

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 358**

51 Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03812100 .0**
96 Fecha de presentación: **02.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572725**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Péptidos de chi-conotoxina que tienen un ácido piroglutámico N-terminal**

30 Prioridad:
02.12.2002 US 430306 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
XENOME LTD
120 MEIERS ROAD
INDOOROOPILLY, QUEENSLAND 4068, AU

72 Inventor/es:
LEWIS, Richard, James;
ALEWOOD, Paul, Francis;
ALEWOOD, Dianne y
PALANT, Elka

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 383 358 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de chi-conotoxina que tienen un ácido piroglutámico N-terminal.

La presente invención se refiere a péptidos χ -conotoxinas novedosos útiles como inhibidores de transportadores de aminas neuronales de neurotransmisores tales como noradrenalina, serotonina, dopamina, ácido glutámico y glicina.

5 La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden estos péptidos y el uso de estos péptidos en la prevención o tratamiento de afecciones, tales como pero no limitadas a, dolor, inflamación, incontinencia, trastornos cardiovasculares y trastornos del humor.

10 Los caracoles marinos del género *Conus* (caracoles cónicos) usan una estrategia bioquímica sofisticada para capturar su presa. Como predadores de bien pescado, bien gusanos o bien otros moluscos, los caracoles cónicos inyectan a su presa con veneno que contiene un cóctel de péptidos bioactivos pequeños. Estas moléculas de toxina, que se refieren como conotoxinas, interfieren con la neurotransmisión usando como objetivo una diversidad de receptores y canales iónicos. El veneno de cualquier especie de *Conus* individual puede contener más de 100 péptidos diferentes. Las conotoxinas se dividen en clases en base a sus objetivos fisiológicos. La clase de péptidos ω -conotoxina usa como objetivo y bloquea canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje que inhiben liberación de neurotransmisores. Las α -conotoxinas y las ψ -conotoxinas usan como objetivo y bloquean receptores ACh nicotínicos, causando bloqueo gangliónico y neuromuscular. Los péptidos de la clase μ -conotoxina actúan para bloquear canales de Na^+ sensibles a voltaje que inhiben potenciales de acción musculares y nerviosos. Las δ -conotoxinas usan como objetivo y retardan la inactivación de canales de Na^+ sensibles a voltaje, potenciando excitabilidad neuronal. La clase de péptidos κ -conotoxina marcan como objetivo y bloquean canales de K^+ sensibles a voltaje y estos péptidos causan también excitabilidad neuronal potenciada. Las conopresinas son antagonistas de receptores de vasopresinas y las conantocinas son agonistas de receptores de NMDA. La clase γ -conotoxinas usa como objetivo un canal catiónico no específico sensible a voltaje. La clase de σ -conotoxinas antagoniza el receptor de 5HT_3 y la clase de χ -conotoxinas inhibe transportadores de aminas neuronales.

25 La clase de péptidos χ -conotoxinas se describió primero en el documento WO 00/20444 (Universidad de Queensland), aunque dos miembros de la clase se refirieron posteriormente en el documento WO 00/44769 (Universidad de Utah Research Foundation). Los péptidos χ -conotoxinas particulares identificados en el documento WO 00/20444 fueron MrlA y MrlB a partir de la caza de moluscos *C. marmoreus* que tienen las siguientes secuencias:

χ -MrlA Asn Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 1

χ -MrlB Val Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 2

30 En estas y las siguientes secuencias las Xaa3 se refieren a 4-hidroxiprolina (Hyp). En la naturaleza, este residuo aminoacídico resulta de la modificación postraduccional del péptido codificado y no está directamente codificado por la secuencia nucleotídica.

Diversos péptidos χ -conotoxinas y variantes y usos, de los mismos se describen en los documentos WO 2004/050688; WO 02/064740; Jones y cols. (2001), Exp. Opin. Ther. Patents, 11 (4): 603-623; y Harvey (2002), TRENDS in Pharmacological Sciences, 23 (5): 201-203.

35 Los compuestos que inhiben la recaptación de neurotransmisores se ha encontrado que son útiles en el tratamiento de dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación. Tales compuestos se pueden administrar también con otros agentes útiles en estos tratamientos para proporcionar alivio de dolor/inflamación mejorado y/o para reducir la gravedad de efectos secundarios indeseados, tales como náuseas y malestar estomacal. También se ha encontrado que son útiles en el tratamiento de trastornos del tracto urinario inferior, tales como incontinencia urinaria, inestabilidad del detrusor y cistitis intersticial. Un compuesto tal es "imipramina" que, además de inhibir la recaptación de noradrenalina, se ha mostrado que afecta el bloqueo de canales de calcio y que exhibe actividad anticolinérgica, anestésica local y un número de otros efectos. Otros compuestos capaces de inhibir la recaptación de noradrenalina, se describen en la patente de EE.UU. 5.441.985. Estos compuestos se ha dicho que tienen un efecto anticolinérgico reducido en relación con la imipramina.

45 En el caso de los péptidos de la presente invención esta inhibición de la recaptación de neurotransmisores se logra inhibiendo selectivamente el transportador de neurotransmisores neuronales, tal como el transportador de noradrenalina, que funciona para disipar rápidamente noradrenalina liberada desde la sinapsis de regreso dentro de las neuronas.

50 Como se describe en el documento WO 00/2044 el péptido χ -MrlA está compuesto de una cola, residuos 1-3, dos bucles, residuos 6-9 (bucle 1) y 11-12 (bucle 2), respectivamente y tienen dos residuos de cisteína entre enlaces disulfuro 4 y 13 y 5 y 10, respectivamente. Mientras MrlA se parece a un péptido α -conotoxina en términos del número de residuos de cisteína, la conectividad de disulfuros es diferente. A este respecto los péptidos α -conotoxina se caracterizan por una conectividad A-C/B-D, más que la conectividad A-D/B-C de MrlA, donde A, B, C y D

representan el primero, segundo, tercero y cuarto residuos de cisteína involucrados en la formación de enlaces disulfuro, respectivamente.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la sustitución de un residuo de asparragina N-terminal de MrIA con un residuo de ácido piroglutámico o la adición de un residuo de piroglutamato al extremo N-terminal de MrIA proporciona ventajas particulares sobre MrIA en términos de eficacia in vivo, duración del efecto, estabilidad y método de preparación.

De acuerdo con ello, en un primer aspecto la presente invención proporciona un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys

SEC ID N.º: 3

donde Xaa1 es un residuo de pGlu o de DpGlu N-terminal; y Xaa2 es Asn o una delección;

o una secuencia tal en la que uno o más Cys se reemplazan con su D-aminoácido correspondiente y/o Pro se reemplaza con 4-hidroxiprolina, y/o Tyr está sustituido con 4-metoxitirosina; o una sal, un éster o amida de la misma.

En un aspecto particular el péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante de la presente invención puede consistir en la secuencia de SEC ID N.º: 3 como anteriormente.

En las secuencias anteriores pGlu representa piroglutamato y DpGlu representa D-piroglutamato.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención tienen un número de ventajas sorprendentes e inesperadas sobre MrIA. Los péptidos se ha encontrado también que son particularmente estables para el almacenamiento en el intervalo de pH de 4 a 7 y a 37 °C, permitiendo administración a largo plazo en un dispositivo, por ejemplo una bomba de infusión, mantenida a temperatura ambiente a 37 °C. Hay también ventajas en relación con la producción y separación de péptidos de subproductos de síntesis no deseados, permitiendo purificación directa a homogeneidad de > 99 %, en relación a MrIA usando un procedimiento similar en el que la pureza es típicamente < 93 %. Cuando se suministra i.t. en un modelo neuropático de rata de alodinia, un péptido de acuerdo con la presente invención se encuentra que tiene mayor eficacia máxima en relación con MrIA, sin influir en los efectos secundarios o reducir la ventana terapéutica en el modelo animal. La duración del efecto del péptido se encontró que se prolonga más allá de 48 horas después de que se da i.t. una dosis de 30 nmol de bolo. Los péptidos de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles en el tratamiento de dolor neuropático y sus síntomas cuando se administran en una i.t. o epidural de tampón apropiado. Incluyendo tales afecciones de dolor neuropático dolor de cirugía (dolor postoperatorio), de intestino, de cáncer, diabético, del miembro fantasma, de daño nervioso, inflamatorio y dolor asociado con nervios periféricos.

Preferentemente, el transportador de aminas neuronal inhibido por el péptido de χ -conotoxina es el transportador de noradrenalina neuronal.

El péptido χ -conotoxina puede ser un péptido que se da en la naturaleza aislado a partir de un caracol cónico, o derivados o versiones sintéticas del mismo.

Preferentemente, el péptido χ -conotoxina es un inhibidor selectivo del transportador de noradrenalina neuronal. Los términos "selectivo" y "selectivamente" como se usan en el presente documento significan que la actividad del péptido como un inhibidor del transportador de noradrenalina neuronal es considerablemente mayor que cualquier actividad en los α_1 -adrenoceptores. Preferentemente el péptido inhibidor es 10 veces más selectivo para el transportador de noradrenalina neuronal, más preferentemente 100 veces más selectivo y lo más preferentemente más de 1000 veces más selectivo. El péptido es también preferentemente selectivo por encima de α_2 -adrenoceptores y/o de transportador de recaptación de serotonina (SERT). La selectividad de un inhibidor del transportador de noradrenalina neuronal se puede medir usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo usando ensayos de desplazamiento de ligando marcados apropiados.

La patente de EE.UU. 5.441.985 indica que los inhibidores de recaptación de noradrenalina que tienen un efecto anticolinérgico despreciable son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos del tracto urinario inferior. Se ha encontrado que los péptidos de esta invención también tienen efecto anticolinérgico no detectable o sustancialmente no detectable.

De acuerdo con ello en una realización preferida de la invención el péptido χ -conotoxina tiene la capacidad para inhibir selectivamente el transportador de noradrenalina neuronal y tiene efecto anticolinérgico sustancial despreciable o no tiene ninguno.

