther.*, 89:123-137, 2001) e inhibiendo la apertura de canales de calcio, con el consecuente bloqueo de la liberación de neurotransmisores (Junien, J.L. y Wettstein, J.G. *Life Science*, 51:2009-18, 1992; Zaki, P.A. y col. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36:379-401, 1996; Yaksh, T.L. *Acta Anaesth. Scand.* 41:94-111, 1997).

Además, los opioides activan la ruta de la L-arginina-óxido nítrico-GMPc, induciendo la apertura de los

canales de potasio, con la consecuente hiperpolarización de la membrana celular (Ferreira, S.H. y col. Eur. J. Pharmacol., 1217: 225-7, 1991; Ferreira, S.H. y col. Br. J. Pharmacol., 114: 303-8, 1995; Nozaki-Taguchi, N. y Yamamoto, T. Anesth. Anal., 87: 388-93, 1998; Amarante, L.H y Duarte, I.D. Eur J Pharmacol., 454:19-23, 2002). El efecto antinociceptivo de agonistas de opioides sobre los canales de K^+ implica tanto a los canales de K^+ sensibles a ATP como a los dependientes del voltaje (Welch, S. y Dunlow, L.D. J. Pharmacol. Exp. Ther., 267:390-399, 1993; Rodrigues, A.R A. y Duarte I.D.G. Br. J. Pharmacol, 129:110-114, 2000; Schultz, J.E.J. y Gross, G.J. Pharmacol. Ther., 89:123-137, 2001).

Adicionalmente, varios estudios han mostrado que los analgésicos opioides, que incluyen agonistas de opioides κ , afectan la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Li, J.G., y col., J. Biol. Chem., 274:12087-12094, 1999; Eitan, S. y col., J. Neuroscience, 23:8360-8369, 2003; Lesscher, H.M.B. y col., Neuroscience, 116:139-144, 2003).

Además de la existencia de múltiples péptidos que presentan actividad opioide, la existencia de múltiples receptores de opioides se caracterizó farmacológicamente. Por tanto, se considera que los analgésicos opioides inducen sus efectos por interacción con receptores específicos, constituidos por al menos 3 clases principales: μ (*mu*), κ (*kappa*) y δ (*delta*) (Yaksh, T. L. Eur. J. Anaesthesiol. 1:201-243, 1984), distribuidos en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos, con distintas actividades farmacológicas, distribución y función anatómica (Junien, J.L. y Wettstein, J.G. Life Science, 51:2009-2018, 1992; Yaksh, T.L. Acta Anaesth. Scand. 41:94-111, 1997).

Las acciones centrales y periféricas de opioides son componentes importantes de su uso terapéutico. Los receptores *mu* son responsables de la mayoría de los efectos analgésicos de los opioides y de algunos de sus efectos adversos tales como depresión respiratoria y cardiovascular, euforia, dependencia, sedación y alteración de varias funciones neuroendocrinas [Brownstein, M.J. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90:5391-5393, 1993].

Estos efectos secundarios se producen principalmente como consecuencia de la acción de estos agonistas en el sistema nervioso central. Este es el principal motivo de los analgésicos opioides subutilizados en el control del dolor. Los receptores de opioides *delta* son probablemente más importantes en la periferia, aunque también producen analgesia central. Además de analgesia, estos receptores modulan motilidad gastrointestinal y varias funciones hormonales. Por otra parte, los receptores de opioides *kappa* inducen analgesia sin causar los efectos adversos característicos de receptores μ tales como estreñimiento, picor, depresión respiratoria, dependencia y/o adicción física. Sin embargo, los receptores *kappa* mantienen algunos efectos centralmente mediados tales como sedación y disforia, pero no dependencia física (Vanvoigtlander y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 224: 7-12, 1983; Wood, P.L. y lyengar, S. en: The opioid receptors. Pasternak, G.W. ed. Humana press, Clifton, N.Y., 1988). Estos receptores son responsables del equilibrio de la bebida, ingesta de alimentos, motilidad intestinal, control de la temperatura y varias funciones endocrinas (Leander, J. Pharmacol. Exp. Ther., 227: 35-41, 1983; Leander y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 234, 463-469, 1985; Morley y col., Peptides 4, 797-800, 1983; Manzanares y col., Neuroendocrinology 52, 200-205, 1990; lyengar y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 238, 429-436, 1986).

La morfina y la codeína, los analgésicos opioides más clínicamente usados, actúan de agonistas de receptores de opioides *mu*. Estos opioides producen efectos adversos no deseables muy conocidos, por ejemplo, el desarrollo de dependencia física. Los agonistas de receptores *kappa* o *delta* actúan de analgésicos actuando sobre los receptores de opioides *kappa* y *delta*, respectivamente. La ventaja de estos agonistas con respecto a los agonistas clásicos de receptores *mu*, por ejemplo, la morfina, resulta de su capacidad en causar analgesia sin inducir los efectos de comportamiento secundarios no deseables descritos para la morfina. Es sabido que la relación estructural entre receptor de opioides y su ligando es responsable de la selectividad y especificidad por el receptor. Sin embargo, varios estudios indican que las interacciones específicas de los receptores de opioides con varios compartimentos de membrana pueden contribuir a la capacidad de estos opioides para interaccionar selectivamente con receptores específicos (Janecka A. y col. Mini Rev Med Chem. 2:565-572, 2002; Naito A. y Nishimura K. Curr Top Med Chem. 4:135-145, 2004; Singh VK y col. Neuroimmunomodulation. 4:285-297, 1997). La presente invención se refiere a péptidos novedosos los cuales no son homólogos a las encefalinas, endorfinas o dinorfinas, y tampoco a los péptidos sintéticos con actividad preferencial por receptores de opioides *kappa*.

Es conocido por la bibliografía que la aparición de efectos adversos usando opioides para fines terapéuticos disminuye cuando la especificidad y selectividad por opioides aumenta para tipo o subtipo específico de receptores. Aquellos agonistas que tienen afinidad por receptores de opioides *kappa* y/o *delta* han demostrado potente actividad analgésica, sin presentar efectos adversos graves, tales como dependencia física, depresión respiratoria e inhibición del movimiento de la musculatura lisa, efectos que se observan por a morfina y derivados de agonistas de receptores *mu* (Nagase, H.; Kawai, K.; Kawamura, K.; Hayakawa, J.; Endoh, T.; patente US6323212, 2001). Efectos adversos tales como dependencia física y depresión respiratoria inducida por opioides están asociados a la acción de estos fármacos sobre el sistema nervioso central. Los opioides convencionales como morfina, naloxona, levorfanol, encefalinas, endorfinas y dinorfinas y análogos son generalmente moléculas hidrófobas. Por tanto, estos opioides pueden penetrar a través de membranas tales como la barrera hematoencefálica, acumulándose fácilmente en tejidos adiposos y órganos. Esta permeabilidad también se ha asociado a efectos adversos en el sistema nervioso central, como euforia y adicción. Además, estos péptido deben administrarse en dosis elevadas, produciendo reacciones tóxicas asociadas con la larga exposición a los opioides (patente US5602100; Brown, W.L., 1997). En el estado de la técnica se encontraron algunas patentes que sugerían

el uso combinado de diversos antagonistas y agonistas, formulados o no, como agentes antinociceptivos e antiinflamatorios. Estos estudios sugieren el uso de composiciones farmacéuticas con acción concomitante en diferentes rutas nociceptivas y/o mecanismos inflamatorios, interfiriendo en el origen de ambos procesos (nociceptivos e inflamatorios), por ejemplo, en procesos quirúrgicos como en procedimientos orales y/o dentales. Estos agentes pueden ser: un antagonista del receptor 5HT-2, un antagonista del receptor 5HT-3, antagonista de histamina, agonista de serotonina, inhibidor de la ciclooxigenasa, antagonista del receptor de la neuroquinina 1, antagonista del receptor de la neuroquinina 2, antagonista de purinorreceptores, antagonista de canales de calcio, antagonista del receptor de la bradiquinina B1, antagonista del receptor de la bradiquinina B2 y un agonista del receptor de opioides *mu*. Además, la asociación de fármacos para el tratamiento de destrucción del cartílago también se describe en estas patentes (patente US6420432; Demopulos, G., 2002; documento US2003096807 A1; Demopulos, G., 2003).

En el estado de la técnica se encontraron muchos trabajos sobre farmacología molecular y manipulación genética de péptidos opioides, receptores de opioides y agonistas y antagonistas de receptores de opioides. Estos estudios cubrieron los efectos bioquímicos y moleculares de los opioides, la localización neuroquímica de opioides endógenos y sus receptores relacionados con el comportamiento. Además, también se investigaron la relación de estos opioides con analgesia y dolor, estrés, tolerancia y dependencia, aprendizaje y memoria, alcoholismo y toxicomanía, actividad sexual y hormonal, embarazo y desarrollo endocrino, actividad cerebral general y locomoción, trastornos neurológicos, funciones gastrointestinal, renal y hepática y respuestas cardiovasculares (Bodnar, R y Hadjimarkou, Peptides, 24, 1241-1302, 2003).

En la patente US5866346 (Yu. L., 1999), Lei Yu describe el procedimiento de uso de dinorfinas como ligandos para el receptor XOR1. Por tanto, compuestos que son agonistas de receptores de opioides *kappa* preferenciales podrían ser ligandos para receptores XOR1.

Aunque en la bibliografía se ha descrito el uso de venenos de serpiente y de péptidos que actúan sobre los receptores de opioides, todavía no se ha determinado la naturaleza de la sustancia analgésica activa presente en el veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, o su eficacia, cuando se administra en forma purificada, incluyendo vías de administración oral. Tales datos tampoco explicaron la eficacia de compuestos análogos a tal sustancia activa, ni su acción específica sobre receptores de opioides.

Descripción de la invención:

La presente invención se basa en el descubrimiento y la caracterización de la sustancia analgésica activa presente en el veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*. También confirma el efecto analgésico de tal sustancia cuando se administra en su forma purificada, incluyendo la vía de administración oral. La presente invención también se basa en la evidencia de la eficacia analgésica de compuestos análogos de la sustancia activa presentes en el veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, además de en la evidencia de la acción de tales compuestos sobre receptores de opioides.

La solicitud describe compuestos análogos a la sustancia analgésica presente en el veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus* los cuales tienen propiedades farmacológicas que imitan a los compuestos con la estructura:

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-R5-Ser-R6-Pro-Cys (SEQ ID NO: 1)

en la que:

Xaa es siempre piroglutamato,

R1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

R2 = Pro o Arg,

R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx,

R6 = Glx o Lys,

sus sales, solvatos o compuestos análogos, excepto cuando el compuesto es un tetradecapéptido en el que R1=Phe, R2=Pro, R3=Glu, R4=Asn, R5=Glu y R6=Gln, los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 2). Como primer aspecto independiente principal, la presente invención se refiere a un péptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys

en la que:

Xaa es piroglutamato,

R1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

5 R2 = Pro o Arg,

R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx, y

R6 = Glx o Lys,

10 en la que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 4);

una sal o un solvato del mismo.

15 Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos según SEQ ID NO: 1, caracterizados por los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 que están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 4); en particular compuestos análogos a tetradecapéptido con la secuencia de aminoácidos Xaa-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys en la que Xaa es piroglutamato y los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 2); como por ejemplo tetradecapéptidos que presentan la secuencia de péptidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO 4.

20 Como se usa en este documento, el concepto "compuestos análogos" se aplica a compuestos que tienen estructura química con porciones que presentan, incluso parcialmente, propiedades farmacológicas de péptidos de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en relación con su acción analgésica o de su interacción agonista o antagonista directa o indirecta, con receptores de opioides.

25 La solicitud también describe compuestos que imitan a las propiedades farmacológicas de péptidos que contienen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO 4 caracterizados por añadir, eliminar o alterar las propiedades peptidomiméticas, para la modulación de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, que incluyen la sustitución de uno o más D-aminoácidos o aminoácidos no convencionales por L-aminoácidos o incluso presentando el residuo de prolina en la posición 4 o γ -carboxilación de los residuos de glutamato en las posiciones 5 ó 10. Ejemplos de D-aminoácidos y aminoácidos no convencionales se describen (no limitándolos), por ejemplo, en la publicación US6613745 (National University of Singapore, 2003) o en la publicación "A Textbook of Drug Design and Development", 2ª edición, Harwood Academic Publishers, Singapur.

30 La solicitud describe adicionalmente compuestos análogos a péptidos que presentan las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, caracterizados por estar purificados o en su forma pura.

35 Según la presente invención, el término "purificado" se corresponde con compuestos sustancialmente libres de contaminantes que se producen a partir de componentes celulares, otros constituyentes del veneno, cultivo de medio u otros materiales tales como reactivos usados en la síntesis química de los "compuestos". Preferentemente, los "compuestos purificados" están en una cantidad superior al 50% de la masa seca de la mezcla, más preferentemente en una cantidad superior al 90% de la masa seca de la mezcla, particularmente superior al 95%.