Los péptidos de la presente invención preferentemente no tienen ninguna actividad como un bloqueante de canales de sodio o como un inhibidor del transportador de dopamina. La ausencia, en los péptidos de la invención y en particular en los péptidos preferidos de acuerdo con la invención, de estas actividades farmacológicas adicionales asociadas comúnmente con otros inhibidores de transportadores de noradrenalina hace a estos péptidos

herramientas farmacológicas útiles.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención son derivados específicos de MrIA.

El término "derivado" como se usa en el presente documento en relación con un péptido χ -conotoxina, tal como χ -MrIA, hace referencia a un péptido que difiere de los péptidos que se dan en la naturaleza por una o más deleciones, adiciones, sustituciones, o modificaciones de cadenas laterales. Los derivados de MrIA específicos reivindicados

tienen la capacidad para inhibir el transportador de noradrenalina neuronal.

Las alteraciones de aminoácidos comprenden sustituciones en las que un aminoácido está reemplazado con un residuo de aminoácidos que se da en la naturaleza o no convencional diferente. Tales sustituciones pueden clasificarse como "conservadoras", en cuyo caso un residuo de aminoácido contenido en un polipéptido está reemplazado con otro aminoácido que se da en la naturaleza de carácter similar bien en relación con polaridad, funcionalidad de cadena lateral o tamaño, por ejemplo Ser \leftrightarrow Thr \leftrightarrow Pro \leftrightarrow Hyp \leftrightarrow Gly \leftrightarrow Ala, Val \leftrightarrow Ile \leftrightarrow Leu, His \leftrightarrow Lys \leftrightarrow Arg, Asn \leftrightarrow Gln \leftrightarrow Asp \leftrightarrow Glu o Phe \leftrightarrow Trp \leftrightarrow Tyr. Se entiende que algunos aminoácidos no convencionales pueden también ser reemplazos adecuados para los aminoácidos que se dan en la naturaleza. Por ejemplo los residuos de Lys pueden sustituirse por ornitina, homoarginina, nor-Lys, N-metil-Lys, N,N-dimetil-Lys y N,N,N-trimetil-Lys. Los residuos de Lys también se pueden reemplazar con aminoácidos básicos sintéticos incluyendo, pero no limitados a, N-1-(2-pirazolinil)-Arg, 2-(4-piperinil)-Gly, 2-(4-piperinil)-Ala, 2-[3-(2S)pirrolinil]-Gly y 2-[3-(2S)pirrolinil]-Ala. Los residuos de Tyr pueden estar sustituidos con 4-metoxitirosina (MeY), *meta-Tyr*, *orto-Tyr*, *nor-Tyr*, ¹²⁵I-Tyr, mono-halo-Tyr, di-halo-Tyr, O-sulfo-Tyr, O-fosfo-Tyr y nitro-Tyr. Los residuos de Tyr pueden estar sustituidos también con isómeros de 3-hidroxilo o 2-hidroxilo (*meta-Tyr* u *orto-Tyr*, respectivamente) y O-sulfo-derivados y O-fosfo-derivados correspondientes. Los residuos de Tyr pueden también reemplazarse con aminoácidos que contienen hidroxilo sintéticos incluyendo, pero no limitados a 4-hidroximetilo-Phe, 4-hidroxifenil-Gly, 2,6-dimetil-Tyr y 5-amino-Tyr. Los aminoácidos alifáticos pueden sustituirse por derivados sintéticos que llevan cadenas laterales ramificadas o lineales alifáticas no naturales C_nH_{2n+2} hasta e incluyendo n = 8. Ejemplos de sustituciones conservadoras adecuadas por aminoácidos no convencionales se dan en el documento WO 02/064740. De acuerdo con la presente invención las sustituciones están restringidas a sustituciones conservadoras particulares, según se define en las reivindicaciones.

Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden ser de múltiples residuos, bien agrupados o bien dispersos.

Las adiciones abarcan la adición de uno o más residuos aminoacídicos que se dan en la naturaleza o no convencionales. Los péptidos de acuerdo con la presente invención donde Xaa2 es Asn pueden considerarse derivados de MrIA Xaa1 que tienen un residuo Xaa1 adicional. Otras adiciones están restringidas al extremo C-terminal. La deleción abarca la deleción de uno o más residuos aminoacídicos.

Como se ha indicado anteriormente la presente invención incluye péptidos en los que (además o alternativamente a la sustitución de uno o más Cys con su correspondiente D-aminoácido) Pro está reemplazado con 4-hidroxiprolina y/o Tyr está reemplazado con 4-metoxitirosina. Ejemplos de otras modificaciones de cadena lateral contempladas por la presente revelación incluyen modificaciones de grupos aminoacídicos tales como por alquilación reductora por reacción con un aldehído seguida por reducción con NaBH₄; amidinación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguida por reducción con NaBH₄; y N-acetilación.

El grupo de guanidina de residuos de arginina puede modificarse por la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glioxal.

El grupo carboxilo se puede modificar por activación de carbodiimida *por medio de* formación de O-acilisourea seguida por derivatización subsiguiente, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Los aminoácidos ácidos pueden estar sustituidos con derivados de tetrazolilo de glicina y alanina, como se describe en el documento WO 02/600923.

El resto de tirosina puede estar alterado, por ejemplo por metoxilación en la posición 4 (como se proporciona por la presente invención). La tirosina también puede estar alterada por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina. Ejemplos de derivados de tirosina se dan en el documento WO 02/064740.

Se puede llevar a cabo modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina por alquilación con derivados del ácido yodoacético o con N-carbetoxilación con dietilpirocarbonato.

Los residuos de prolina se pueden modificar mediante, por ejemplo, hidroxilación en la posición 4 (como se proporciona por la presente invención).

Otros derivados contemplados por la presente revelación incluyen un intervalo de variantes de glicosilación. Los patrones de glicosilación alterados pueden resultar de la expresión de moléculas recombinantes en diferentes

células huésped. Residuos de Ser, Thr y Hyp pueden estar modificados para contener un O-glicano, mientras que residuos Asn y Gln pueden modificarse para formar un N-glicano. De acuerdo con la presente invención, el término "glicano" se refiere a un mono-, di-, tri-, poli- u oligosacárido N-enlazado, S-enlazado u O-enlazado que puede estar unido a cualquier grupo hidroxilo, amino o grupo de aminoácidos naturales o modificados por metodologías sintéticas o enzimáticas conocidas en la técnica. Los monosacáridos que componen el glicano pueden incluir D-alosa, D-altrosa, D-glucosa, D-manosa, D-gulosa, D-idosa; D-galactosa, D-talosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-N-acetil-glucosamina (GlcNAc), D-N-acetil-galactosamina (GalNAc), D-fucosa o D-arabinosa. Estos sacáridos pueden estar modificados estructuralmente es decir, con uno o más grupos de O-sulfato, O-fosfato, O-acetilo o con grupos ácidos tales como ácido siálico, incluyendo combinaciones de los mismos. El glicano también puede incluir grupos de polihidroxilo similares, tales como D-penicilamina 2,5 y derivados halogenados de los mismos o derivados de polipropilenglicol. El enlace glicosídico es beta y 1-4 o 1-3, preferentemente 1-3. El enlace entre el glicano y el aminoácido puede ser alfa o beta, preferentemente alfa y es 1-.

Una lista de algunos aminoácidos que tienen cadenas laterales modificadas y otros aminoácidos no naturales se muestra en la tabla 1.

15 Tabla 1

Aminoácidos no convencionales	Código	Aminoácidos no convencionales	Código
ácido α -aminobutírico	Abu	4-hidroxiprolina	Hyp
α -amino- α -metilbutirato	Mgabu	ácido L-piroglutámico	pGlu
aminociclopropano-	Cpro	L-4-metoxitirosina	MeY
carboxilato		L-N-metilalanina	Nmala
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilarginina	Nmarg
aminonorbornil-	Norb	L-N-metilasparragina	Nmasn
carboxilato		ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilglutamina	Nmgln
ciclopentilalanina	Cpen	ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
D-alanina	DAla	L-N-metilhistidina	Nmhis
D-arginina	DArg	L-N-metilisoleucina	Nmile
ácido D-aspártico	DAsp	L-N-metil-leucina	Nmleu
D-cisteína	DCys	L-N-metil-lisina	Nmlys
D-glutamina	DGln	L-N-metilmetionina	Nmmet
ácido D-glutámico	DGlu	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-histidina	DHis	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-isoleucina	Dlle	L-N-metilornitina	Nmom
D-leucina	DLeu	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-lisina	DLys	L-N-metilprolina	Nmpro

ES 2 383 358 T3

Aminoácidos no convencionales	Código	Aminoácidos no convencionales	Código
D-metionina	DMet	L-N-metilserina	Nmser
D-ornitina	DOrn	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-fenilalanina	DPhe	L-N-metilriptófano	Nmtrp
D-prolina	DPro	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-serina	DSer	L-N-metilvalina	Nmval
D-treonina	DThr	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-riptófano	DTrp	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-tirosina	DTyr	L-norleucina	Nle
D-valina	DVal	L-norvatina	Nva
D- α -metilalanina	DMala	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D- α -metilarginina	DMarg	α -metil- γ -aminobutirato	Mgabv
D- α -metilasparragina	DMasn	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilaspártato	DMasp	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilglutamina	DMgln	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilhistidina	DMhis	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilisoleucina	DMile	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metil-leucina	DMleu	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metil-lisina	DMlys	N-(3-aminopropil)glicina	Nom
D- α -metilmetionina	DMmet	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metilomitina	DMom	α -naftilalanina	Anap
D- α -metilfenilalanina	DMphe	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilprolina	DMpro	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D- α -metilserina	DMser	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α -metiltreonina	DMthr	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilriptófano	DMtrp	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metiltirosina	DMty	N-ciclobutilglicina	Ncbut

ES 2 383 358 T3

Aminoácidos no convencionales	Código	Aminoácidos no convencionales	Código
D- α -metilvalina	DMval	N-cicloheptilglicina	Nchep
D-N-metilalanina	DNmala	N-ciclohexilglicina	Nchex
D-N-metilarginina	DNmarg	N-ciclodecilglicina	Ncdec
D-N-metilasparragina	DNmasn	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D-N-metilaspártato	DNmasp	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilglutamina	DNmgln	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilglutamato	DNmglu	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilhistidina	DNmhis	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D-N-metilisoleucina	DNmile	N-(1-hidroxiethyl)glicina	Nthr
D-N-metil-leucina	DNmleu	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metil-lisina	DNmlys	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
N-metilciclohexilalanina	NMchexa	N-(hidroxiethyl)glicina	Nser
D-N-metilornitina	DNmorn	N-(imidazoliletíl)glicina	Nhis
D-N-metilmetionina	Dnmmt	N-(3-indoliletíl)glicina	Nhtrp
N-metilglicina	Nala	N-metil- γ -aminobutirato	Nngabu
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilfenilalanina	DNmphe
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metilprolina	DNmpro
D-N-metilriptófano	DNmtrp	D-N-metilserina	DNmser
D-N-metilrosina	DNmtyr	D-N-metilreonina	DNmthr
D-N-metilvalina	DNmval	N-(1-metiletíl)glicina	Nval
ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-metila-naftilalanina	Nmanap
L-t-butilglicina	Tbug	N-metilpenicilamina	Nmpen
L-etilglicina	Etg	N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L-homofenilalanina	Hphe	N-(tiometil)glicina	Ncys
L- α -metilarginina	Marg	penicilamina	Pen

Aminoácidos no convencionales	Código	Aminoácidos no convencionales	Código
L- α -metilasparragina	Masn	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilaspártato	Masp	L- α -metil-t-butilglicina	Mtbug
L- α -metilglutamina	Mgln	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamato	Mglu	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilhistidina	Mhis	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L- α -metilisoleucina	Mile	L- α -metil-lisina	Mlys
L- α -metil-leucina	Mleu	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilornitina	Mom
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metiltriptófano	Mtrp	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
L- α -metilvalina	Mval	N-(N-(3,3-difenilpropilo)	Nnbhe
N-(N-(2,2-difeniletilo)	Nnbhm	carbamilmetilglicina	
carbamilmetilglicina		O-metil-L-serina	Omser
1-carboxi-1-(2,2-difenil-	Nmbc	O-metil-L-homoserina	Omhser
etilamino)ciclopropano		D-piroglutamato	DpGlu
L-(ácido carboxiglutámico)	Gla		

Las modificaciones de la cadena lateral particularmente preferidas incluyen la sustitución de Tyr con MeY y/o la sustitución de Pro con Hyp.

- 5 Estos tipos de modificaciones y otros que implican modificaciones de cadenas laterales más importantes, pueden ser importantes para estabilizar el péptido si se administra a un individuo o si se usa como un reactivo de diagnóstico, o para mejorar la solubilidad o biodisponibilidad, o para proporcionar otras farmacologías. Por ejemplo es posible ampliar o contraer la longitud de la cadena lateral, o insertar o eliminar grupos funcionales para lograr estos efectos, por ejemplo por introducción de grupos donantes de nitróxido.
- 10 Los péptidos de la presente invención pueden estar en forma de una sal, un éster, una amida o un profármaco de los mismos. Las conotoxinas de la presente invención están típicamente amidadas en el extremo C-terminal, sin embargo, los compuestos con un extremo carboxilo libre u otras modificaciones en el extremo C-terminal se considera que están dentro del ámbito de la presente invención. Preferentemente los péptidos están amidados o tienen un carboxilo libre en el extremo C-terminal. Los péptidos de acuerdo con la invención pueden estar en forma de una sal o profármaco.
- 15 Ejemplos de sales adecuadas incluyen las sales de cloruro, de acetato, de lactato y de glutamato. Son bien conocidos en la técnica procedimientos convencionales para la preparación de sales adecuadas.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención también pueden estar en forma de profármacos. Los profármacos se entiende que incluyen todos los derivados de péptidos de acuerdo con la invención que son fácilmente convertibles *in vivo* en el péptido activo requerido. En libros de texto, tales como "Design of Prodrugs" ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985, se describen procedimientos convencionales para la preparación de profármacos adecuados de acuerdo con la invención.

Los péptidos de la presente invención conservan los residuos de Cys y el patrón de formación de enlaces disulfuro característicos de péptidos de χ -conotoxina.

Los péptidos pueden también marcarse y usarse para establecer ensayos de unión para identificar moléculas nuevas que actúan en el mismo sitio. Por ejemplo, un ligando de péptido marcado podría tener tritio incluido o podría tener yodo radiactivo o similar unido por un Tyr o por otro residuo apropiado. La inhibición de unión de tales péptidos marcados a homogenados de tejidos o transportadores expresados por compuestos o mezclas permitiría identificación de nuevos péptidos activos en este sitio, incluyendo péptidos presentes en el suero y nervios y tejido muscular de mamíferos, incluyendo tejidos humanos. El ensayo también permitirá la identificación de moléculas no peptídicas que actúan también en la misma zona como péptidos de χ -conotoxina y que pueden tener utilidad como formas activas oralmente de estos péptidos. Los péptidos marcados permitirán adicionalmente estudios autorradiográficos para identificar la localización de la unión del péptido a través de diversos tejidos.

Contrariamente a lo que se propuso en el documento WO 00/20444 se ha encontrado que los péptidos de χ -conotoxina son inhibidores no competitivos en relación con noradrenalina, pero competitivos en relación con moléculas pequeñas que también unen al transportador de noradrenalina, tales como mazindol, cocaína y antidepresivos tricíclicos, tales como desipramina.

De acuerdo con ello los ensayos de unión usando los péptidos marcados de la presente invención, preferentemente marcados radioisotópicamente, pueden usarse para descubrir moléculas pequeñas que podrían actuar como inhibidores no competitivos del transporte de noradrenalina a través del transportador de noradrenalina. Preferentemente este ensayo se realizaría en presencia de concentraciones bloqueantes de noradrenalina o de moléculas pequeñas relacionadas que no se solapan con el sitio de unión a conopéptidos χ pero que se solapan con muchos inhibidores de moléculas pequeñas del transportador de noradrenalina (por ejemplo antidepresivos tricíclicos).

Las χ -conotoxinas de la presente invención se pueden preparar usando métodos sintéticos de péptidos estándar seguidos por formación de enlaces disulfuro oxidativos. Por ejemplo, los péptidos lineales se pueden sintetizar por metodología en fase sólida usando química de BOC, como se describe por Schnoltzer y cols. (1992). Tras la desprotección y la escisión desde el soporte sólido, los péptidos reducidos se purifican usando cromatografía preparativa. Los péptidos reducidos purificados se oxidan en sistemas tamponados, por ejemplo según se describen en los ejemplos. Los péptidos oxidados pueden purificarse usando cromatografía preparativa.

Las referencias que describen la síntesis de conotoxinas incluyen Sato y cols., Lew y cols. y el documento WO 91/07980.

Las χ -conotoxinas también pueden prepararse usando tecnología de ADN recombinante. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica deseada se puede insertar dentro de un vector adecuado y la proteína se puede expresar en un sistema de expresión apropiado. En algunos casos, la modificación química adicional del péptido expresado puede ser apropiada, por ejemplo amidación C-terminal y conversión de un residuo de glutamato N-terminal a residuo de piroglutamato. En algunas circunstancias puede ser deseable emprender formación de enlaces oxidativos del péptido expresado como una etapa química tras expresión peptídica. Esto puede ir precedido por una etapa reductora para proporcionar el péptido no plegado. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las condiciones apropiadas para la reducción y la oxidación del péptido.

También puede ser posible preparar anticuerpos antiidiotípicos usando técnicas conocidas en la técnica. Estos anticuerpos antiidiotípicos y su uso como agentes terapéuticos representan un aspecto adicional de la invención.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden estar en forma aislada, o puede estar integradas o ligadas a o de otra forma condensadas con otras moléculas genéticas tales como moléculas de vector y en particular moléculas de vector de expresión particular. Los vectores y los vectores de expresión son generalmente capaces de replicación y si es aplicable, de expresión en una o ambas de una célula procariota o una célula eucariota. Preferentemente, las células procariotas incluyen *E. coli*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* Las células eucariotas preferidas incluyen células de levadura, de hongos, de mamíferos y de insectos.

Preferentemente, la parte del gen de la construcción genética está unida operativamente a un promotor en el vector tal que dicho promotor es capaz de dirigir la expresión de la parte del gen en una célula apropiada.

Las quimeras de las χ -conotoxinas de la presente invención, con otras conotoxinas o adicionalmente con otros péptidos o proteínas, se pueden hacer para manipular la actividad en otras moléculas, en algunos casos para producir una nueva molécula con funcionalidad extra. Por ejemplo, los aminoácidos que se unen a los canales de

calcio de tipo N se pueden combinar con aminoácidos que inhiben NET para producir un péptido con actividad en NET (usando residuos de bucle 1 de χ -conopéptidos) y actividad en los canales de calcio de tipo N (usando bucle 2 de CVID) como en los CCSKLMYDCCGYKLG N/C-cicladados. De forma similar, un péptido cíclico puede contrastarse con residuos chi de bucle 1 y con un bucle de aminoácidos que tienen actividad como receptores de opiato, como en

5 cCRRQICCGYKLG. Estos péptidos quiméricos puede ser particularmente útiles ya que poseen características farmacológicas que son aditivas o incluso sinérgicas y se espera que sean beneficiosas en el tratamiento de un amplio intervalo de síndromes de dolor que están presentes en seres humanos.

Debería entenderse así que los términos péptido conotoxina o conotoxinas no se limitan a péptidos tóxicos que se dan en la naturaleza obtenidos del género *Conus* sino más bien indican simplemente una fuente inicial de la que se han derivado los péptidos. Los péptidos conotoxina pueden crearse sintéticamente, derivados peptídicos no tóxicos que no se dan en la naturaleza. Conopéptidos es un término alternativo intercambiable con péptidos conotoxina.

10

Un subgrupo de estos análogos de MrlA pueden actuar en receptores además de los efectos sinérgicos o adicionales que permiten NET. Preferentemente, estas interacciones adicionales actúan de forma sinérgica para potenciar los efectos antinociceptivos. Más preferentemente, estas interacciones adicionales tienen lugar en receptores opioides, receptores similares a receptores opioides, GPCR de la familia MRG, los receptores NMDA, los receptores de glutamato, las neuroquininas, receptores de ciclooxigenasa, receptores serotérgicos, receptores adrenérgicos, receptores vainilloides, receptores de benzodiacepinas, antagonistas de los canales de calcio de tipo N, receptores nicotínicos neuronales, receptores de capsaicina acetilcolina muscarínicos, TNF- α , canales de Na resistentes a tetradotoxina y sensibles a tetradotoxina, canal de calcio sensible a voltaje y receptores endoteliales.