40 La solicitud también describe composiciones farmacéuticas caracterizadas por contener uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferencialmente purificados.

Como segundo aspecto independiente principal, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y uno o más péptidos que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 4.

45 Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluidas en la presente invención son, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, pastas, geles para cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, sustancias liofilizadas, sistemas de liberación controlada, micropartículas, micro o nanoesferas, liposomas y formulaciones asociadas a recubrimientos orgánicos, etc. Vías de administración posibles para composiciones farmacéuticas incluidas en la presente invención son: oral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, rectal, sublingual, intradérmica, intraperitoneal, intratecal, etc., en formas de liberación inmediata, retardada, prolongada o controlada. Ejemplos de formas farmacéuticas, vehículos, diluyentes y vías de administración incluidos en la

50

presente invención se describen (no se limitan a), por ejemplo, en el libro Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE.UU.

La solicitud también describe composiciones farmacéuticas caracterizadas por contener uno o más principios activos en asociación con compuestos análogos a péptidos que presentan las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, en la misma unidad de dosificación o en forma de kits.

Como otro aspecto específico, cuando las composiciones son líquidas, semi-sólidas, o en formas secas para reconstitución, éstas contienen un diluyente basado en agua. Como otro aspecto específico, las composiciones pueden ser para administración por vía oral, presentando la ventaja con respecto a composiciones inyectables, con respecto a la comodidad del paciente usando estas vías de administración y aceptabilidad del tratamiento.

La solicitud describe adicionalmente el uso de uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferentemente purificados o puros, en la preparación de composiciones farmacéuticas analgésicas o útiles en el tratamiento, diagnóstico o prevención de afecciones moduladas por receptores de opioides.

Como tercer aspecto independiente principal, la presente invención incluye el péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de una afección modulada por receptores de opioides.

La solicitud también describe el uso de uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferentemente purificados o puros, en la preparación de composiciones con propiedades agonistas o antagonistas, directas o indirectas, de receptores de opioides, particularmente receptores de opioides *kappa*.

La solicitud describe adicionalmente el uso de uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferentemente purificados o puros, como sustancias analgésicas, particularmente en composiciones farmacéuticas para administración por vía oral y/o compuestos con efectos analgésicos de larga duración hasta 5 días después de la administración. Como cuarto aspecto independiente principal, la invención incluye el péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención del dolor.

La solicitud también describe el uso de uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferentemente purificados o puros, para la preparación de composiciones útiles en el tratamiento, diagnóstico o prevención de dolor agudo o crónico que incluye dolor por cáncer, dolor neuropático como neuralgia trigeminal, migraña, distrofia simpática, neuralgia posherpética, dolor de miembro fantasma, accidente cerebrovascular (accidente cerebrovascular), neuropatía diabética, dolores asociados a neoplasia, fibromialgia, dolor dental, dolores por dismenorrea, renales, menstruales o por cólico biliar, de articulaciones, artritis que incluye artritis reumatoide o artritis degenerativa, hipertensión intraocular, dolor postartroscopia, dolor ginecológico postlaparoscopia, dolor producido por nefrolitotomía percutánea, dolor postprostatectomía retropúbica radical, dolor postoracotomía, dolor post-tonsilectomía en pacientes pediátricos, dolor posthisterectomía, dolores postoperatorios por cesárea o por quemaduras, dependencia de cocaína u opioides, proliferación celular, carcinoma pulmonar de células pequeñas, depresión y psicosis, inflamación, afecciones asociadas debido al aumento de angiogénesis, heridas, enfermedades isquémicas coronarias, enfermedad de Parkinson y disquinesias, encefalopatía hepática, enfermedades cognitivas, enfermedad de Alzheimer, picor debido a colestasis hepática o hiperinsulinemia en mujeres con ovario poliquístico.

La solicitud describe procedimientos para tratar, diagnosticar y prevenir afecciones dolorosas o afecciones mediadas por receptores de opioides usando uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, preferentemente purificados o puros.

En particular, la solicitud describe procedimientos para tratar, diagnosticar y prevenir afecciones moduladas por receptores de opioides usando uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, con propiedades directas o indirectas, agonistas o antagonistas, en receptores de opioides, particularmente receptores de opioides *kappa*.

La solicitud también describe procedimientos para tratar, diagnosticar y prevenir afecciones dolorosas caracterizadas por el uso de uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, por vía de administración oral y/o con composiciones farmacéuticas con efecto analgésico de larga duración hasta 5 días después de la administración.

La solicitud describe adicionalmente procedimientos para tratar, diagnosticar y prevenir, usando uno o más compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, afecciones tales como dolor agudo o crónico que incluye dolor por cáncer, dolor neuropático como neuralgia trigeminal, migraña, distrofia simpática, dolor postherpético, dolor de miembro fantasma, accidente cerebrovascular (accidente cerebrovascular), neuropatía diabética, dolores asociados a neoplasia, fibromialgia, dolor dental, dolor por

dismenorrea, renal, menstrual o cólico biliar, dolor de articulaciones, artritis incluyendo artritis reumatoide o artritis degenerativa, hipertensión intraocular, dolor postartroscopia, dolor ginecológico postlaparoscopia, dolor producido por nefrolitotomía percutánea, dolor postprostatectomía retropúbica radical, dolor post-toracotomía, dolor post-tonsilectomía en pacientes pediátricos, dolor posthisterectomía, dolores postoperatorios por cesárea o por quemaduras, dependencia de cocaína u opioides, proliferación celular, carcinoma pulmonar de células pequeñas, depresión y psicosis, inflamación, afecciones asociadas debido al aumento de angiogénesis, heridas, enfermedades isquémicas coronarias, enfermedad de Parkinson y disquinesias, encefalopatía hepática, enfermedades cognitivas, enfermedad de Alzheimer, picor debido a colestasis hepática o hiperinsulinemia en mujeres con ovario poliquístico.

Como quinto aspecto independiente principal, la presente invención incluye un procedimiento para producir un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys

en la que:

Xaa es piroglutamato,

R1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

R2 = Pro o Arg,

R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx, y

R6 = Glx o Lys,

una sal o un solvato del mismo, en el que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 4); en el que el procedimiento comprende oxidar grupos sulfhidrilo sobre los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14, formando así un puente disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína.

La invención también incluye un procedimiento para producir un péptido que comprende SEQ ID NO: 4 en el que el procedimiento comprende síntesis de péptidos en fase sólida.

La solicitud describe procedimientos de producción y purificación de compuestos análogos a péptidos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos.

La solicitud también describe procedimientos de producción de compuestos que contienen la secuencia SEQ ID NO 4, sus sales y compuestos análogos, que contienen puente disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14, caracterizados porque implican la etapa de oxidación de los sulfhidrilos de posiciones 7 y 14 con un agente enzimático o mediante oxidación con agentes de oxidación (tales como yodo, aire, oxígeno o ferrocianuro de potasio), o incluso caracterizados porque implican una etapa de purificación de un compuesto que contiene en su estructura la secuencia de aminoácidos.

Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys (SEQ ID NO: 5)

en la que

R5 = Glx o Asx,

R6 = Glx o Lys

y en el que los residuos de cisteína están ligados por un puente disulfuro intramolecular.

La invención también incluye un procedimiento para producir el péptido de la reivindicación 1 que comprende purificar una mezcla de compuestos de origen sintético o semisintético y un procedimiento para producir

el péptido de la reivindicación 1 que comprende purificar una mezcla de compuestos de origen biológico.

La solicitud describe procedimientos de producción de compuestos que contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, sus sales, solvatos o compuestos análogos, purificados, mediante la purificación de mezclas de compuestos de origen sintético, semisintético o biológico; por ejemplo: el veneno bruto de serpientes *Crotalus durissus terrificus* o incluso cultivos celulares de microorganismos recombinantes o sus lisados respectivos usando precipitación y/o separación selectiva por procedimientos cromatográficos.

En el caso de precipitación selectiva, es particularmente útil el uso de disoluciones de ácido trifluoroacético en mezclas de acetonitrilo y agua, particularmente en concentración de aproximadamente el 0,1% de ácido trifluoroacético en mezclas de acetonitrilo y agua en una proporción de aproximadamente 1:2.

Para la separación por cromatografía es particularmente útil el uso de columnas de HPLC de fase inversa y aplicación de fase móvil con concentración en gradiente, y el uso de disoluciones de ácido trifluoroacético en acetonitrilo y agua como fase móvil.

Ejemplos de procedimientos de síntesis y purificación de compuestos análogos a péptidos con secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 incluyen, por ejemplo (no se limitan a), aquellos descritos en la publicación "Amino Acid and Peptide Synthesis", 2ª edición, Oxford University Press, Bath, Gran Bretaña; Principles of Biochemistry, 3ª Edición, Worth Publishers, EE.UU.

La solicitud describe procedimientos de identificación de compuestos que imitan la actividad analgésica de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Como sexto aspecto principal, la presente invención incluye procedimientos para identificar compuestos que imitan la actividad analgésica de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1, procedimiento que comprende:

a) evaluar la actividad biológica de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1 para determinar la actividad de analgesia del péptido,

b) evaluar la actividad biológica de un compuesto de prueba para determinar la actividad de analgesia del compuesto de prueba; y,

c) comparar los resultados obtenidos para la actividad biológica de los péptidos con los resultados obtenidos para la actividad biológica del compuesto de prueba;

o

a) poner en contacto un péptido marcado que consiste en SEQ ID NO: 1 con una muestra,

b) añadir un compuesto de prueba a la muestra en contacto con el péptido marcado; y,

c) medir la unión del péptido marcado a la muestra.

La solicitud también describe procedimientos para identificar compuestos que imitan la actividad analgésica de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, caracterizados porque incluyen las etapas de:

a) evaluación de la actividad biológica de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 para determinar su actividad analgésica,

b) evaluación de la actividad biológica de un compuesto de prueba (control) para determinar la actividad analgésica y

c) comparar los resultados obtenidos para la actividad biológica de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 con los resultados obtenidos para el compuesto de prueba (control)

o

a) insertar un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, marcada, en contacto con una muestra de prueba,

b) añadir un compuesto de prueba a la muestra de prueba en contacto con un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, marcada, y

c) evaluar el enlace peptídico de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, marcada, con la muestra de prueba.

Ejemplos de procedimientos de identificación de compuestos que imitan la actividad analgésica de péptidos se describen (sin limitación), por ejemplo, en la publicación US5877026 (Lampe R.A., 1999).

La presente invención se ilustra complementariamente por los siguientes ejemplos experimentales no limitativos:

EJEMPLO 1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ENPAK-k DEL VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*.

20 mg de veneno sin refinar liofilizado de serpientes *Crotalus durissus terrificus* (proporcionado por el Laboratorio de herpetología del Instituto Butantan) se diluyeron en 1,5 ml de una disolución 1:2 de acetonitrilo / agua que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). El sobrenadante se fraccionó mediante una columna Sep-Pak C¹⁸ (2g, 12cc, Millipore) y se eluyó en diferentes concentraciones de acetonitrilo / agua (que contenía 0,1% de TFA). Este procedimiento se repitió 60 veces y se liofilizó el conjunto obtenido de las fracciones de cada concentración de acetonitrilo / agua.

La fracción obtenida de la elución de 20% de acetonitrilo / agua (que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético - TFA) se disolvió en agua y se sometió a una columna HPLC de fase inversa (Shimadzu Co. Ltd.) usando una columna de 6 mm x 150 mm CAPCELL PAK C₁₈ (Shiseido Co. Ltd.) en gradiente lineal del 15% al 35% de acetonitrilo / agua (que contenía 0,1% de TFA), con flujo de 1 ml/min durante 25 minutos a temperatura ambiente. La fracción obtenida del tiempo de retención de 10,7 minutos se recogió con monitorización espectrofotométrica UV en la longitud de onda a 215 nm.

La fracción obtenida se sometió de nuevo a HPLC usando una columna de 6 mm x 150 mm CAPCELL PAK C₁₈ en modo isocrático del 15% de acetonitrilo / agua (que contenía 0,1% de TFA), con flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, y la fracción obtenida del tiempo de retención de 14 minutos se recogió con monitorización espectrofotométrica UV en la longitud de onda a 215 nm. La fracción resultante demostró alto grado de pureza en espectrometría de masas MALDI-TOF usando Ettan MALDI-Tof/Pro (Amersham Biosciences), con pico iónico molecular [(M+H)⁺, monoisotópico] a *m/z* 1534,6. Esta fracción se liofilizó y se ha denominado ENPAK-k en la presente invención.

EJEMPLO 2. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ENPAK-k

La secuencia de aminoácidos del péptido resultante se determinó por espectrometría de masas, ya que la secuencia no se obtuvo mediante degradación de Edman, debido al bloqueo del extremo N.