15

Preferentemente los péptidos de α -conotoxina de acuerdo con la invención tienen 10 a 30 aminoácidos, más preferentemente 11 a 20.

20

El extremo C-terminal puede prolongarse por adición de una "cola" peptídica. En algunos casos, la actividad del péptido puede mejorarse por tales modificaciones.

Ejemplos de péptidos de χ -conotoxina de acuerdo con la presente invención incluyen los siguientes:

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys SEC ID N.º: 4

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Xaa5 SEC ID N.º: 5

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Xaa4 Lys Leu Cys His Xaa3 Cys SEC ID N.º: 6

Xaa1 Asn Gly Val Cys Cys Gly Xaa4 Lys Leu Cys His Xaa3 Cys SEC ID N.º: 7

Xaa1 Asn Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys SEC ID N.º: 8

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys-OH SEC ID N.º: 9

25 En las secuencias anteriores, Xaa1 se refiere a ácido piroglutámico, Xaa3 se refiere a 4-hidroxi prolina, Xaa4 se refiere a 4-metoxitirosina, Xaa5 (Cys) se refiere a D-cisteína y -OH indica un ácido libre C terminal.

A menos que se indique lo contrario el extremo C-terminal del péptido está preferentemente amidado.

Ejemplos adicionales de péptidos de χ -conotoxina de acuerdo con la presente invención incluyen los siguientes:

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys-OH SEC ID N.º: 10

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys SEC ID N.º: 11

30 En las secuencias anteriores, Xaa1 se refiere a ácido D-piroglutámico, Xaa3 se refiere a 4-hidroxi prolina y -OH indica un extremo C-terminal ácido libre.

Los péptidos de χ -conotoxina de acuerdo con la presente invención están activos en inhibir transportador de noradrenalina neuronal. De acuerdo con ello, la invención se refiere al uso de los péptidos de χ -conotoxina como inhibidores de transportador de noradrenalina neuronal y al tratamiento o profilaxis de enfermedades o afecciones en relación con los que la inhibición del transportador de noradrenalina neuronal está asociado con tratamiento efectivo. Tal actividad en agentes farmacológicos está asociada con la actividad en la prevención o en el tratamiento de enfermedades o afecciones de los sistemas urinario y cardiovascular, o de trastornos del humor, o en el tratamiento o control del dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación.

35

Ejemplos de la formulación y el uso de inhibidores de recaptación de noradrenalina en terapia pueden encontrarse

en Ardid, D. y cols., (1992) *Fund. Clinical Pharmacology* 6 (2): 75-8; Yaksh, T.L. (1985) *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 22: 845-858; Yaksh, T.L. & Takano, Y. (1992) *J. Pharmacology & Experimental Therapeutics* 261 (2): 764-772; Yaksh, T.L. y Howe, J.R. (1982) *J. Pharmacology & Experimental Therapeutics* 220 (2): 311-321; Howe, J.R. y cols., (1983) *J. Experimental Pharmacology & Therapeutics* 224 (3): 552-558; Solomon y cols., (1989) *J. Pharmacology & Experimental Therapeutics* 251 (1): 28-38; Fleetwood-Walker, S.M. y cols., (1985) *Brain Research* 334: 243-254; Takagi, H & Harima, A. (1996) *European Neuropsychopharmacology* 6, 43-47; Eisenach, J.C. y cols. (1998) *Anesth Analg* 87, 591-6; Dubner, R. & Hargreaves, KM (1989) *Clin J Pain*, 5 pS1-6; Max, MB (1992) *N Engl J Med* 326, página 1287-8; Atkinson, JH y cols. (1998) *Pain* 76, p. 287-96; Mico, J.A. y cols., (1997) *European Neuropsychopharmacology* 7, S 162.

10 De acuerdo con ello la presente invención proporciona el uso de un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys

SEC ID N.º: 3

donde Xaa1 es un residuo de piroglutamato N-terminal (pGlu) o un residuo de D-piroglutamato (dpGlu) N-terminal; y Xaa2 es Asn o una deleción; o una secuencia tal en la que una o más Cys se reemplaza(n) con su correspondiente D-aminoácido y/o Pro se reemplaza con 4-hidroxiprolina, y/o Tyr se reemplaza con 4-metoxitirosina; o una sal, un éster, amida o profármaco del mismo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de afecciones o enfermedades urinarias o cardiovasculares, o trastornos del humor, o para el tratamiento o control de dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación. El medicamento puede formularse para administración de forma sustancialmente simultánea o secuencialmente con otros agentes útiles en el tratamiento de las afecciones, enfermedades o trastornos. Así, el péptido de χ -conotoxina de la invención se puede usar en un método para el tratamiento o profilaxis de afecciones o enfermedades urinarias o cardiovasculares o de trastornos del humor o para el tratamiento o control de dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación, que incluye la etapa de administrar a un mamífero una cantidad efectiva de un péptido χ -conotoxina que tiene la capacidad para inhibir el transportador de noradrenalina neuronal, en el que dicho péptido χ -conotoxina es según se define en las reivindicaciones en el presente documento.

Al llevar a cabo un método tal, la administración del χ -péptido se puede llevar a cabo en conjunción con otras terapias útiles en el tratamiento de la afección, enfermedad o trastorno. De acuerdo con ello el péptido puede administrarse sustancialmente simultáneamente o secuencialmente con otros agentes útiles en el tratamiento de las afecciones, enfermedades o trastornos. Donde la coadministración es simultánea, el péptido se puede formular en una composición con uno o más de los otros agentes. La co-administración de otros agentes se puede llevar a cabo por medio de la misma o diferente vía a la vía de administración para el χ -péptido. Donde el método es para el tratamiento o control de dolor agudo, crónico y/o neuropático o migraña, el péptido se puede administrar sustancialmente o secuencialmente con un agente analgésico seleccionado del grupo constituido por analgésicos opioides, antagonistas similares al receptor de opioides, antagonistas de GPCR de la familia MRG, antagonistas de NMDA, antagonistas de la sustancia P, inhibidores de COX 1 y de COX 2, antidepresivos tricíclicos (TCA), inhibidores de recaptación de serotonina selectivos (IRSS), antagonistas de receptor de capsaicina, agentes anestésicos, benzodiazepinas, relajantes del músculo esquelético, agentes terapéuticos de migraña, anti-convulsivantes, antihipertensores, antiarrítmicos, antihistamínicos, esteroides, cafeína, antagonistas de los canales del calcio de tipo N, agonistas y antagonistas parciales de receptor nicotínico, antagonistas y agonistas de receptor vainilloide, antagonistas de TNF- α y anticuerpos, inhibidores de canales de Na sensibles a tetrodotoxina, inhibidores de canales de tipo P, antagonistas endoteliales y toxina botulínica. El péptido puede también administrarse simultáneamente con dos o más de otros agentes, por ejemplo mezclas de los IRSS y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina.

Cuando el agente analgésico es un agente analgésico opioide se selecciona preferentemente a partir de naltrexona y nalmeveno; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

45 Cuando el agente analgésico es un agente analgésico opioide se selecciona preferentemente a partir de propoxifeno, meperidina, hidromorfona, hidrocodona, morfina, codeína y tramadol; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico es un agente analgésico antagonista de NMDA se selecciona preferentemente de derivados de 2-piperidino-1-alcánol, dextrometorfano, eliprodilo e ifenprodilo; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico P es un antagonista de agente analgésico se selecciona preferentemente a partir de 2-fenil-piperidin-3-ilo o 2-difenilmetil-1-azabicyclo[2.2.2]-octano-3-amina derivados como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2001/00336943 A1 (Coe y cols.); sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

55 Cuando el agente analgésico es un agente analgésico de inhibición COX 2 se selecciona preferentemente a partir de rofecoxib y celecoxib; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Donde el agente analgésico es un agente analgésico anestésico se selecciona preferentemente a partir de óxido nitroso, halotano, lidocaína, etidocaína, ropivacaína, cloroprocaína, sarapin y bupivacaína; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 5 Cuando el agente analgésico es un agente analgésico de benzodiazepina se selecciona preferentemente de diazepam, clordiazepóxido, alprazolam, lorazepam, midazolam, L-365260; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico es un agente analgésico relajante del músculo esquelético se selecciona preferentemente a partir de flexeril, carisoprodol, robaxisal, norgesic y dantrium; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 10 Cuando el agente analgésico es un agente terapéutico de migraña se selecciona preferentemente de elitriptán, sumatriptán, rizatriptán, zolmitriptán, y naratriptán; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico es un agente analgésico anticonvulsivante se selecciona preferentemente de gabapentina, pregabalina, carbamazepina y topiramato y ácido valproico; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 15 Cuando el agente analgésico es un analgésico agente inhibidor COX 1 se selecciona preferentemente de ácido salicílico, acetaminofeno, diclofenaco, piroxicam indometacina; ibuprofeno y naproxeno; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Donde el agente analgésico es un agente antidepresivo tricíclico el agente analgésico se selecciona preferentemente a partir de amitriptilina, desipramina, perfenazina, protriptilina y tranilcipromina; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 20 Cuando el agente analgésico es un agente analgésico IRSS se selecciona preferentemente de tramadol y milnaciprán; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico es una mezcla de IRSS y de los inhibidores de la recaptación de noradrenalina, los últimos se seleccionan preferentemente de reboxetina y atomoxetina; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 25 El agente analgésico también puede seleccionarse a partir de adenosina, baclofeno, clonidina, mexiliteno, difenilhidramina, hidroxicina, cafeína, prednisona; metilprednisona, decadrón, paroxetina, sertralina, fluoxetina, Ziconotida® y levodopa; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 30 Cuando el agente analgésico es un antagonista de TNF- α o un anticuerpo, el agente se selecciona preferentemente a partir de etanercept, infliximab y talidomida; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

Cuando el agente analgésico es un antagonista endotelial, el agente se selecciona preferentemente a partir de bosentán y tesosentán; sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 35 Cuando el agente analgésico es un antagonista de vainilloides, el agente analgésico se selecciona preferentemente de ananamida, capsazepina, derivados de ácido tiocarbámico (como se describe en el documento WO 02/16318 A1); sus sales farmacéuticamente activas y sus isómeros ópticos.