Inicialmente, el puente disulfuro se redujo y se alquiló. Una alícuota de ENPAK-k puro resultante se disolvió en 10 µl de agua. A esta disolución se añadieron 10 µl de 5 mM de ditiotreitól en 25 mM de tampón bicarbonato de amonio, y la disolución se mantuvo a 60°C durante 30 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente se añadieron 10 µl de una disolución 55 mM de yodoacetamida en 25 mM de tampón bicarbonato de amonio y luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. El EM de MALDI-TOF de este producto mostró un pico iónico molecular [(M+H)⁺, monoisotópico] a *m/z* 1650,7, demostrando que hay un puente disulfuro en el péptido natural.

La secuencia de péptidos reducida-alquilada se analizó por espectrometría de masas en tándem por ESI usando Q-ToF *Ultima*[™] (Micromass). Un espectro de masas en tándem del ión cargado doble [(M+2H)²⁺, monoisotópico] a *m/z* 825,90 proporcionó las series de iones *b* y *y*, dando una secuencia de 14 residuos de aminoácidos hipotéticos representados por: pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Lys/Gln-Gly-Glu-Ser-Lys/Gln-Pro-Cys, considerando los datos obtenidos con la espectrometría de masas, en la que pGlu muestra residuos de piroglutamato y Lys/Gln implica que es posible Lys o Gln en esta posición. Los 2 residuos Cys están ligados entre sí por un puente disulfuro.

Por tanto, serían posibles 4 secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 que se corresponderían con ENPAK-k. Se obtuvieron las siguientes secuencias:

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys (SEQ ID NO: 2)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Lys-Pro-Cys (SEQ ID NO: 3)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Lys-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys (SEQ ID NO: 6)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Lys-Gly-Glu-Ser-Lys-Pro-Cys (SEQ ID NO: 7)

en las que los residuos de cisteína están ligados por un puente disulfuro intramolecular y los aminoácidos se representan por el código de tres letras correspondiente a, respectivamente:

pGlu = piroglutamato

Phe = fenilalanina

5 Ser = serina

Pro = prolina

Glu = ácido glutámico

Asn = asparagina

Cys = cisteína

10 Gln = glutamina

Lys = lisina

Gly = glicina

15 Estas secuencias de aminoácidos, cuando se compararon con secuencias de proteínas conocidas depositadas en la base de datos Swiss Prot, mostraron que el péptido de SEQ ID NO: 2 tenía identidad con la secuencia de aminoácidos de la porción del extremo C de crotapotina, la subunidad ácida no tóxica de la crotoxina del veneno de serpiente de la especie *Crotalus durissus terrificus* (Faure G, Guillaume JL, Camoin L, Saliou B, Bon C. Biochemistry, 1991, 13, 8074-8083); excepto por el hecho de que los residuos de cisteína en la porción del extremo C de la crotapotina no presentaban puente disulfuro intramolecular como el péptido de SEQ ID NO: 2:

20 Porción del extremo C de la crotapotina, la subunidad ácida no tóxica de la crotoxina del veneno de serpiente de la especie *Crotalus durissus terrificus*:

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys (SEQ ID NO: 8)

EJEMPLO 3. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DE SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, COMO EJEMPLO NO LIMITANTE.

25 Los péptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 se obtuvieron mediante la síntesis de péptidos manual en fase sólida, mediante la estrategia Fmoc, usando la resina H-Cys(Trt)-2-ClTrt como soporte sólido.

30 Entonces, cada uno de los péptidos sintetizados se escindió de la resina mediante la adición de acético / trifluoroetanol / diclorometano (1:1:8) a temperatura ambiente, durante 1 hora, seguido de desprotección mediante una disolución de TFA / tioanisol / 1,2-etanoditiol (94:5:1), también a temperatura ambiente, durante 2 horas. Después de los tratamientos se añadió éter a la disolución de TFA para precipitar los péptidos. El precipitado se lavó 3 veces con éter para obtener los péptidos sin refinar libres de SH. El puente disulfuro se formó por el tratamiento con disolución 0,1 M de metanol y yodo a temperatura ambiente, durante 30 minutos, seguido de la adición de una disolución acuosa de ácido ascórbico 0,1 M. Después, los péptidos sin refinar obtenidos se purificaron por HPLC de fase inversa usando YMC-Pak ODS, 20 x 150 mm (Yamamura Kagaku Co. Ltd.), en gradiente lineal del 15% al 35% de acetonitrilo / agua que contenía 0,1% de TFA con flujo de 8 ml/min durante 25 minutos, a temperatura ambiente. La comparación de los péptidos sintéticos resultantes:

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys (SEQ ID NO: 2)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Lys-Pro-Cys (SEQ ID NO: 3)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Lys-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys (SEQ ID NO: 6)

pGlu-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Lys-Gly-Glu-Ser-Lys-Pro-Cys (SEQ ID NO: 7)

en las que los residuos de cisteína están ligados por un puente disulfuro intramolecular,

con el péptido ENPAK-k natural, en HPLC y espectrometría de masas, demostró que el péptido de SEQ ID NO: 2 es idéntico al ENPAK-k natural. Complementariamente, el péptido de SEQ ID NO: 2 mostró la misma actividad analgésica que el ENPAK-k natural.

- 5 El péptido de SEQ ID NO: 3 también demostró actividad analgésica, mientras que los otros 2 péptidos (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7) mostraron inactividad en condiciones similares.

Basándose en los estudios de modelado molecular de las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 se probaron otras secuencias importantes para la presente invención:

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys (SEQ ID NO: 1)

- 10 particularmente

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys (SEQ ID NO: 4)

en la que:

Xaa es siempre piroglutamato,

R1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

- 15 R2 = Pro o Arg,

R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx,

R6 = Glx o Lys,

EJEMPLO 4. IDENTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ANALGÉSICA EN CADA ETAPA DE PURIFICACIÓN: PRUEBA DE PRESIÓN DE LA PATA DE RATA

- 20 Para evaluar la sensibilidad de los animales al dolor se usaron ratas Wistar macho que pesaban entre 170-190 g proporcionadas por Biotério Central del Instituto Butantan. Los animales se mantuvieron en el laboratorio, con ciclo de luz / oscuridad de 12/12 horas, y se controló la temperatura a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con acceso a agua y comida a voluntad. El protocolo usado fue aprobado por el Comité institucional de cuidado animal del Instituto Butantan (CEUAIB) bajo el protocolo número 019/2000.

- 25 Para la evaluación de la sensibilidad al dolor se usó la prueba de la presión de la pata de rata (Analgesy-Meter Ugo Basile[®], Italia), realizada según el procedimiento descrito por Randall & Selitto (Randall L.O. y Selitto J.J. Arch. Intern. Pharmacodyn. 111:209-219, 1957).

- 30 En esta prueba, una fuerza en gramos (g), con magnitud creciente (16 g/s), se aplica continuamente sobre la superficie dorsal de una de las patas traseras de la rata y se interrumpe cuando el animal reacciona "retirando" la pata. En este modelo, el umbral de dolor se representa como la fuerza (g) necesaria para la inducción de la reacción. Esta prueba se aplicó antes (medición inicial) y 3 horas después (medición final) de la inducción de hiperalgesia.

- 35 Para la inducción de hiperalgesia se preparó una disolución madre de prostaglandina E₂ (PGE₂) disolviendo 500 µg de PGE₂ en 1 ml de etanol. En el momento de uso, esta disolución madre se volvió a diluir en solución salina estéril. La dosis de prostaglandina usada fue 100 ng en 100 µl de solución salina administrada por vía intraplantar (2.pl.). La hiperalgesia se evaluó 3 horas después de la inyección de PGE₂.

En cada etapa de purificación, el material obtenido se diluyó en un volumen de 11 ml de solución salina. Cada animal recibió 2 ml de esta disolución, administrada por vía oral, inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia. Como controles se usaron animales a los que se les administró una solución salina.

- 40 **EJEMPLO 5. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y DURACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO NATURAL AISLADO ENPAK-k DE VENENO DE *Crotalus durissus terrificus***

El péptido natural, ENPAK-k, aislado de la purificación de 60 mg de veneno bruto, según el EJEMPLO 1, se diluyó en un volumen de 33 ml de solución salina. Cada animal recibió 2 ml de esta disolución, administrada por vía

oral (p.o.), inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia. Como controles se usaron animales que recibieron solución salina, por vía oral.

Para la evaluación de la sensibilidad al dolor se usó la prueba de la presión de la pata de rata. El umbral de dolor, representado por la fuerza (en gramos) necesaria para retirar la pata, se determinó antes (tiempo 0) y 3, 72 y 120 horas (mediciones finales) después del tratamiento, por vía oral (p.o.), con el péptido natural (ENPAK-k) o solución salina (grupo de control). La prostaglandina (100 ng/pata), usada como agente hiperalgésico, se inyectó 3 horas antes de cada medición final. Los datos presentados en la Tabla 1 representan la media $\pm$ E.E.M. de 5 animales por grupo.

TABLA 1: EFICACIA Y DURACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO NATURAL (ENPAK-k) AISLADO DE VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*.

Tratamiento	0 h MI (g) $\pm$ E.E.M.	3 h MF (g) $\pm$ E.E.M.	72 h MF (g) $\pm$ E.E.M.	120 h MF (g) $\pm$ E.E.M.
Solución salina	76 $\pm$ 1,00	56 $\pm$ 1,87*	58 $\pm$ 1,22*	57 $\pm$ 1,22*
Péptido natural	77 $\pm$ 2,00	118 $\pm$ 2,55*#	113 $\pm$ 2,55*#	112 $\pm$ 3,39*#
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial				
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).				
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos				

Este ejemplo muestra la eficacia y el efecto antinociceptivo de larga duración del péptido natural ENPAK-k aislado de veneno de la serpiente *Crotalus durissus terrificus*.

EJEMPLO 6. CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂ COMO EJEMPLO NO LIMITATIVO

El péptido sintético de SEQ ID NO: 2, en diferentes dosis, se diluyó en solución salina y se administró por diferentes vías inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia. Como controles se usaron animales que recibieron solución salina por las mismas vías.

Para la inducción de hiperalgesia se administró prostaglandina E₂, a la dosis de 100 ng/pata, por vía intraplantar (i.pl.). La hiperalgesia se evaluó antes (medición inicial - MI) y 3 horas después (medición final - MF) de la inyección de PGE₂.

Para la evaluación de la sensibilidad al dolor se usó la prueba de la presión de la pata de rata. El umbral de dolor, representado por la fuerza (en gramos) necesaria para inducir la retirada de la pata, se determinó antes (medición inicial) y 3 horas después (medición final) de la inyección intraplantar de prostaglandina E₂ (100 ng/pata). El péptido sintético se administró antes del estímulo hiperalgésico por las siguientes vías y dosis:

A) Vía oral, en un volumen de 2 ml, en las dosis de 0,0016; 0,008; 0,04; 0,2; 1; 5 y 25 μ g/kg, inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia (Tabla 2).

B) Vía intraplantar, en un volumen de 50 μ l, en las dosis de 0,00000256; 0,0000128; 0,00032 y 0,0016 μ g/pata, inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia (Tabla 3).

C) Vía intravenosa, en un volumen de 200 μ l, en las dosis de 0,0000128, 0,000064, 0,00032, 0,0016 y 0,008 μ g/kg, inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia (Tabla 4).

D) Se probó un grupo adicional usando morfina como control positivo. La morfina se administró, por vía oral, en dosis de 0,004; 0,2; 1 y 5 μ g/kg (Tabla 5).

Se usó solución salina, administrada por las vías respectivas, como control de todos los experimentos.

Los resultados se analizaron comparando las medias de las mediciones iniciales y finales o, cuando se determinaron, comparando las medias obtenidas en los diferentes grupos experimentales. Los datos se usaron para determinar DE₅₀, DE₆₀ y DE₉₀.

En la Tablas 2, 3, 4 y 5: MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos; las dosis de péptido se representan en μ g/kg cuando se administran por vía oral e intravenosamente, o en μ g/pata cuando se administran por vía intraplantar. Los datos representan las medias $\pm$ E.E.M. de 5 animales por grupo.

TABLA 2: CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2, ADMINISTRADO POR VÍA ORAL, EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina (p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	77 ± 1,34	56 ± 1,30 *
Péptido (0,0016, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	78 ± 1,22	64 ± 1,00 *
Péptido (0,008, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	79 ± 1,25	71 ± 2,39 #
Péptido (0,04, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	77 ± 1,22	75 ± 1,87 #
Péptido (0,2, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	77 ± 2,00	84 ± 1,87 #
Péptido (1,0, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	77 ± 2,00	108 ± 2,00 *#
Péptido (5,0, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	78 ± 2,00	130 ± 1,58 *#
Péptido (25,0, p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	79 ± 1,87	133 ± 3,39*#
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		

5 Estos resultados mostraron el potente efecto analgésico del péptido sintético de SEQ ID NO: 2, administrado por vía oral, en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂. Para la determinación de las dosis eficaces al 50, 60 y 90%, los datos se analizaron determinando el porcentaje de disminución del umbral de dolor (hiperalgesia) comparando las mediciones finales e iniciales, seguido de la determinación del porcentaje de inhibición de hiperalgesia comparando los grupos tratados (péptido) y de control (solución salina). Estos datos se
10 analizaron usando el programa CurveExpert 1.3. Los resultados demostraron que las dosis eficaces al 50, 60 y 90% del péptido en este ejemplo fueron 0,004146; 0,006348 y 0,02106 µg/kg, respectivamente. Es importante observar que sólo las dosis de 0,0016; 0,008; 0,04 y 0,2 se usaron para la determinación de las dosis eficaces.

15 TABLA 3: CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2, ADMINISTRADO POR VÍA INTRAPLANTAR, EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina (i.pl.) + PGE ₂ (i.pl.)	75 ± 1,83	40 ± 3,10 *
Péptido (0,00000256) (i.pl.) + PGE ₂ (i.pl.)	72 ± 1,12	57 ± 5,34 *
Péptido (0,0000128) (i.pl.) + PGE ₂ (i.pl.)	71 ± 2,39	62 ± 3,22 #
Péptido (0,00032) (i.pl.) + PGE ₂ (i.pl.)	67 ± 2,35	60 ± 3,25 #
Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Péptido (0,0016) (i.pl.) + PGE ₂ (i.pl.)	72 ± 1,84	67 ± 1,12 #
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		

20 Estos resultados mostraron el potente efecto analgésico del péptido sintético de SEQ ID NO: 2, administrado por vía intraplantar, en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂. Para la determinación de las dosis eficaces al 50, 60 y 90%, los datos se analizaron determinando el porcentaje de disminución del umbral de dolor (hiperalgesia) comparando las mediciones finales e iniciales, seguido de la determinación del porcentaje de inhibición de hiperalgesia comparando los grupos tratados (péptido) y de control (solución salina). Estos datos se analizaron usando el programa CurveExpert 1.3. Los resultados demostraron que las dosis eficaces al 50, 60 y 90% del péptido en este ejemplo fueron 0,000002327; 0,000004904 y 0,0028758 µg/kg, respectivamente.

TABLA 4: CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2, ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA, EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina + PGE2 (i.pl.)	72 ± 1,83	44 ± 2,67 *
Péptido (0,0000128) (i.v.) + PGE2 (i.pl.)	70 ± 2,05	54 ± 3,04 *
Péptido (0,000064) (i.v.) + PGE2 (i.pl.)	68 ± 1,44	54 ± 2,39
Péptido (0,00032) (i.v.) + PGE2 (i.pl.)	72 ± 1,84	63 ± 5,16 #
Péptido (0,0016) (i.v.) + PGE2 (i.pl.)	74 ± 0,92	67 ± 2,35 #
Péptido (0,008) (i.v.) + PGE2 (i.pl.)	69 ± 2,26	73 ± 4,74 #
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		

Estos resultados mostraron el potente efecto analgésico del péptido sintético de SEQ ID NO: 2, administrado por vía intravenosa, en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂. Para la determinación de las dosis eficaces al 50, 60 y 90%, los datos se analizaron determinando el porcentaje de disminución del umbral de dolor (hiperalgesia) comparando las mediciones finales e iniciales, seguido de la determinación del porcentaje de inhibición de hiperalgesia comparando los grupos tratados (péptido) y de control (solución salina). Estos datos se analizaron usando el programa CurveExpert 1.3. Los resultados demostraron que las dosis eficaces al 50, 60 y 90% del péptido en este ejemplo fueron 0,0000458; 0,0002144 y 0,002701 µg/kg, respectivamente.

TABLA 5: CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DE MORFINA, ADMINISTRADA POR VÍA ORAL, EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina (p.o.) + PGE2 (i.pl.)	77 ± 2,55	59 ± 1,87*
Morfina (0,004) (p.o.) + PGE2 (i.pl.)	77 ± 1,22	69 ± 1,87 #
Morfina (0,2) (p.o.) + PGE2 (i.pl.)	76 ± 1,87	70 ± 1,58 #
Morfina (1) (p.o.) + PGE2 (i.pl.)	78 ± 1,22	85 ± 1,58 #
Morfina (5) (p.o.) + PGE2 (i.pl.)	78 ± 1,22	109 ± 1,87 *#
Dosis de morfina = µg/kg		
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		

Estos resultados mostraron el efecto analgésico de la morfina, administrada por vía oral, en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂. Para la determinación de las dosis eficaces al 50, 60 y 90%, los datos se analizaron determinando el porcentaje de disminución del umbral de dolor (hiperalgesia) comparando las mediciones finales e iniciales, seguido de la determinación del porcentaje de inhibición de hiperalgesia comparando los grupos tratados (péptido) y de control (solución salina). Estos datos se analizaron usando el programa CurveExpert 1.3. Los resultados demostraron que las dosis eficaces al 50, 60 y 90% del péptido en este ejemplo fueron 0,0551516; 0,100504 y 0,326728 µg/kg, respectivamente.

EJEMPLO 7. EVALUACIÓN DE LA DURACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Después de demostrar el efecto antinociceptivo del péptido sintético en el modelo de hiperalgesia inducida por prostaglandina E₂, se investigó la duración de este efecto. Para la evaluación de la sensibilidad al dolor se usó la prueba de la presión de la pata de rata. El umbral de dolor, representado por la fuerza (en gramos) necesaria para la reacción de retirada de la pata, se determinó antes (medición inicial) y 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después

(mediciones finales) de la administración por vía oral del péptido sintético (1 µg/kg) o solución salina (control). Se administró PGE₂, en la dosis de 100 ng/pata, a los diferentes grupos 3 horas antes de cada medición final (Tabla 6).

TABLA 6: DURACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PGE₂.

	Tiempo después de la administración del péptido (horas)						
	0	24	48	72	96	120	144
Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina	78 ± 1,66	58 ± 1,66*	62 ± 1,66*	58 ± 3,33*	56 ± 1,87*	57 ± 2,55*	57 ± 1,22*
Péptido	79 ± 1,00	126 ± 3,32*#	121 ± 1,87*#	111 ± 4,3*#	117 ± 2,5*#	130 ± 2,24*#	59 ± 2,39*
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial							
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).							
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos							

5

Los resultados demostraron que el efecto antinociceptivo del péptido se detectó hasta 120 horas después de una única administración.

10 EJEMPLO 8. EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PGE₂

15 Para la evaluación de la sensibilidad al dolor se usó la prueba de la presión de la pata de rata. El umbral de dolor, representado por la fuerza (en gramos) necesaria para inducir la retirada de la pata, se determinó antes (medición inicial, MI) y 3 horas después (medición final, MF) de la inyección intraplantar de prostaglandina E₂ (100 ng/pata). El péptido sintético (1 µg/kg) o solución salina (grupo de control) se administraron por vía oral inmediatamente antes del estímulo hiperalgésico (PGE₂). ICI174.864 - ICI (10 µg/pata), un antagonista de receptores de opioides *delta*, nor-binaltorfimina - BNI (50 µg/pata), un antagonista de receptores de opioides *kappa*, y CTOP (20 µg/pata), un antagonista de receptores de opioides *mu*, se administraron por vía intraplantar (i.pl.) concomitantemente con la inyección de PGE₂ (Tabla 7). Los datos representan las medias ± E.E.M. de 5 animales por grupo.

20

Además, los antagonistas de receptores de opioides *kappa* y *delta* también se probaron en la antinocicepción inducida por el péptido en la dosis de 5 µg/kg (Tabla 8). Los datos representan las medias ± E.E.M. de 5 animales por grupo.

25 TABLA 7: EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO (1 µg/kg) EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina + PGE ₂	78 ± 1,44	56 ± 1,25*
Péptido + PGE ₂	77 ± 1,22	111 ± 3,32 *#
Péptido + PGE ₂ + ICI174,864	78 ± 1,22	114 ± 1,00 *#
Péptido + PGE ₂ + nor-binaltorfimina	77 ± 1,22	56 ± 1,87*
Péptido + PGE ₂ + CTOP	77 ± 1,22	114 ± 1,87 *#
Solución salina + PGE ₂ + ICI174.864	75 ± 2,04	57 ± 3,22*
Solución salina + PGE ₂ + nor-binaltorfimina	72 ± 1,44	56 ± 1,25*

Solución salina + PGE ₂ + CTOP	74±2,39	56 ±2,39*
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos		

Estos datos indican que en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂, los receptores de opioides *kappa* participan en el efecto antinociceptivo del péptido sintético de SEQ ID NO: 2 (1 µg/kg).

5 TABLA 8: EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO (5 µg/kg) EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA E₂.

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina + PGE ₂	78 ± 1,44	59 ± 2,39*
Péptido + PGE ₂	77 ± 1,22	147 ± 2,55 *#
Péptido + PGE ₂ + nor-BNI	77 ± 1,05	58 ± 2,47*
Péptido + PGE ₂ + ICI 174.864	77 ± 1,05	145 ± 2,89 *#
Solución salina + PGE ₂ + nor-BNI	72 ± 1,44	56 ± 1,25 *
Solución salina + PGE ₂ + ICI174.864	75 ± 2,04	57 ± 3,22*
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos		

10 Estos datos indican que en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂, los receptores de opioides *kappa* participan en la actividad antinociceptiva del péptido sintético de SEQ ID NO: 2, incluso cuando se usaron en mayor dosis (5 µg/kg).

EJEMPLO 9. ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR CARRAGENINA COMO EJEMPLO NO LIMITATIVO

15 El efecto antinociceptivo del péptido sintético se evaluó en la hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenina. La prueba de presión de la pata de rata se aplicó antes (medición inicial) y 3 horas después (medición final) de la hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenina (200 µg/pata). El péptido sintético se administró por vía oral (2 ml), en la dosis de 1 µg/kg, inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia (Tabla 9). Como control se usó solución salina, administrada por la misma vía. Los datos representan las medias ± E.E.M. de 5 animales por grupo.

20 TABLA 9: EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR CARRAGENINA

Tratamientos	MI (g) ± E.E.M.	MF (g) ± E.E.M.
Solución salina + carragenina	77 ± 2,00	57 ± 2,00*
Péptido + carragenina	77 ± 2,00	116 ± 1,87 *#
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos		

Los resultados demuestran que el péptido sintético también puede inducir antinocicepción en el modelo de hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenina.

EJEMPLO 10. DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR CARRAGENINA

Como se determina en el modelo de PGE₂, se investigó la participación de receptores de opioides en el efecto antinociceptivo del péptido de SEQ ID NO: 2 en la hiperalgesia inducida por carragenina (Tabla 10). Por tanto, los animales se trataron con CTOP, un antagonista de receptores μ específico (20 μ g/pata), nor-BNI, un antagonista de receptores κ específico (50 μ g/pata), o con ICI 174.864, un antagonista de receptores δ específico (10 μ g/pata), inyectados por vía Intraplantar (i.pl.), concomitantemente con carragenina. El péptido se administró en la dosis de 1 μ g/kg, por vía oral, inmediatamente antes de la carragenina. Los datos representan las medias $\pm$ E.E.M. de 5 animales por grupo.

TABLA 10: EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO (1 μ g/kg) EN EL MODELO DE HIPERALGESIA INDUCIDA POR CARRAGENINA

Tratamientos	MI (g) $\pm$ E.E.M.	MF (g) $\pm$ E.E.M.
Solución salina + carragenina	75 $\pm$ 2,04	57 $\pm$ 1,44*
Péptido + carragenina	77 $\pm$ 1,22	129 $\pm$ 1,87 **
Péptido + carragenina + CTOP	76 $\pm$ 1,87	126 $\pm$ 2,92 **
Péptido + carragenina + nor-BNI	78 $\pm$ 2,00	56 $\pm$ 1,00*
Péptido + carragenina + ICI174.864	77 $\pm$ 1,22	128 $\pm$ 2,00 **
Solución salina + carragenina + CTOP	73 $\pm$ 1,25	49 $\pm$ 1,25*
Solución salina + carragenina + nor-BNI	72 $\pm$ 1,12	52 $\pm$ 2,79*
Solución salina + carragenina + ICI174.864	72 $\pm$ 1,7	51 $\pm$ 2,47*
*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial		
# p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		
MI = medición inicial; MF = medición final; g = peso en gramos		

Como se observa en el modelo de hiperalgesia inducida por PGE₂, sólo el antagonista de receptores de opioides κ puede interferir con el efecto antinociceptivo del péptido.

EJEMPLO 11. ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN HIPERALGESIA INDUCIDA POR LA CONSTRICCIÓN CRÓNICA DEL NERVIIO CIÁTICO, UN MODELO DE DOLOR PERSISTENTE.

Para la inducción de dolor neuropático se realizó cirugía en el nervio ciático, según el procedimiento descrito por Bennett, G.J y Xie, Y.K. (Pain, 33:87-107, 1988). Los animales se anestesiaron con halotano. El nervio ciático se expuso en la región media del muslo, apartando el músculo bíceps femoral. Próxima a la trifurcación del nervio ciático, a 7 mm de distancia de la trifurcación, se realizaron 4 ligaciones sueltas (catgut crómico 4-0) alrededor del mismo, distantes entre sí en aproximadamente 1 mm. Las uniones se realizaron a lo largo del nervio, hasta 4-5 mm del punto inicial. La incisión se suturó en capas usando hilo de sutura de seda número 4-0.