- 40 Cuando el agente analgésico se selecciona a partir de agonista parcial de receptor de nicotina se seleccionan preferentemente a partir de derivados de 1,2,3,4,5,6-hexahidro-1,5-metano-pirido[1,2-a][1,5]diazocin-8-ona, derivados de diazatetraciclo[9.3.1.0.sup.2,10.0.sup.4,8]pentadeca-2(10),3,8-trieno, derivados de 10-azatriciclo[6.3.1.0.sup.2,7]dodeca-2 (7),3,5-trieno, derivados de triazatetraciclo[9.3.1.0.sup.2,10.0.sup.4,8]pentadeca-2(10),3,5,8-tetraeno, derivados de 5,8,14-triazatetraciclo[10.3.1.0.sup.2,11.0.sup.4,9]hexadeca-2 (11),3,5,7,9-pentaeno, derivados de diazatetraciclo[9.3.1.0.sup.2,10.0.sup.4,8]pentadeca-2(10),3,6,8-tetraeno, derivados de 10-azatriciclo[6.3.1.0.sup.2,7]dodeca-2 (7),3,5-trieno, derivados de 5,7,14-triazatetraciclo[10.3.1.0.sup.2,10.0.sup.4,8]hexadeca-2(10),3,5,8-tetraeno, derivados de 5,8,15-triazatetraciclo[11.3.1.0.sup.2,11.0.sup.4,9]heptadeca-2(11),3,5,7,9-pentaeno, derivados de 5,14-diazatetraciclo[10.3.1.0.sup.2,10.0.sup.4,8]heptadeca-2 (10),3,5,8-tetraeno, derivados de 11-azatriciclo[7.3.1.0.sup.2,7]trideca-2(7),3,5-trieno, todos los cuales se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2001/00336943 A1 y sus sales farmacéuticamente aceptables y sus isómeros ópticos.

- 50 Ejemplos de afecciones asociadas con dolor agudo, crónico y/o neuropático e inflamatorio incluyen daño de tejidos blandos y periférico, tal como un traumatismo agudo, osteoartritis, artritis reumatoide, dolor musculoesquelético, particularmente después del trauma, dolor espinal, dolor dental, síndromes de dolor miofascial, dolor de cabeza, dolor de episiotomía y quemaduras; y dolor profundo y visceral, tal como dolor cardiaco, dolor muscular, dolor ocular, dolor orofacial, por ejemplo, odontalgia, dolor abdominal, dolor ginecológico, por ejemplo, dismenorrea y dolor de parto; dolor asociado con nervios y lesión radicular, tal como dolor asociado a trastornos de nervios periféricos, por ejemplo, atrapamiento nervioso y avulsiones del plexo braquial, amputaciones, neuropatías periféricas, neuralgia, tic

doloroso, dolor facial atípico, lesión radicular nerviosa, dolor y/o compresión nerviosa crónica y aracnoiditis; dolor asociado con carcinoma, a menudo referido como dolor de cáncer; dolor asociado con SIDA, dolor del sistema nervioso central, tales como dolor debido a daño de la médula espinal o daño del bulbo raquídeo; lumbago; ciática; dolor de cabeza, incluyendo migraña, dolor de cabeza tensional agudo o crónico, dolor de cabeza en racimo, dolor temporomandibular y dolor del seno maxilar; espondilitis anquilosante, gota; dolor postoperatorio; dolores fantasma, neuropatía diabética; herpes zóster; y dolor de cicatrices.

Ejemplos de la formulación y el uso de péptidos conotoxina en el tratamiento de dolor se pueden encontrar en los documentos WO 9107980; US 5.587.454 y WO 9701351. Estos documentos se refieren a conotoxinas omega. Véanse también Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX y Luther RR (1996) J Pharmacol Exp Ther, 279 (3) páginas 1243-9 que se refiere a péptidos de conotoxina que son bloqueantes de canales de calcio sensibles a voltaje selectivos y a su uso en el tratamiento de dolor agudo, persistente y neuropático en ratas.

Ejemplos de las enfermedades o afecciones del sistema urinario incluyen incontinencia urinaria e incontinencia fecal. Ejemplos de enfermedades cardiovasculares o afecciones incluyen arritmias de diversos orígenes e insuficiencia cardiaca coronaria. Ejemplos de trastornos del humor incluyen depresión, ansiedad, ansias, un trastorno adictivo y un síndrome de abstinencia, un trastorno de adaptación, trastornos del aprendizaje y mentales asociados con la edad, anorexia nerviosa, apatía, trastornos de déficit de atención debidos a afecciones médicas generales, trastornos de hiperactividad con déficit de atención, trastorno bipolar, bulimia nerviosa, síndrome de fatiga crónica, estrés crónico o agudo, trastorno de conducta, trastorno ciclotímico, depresión, trastorno distímico, fibromialgia y otros trastornos somatoformes, trastorno de ansiedad generalizada, incontinencia, trastornos de inhalación, trastornos de la intoxicación, manía, obesidad, trastornos obsesivo-compulsivos y trastornos relacionados con el espectro obsesivo-compulsivo, trastorno de oposición desafiante, trastorno de pánico, neuropatía periférica, trastorno de estrés postraumático, trastorno disfórico premenstrual, trastornos psicóticos, trastorno afectivo estacional, trastornos del sueño, fobia social, trastornos de desarrollo específicos, síndrome de pérdida de eficacia de los antidepresivos durante el tratamiento de la inhibición de recaptación de serotonina selectiva (SARI) y trastornos de tic.

Ejemplos del uso de inhibidores de recaptación de norepinefrina selectiva en el tratamiento de enfermedades o afecciones del sistema urinario incluyen Springer, JP., Kropp, BP y Thor KB (1994) J. Urol 152 (2), páginas 515-9 (se refiere al tracto urinario inferior); Penttila, O. y cols. (1975) Ann Clin Res (7), 32-6 (se refiere al tratamiento de la colitis ulcerosa) y Dinan, TG y cols. (1990) J Psychosom Res 34, páginas 575-80 (se refiere al tratamiento del síndrome del intestino irritable).

Preferentemente el mamífero está en necesidad de tal tratamiento aunque el péptido se puede administrar en un sentido profiláctico.

La invención también proporciona una composición que comprende un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys SEC ID N.º: 3

donde Xaa1 es un residuo de pGlu o de DpGlu N-terminal; y Xaa2 es Asn o una deleción;

o una secuencia tal en la que uno o más Cys están reemplazados con su D-aminoácido correspondiente y/o Pro está reemplazada con 4-hidroxi prolina, y/o Tyr está reemplazada con 4-metoxitirosina; o una sal, un éster o amida de la misma y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente la composición está en forma de una composición farmacéutica. La composición puede ser también otros agentes activos útiles en el tratamiento de la afección, enfermedad, o trastorno presentes en la composición farmacéutica.

Como se comentó anteriormente, también se proporciona el uso de un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante, en el que dicho péptido χ -conotoxina comprende la secuencia siguiente de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys SEC ID N.º: 3

donde Xaa1 es un residuo de pGlu o de DpGlu N-terminal; y Xaa2 es Asn o una deleción;

o una secuencia tal en la que uno o más Cys están reemplazados con su D-aminoácido correspondiente y/o Pro está reemplazada con 4-hidroxi prolina, y/o Tyr está reemplazada con 4-metoxitirosina; o una sal, éster, amida o profármaco de la misma, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de afecciones o enfermedades urinarias o cardiovasculares, o trastornos del humor, o para el tratamiento o control de dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación.

Como se menciona anteriormente, los péptidos χ -conotoxina aislados, sintéticos o recombinantes MrlA específicos de la invención tienen la capacidad para inhibir el transportador de noradrenalina neuronal.

También se proporciona un péptido χ -conotoxina aislado, sintético, o recombinante que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys

SEC ID N.º: 3

5 donde Xaa1 es un residuo de piroglutamato (pGlu) o de D-piroglutamato (dpGlu) N-terminal; y Xaa2 es Asn o una
delección; o una secuencia tal en la que uno o más Cys se reemplazan con su correspondiente D-aminoácido y/o Pro
se reemplaza con 4-hidroxiprolina, y/o Tyr se reemplaza con 4-metoxitirosina; o una sal, un éster, amida o
10 profármaco del mismo para usar como un medicamento o para usar en tratar o evitar enfermedades o afecciones de
los sistemas cardiovascular o urinario, o trastornos del humor, o en el tratamiento o control de dolor agudo, crónico
y/o neuropático, migraña o inflamación o para usar en tratar dolor neuropático asociado con cirugía (dolor
postoperatorio), de intestino, de cáncer, diabético, del miembro fantasma, de daño nervioso, inflamatorio y dolor
asociado con nervios periféricos.

Se señaló también que el transportador de noradrenalina se expresó no solamente por células nerviosas, sino
también por otros tejidos que incluyen la placenta, las células pulmonares endoteliales y el útero. Los péptidos de
acuerdo con la presente invención también pueden ser eficaces en inhibir estos transportadores de noradrenalina y
pueden ser útiles en tratar afecciones en las que estos transportadores están implicados.

15 Como se apreciará fácilmente por aquellos expertos en la técnica, la vía de administración y la naturaleza del
vehículo farmacéuticamente aceptable dependerá de la naturaleza de la afección y del mamífero a tratarse. Se cree
que la elección de un vehículo o sistema de administración particular y la vía de administración podría determinarse
fácilmente por una persona experta en la técnica. En la preparación de cualquier formulación que contenga los
péptidos activos se debería de tener cuidado para asegurar que la actividad del péptido no se destruye en el proceso
20 y que el péptido es capaz de alcanzar su sitio de acción sin ser destruido. En algunas circunstancias puede ser
necesario proteger el péptido por medios conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, la microencapsulación.
De forma similar la vía de administración elegida debería ser tal que el péptido alcance su sitio de acción.