EJEMPLO 11 A. EVALUACIÓN DE HIPERALGESIA

Para la evaluación de hiperalgesia se usó la prueba de la presión de la pata de rata (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Italia) realizada según el procedimiento descrito por Randall & Sellito (1957). La prueba se aplicó antes (MB - medición basal) y en el día 14 después de la cirugía para caracterizar el desarrollo de dolor neuropático. En el día 14 después de la cirugía, la prueba se aplicó antes (medición inicial - MI) y 1, 3, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración del péptido sintético, en las dosis de 0,0016; 0,008; 0,04; 0,2; 1 y 5 μ g/kg, por vía oral, o de solución salina, como control (Tabla 11).

Los resultados se analizaron comparando las medias de las mediciones basales e iniciales o comparando las medias de las mediciones iniciales y finales o, cuando se determinaron, mediante la comparación de las medias obtenidas en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan las medias $\pm$ E.E.M. de 5 animales por grupo.

5 TABLA 11: DURACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 SOBRE LA HIPERALGESIA INDUCIDA POR CONSTRICCIÓN DEL NERVIIO CIÁTICO.

Tratamientos	MB	MI	MF 1 h	MF 3 h	MF 24 h	MF 48 h	MF 72 h	MF 96 h
Solución salina	73 $\pm$ 1,44	33 $\pm$ 1,44*	30 $\pm$ 0,00*	30 $\pm$ 0,00*	30 $\pm$ 0,00*	34 $\pm$ 1,25*	33 $\pm$ 1,44*	33 $\pm$ 1,44*
P 0,0016	72 $\pm$ 1,22	33 $\pm$ 1,22*	32 $\pm$ 1,22*	32 $\pm$ 1,22*	33 $\pm$ 1,22*	30 $\pm$ 0,00*	32 $\pm$ 1,22*	32 $\pm$ 1,22*
P 0,008	74 $\pm$ 1,87	33 $\pm$ 1,22*	34 $\pm$ 1,00*	30 $\pm$ 1,58*	30 $\pm$ 0,00*	33 $\pm$ 1,22*	31 $\pm$ 1,00*	32 $\pm$ 1,22*
P 0,04	71 $\pm$ 1,00	33 $\pm$ 1,22*	29 $\pm$ 1,00*	30 $\pm$ 0,00*	31 $\pm$ 1,00*	33 $\pm$ 1,22*	33 $\pm$ 0,00*	33 $\pm$ 1,22*
P 0,2	73 $\pm$ 1,22	31 $\pm$ 1,00*	51 $\pm$ 1,87 *\$#	56 $\pm$ 1,87 *\$#	52 $\pm$ 1,22 *\$#	54 $\pm$ 1,00 *\$#	53 $\pm$ 1,22 *\$#	33 $\pm$ 1,22*
P1	72 $\pm$ 1,22	31 $\pm$ 1,00*	73 $\pm$ 1,22\$#	73 $\pm$ 1,22\$#	71 $\pm$ 1,00\$#	74 $\pm$ 1,00\$#	71 $\pm$ 1,00\$#	33 $\pm$ 1,22*
P5	72 $\pm$ 0,79	32 $\pm$ 0,79*	100 $\pm$ 4,42 *\$#	98 $\pm$ 4,28 *\$#	99 $\pm$ 3,51 *\$#	93 $\pm$ 3,00 *\$#	86 $\pm$ 2,45 *\$#	33 $\pm$ 1,18*

MB = medición basal antes de la cirugía, MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido, MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes momentos después de la administración del péptido o de solución salina, g = peso en gramos

Dosis de péptido en μ g/kg.

El péptido o la solución salina se administraron en el día 14 inmediatamente después de la determinación de de la MI. Los valores de MB, MI y MF se representan en gramos (g) $\pm$ E.E.M.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

\$p<0,05 significativamente diferente de los valores medios en el día 14

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los datos obtenidos demostraron que el péptido podía inducir efecto antihiperalgésico en el modelo de dolor neuropático detectado hasta 3 días después de una única administración.

- 10 Los resultados obtenidos 1 hora después del tratamiento de los animales con el péptido sintético, en las dosis de 0,0016; 0,008; 0,04; 0,2 y 1 μ g/kg, se usaron para la determinación de las dosis eficaces al 50, 60 y 90%. Los datos se analizaron determinando el porcentaje de disminución del umbral de dolor (hiperalgesia) comparando las mediciones basales e iniciales, seguido de la determinación del porcentaje de inhibición de hiperalgesia comparando los grupos tratados (péptido) y de control (solución salina). Estos datos se analizaron usando el programa CurveExpert 1.3. Los resultados demostraron que las dosis eficaces al 50, 60 y 90% del péptido en este ejemplo se corresponden con 0,205517; 0,283173 y 0,5747158 μ g/kg, respectivamente.
- 15

EJEMPLO 11B. DETERMINACIÓN DE LA ALODINIA.

- 20 La alodinia se evaluó para la prueba cuantitativa en respuesta al estímulo táctil aplicado a las patas de la rata según el procedimiento descrito por Chaplan y col. (1994), modificado. En esta prueba, las ratas se colocaron individualmente en jaulas de plástico con alambre mallado en el fondo para permitir el acceso a las patas de estos animales. Brevemente, una serie logarítmica de 10 monofilamentos de Semmer-Weinstein calibrados (pelos de von Frey, Aesthesiometer Semmer-Weinstein, Stoelting Co., E.U.A) se aplicó a la pata trasera derecha para determinar la rigidez umbral de la intensidad del estímulo requerida para provocar una respuesta de retirada de la pata. El

logaritmo de la rigidez de los pelos se determina por $\log_{10}$ (mg x 10) que tiene los siguientes valores (el valor en gramos está entre paréntesis): 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495 g); 4,93 (8,511 g); 5,07 (11,749 g) y 5,18 (15,136 g). Es importante indicar que los filamentos con peso superior a 15,136 g no se emplearon en los estudios de alodinia.

5 Los filamentos se aplicaron, uno a uno, perpendicularmente bajo el área plantar de ambas patas traseras y se mantuvieron durante un periodo de 8 segundos. El filamento capaz de provocar la retirada de la pata, dos veces consecutivas, se consideró como la fuerza en gramos necesaria para provocar la respuesta (100% de respuesta). En ausencia de una respuesta al mayor estímulo (15,135 g), este filamento se consideró como valor de corte.

10 Se usaron respuestas de comportamiento para calcular el 50% del umbral de retirada de la pata (umbral absoluto) ajustando una función psicométrica integral gaussiana usando un procedimiento de ajuste de probabilidad máxima. Este procedimiento de ajuste permite análisis paramétricos.

El periodo de la aplicación de la prueba y los tratamientos fueron los mismos que aquellos usados para la determinación de hiperalgesia (Tabla 12).

15 Los resultados se analizaron comparando las medias de las mediciones basales e iniciales o, cuando se determinaron, comparando las medias obtenidas en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan las medias $\pm$ E.E.M. de 5 animales por grupo.

TABLA 12: DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 SOBRE ALODINIA INDUCIDA POR CONSTRICCIÓN DEL NERVO CIÁTICO.

Tratamientos	MB	MI	MF 1 h	MF 3 h	MF 24 h	MF 48 h	MF 72 h	MF 96 h
Solución salina	5,04 $\pm$ 0,02*	4,23 $\pm$ 0,01*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*
P 0,0016	5,02 $\pm$ 0,03	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*
P 0,008	4,99 $\pm$ 0,02	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*
P 0,04	4,97 $\pm$ 0,99	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,26 $\pm$ 0,04*	4,22 $\pm$ 0,00*	4,22 $\pm$ 0,00*
P 0,2	5,03 $\pm$ 0,02	4,22 $\pm$ 0,00*	4,41 $\pm$ 0,00 *\$#	4,41 $\pm$ 0,00 *\$#	4,41 $\pm$ 0,00 *\$#	4,41 $\pm$ 0,00 *\$#	4,41 $\pm$ 0,00 *\$#	4,22 $\pm$ 0,00*
P1	5,06 $\pm$ 0,02	4,23 $\pm$ 0,01 *	4,62 $\pm$ 0,00 *\$4	4,62 $\pm$ 0,00 *\$#	4,62 $\pm$ 0,00 *\$#	4,62 $\pm$ 0,00 *\$#	4,62 $\pm$ 0,00 *\$#	4,22 $\pm$ 0,00
P 5	4,99 $\pm$ 0,03	4,23 $\pm$ 0,00*	4,94 $\pm$ 0,05\$#	4,98 $\pm$ 0,04\$#	4,97 $\pm$ 0,03\$#	4,93 $\pm$ 0,04\$#	4,85 $\pm$ 0,02\$#	4,21 $\pm$ 0,01\$#

MB = medición basal antes de la cirugía, MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido; MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes periodos después de la administración del péptido o de solución salina; los datos se expresaron como $\log_{10}$ (mg x 10) $\pm$ E.E.M.

Dosis de péptido en $\mu\text{g/kg}$.

El péptido o la solución salina se administraron en el día 14 inmediatamente después de la determinación de la MI.

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

\$ $p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios en el día 14

$p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

20 Los datos demostraron que el péptido podía inducir efecto antialodínico en el modelo de dolor neuropático, detectado hasta 3 días después de una única administración.

EJEMPLO 11C. DETERMINACIÓN DE DOLOR ESPONTÁNEO

Para la evaluación de dolor espontáneo, las ratas se observaron en el día 14 después de la cirugía de constricción del nervio ciático, antes y 1, 3, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de la administración del péptido (5 µg/kg) o de solución salina, por vía oral (Tablas 13 y 14). Para la observación de los signos que caracterizan el dolor espontáneo, los animales se colocaron uno a uno en una caja de plástico transparente. Después del periodo de aclimatación de 30 minutos, las ratas fueron observadas durante 10 minutos, determinando la duración de lamido (en segundos) y tiempo de levantamiento. No se consideraron las actividades de lamido y levantamiento, realizadas como parte del comportamiento de acicalamiento normal de los animales.

TABLA 13. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CNF021.03 SOBRE EL DOLOR ESPONTÁNEO INDUCIDO POR CONSTRUCCIÓN DEL NERVIO CIÁTICO - DURACIÓN DEL TIEMPO DE LAMIDO (EN S) DE LA PATA

Tratamientos	MI	MF 1 h	MF 3 h	MF 24 h	MF 48 h	MF 72 h	MF 96 h	MF 120
Solución salina	24 ± 0,6	21 ± 0,3	20 ± 0,8	21 ± 0,5	21 ± 0,5	22 ± 0,6	22 ± 0,5	22 ± 0,6
Péptido	22 ± 0,64	2 ± 0,21*#	2 ± 0,21*#	2 ± 0,39*#	1,5 ± 0,22*#	1,5 ± 0,22*#	21 ± 0,26	21 ± 0,38

MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido; MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes momentos después de la administración del péptido o de la solución salina

Los datos se expresaron como tiempo de lamido de las patas (en segundos). Los datos representan las medias ± E.E.M. de 5 animales por grupo.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

TABLA 14. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CNF021.03 SOBRE EL DOLOR ESPONTÁNEO INDUCIDO POR CONSTRUCCIÓN DEL NERVIO CIÁTICO - DURACIÓN DEL TIEMPO DE LEVANTAMIENTO (EN S)

Tratamientos	MI	MF 1 h	MF 3 h	MF 24 h	MF 48 h	MF 72 h	MF 96 h	MF 120
Solución salina	97 ± 0,37	97 ± 0,42	96 ± 0,58	96 ± 0,42	96 ± 0,48	95 ± 0,47	96 ± 0,40	96 ± 0,51
Péptido	97 ± 0,43	2 ± 0,21*#	2 ± 0,26*#	2 ± 0,22*#	1,0 ± 0,16*#	2 ± 0,26*#	1,5 ± 0,16*#	95 ± 0,50

MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido; MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes momentos después de la administración del péptido o de la solución salina

Los datos se expresaron como el tiempo de levantamiento (en segundos). Los datos representan las medias ± E.E.M. de 5 animales por grupo.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los resultados demuestran que el péptido podía interferir con tanto el tiempo de lamido como de levantamiento (Tablas 13 y 14), mostrando el efecto inhibitor de este péptido en dolor espontáneo en el modelo de dolor neuropático.

EJEMPLO 12. IMPLICACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE CONSTRICCIÓN DEL NERVO CIÁTICO.

Después de demostrar el efecto antinociceptivo del péptido en hiperalgesia y alodinia inducidas por constricción crónica del nervio ciático se investigó la participación de receptores de opioides en este efecto. Para este fin, los animales se trataron con CTOP, un antagonista de receptores μ específico (20 μ g/pata), nor-BNI, un antagonista de receptores κ específico (50 μ g/pata), o con ICI 174.864, un antagonista de receptores δ específico (10 μ g/pata). Los antagonistas se inyectaron por vía intraplantar. El péptido se administró en la dosis de 5 μ g/kg, por vía oral, inmediatamente antes de la inyección de los antagonistas de opioides.

Los resultados se analizaron comparando los valores medios de las mediciones basales e iniciales, o de las mediciones iniciales y finales o, cuando se determinaron, comparando los valores medios obtenidos en los diferentes grupos experimentales (Tablas 15 y 16).

TABLA 15. CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO

Tratamientos	MB	MI	MF 1 h	MF 3 h
Solución salina (p.o.)	73 $\pm$ 1,66	37 $\pm$ 3,33*	35 $\pm$ 0*	30 $\pm$ 0*
Péptido (p.o.)	72 $\pm$ 1,44	35 $\pm$ 2,04*	114 $\pm$ 6,57*§#	121 $\pm$ 5,91*§#
Péptido + ICI (i.pl.)	72 $\pm$ 1,22	34 $\pm$ 1,87*	35 $\pm$ 1,87*	37 $\pm$ 2,55*
Péptido + nor-BNI (i.pl.)	73 $\pm$ 1,22	35 $\pm$ 1,58*	69 $\pm$ 1,87*§#	75 $\pm$ 1,58*§#
Péptido + CTOP (i.pl.)	72 $\pm$ 1,22	41 $\pm$ 1,88*	105 $\pm$ 4,18*§#	112 $\pm$ 5,83*§#
Solución salina + ICI (i.pl.)	71 $\pm$ 1,00	31 $\pm$ 1,00*	32 $\pm$ 1,22*	31 $\pm$ 1,00*
Solución salina + nor-BNI (i.pl.)	72 $\pm$ 1,22	32 $\pm$ 1,22*	32 $\pm$ 1,22*	31 $\pm$ 1,00*
Solución salina + CTOP (i.pl.)	72 $\pm$ 1,22	28 $\pm$ 1,22*	30 $\pm$ 1,58*	30 $\pm$ 1,58*

MB = medición basal antes de la cirugía, MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido, MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes tiempos después de la administración del péptido o de la solución salina (control), los datos se presentan como la media de gramos (g) $\pm$ E.E.M.

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 14

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los datos demostraron que el antagonista de receptores de opioides *delta* bloqueó el efecto antihiperalgésico del péptido en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. El antagonista de receptores de opioides *kappa* inhibió parcialmente este efecto. El antagonista de receptores de opioides *mu* no alteró el péptido efecto.

TABLA 16. CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTIALODÍNICO DE PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO

Tratamientos	MB	MI	MF 1 h	MF 3 h
Solución salina (p.o.)	5,03 $\pm$ 0,03	4,28 $\pm$ 0,06*	4,22 $\pm$ 0*	4,22 $\pm$ 0*
Péptido (p.o.)	5,00 $\pm$ 0,03	4,27 $\pm$ 0,04*	5,08 $\pm$ 0,01 §#	5,09 $\pm$ 0§#
Péptido + ICI (i.pl.)	4,96 $\pm$ 0,04	4,29 $\pm$ 0,04*	4,22 $\pm$ 0*	4,22 $\pm$ 0*
Péptido + nor-BNI (i.pl.)	5,03 $\pm$ 0,02	4,25 $\pm$ 0,03 *	4,62 $\pm$ 0*§#	4,62 $\pm$ 0*§#
Péptido + CTOP (i.pl.)	4,99 $\pm$ 0,02	4,29 $\pm$ 0,04*	5,00 $\pm$ 0,05§#	4,99 $\pm$ 0,02§#
Solución salina + ICI (i.pl.)	5,08 $\pm$ 0,01	4,22 $\pm$ 0*	4,22 $\pm$ 0*	4,22 $\pm$ 0*

Solución salina + nor-BNI (i.pl.)	5,08 ± 0	4,22 ± 0*	4,22 ± 0*	4,22 ± 0*
Solución salina + CTOP (i.pl.)	5,08 ± 0	4,22 ± 0*	4,22 ± 0*	4,22 ± 0*

MB = medición basal antes de la cirugía, MI = medición inicial en el día 14 después de la cirugía, antes de la administración del péptido, MF = medición final en el día 14 después de la cirugía, en diferentes momentos después de la administración del péptido o de la solución salina (control). El péptido o la solución salina se administraron en el día 14 inmediatamente después de la determinación de la MI. Los valores de MI y MF se representan como la media de log 10 (mg x 10) ± E.E.M.

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 14

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los datos demostraron que el antagonista de receptores de opioides *delta* bloqueó el efecto antialodínico del péptido en el modelo de constricción crónica del nervio ciático. El antagonista de receptores de opioides *kappa* inhibió parcialmente este efecto, mientras que el antagonista de receptores *mu* no alteró el efecto del péptido.

5 EJEMPLO 13. ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN DOLOR POR CÁNCER, UN MODELO DE DOLOR PERSISTENTE - ESTUDIOS CON EL TUMOR WALKER 256

Las células de tumor Walker 256 fueron amablemente proporcionadas por el Prof. Dr. Rui Curi del Departamento de fisiología y biofísica del Instituto de ciencias biomédicas de la Universidad de São Paulo. El animal que llevaba el tumor se sacrificó y el tejido tumoral se extirpó, se colocó en una placa de Petri que contenía 0,9% de solución salina. Entonces, el tumor se cortó en partes más pequeñas y se transfirió a un vaso de precipitados que contenía solución salina. El material se trituró con un corte fino hasta que el tumor se fragmentó totalmente. Entonces, este material se filtró en gasa y el líquido se recogió en un vaso de precipitados. Todos los procedimientos se realizaron sobre hielo. El material del vaso de precipitados se transfirió a tubos de plástico de 50 ml y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 1200 rpm. Después de la centrifugación, el sobrenadante se rechazó y el precipitado se resuspendió en solución salina al 0,9%. Para los recuentos de células, la suspensión de células se diluyó (1:100) en solución salina. Se tomó una alícuota (200 µl) y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 200 µl de 1% de azul tripano. El número de células se determinó en el microscopio óptico usando una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó considerando las células refractantes de la luz.

Después de determinar el número de células, 1 ml de la suspensión que contenía 1×10^7 células se inyectó por vía intraperitoneal en el lado derecho de las ratas para obtener tumor líquido (ascitis).

Cinco días después de la inyección, las ratas con ascitis se sacrificaron y el fluido ascítico se recogió de la cavidad peritoneal y se colocó en un tubo de ensayo que contenía EDTA. El líquido se diluyó 100 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. El recuento de células se hizo después de la dilución con azul de tripano como se ha descrito anteriormente. Se determinó que el recuento de células tumorales era 1×10^6 células en 100 µl, por dilución con PBS. Este número de células se determinó en pruebas preliminares para la inducción de dolor por cáncer en ratas. En este ajuste del número de células final se tuvo en cuenta el volumen de antibiótico (Benzetacil®) añadido a la suspensión (150.000 unidades de antibiótico/10 ml de suspensión). El antibiótico se usó con el fin de evitar contaminación microbiana. Las células se inyectaron por vía intraplantar en una de las patas traseras de la rata. Los animales de control se inyectaron con PBS en la pata contralateral, en las mismas condiciones experimentales.

Para la evaluación del efecto antinociceptivo del péptido sintético en este modelo, los animales se trataron con el péptido, en la dosis de 6 µg/kg, o solución salina (control), por vía oral, 5 días después de la inyección de células del tumor Walker. La hiperalgesia, la alodinia y el dolor espontáneo se determinaron antes (MB - medición basal) y 5 días después de la inyección de células del tumor, antes (MI - medición inicial) y 2 horas después (MF - medición final) de la administración del péptido.

Los resultados se analizaron comparando los valores medios de las mediciones basales e iniciales, o de las mediciones iniciales y finales o, cuando se determinaron, comparando los valores medios obtenidos en los diferentes grupos experimentales (Tablas 17, 18, 19).

40 TABLA 17. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CNF021.03 SOBRE HIPERALGESIA INDUCIDA POR EL TUMOR WALKER 256

Tratamientos	MB	MI	MF
Solución salina (p.o.)	69 ± 1,42	29 ± 2,97*	29 ± 2,29*

Péptido (6 µg/kg, p.o.)	69 ± 1,30	27 ± 1,01*	76 ± 2,29§#
-------------------------	-----------	------------	-------------

MB = medición basal antes de la inyección del tumor, MI = medición en el día 5 después de la implantación del tumor, antes de la administración del péptido, MF = medición en el día 5 después de la implantación del tumor y 2 horas después de la administración del péptido, los datos se presentan como la media de gramos (g) ± E.E.M.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 5

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

TABLA 18. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CNF021.03 SOBRE ALODINIA INDUCIDA POR EL TUMOR WALKER 256.

Tratamientos	MB	MI	MF
Solución salina (p.o.)	5,01 ± 0,04	4,41 ± 0,00*	4,41 ± 0,00*
Péptido (6 µg/kg, p.o.)	4,97 ± 0,00	4,41 ± 0,00*	4,97 ± 0,00§#

MB = medición basal antes de la inyección del tumor, MI = medición en el día 5 después de la implantación del tumor, antes de la administración del péptido, MF = medición en el día 5 después de la implantación del tumor y 2 horas después de la administración del péptido, los datos se presentan como el valor medio de log 10 (mg x 10) ± E.E.M.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 5

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

5 TABLA 19. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CNF021.03 SOBRE DOLOR ESPONTÁNEO INDUCIDO POR EL TUMOR WALKER 256

Tratamientos	Levantamiento			Lamido		
	MB	MI	MF	MB	MI	MF
Solución salina (p.o.)	0 ± 0,00	107 ± 10,52*	117 ± 15,16*	0 ± 0,00	17 ± 4,91*	16 ± 4,66*
Péptido (6 µg/kg, p.o.)	0 ± 0,00	204 ± 30,74*	25 ± 7,72*§#	0 ± 0,00	15 ± 1,46*	1,6 ± 0,81*§#

MB = medición basal antes de la inyección del tumor, MI = medición en el día 5 después de la implantación del tumor, antes de la administración del péptido; MF = medición en el día 5 después de la implantación del tumor y 2 horas después de la administración del péptido, los datos se presentan como el valor medio de la duración (en segundos) de levantamiento o lamido de las patas traseras ± E.E.M.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 5

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

10 Los resultados demostraron que el péptido bloquea la hiperalgesia (Tabla 17), la alodinia (Tabla 18) y el dolor espontáneo (Tabla 19) inducidos por el tumor Walker. Estos datos mostraron que el péptido puede inhibir dolor por cáncer.

EJEMPLO 14. EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE DOLOR POR CÁNCER INDUCIDO POR TUMOR WALKER 256.

Después de demostrar el efecto antinociceptivo del péptido sobre la hiperalgesia y la alodinia inducidas por

el tumor Walker 256, se investigó la participación de receptores de opioides en este efecto. Para este fin, los animales se trataron con CTOP, un antagonista de receptores μ específico (20 $\mu\text{g/pata}$), nor-BNI, un antagonista de receptores κ específico (50 $\mu\text{g/pata}$), o con ICI 174.864, un antagonista de receptores δ específico (10 $\mu\text{g/pata}$). Los antagonistas se inyectaron por vía intraplantar. El péptido se administró en la dosis de 6 $\mu\text{g/kg}$, por vía oral, inmediatamente antes de la inyección de los antagonistas de opioides. Los resultados se analizaron comparando los valores medios de las mediciones basales e iniciales, o de las mediciones iniciales y finales o, cuando se determinaron, comparando los valores medios obtenidos en los diferentes grupos experimentales (Tabla 20).

TABLA 20. CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTIHIPERALGÉSICO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN EL MODELO DE CÁNCER INDUCIDO POR EL TUMOR WALKER 256

Tratamientos	MB	MI	MF
Solución salina (p.o.)	68 $\pm$ 1,66	40 $\pm$ 0,00*	38 $\pm$ 1,66*
Péptido (p.o.)	71 $\pm$ 1,25	36 $\pm$ 2,39*	75 $\pm$ 2,88§#
Péptido + ICI (i.pl.)	67 $\pm$ 1,22	33 $\pm$ 3,39*	52 $\pm$ 1,22*§#
Péptido + nor-BNI (i.pl.)	69 $\pm$ 1,53	32 $\pm$ 2,14*	32 $\pm$ 1,05*
Péptido + CTOP (i.pl.)	70 $\pm$ 1,29	37 $\pm$ 2,81 *	72 $\pm$ 2,81§#
Solución salina + ICI (i.pl.)	68 $\pm$ 3,33	30 $\pm$ 2,88*	30 $\pm$ 2,88*
Solución salina + nor-BNI (i.pl.)	70 $\pm$ 2,88	33 $\pm$ 3,33*	32 $\pm$ 1,66*
Solución salina + CTOP (i.pl.)	68 $\pm$ 1,66	35 $\pm$ 2,88*	32 $\pm$ 1,66*

MB = medición basal antes de la inyección del tumor, MI = medición en el día 5 después de la implantación del tumor, antes de la administración del péptido, MF = medición en el día 5 después de la implantación del tumor y 2 horas después de la administración del péptido, los datos se presentan como la media de gramos (g) $\pm$ E.E.M.