25 Por ejemplo, la vía de administración preferida para el tratamiento de enfermedades urinarias es oral, tópica,
intranasal, intratecal, intramucosal e intravenosa. Lo mismo se puede usar para el tratamiento de trastornos de dolor
y de humor, además de administración intratecal. Un método y formulaciones para usar con péptidos de conotoxina
en administración intratecal se describe en el documento WO 9701351.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones inyectables estériles y
polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Debería ser estable en las
condiciones de elaboración y almacenamiento y puede preservarse frente a la oxidación y a la acción contaminante
de microorganismos tales como bacterias u hongos.

35 Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las formulaciones adecuadas para los péptidos o
péptidos modificados de la presente invención usando aproximaciones convencionales. La identificación de los
intervalos de pH preferidos y de los excipientes adecuados, por ejemplo antioxidantes, es de rutina en la técnica
(véase por ejemplo Cleland y cols., 1993). Los sistemas de tampón se usan rutinariamente para proporcionar valores
de pH de un intervalo deseado e incluyen tampones de ácido carboxílico, por ejemplo acetato, citrato, lactato y
succinato. Una diversidad de antioxidantes están disponibles para tales formulaciones incluyendo compuestos
fenólicos tales como BHT o vitamina E, agentes reductores, como la metionina o el sulfito y quelantes de metales
tales como EDTA.

40 Los enfoques convencionales para la formulación de péptidos farmacéuticamente activos se describen en los
artículos siguientes: Ryan, J. y cols., (1986) Clin Pharmacol Ther (39), 40-2 (un ensayo clínico que detalla la
administración oral del péptido nifalátida); Krames E.S. y cols. (1986) Pain 24, 205-9 (describe la administración
intratecal de un péptido); documento WO 9614079 A1 (que describe administración oral y rectal de formulaciones del
péptido ciclosporina); documento WO 9640064 A1 (que describe las formulaciones para la estabilidad de péptidos);
45 documento WO 9805309 A1 (describe formulaciones peptídicas -una composición farmacéutica de ciclosporina para
uso de intervalo) y documento WO 9802148 A2 (que describe la liberación sostenida rectal y las formulaciones
peptídicas orales).

50 El disolvente o medio de dispersión para la solución o dispersión inyectable puede contener cualquiera de los
sistemas disolventes o de vehículo convencionales para péptidos activos y pueden contener, por ejemplo, agua,
etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los
mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal
como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de
tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo donde sea necesario por la
inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido
sorbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos para ajustar osmolalidad,
55 por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Preferentemente, la formulación inyectable será isotónica con sangre. La
absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las
composiciones de agentes que retardan absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las formas

farmacéuticas adecuadas para uso inyectable puede administrarse por cualquier vía apropiada incluyendo inyección intravenosa, intramuscular, intracerebral, intratecal, epidural o infusión.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros componentes tales como aquellos enumerados anteriormente, según se requiere, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, se prepararon dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación se secan al vacío o se secan por congelación de una solución filtrada en condiciones estériles del ingrediente activo con cualesquiera ingredientes deseados adicionales.

Cuando los ingredientes activos están adecuadamente protegidos se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente o con un vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsula de gelatina dura o cápsula de gelatina blanda, o se pueden comprimir en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones contienen preferentemente al menos el 1 % en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 5 a aproximadamente el 80 % del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también los componentes como se enumeran a continuación: un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina puede añadirse o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, ella puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otras maneras la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas puede estar recubiertas con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, una tinción y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material usado en preparar cualquier forma de unidad de dosificación sería farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el/los compuesto(s) activo(s) se puede(n) incorporar dentro de preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

La presente invención también se extiende a cualesquiera otras formas adecuadas para administración, por ejemplo la aplicación tópica tal como cremas, lociones, parches transdérmicos, pulverizaciones y geles, o las composiciones adecuadas para inhalación o administración intranasal, por ejemplo, soluciones o polvos secos.

Se prefieren las formas de dosificación parenteral, incluyendo aquellas adecuadas para administración intravenosa, subcutánea, intratecal, intracerebral o epidural.

La composición también pueden formularse para administración por medio de implantes de liberación lenta, incluyendo bombas implantables, tales como bombas osmóticas.

Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Salvo cuando alguno de los medios o agentes convencionales sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Los ingredientes activos suplementarios se pueden incorporar también dentro de las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se tratan; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las nuevas formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y del efecto terapéutico particular que se logra y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal material activo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos que tienen una afección morbosa en la que la salud corporal se ve afectada como se describe en detalle en el presente documento.

El principal ingrediente activo está compuesto para administración conveniente y efectiva en cantidades efectivas con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma de dosificación unitaria. Una forma de dosificación unitaria puede, por ejemplo, contener el principal compuesto activo en cantidades que varían desde 0,25 µg a

aproximadamente 2000 mg. Expresado en porcentaje, el compuesto activo está generalmente presente desde aproximadamente en 0,25 µg hasta aproximadamente 200 mg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis usual y a la manera de administración de dichos ingredientes.

- 5 La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos y los dibujos que se acompañan; sin embargo, se entenderá que la particularidad de la descripción siguiente no está reemplazando la generalidad de la descripción precedente de la invención.

En referencia a las figuras:

- 10 Figura 1: alivio de alodinia táctil en la zarpa ipsilateral en la rata CCI usando (a) SEC ID N.º: 4 (0,2-30 nM) durante 6 horas; (b) Morfina (3,5-50 nM) durante 6 horas; y (c) SEC ID N.º: 4 (1-30 nM) durante 72 horas.

Figura 2: Morfina i.t. frente a 2174 i.t. para el alivio de alodinia táctil en la zarpa ipsilateral en la rata CCI.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis y purificación de MrlA (SEC ID N.º: 1), SEC ID N.º: 4 y derivados de MrlA relacionados

(a) Síntesis

- 15 El péptido de acuerdo con la SEC ID N.º: 4 se ensambló usando métodos de química de F-moc en base al método de Scholzer y cols. (Scholzer y cols. Int. J. Prot. Pept. Res., 40, 180, (1992)) sobre la resina de amida de Rink obtenida de Polymer Laboratories. La protección de la cadena lateral de Trt-Bu se usó por todo el ensamblaje de cadena. La eficiencia de acoplamiento se controló usando la prueba de ninhidrina (Sarin y cols., Anal. Biochem. 117, 145-157 (1981)).
- 20 Otros péptidos se ensamblaron usando química de Boc- y grupos protectores de cadena lateral convencionales en resina de MBHA (Scholzer y cols., 1992). Cuando este método se usa la escisión se lleva a cabo usando HF: desoxidantes (9:1) durante 1 hora a 0 a -10°C.

(b) Oxidación y purificación

- 25 La oxidación del péptido reducido puro de acuerdo con (a) (i) se llevó a cabo usando un sistema de tampón optimizado (DMSO al 30 % en peso/NH₄HCO₃ 0,1 M, pH 6, 12 h) y el producto oxidado deseado que tiene conectividad a enlace disulfuro correspondiente a MrlA se purificó usando la etapa de RP-HPLC (columna C-8 con un gradiente desde B al 10 % hasta B al 33 % durante 40 minutos) proporcionando péptido con una pureza mayor del 99 %.

- 30 La purificación se logró usando una etapa de RP-HPLC tanto en la fase de péptido oxidado como en la fase de péptido reducido. Esto está en contraste con MrlA que requiere una etapa de purificación adicional usando un programa de cromatografía optimizado eliminando una impureza de degradación de Asp que eluye cerca (P.m.: 1408,8, Asp, B-Asp).

- 35 Los otros péptidos se oxidaron y se purificaron siguiendo procedimientos sustancialmente iguales a como se describe anteriormente. En algunas síntesis el sistema de tampón fue isopropanol al 30 %/NH₄HCO₃ 0,1 M pH 8,0 o una mezcla de isopropanol/DMSO/NH₄HCO₃ 0,1 M, pH 8,8.

Ejemplo 2. Estabilidad de péptidos relativa a MrlA

Métodos

- 40 Los péptidos se disolvieron en 1 mg/ml en tampón de acetato sódico 5 mM/solución salina al 0,9 %. Las muestras se almacenaron a 37 °C y las muestras se tomaron a intervalos durante un periodo de 31 días. Para los estudios de comparación, se elaboró una muestra reciente de ambos péptidos a partir de polvo liofilizado seco a -20 °C a la misma concentración en agua justo antes de la evaluación. Las muestras se evaluaron por RP-HPLC/EM usando el programa de cromatografía optimizado descrito anteriormente y a lo largo de un intervalo de masas de 300-1800 umas.

Resultados

- 45 (a) Estabilidad usando diferentes tampones

La estabilidad del péptido de SEC ID N.º: 4 se midió en un intervalo de condiciones de tampón a 37 °C. Los resultados, mostrados en la tabla 2, indican que este péptido es estable en un intervalo de condiciones durante periodos prolongados de tiempo.

Tabla 2

Tiempo	Acetato pH 4,5	Acetato pH 5,0	Acetato pH 5,5	Lactato pH 4,5	Lactato pH 5,0	Lactato pH 5,5
6 días	100	100	100	100	100	100
18 días	100	100	100	100	100	100
31 días	99,46	98,52	100	99,58	100	99,51

Gráfica 1: estabilidad de la SEC ID N.º: 4 a 37 °C después de diversas veces y en diversos tampones.

Tampón de acetato = acetato de sodio 5 mM/ácido acético más solución salina al 0,9 %.

Tampón lactato = lactato de sodio 5 mM/ácido láctico más solución salina al 0,9 %.

(b) Comparación de MrlA y SEC ID N.º: 4

- 5 La estabilidad del péptido de SEC ID N.º: 4 también se comparó directamente con la estabilidad de MrlA a 37 °C. Los resultados mostrados en la tabla 3 destacan la estabilidad grandemente incrementada del péptido de la SEC ID N.º: 4. Después de 31 días más del 99 % del producto parental está aún presente para el péptido de la SEC ID N.º: 4. Después del mismo tiempo a 37 °C MrlA es significativamente menos estable con respecto a su estabilidad general. Adicionalmente, MrlA está casi completamente convertido a los productos de degradación (Asn a Asp y B-Asp, JBC, vol. 286 (33), páginas 22549-22556, 1991 Tyler-Cross, R y Schirch, V.) después de 31 días.