*p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 5

p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los datos demostraron que el antagonista de receptores de opioides *kappa* bloqueó el efecto antihiperálgico del péptido. El antagonista de receptores de opioides *delta* inhibió parcialmente este efecto, mientras que el antagonista de receptores de opioides *mu* no alteró el efecto del péptido.

TABLA 21. CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES EN EL EFECTO ANTIALODÍNICO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2, EN EL MODELO DE CÁNCER INDUCIDO POR EL TUMOR WALKER 256

Tratamientos	MB	MI	MF
Solución salina (p.o.)	5,01 $\pm$ 0,04	4,41 $\pm$ 0,00*	4,59 $\pm$ 0,18*
Péptido (p.o.)	4,97 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,00*	4,97 $\pm$ 0,00§#
Péptido + ICI (i.pl.)	4,99 $\pm$ 0,02	4,41 $\pm$ 0,00*	4,56 $\pm$ 0,03*§#
Péptido + nor-BNI (i.pl.)	4,97 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,00*	4,41 $\pm$ 0,00*
Péptido + CTOP (i.pl.)	5,03 $\pm$ 0,02	4,41 $\pm$ 0,00*	4,98 $\pm$ 0,03*#
Solución salina + ICI (i.pl.)	4,97 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,00*	4,41 $\pm$ 0,00*
Solución salina + nor-BNI (i.pl.)	4,97 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,00*	4,41 $\pm$ 0,00*
Solución salina + CTOP (i.pl.)	4,97 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,00*	4,41 $\pm$ 0,00*

MB = medición basal antes de la inyección del tumor, MI = medición en el día 5 después de la implantación del tumor, antes de la administración del péptido, MF = medición en el día 5 después de la implantación del tumor y 2 horas después de la administración del péptido, los datos se presentan como el valor medio de $\log 10 (\text{mg} \times 10) \pm \text{E.E.M.}$

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios de la medición basal

§ $p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial en el día 5

$p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).

Los datos demostraron que el antagonista de receptores de opioides *kappa* bloqueó el efecto antialodínico del péptido. El antagonista de receptores de opioides *delta* inhibió parcialmente este efecto, mientras que el antagonista de receptores de opioides *mu* no alteró el efecto del péptido.

5 EJEMPLO 15. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EN LA PRUEBA DE LA PLACA CALIENTE.

Esta prueba se usa para la evaluación de fármacos que interfieren con la nocicepción en el sistema nervioso central como, por ejemplo, morfina y productos derivados, ya que el estímulo térmico activa directamente el nociceptor, evitando la lesión de tejido y la consecuente inflamación. Los datos obtenidos en esta prueba indican que el efecto antinociceptivo de un compuesto es debido principalmente a una respuesta supraespalmente integrada.

Esta prueba se realizó según el procedimiento descrito por Jacob, J.J.C. y Ramabadran, K. (Br. J. Pharmacol., 64:91-8, 1978). Para esta prueba, los ratones se colocaron sobre una superficie metálica mantenida a $50^\circ\text{C} \pm 1$. Los resultados se expresan como el tiempo de latencia (en segundos - s) para observar el lamido de ambas patas anteriores (tiempo de reacción). Esta prueba se aplicó antes (medición inicial - MI) y 2 horas después del tratamiento de los animales (medición final - MF) con solución salina (control) o con el péptido sintético (1 y 3 $\mu\text{g/kg}$ en 200 μl), por vía oral. Cada animal se consideró como su propio control. Los resultados se analizaron comparando los valores medios de la MI y MF o, cuando se determinaron, comparando los valores medios obtenidos en los diferentes grupos experimentales (Tabla 22).

20 TABLA 22. EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO DE SEQ ID NO: 2 EVALUADO EN LA PRUEBA DE LA PLACA CALIENTE

Tratamiento	MI (s) $\pm$ E.E.M.	MF (s) $\pm$ E.E.M.
Solución salina (p.o.)	19 $\pm$ 0,54	19 $\pm$ 0,45
Péptido 1 $\mu\text{g/kg}$ (p.o.)	18 $\pm$ 0,64	25 $\pm$ 0,68 *
Péptido 3 $\mu\text{g/kg}$ (p.o.)	22 $\pm$ 1,01	27 $\pm$ 1,06*
MI = medición inicial; MF = medición final; los datos se presentan como la media de gramos (g) $\pm$ E.E.M.		
* $p < 0,05$ significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial.		

Los resultados demuestran que el péptido sintético también induce antinocicepción por una acción en el sistema nervioso central.

EJEMPLO 16. ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DEL PÉPTIDO SINTÉTICO MODIFICADO DE SEQ ID NO: 3.

25 Para la inducción de hiperalgesia se administró prostaglandina E_2 , en la dosis de 100 ng/pata, por vía intraplantar (i.pl.). La hiperalgesia se evaluó antes (medición inicial - MI) y 3 horas después (medición final - MF) de la inyección de PGE_2 .

30 Para la evaluación de hiperalgesia se usó la prueba de la presión de la pata de rata. El umbral de dolor, representado por la fuerza (en gramos) que hace que el animal reaccione retirando la pata, se determinó antes (medición inicial) y 3 horas después (medición final) de la inyección intraplantar de prostaglandina E_2 (100 ng/pata).

El péptido sintético modificado de SEQ ID NO: 3 se diluyó en un volumen de 11 ml de solución salina. Cada animal recibió 2 ml de esta disolución, administrada por vía oral (p.o.), inmediatamente antes de la inducción de hiperalgesia. Como control se usaron animales inyectados con solución salina por vía oral.

Tratamientos	MI (gramos) $\pm$ E.E.M.	MF (gramos) $\pm$ E.E.M.
Solución salina (p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	76 $\pm$ 1,05	59 $\pm$ 1,54 *
Péptido (p.o.) + PGE ₂ (i.pl.)	76 $\pm$ 1,00	110 $\pm$ 2,74 *#
Los datos se presentan como la media de gramos (g) $\pm$ E.E.M. *p<0,05 significativamente diferente de los valores medios de la medición inicial. #p<0,05 significativamente diferente de los valores medios del grupo de control (solución salina).		

Los resultados demuestran el efecto antinociceptivo del péptido sintético modificado de SEQ ID NO: 3 en hiperalgesia inducida por PGE₂.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> NOMBRE DEL SOLICITANTE: Laboratório Biosintética Ltda.; y col.
- <120> TÍTULO DE LA INVENCION: Compuestos análogos de péptidos analgésicos derivados del veneno de serpientes Crotalus durissus terrificus, sus usos, composiciones, procedimientos de preparación y purificación
- <130> REFERENCIA DEL EXPEDIENTE: PI0401702-1
- <140> SOLICITUD DE PATENTE: EN TRÁMITE
- 10 <141> FECHA DE PRESENTACIÓN: DE LA PRESENTE 05/06/2005
- <150> SOLICITUD DE PATENTE ANTERIOR: BR PI0401702-1
- <151> FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA PATENTE ANTERIOR: 05/06/2004
- <160> NÚMERO DE SEQ ID NO: 8
- <170> SOFTWARE: PatentIn
- 15 <210> SEQ ID NO 1
- <211> LONGITUD: 14
- <212> TIPO: PÉPTIDO
- <213> ORGANISMO:
- <220> CARACTERÍSTICA:
- 20 <221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO
- <222> LOCALIZACIÓN:
- <223> OTRA INFORMACIÓN: ANALGÉSICO; EFECTO SOBRE RECEPTORES DE OPIOIDES; Xaa(1) es siempre piroglutamato; Xaa(2) = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr; Xaa(4) = Pro o Arg; Xaa(5) = Glx o Asx o Gly; Xaa(6) = Asn o Gln o Leu; Xaa(10) = Glx o Asx; Xaa(12) = Glx o Lys
- 25 <400> SECUENCIA: 1
- Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Cys Glx Gly Xaa Ser Xaa Pro Cys
1 5 10
- <210> SEQ ID NO 2
- <211> LONGITUD: 14
- <212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

<222> LOCALIZACIÓN:

5 <223> OTRA INFORMACIÓN: ANALGÉSICO; AISLADO DE VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS; EFECTO SOBRE RECEPTORES DE OPIOIDES; Xaa(1) es siempre piroglutamato

<400> SECUENCIA: 2

Xaa Phe Ser Pro Glu Asn Cys Gln Gly Glu Ser Gln Pro Cys
1 5 10

<210> SEQ ID NO 3

10 <211> LONGITUD: 14

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

15 <222> LOCALIZACIÓN:

<223> OTRA INFORMACIÓN: ANALGÉSICO; EFECTO SOBRE RECEPTORES DE OPIOIDES; Xaa(1) es siempre piroglutamato

<400> SECUENCIA: 3

Xaa Phe Ser Pro Glu Asn Cys Gln Gly Glu Ser Lys Pro Cys
1 5 10

20 <210> SEQ ID NO 4

<211> LONGITUD: 14

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

25 <221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

<222> LOCALIZACIÓN:

<223> OTRA INFORMACIÓN: Xaa(1) es siempre piroglutamato; Xaa(2) = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr; Xaa(4) = Pro o Arg; Xaa(5) = Glx o Asx o Gly; Xaa(6) = Asn o Gln o Leu; Xaa(10) = Glx o Asx; Xaa(12) = Glx o Lys;

<400> SECUENCIA: 4

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Cys Glx Gly Xaa Ser Xaa Pro Cys
1 5 10

30

<210> SEQ ID NO 5

<211> LONGITUD: 8

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

<222> LOCALIZACIÓN:

5 <223> OTRA INFORMACIÓN: PRODUCTO INTERMEDIO EN LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS ANALGÉSICOS O QUE ACTÚAN SOBRE RECEPTORES DE OPIOIDES; Xaa(4) = Glx o Asx; Xaa(6) = Glx o Lys

<400> SECUENCIA: 5

Cys Glx Gly Xaa Ser Xaa Pro Cys
1 5

<210> SEQ ID NO 6

10 <211> LONGITUD: 14

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

15 <222> LOCALIZACIÓN:

<223> OTRA INFORMACIÓN:

Xaa(1) es siempre piroglutamato

<400> SECUENCIA: 6

Xaa Phe Ser Pro Glu Asn Cys Lys Gly Glu Ser Gln Pro Cys
1 5 10

20 <210> SEQ ID NO 7

<211> LONGITUD: 14

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

25 <221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

<222> LOCALIZACIÓN:

<223> OTRA INFORMACIÓN:

Xaa(1) es siempre piroglutamato

<400> SECUENCIA: 7

Xaa Phe Ser Pro Glu Asn Cys Lys Gly Glu Ser Lys Pro Cys
1 5 10

30

<210> SEQ ID NO 8

<211> LONGITUD: 14

<212> TIPO: PÉPTIDO

<213> ORGANISMO:

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO

<222> LOCALIZACIÓN:

5 <223> OTRA INFORMACIÓN: PORCIÓN DEL EXTREMO C DE LA CROTAPOTINA, LA SUBUNIDAD ÁCIDA NO TÓXICA DE LA CROTOXINA DEL VENENO DE SERPIENTE DE LA ESPECIE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS (SWISS PROT/P08878); Xaa (1) es siempre piroglutamato

<400> SECUENCIA: 8

Xaa	Phe	Ser	Pro	Glu	Asn	Cys	Gln	Gly	Glu	Ser	Gln	Pro	Cys
1				5					10				

REIVINDICACIONES

1. Un péptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys

en la que:

Xaa es piroglutamato,

5 R 1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

R2 = Pro o Arg,

R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx, y

10 R6 = Glx o Lys,

en la que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 4); una sal o un solvato del mismo.

15 2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos Xaa-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Gln-Pro-Cys en la que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 2).

3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos Xaa-Phe-Ser-Pro-Glu-Asn-Cys-Gln-Gly-Glu-Ser-Lys-Phe-Cys en la que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular (SEQ ID NO: 3).

4. El péptido de la reivindicación 1, en el que R2 es Pro.

20 5. El péptido de la reivindicación 4, en el que Pro está hidroxilado.

6. El péptido de la reivindicación 1, en el que R3 es Glu.

7. El péptido de la reivindicación 1, en el que R5 es Glu.

8. El péptido de la reivindicación 6 ó 7, en el que Glu está γ -carboxilado.

9. El péptido de la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de aminoácidos:

25 Xaa-R1-Ser-R2-R3-R4-Cys-Glx-Gly-R5-Ser-R6-Pro-Cys

en la que:

Xaa es piroglutamato

R1 = Phe o Trp o Tyr o Leu o Thr,

R2 = Pro o Arg,

30 R3 = Glx o Asx o Gly,

R4 = Asn o Gln o Leu,

R5 = Glx o Asx, y

R6 = Glx o Lys,

35 en la que los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14 están ligados por un puente disulfuro intramolecular; o una sal o a solvato del mismo (SEQ ID NO: 4)

10. El péptido de la reivindicación 9, en el que R2 es Pro.

11. Los péptidos de la reivindicación 10, en el que Pro está hidroxilado.

12. El péptido de la reivindicación 9, en el que R3 es Glu.
 13. El péptido de la reivindicación 9, en el que R5 es Glu.
 14. El péptido de la reivindicación 12 ó 13, en el que Glu está γ -carboxilado.
 15. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido puede causar analgesia en un sujeto.
- 5 16. Una composición farmacéutica que comprende uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y uno o más péptidos que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 4.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que dichos péptidos comprenden la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 10 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la composición está en forma de una disolución, una suspensión, una pasta, una cápsula, un gel, un comprimido, una píldora, un polvo, un gránulo, una sustancia liofilizada, un sistema de liberación controlada, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, un liposoma, o la composición comprende un recubrimiento orgánico.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la composición comprende un diluyente basado en agua.
- 15 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la composición se formula para uso oral, intramuscular, intravenoso, subcutáneo, tópico, pulmonar, intranasal, bucal, rectal, sublingual, intradérmico, intraperitoneal o intratecal.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en la que la composición se formula para uso oral.
- 20 22. El péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de una afección modulada por receptores de opioides.
23. El péptido para su uso según la reivindicación 22, en el que dicho péptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
24. El péptido para su uso según la reivindicación 22, en el que el péptido es un agonista de receptores de opioides directo o indirecto.
- 25 25. El péptido para su uso según la reivindicación 22, en el que el péptido es un antagonista de receptores de opioides directo o indirecto.
26. El péptido para su uso según la reivindicación 22, en el que la afección se modula por receptores de opioides de tipo *kappa*.
- 30 27. El péptido para su uso según la reivindicación 22, en el que el péptido se usa en la preparación de una composición farmacéutica analgésica.
28. El péptido para su uso según la reivindicación 27, en el que la composición tiene un efecto analgésico de larga duración.
29. El péptido para su uso según la reivindicación 28, en el que el efecto analgésico dura hasta 5 días.
- 35 30. El péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de dolor.
31. El péptido para su uso según la reivindicación 30, en el que dicho péptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
32. El péptido para su uso según la reivindicación 30, en el que el dolor es agudo o crónico.
- 40 33. El péptido para su uso según la reivindicación 30, en el que el dolor se selecciona del grupo que consiste en: dolor relacionado con cáncer, dolor neuropático, dolores asociados a neoplasia, fibromialgia, dolor dental, dolor por dismenorrea, renal, dolor menstrual, dolor por cólico biliar, dolor de articulaciones, artritis, hipertensión intraocular, dolor postartroscopia, dolor ginecológico postlaparoscopia, dolor producido por nefrolitotomía percutánea, dolor postprostatectomía retropúbica radical, dolor post-toracotomía, dolor post-tonsilectomía en pacientes pediátricos, dolor posthisterectomía, dolores postoperatorios por cesárea y dolor asociados a: quemaduras, dependencia de cocaína, dependencia de opioides, proliferación celular, carcinoma pulmonar de células pequeñas, depresión, psicosis, inflamación, afecciones asociadas a un aumento de angiogénesis, heridas, enfermedad isquémica coronaria, enfermedad de Parkinson, disquinesia, encefalopatía hepática, enfermedad cognitiva, enfermedad de Alzheimer, picor debido a colestasis hepática e hiperinsulinemia.
- 45

34. El péptido para su uso según la reivindicación 33, en el que el dolor es dolor neuropático seleccionado del grupo que consiste en neuralgia trigeminal, distrofia simpática, neuralgia postherpética, dolor de miembro fantasma, accidente postcerebrovascular y neuropatía diabética.
- 5 35. El péptido para su uso según la reivindicación 33, en el que la artritis es artritis reumatoide o artritis degenerativa.
36. Un procedimiento para producir el péptido de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende oxidar grupos sulfhidrido sobre los residuos de cisteína en las posiciones 7 y 14, formando así un puente disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína.
- 10 37. El procedimiento de la reivindicación 36 que comprende el uso de yodo como un agente de oxidación.
38. El procedimiento de la reivindicación 36 que comprende síntesis de péptidos en fase sólida.
39. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicho péptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 15 40. El procedimiento de la reivindicación 38, que comprende el uso de la resina H-Cys(Trt)-2-CITrt como soporte sólido.
41. Un procedimiento para producir el péptido de la reivindicación 1 que comprende purificar una mezcla de compuestos de origen sintético o semisintético.
42. Un procedimiento para producir el péptido de la reivindicación 1 que comprende purificar una mezcla de compuestos de origen biológico.
- 20 43. El procedimiento de la reivindicación 42, en el que la mezcla consiste en veneno sin refinar de una serpiente *Crotalus durissus terrificus*.
44. El procedimiento de la reivindicación 42, en el que la mezcla se obtiene de un cultivo celular o de un microorganismo recombinante.
- 25 45. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44 que comprende precipitación selectiva de péptidos.
46. El procedimiento de la reivindicación 45 que comprende el uso de una disolución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo y agua como agente para la precipitación selectiva.
- 30 47. El procedimiento de la reivindicación 46 que comprende la aplicación de una disolución de aproximadamente el 0,1% de ácido trifluoroacético en una mezcla de aproximadamente 1 parte de acetonitrilo con respecto a 2 partes de agua.
48. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44 que comprende cromatografía.
49. El procedimiento de la reivindicación 48 que comprende el uso de columnas de HPLC de fase inversa.
50. El procedimiento de la reivindicación 48 que comprende el uso de fase móvil con concentración en gradiente.
- 35 51. El procedimiento de la reivindicación 50 que comprende el uso de una disolución de ácido trifluoroacético en una mezcla de agua y acetonitrilo como fase móvil.
52. Un procedimiento para identificar compuestos que imitan la actividad analgésica de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1, procedimiento que comprende
- 40 a) evaluar la actividad biológica de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1 para determinar la actividad de analgesia del péptido,
- b) evaluar la actividad biológica de un compuesto de prueba para determinar la actividad de analgesia del compuesto de prueba; y
- c) comparar los resultados obtenidos para la actividad biológica del péptido con los resultados obtenidos para la actividad biológica del compuesto de prueba.
- 45 53. Un procedimiento para identificar compuestos que imitan la actividad analgésica de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1, procedimiento que comprende:

- a) poner en contacto un péptido marcado que consiste en SEQ ID NO: 1 con una muestra,
- b) añadir un compuesto de prueba a la muestra en contacto con el péptido marcado; y
- c) medir la unión del péptido marcado con la muestra.

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5

Documentos de patente indicados en la descripción

- US 5182260 A [0012]
- US 5763403 A [0012]
- US 6489451 B [0012]
- US 6555109 B [0012]
- US 6613745 B [0012] [0032]
- US 6323212 B, Nagase, H.; Kawai, K.; Kawamura, K.; Hayakawa, J.; Endoh, T. [0023]
- US 2001 A [0023]
- US 5602100 A [0023]
- US 6420432 B, Demopoulos, G. [0024]
- US 2003096807 A1, Demopoulos, G. [0024]
- US 5866346 A [0026]
- US 5877026 A, Lampe R.A. [0059]

Literatura de patentes no citadas en la descripción

- BRASIL. *V. Biol. Med. São Paulo*, 1934, vol. 1, 7-21 [0003]
- BRAZIL. *V. An. Paul. Med. Cir.*, 1950, vol. 60, 398-408 [0003] [0004]
- KLOBUSITZKY D. *Anais do Instituto Pinheiros*, 1938, vol. 1, 3-23 [0003]
- KLOBUSITZKY, D. *Anais do Instituto Pinheiros*, 1938, vol. 1, 3-23 [0003]
- BRASIL. *V. Biol. Med. São Paulo*, 1934, vol. 1, 7-21 [0004]
- GIORGI R. et al. *Toxicon*, 1993, vol. 31, 1257-65 [0008] [0009]
- PICOLO G. et al. *Toxicon*, 1998, vol. 36, 223-227 [0008]
- BRIGATTE P. et al. *Toxicon*, 2001, vol. 39, 1399-1410 [0008]
- PICOLO G. et al. *Eur J Pharmacol*, 2000, vol. 391, 55-62 [0009]
- PICOLO G. et al. *Eur J Pharmacol*, 2003, vol. 469, 57-64 [0010]
- PICOLO ; CURY. *Life Science*, 2004, vol. 75, 559-73 [0010]
- GUTIERREZ, V. P. ; CHACUR, M. ; SAMPAIO, S.C. ; PICOLO, G. ; CURY, Y. *Memórias do Instituto Butantan*, 2003, vol. 60, 50 [0011]
- BRIGATTE, P. ; SAMPAIO S.C. ; GUTIERREZ, V. ; CURI, R. ; RANGEL-SANTOS, A.C. ; GUERRA, J.L. ; CURY Y. *XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Programa e Resumos*, 2004, 195 [0011]
- MANCIN C. A. et al. *Toxin*, 1998, vol. 36 (12), 1927-1937 [0013]
- YAKSH, T.L. *Acta Anaesth. Scand.*, 1997, vol. 41, 94-111 [0014] [0016] [0019]
- PRZEWOŁOCKI R. ; PRZEWOŁOCKA B. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, vol. 429, 79-91 [0015]
- REISINE T. ; PASTERNAK, G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, 1996, 521-555 [0015]
- SCHULTZ, J.E.J. ; GROSS, G.J. *Pharmacol. Ther.*, 2001, vol. 89, 123-137 [0016] [0017]
- JUNIEN, J.L. ; WETTSTEIN, J.G. *Life Science*, 1992, vol. 51, 2009-18 [0016]
- ZAKI, P.A. et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996, vol. 36, 379-401 [0016]
- FERREIRA, S.H. et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 1991, vol. 1217, 225-7 [0017]
- FERREIRA, S.H. et al. *Br. J. Pharmacol.*, 1995, vol. 114, 303-8 [0017]
- NOZAKI-TAGUCHI, N. ; YAMAMOTO, T. *Anesth. Anal.*, 1998, vol. 87, 388-93 [0017]
- AMARANTE, L.H. ; DUARTE, I.D. *Eur J Pharmacol.*, 2002, vol. 454, 19-23 [0017]
- WELCH, S. ; DUNLOW, L.D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, vol. 267, 390-399 [0017]
- RODRIGUES, A.R. A. ; DUARTE I.D.G. *Br. J. Pharmacol.*, 2000, vol. 129, 110-114 [0017]
- LI, J.G. et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 12087-12094 [0018]
- EITAN, S. et al. *J. Neuroscience*, 2003, vol. 23, 8360-8369 [0018]
- LESSCHER, H.M.B. et al. *Neuroscience*, 2003, vol. 116, 139-144 [0018]
- YAKSH, T. L. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 1984, vol. 1, 201-243 [0019]
- JUNIEN, J.L. ; WETTSTEIN, J.G. *Life Science*, 1992, vol. 51, 2009-2018 [0019]
- BROWNSTEIN, M.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1993, vol. 90, 5391-5393 [0020]
- VANVOIGTLANDER et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983, vol. 224, 7-12 [0021]
- WOOD, P.L. ; IYENGAR, S. *The opioid receptors*. Humana press, 1988 [0021]

10

- LEANDER. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983, vol. 227, 35-41 [0021]
- LEANDER et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1985, vol. 234, 463-469 [0021]
- MORLEY et al. *Peptides*, 1983, vol. 4, 797-800 [0021]
- MANZANARES et al. *Neuroendocrinology*, 1990, vol. 52, 200-205 [0021]
- IYENGAR et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, vol. 238, 429-436 [0021]
- JANECKA A. et al. *Mini Rev Med Chem.*, 2002, vol. 2, 565-572 [0022]
- NAITO A. ; NISHIMURA K. *Curr Top Med Chem.*, 2004, vol. 4, 135-145 [0022]
- SINGH VK et al. *Neuroimmunomodulation*, 1997, vol. 4, 285-297 [0022]
- BODNAR, R ; HADJIMARKOU. *Peptides*, 2003, vol. 24, 1241-1302 [0025]
- A Textbook of Drug Design and Development. Harwood Academic Publishers [0032]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company [0037]
- Peptide Synthesis. Oxford University Press [0056]
- Principles of Biochemistry. Worth Publishers [0056]
- FAURE G ; GUILLAUME JL ; CAMOIN L ; SALIOU B ; BON C. *Biochemistry*, 1991, vol. 13, 8074-8083 [0068]
- RANDALL L.O. ; SELITTO J.J. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 1957, vol. 111, 209-219 [0073]
- BENNETT, G.J ; XIE, Y.K. *Pain*, 87-107 [0100]
- JACOB, J.J.C. ; RAMABADRAN, K. *Br. J. Pharmacol.*, 1978, vol. 64, 91-8 [0127]