Tabla 3: Estabilidad de MrlA y SEC ID N.º: 4 a 37 °C a lo largo del tiempo en acetato de sodio 5 mM/ácido acético más solución salina al 0,9 % pH 5,5.

Muestra	% de pureza	
	6 días	31 días
SEC ID N.º: 4 (recién preparado)	100,00	100,00
SEC ID N.º: 4	100,00	100,00
MrlA (recién preparado)	99,77	99,77
MrlA	94,04*	93,30 †

* contiene una mezcla de MrlA y AspMrlA;

† contiene predominantemente AspMrlA.

15 Ejemplo 3

La actividad de unión al transportador de noradrenalina humano (NET) y la actividad de recaptación de noradrenalina (NA) se midieron para diversos péptidos de acuerdo con la invención, así como para MrlA y otros péptidos no de acuerdo con la invención.

(i) Ensayo de unión de radioligando hNET

- 20 La capacidad de las χ -conotoxinas para actuar como inhibidores del transportador de noradrenalina humano (hNET) se puede medir por su inhibición competitiva de ³H-nosoxetina a partir de membrana preparada a partir de células de mamífero COS-7 que expresan hNET. Se observaron resultados similares con otras moléculas pequeñas 3H, tales como mazindol.

- 25 Las células COS-7 (ATCC) cultivadas en placas de 150 mm conteniendo DMEM y suero al 10 % se infectaron transitoriamente con ADN plasmídico que codifica NET de mamífero (ser humano) (Percy y cols. 1999, Br J Pharmacol 128: 774-780) usando reactivo metafecteno (Biontex). Se recogieron células 48 horas después de la transfección, las células se rasparon, se lavaron, se homogeneizaron y se centrifugaron usando tampón TEM. Para cada de placa de 150 mm se resuspendió membrana en 500 μ l de TEM con glicerol al 10 %. Se llevaron a cabo estimaciones de la proteína BCA dando = 6 μ g/ μ l. Se usó 1 μ l membrana + 49 μ l de tampón de ensayo por pocillo en

el ensayo (tampón de ensayo es Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 75 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, BSA al 0,1%). El volumen de ensayo total fue de 150 μ l y cada punto temporal se llevó a cabo por triplicado. Los péptidos a diversas concentraciones (10^{-4} a 10^{-11} M) o el ligando de control (nisoxetina) se añadieron a la placa de ensayo seguida por 3 H-nisoxetina 4,3 nM (Perkin Elmer n.º de catálogo NET1084). Finalmente se añadió la membrana y el ensayo se incubó durante 1 hora a TA después de lo que la reacción se filtró sobre alfombrillas de filtro B de GF (Perkin Elmer n.º de catálogo: 1450-521) pretratadas con PEI al 0,6 % usando un cosechador celular Tomtec y se lavó 3 veces usando tampón de lavado (HEPES 20 mM pH 7,4, 125 mM NaCl @ 4 °C). Después las alfombrillas de filtro se secaron, se situaron en una bolsa de filtro, se añadieron 9 ml de centelleante de placa beta (Perkin Elmer n.º de catálogo: 1205-440) y después las alfombrillas de filtro se contaron en un instrumento de Wallac MicroBeta. Cada punto temporal se llevó a cabo por triplicado y los resultados resumidos en la tabla 4 son de n > 3 experimentos.

(ii) Ensayo de captación de NA

La capacidad de χ -conotoxinas para actuar como inhibidores del transportador de noradrenalina humano (hNET) se puede medir por su inhibición no competitiva del transportador de noradrenalina para transportar 3 H-noradrenalina en células de mamífero que expresan hNET.

Las células COS-7 (ATCC) cultivadas en placas de 24 pocillos que contienen DMEM y suero al 10 % se transfectaron transitoriamente con ADN plasmídico que codifica el NET de mamífero (ser humano) usando reactivo metafecteno (Biontex). Se llevaron a cabo ensayos de captación a TA 48 horas después de la transfección en el tampón de transporte conteniendo NaCl 125 mM, KCl 4,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, HEPES 25 mM pH 7,4, glucosa 5,55 mM, ácido ascórbico 1,02 mM, U-0521 10 μ M y pargilina 100 μ M. El volumen total de ensayo fue 250 μ l. Las células se lavaron 3 veces con PBS cálido seguido por la adición de tampón de ensayo al que se añadió ligando de control o de competición a diversas concentraciones (10^{-4} a 10^{-11} M). El ensayo se incubó durante 20 minutos después de que se añadió 3 H-noradrenalina 100 nM y se dejó incubar durante 10 minutos. El ensayo se paró por retirada y lavado con PBS frío. Las células se lisaron con 500 μ l de SDS al 0,1 %, NaCl 0,1 N. Se tomaron y se añadieron alícuotas de 100 μ l a placa de 96 pocillos flexible (para el marcador) a la que se añadió centelleante supermix (100 μ l), se mezclaron bien y se contaron durante 3 minutos por pocillo. Cada punto temporal se llevó a cabo por triplicado y los resultados, resumidos en la tabla 4, son de n > 3 experimentos.

Los resultados se muestran a continuación en la tabla 4. En la tabla "h", "c" y "u" se refieren a D-histidina, D-cisteína y D- piroglutamato respectivamente, o se refieren a 4-hidroxiprolina, MeY se refiere a 4-metoxitirosina y U se refiere a piroglutamato y -OH indica que hay un ácido libre C-terminal.

30 Tabla 4

χ -péptido	Secuencia													Av log Cl ₅₀ para desplazamiento de 3 H-nisoxetínico desde hNET	Av log Cl ₅₀ para inhibición de 3 H-NA hasta hNET	
SEC ID N.º: 1		N	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O	C	-5,74	-6,30
SEC ID N.º: 4		U	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O		-5,57	-6,48
SEC ID N.º: 12 (comparativa)		U	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	h	O	C	4,22	-4,15
SEC ID N.º: 5		U	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O	c	-5,38	-6,24
SEC ID N.º: 6		U	G	V	C	C	G	MeY	K	L	C	H ^j	O	C	-5,94	-6,67
SEC ID N.º: 7	U	N	G	V	C	C	G	MeY	K	L	C	H	O	C	-5,64	-6,58
SEC ID N.º: 8	U	N	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O	C	-5,33	-6,12
SEC ID N.º: 9		U	G	V	C	C	O	Y	K	L	C	H	O	C	-5,08	-

SEC ID N.º: 10		u	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O	C	-OH	-5,16	-
SEC ID N.º: 11		u	G	V	C	C	G	Y	K	L	C	H	O	C		-5,56	-

- indica no probado

Ejemplo 4. Comparación de los efectos antinociceptivos de SEC ID N.º: 4, MrlA y morfina en un modelo de rata de dolor neuropático

Métodos

5 Animales

Se adquirieron ratas Sprague-Dawley macho adultas del Animal Resources Centre (ARC), Perth, Australia, y del Centro de Investigación Médica Herston, Universidad de Queensland. Las ratas se albergaron en un entorno con temperatura controlada (21 a 2 °C) con un 1 ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. La comida y el agua estaban disponibles a voluntad. La aprobación ética para este estudio se obtuvo a partir del Comité Ético de Experimentación con Animales de la Universidad de Queensland.

10

Reactivos y materiales

Se obtuvo isoflurano (Forthane®) a partir de Abbott Australasia Pty Ltd (Sidney, Australia). Se adquirieron viales de bencilpenicilina de sodio (600 mg) de CSL Ltd (Melbourne, Australia). Se obtuvieron ampollas de solución salina normal a partir de Delta West Htp Ltd (Perth, Australia) y se compró solución salina heparinizada (50 UI/5 ml) de Astra Pharmaceuticals Pty Ltd (Sidney, Australia). Se compró tubo de polietileno de luz individual (D.I. 0,2 mm, D.O. 0,6 mm) de Auburn Plastics y Engineering Pty Ltd (Sidney, Australia). Se obtuvieron suturas de seda siliconizada (Dysilk™) de Dynek Pty Ltd (Adelaida, Australia del Sur) y los clips de Michel se adquirieron de Medical and Surgical Requisites Pty Ltd (Brisbane, Australia).

15

Lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático

20 Las ratas se anestesiaron con ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) administradas mediante inyección intraperitoneal y se produjo una lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático de acuerdo con el método de Bennett y Xie (1988). Brevemente, el nervio ciático común izquierdo se expuso a nivel de media altura por disección roma a través del bíceps femoral. Cerca de la trifurcación, se liberaron = 10 mm de nervio del tejido adherente y se ataron cuatro ligaduras flojas (3,0 de seda) alrededor del nervio ciático (separadas = 1 mm). La incisión se cerró en capas. Después de la cirugía, las ratas recibieron bencilpenicilina (60 mg, s.c.) evitando infección y se mantuvieron calientes durante la recuperación quirúrgica. Las ratas se albergaron individualmente durante 14 días antes de administración de opioide o vehículo. Las ratas se inspeccionaron diariamente desde el momento de la cirugía de CCI con respecto a la postura de la zarpa trasera afectada, comportamiento de exploración e ingesta de agua y cualesquiera signos de autonomía. Los primeros signos de autonomía se observados en una rata (royendo las puntas de las garras y algún tejido en la zarpa trasera ipsilateral) y este animal fue apropiadamente sometido a eutanasia.

25

30

Inserción de un catéter intratecal

Diez a once días después de cirugía de CCI o en los controles no tratados, las ratas se anestesiaron profundamente con una mezcla de ketamina (80 mg/kg⁻¹) y xilazina (8 mg/kg) administrada como una única inyección intraperitoneal (i.p.). Antes de la cirugía, las regiones de la espalda y el cuello de la rata se afeitaron y la piel se lavó con restregado quirúrgico de betadina. La rata se situó después en una posición boca abajo y la vértebra lumbar L6 se localizó por palpación de los tubérculos sacros del *os ileum* (Hebel y Stromberg 1976). Se realizó una incisión de 6 cm en la línea media de la espalda, 3 cm caudal y 3 cm hacia la cabeza respecto a L6. Se formó un bolsillo subcutáneo (para el catéter intratecal) por disección roma con tijeras en ambos lados de la incisión. La fascia que recubre los músculos superficiales de la espalda se cortó en una incisión en forma de V que abarcó L5. Se hicieron incisiones 5 mm caudales adicionales paralelas a L6. La fascia se retrajo después y los músculos lumbares que rodean la base de L5 y L6 se retiraron, según estaba el *musculus interspinalis* entre las apófisis de L5-L6.

35

40

Después la retirada de las apófisis de L6 con ruginas, el tejido blando bajo el arco ilíaco de L5 se eliminó, exponiendo la duramadre. La membrana dural se perforó con una aguja 23G, liberando CSF claro. Un catéter de polietileno (D.O. 0,6 mm, LD. 0,2 mm; 20 cm de longitud) pre-cargado con solución salina, se hizo avanzar cuidadosamente una distancia de 1 cm dentro del espacio intratecal y se administró un pequeño volumen de solución salina (20 µl) a través del catéter. Si se observó fuga de solución salina alrededor del catéter, la rata se excluyó de la experimentación adicional. Después de finalizar con éxito la "prueba de fugas", del catéter intratecal (i.t.) se fijó con cemento dental sobre el músculo circundante -2 cm de L5, exteriorizado a través de un túnel subcutáneo (s.c.) a una pequeña incisión en la base del cuello y se cosió en posición. Después de suturar los músculos lumbares y la piel, las ratas recibieron bencilpenicilina (50.000 UI i.p.) y enrofloxacin (5 mg · kg⁻¹ s.c.) evitando infección y se mantuvieron calientes durante la recuperación de la anestesia. Tras la finalización de la

45

50

cirugía, las ratas se albergaron individualmente durante un período de recuperación de 3-4 días antes de administración de fármacos i.t.. En el día después de la cirugía, se administró el anestésico local, lignocaina (al 2 %, 20 μ l) por medio del catéter i.t.. Si no se observó parálisis completa de ambas patas traseras, las ratas se excluyeron de experimentación adicional.

5 Fármacos administrados

Se preparó SEC ID N.º: 4 en tampón de acetato de sodio 5 mM a pH 5,5 y se administró a ratas en una dosis de bolo individual de 0,2-30 nmoles. Las soluciones madre de los péptidos se cuantificaron en relación con una solución madre de aminoácidos analizada por HPLC en fase reversa con detección de u.v. en Xenome Ltd., se adquirió polvo de HCl Morfina de la Farmacia del Hospital Central Royal Brisbane (Herston, Queensland) y se disolvió en solución salina normal preparando una concentración de reserva de 10 μ g/10 μ l (base de morfina). Cada rata recibió 3,5-50 nmol (10-15 μ l) de morfina. Todas las diluciones se hicieron con solución salina normal. Todas las inyecciones de i.t. se siguieron por un flujo de solución salina (20 μ l) asegurando administración de péptidos completa dentro del espacio intratecal.

Conservación de las soluciones madre

15 Se almacenaron alícuotas (10 μ l) de las soluciones madre a -20 °C antes de su uso para la experimentación con animales. Inmediatamente antes de la experimentación, se descongelaron alícuotas de este compuesto a temperatura ambiente y después se diluyeron a la concentración requerida con solución salina estéril alcanzando la concentración final deseada para su i.t. subsiguiente. Las partes no usadas se descartaron como desechos asegurando que los compuestos solamente sufrían un ciclo de congelación-descongelación.

20 Dosificación de fármacos intratecal

En el día 14 tras cirugía de CCI, grupos individuales de ratas de CCI no sometidas a la acción de ningún fármaco recibieron una inyección de bolo i.t. de SEC ID N.º: 4, morfina o solución salina en un volumen de 10-15 μ l. La antinocicepción se evaluó con filamentos de von Frey hasta que las respuestas volvieron al valor basal.

Evaluación de antinocicepción: ratas de CCI usando filamentos de von Frey

25 La alodinia táctil, la característica distintiva del dolor neuropático, se cuantificó usando filamentos de von Frey que se usaron aplicando un estímulo mecánico no nocivo (presión ligera) a la zarpa trasera. Las ratas se transfirieron a jaulas de prueba de malla de alambre (20 cm x 20 cm x 20 cm) y se dejaron aclimatarse durante 10 minutos. Los filamentos de von Frey se usaron determinando el umbral mecánico mínimo requerido para un reflejo de retirada de zarpa enérgico. Brevemente, comenzando con el filamento de von Frey que produce la fuerza más baja, el filamento se aplicó a la superficie plantar de la zarpa trasera hasta que el filamento se dobló ligeramente. La ausencia de una respuesta después de 5 segundos da lugar al uso del siguiente filamento de peso creciente. Los filamentos usados produjeron un aumento de peso de doblamiento de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 g y estos se calibraron regularmente. Se dio una puntuación de 20 g a animales que no respondieron a ninguno de los filamentos de von Frey. Los umbrales de retirada de zarpa (g) se convirtieron en área bajo la curva (AUC). La respuesta máxima en el lado ipsilateral fue 45 AUC.

Verificación de la colocación del catéter i.t. correcta

40 En la finalización de cada experimento, se inyectó tinte verde de malaquita (30 μ l) por medio del catéter i.t. mientras las ratas se anestesiaron ligeramente con O₂:CO₂ (50%:50%). Treinta segundos más tarde, las ratas se decapitaron y la columna vertebral se expuso quirúrgicamente. Los datos de ratas donde hubo evidencia de un escape de tinte subcutáneo en el sitio donde el catéter entró en los músculos traseros sobre L6 o de fallo del tinte en distribuirse al menos 3-4 cm de la médula espinal, se excluyeron del análisis.

Análisis de datos

45 Las áreas sometidas al grado de antinocicepción frente a las curvas de tiempo (valores de AUC) para cada uno de los péptidos se calcularon a partir del momento = 0 a 3 h. Las curvas dosis-respuesta para cada uno de los péptidos se construyeron representando los valores de AUC frente a la dosis de péptidos i.t. (expresados en nmol por rata).

Resultados

50 Tanto la SEC ID N.º: 4 (Figura 1A, C) como la morfina (Figura 1B) produjo efectos antinociceptivos en un modelo de rata de dolor neuropático cuando se inyectan como una dosis de bolo individual por la vía intratecal (i.t.). Estos efectos fueron dependientes de dosis (Figura 2). Mientras que ambos compuestos produjeron efectos secundarios leves similares, la SEC ID N.º: 4 produjo efectos antinociceptivos que fueron mayores tanto en extensión como en duración usando dosis más bajas de compuesto (Figura 1). Sorprendentemente, SEC ID N.º: 4 muy cerca de una dosis de máxima eficacia produjo efectos antinociceptivos que duraron 2 días. En contraste, morfina, con una dosis i.t. de máxima eficacia produjo efectos que duraron solamente 3 horas. Dado que la SEC ID N.º: 4 produjo efectos nociceptivos moderados a 1 nmol y efectos adversos relativamente moderados a 30 nmoles que no son limitantes de

dosis, SEC ID N.º: 4 tiene una ventana terapéutica de al menos 30 veces. Los efectos antinociceptivos tanto de la morfina como de la SEC ID N.º: 4 fueron selectivos para la zarpa ipsilateral sobre la zarpa contralateral.

5 Por toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, deberá entenderse que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprenden" o "comprendiendo" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas.

Listado de secuencias

10 <110> XENOME LTD
 <120> PÉPTIDOS CHI-CONOTOXINA NOVEDOSOS (-I)
 <130> 12373570/JGC
 <150> Documento US 60/430306 <151> 2-12-2.002
 <160> 12

15 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PROTEÍNA
 <213> Conus marmoreus

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X es 4-hidroxiprolina
 <220>

25 <221> DISULFURO
 <222> (4)..(13)
 <223>
 <220>
 <221> DISULFURO

30 <222> (5)..(10)
 <223>
 <400> 1

Asn Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 5 10

<210> 2

35 <211> 13
 <212> PROTEÍNA
 <213> Conus marmoreus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

5 <220>

<221> DISULFURO

<222> (4)..(13)

<223>

<220>

10 <221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

<400> 2

Val	Gly	Val	Cys	Cys	Gly	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Xaa	Cys
1				5					10			

15 <210> 3

<211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X es un residuo pGLU o DpGlu

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X es Asn o una delección

<220>

30 <221> DISULFURO

<222> (5)..(14)

<223>

<220>

<221> DISULFURO

35 <222> (6)..(11)

<223>

<400> 3

Xaa Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys
 1 5 10

<210> 4

5 <211> 13

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

<220>

<223> MOD_RES

20 <222> (13)..(13)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> DISULFURO

<222> (4)..(13)

25 <223>

<220>

<221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

30 <400> 4

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (13)..(13)

<223> X es D-cisteína

<220>

<223> MOD_RES

<222> (13)..(13)

20 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

25 <400> 5

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PROTEÍNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (11)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

5 <223> X es 4-metoxitirosina

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

10 <220>

<223> DISULFURO

<222> (4)..(13)

<223>

<220>

15 <221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

<220>

<223> MOD_RES

20 <222> (13)..(13)

<223> AMIDACIÓN

<400> 6

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Xaa Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 . 5 10

<210> 7

25 <211> 14

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (8)..(8)
 <223> X es 4-metoxitirosina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (13)..(13)
 <223> X es 4-hidroxi prolina
 <220>
 <223> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 10 <223> AMIDACIÓN
 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (5)..(14)
 <223>
 15 <220>
 <223> DISULFURO
 <222> (6)..(11)
 <223>
 <400> 7

 Xaa Asn Gly Val Cys Cys Gly Xaa Lys Leu Cys His Xaa Cys
 20 1 5 10
 <210> 8
 <211> 14
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 30 <223> X es ácido piroglutámico
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> X es 4-hidroxi prolina
 35 <220>

<223> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> AMIDACIÓN

<220>

5 <221> DISULFURO

<222> (5)..(14)

<223>

<220>

<223> DISULFURO

10 <222> (6)..(11)

<223>

<400> 8

```
Xaa Asn Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
1           5           . 10
```

<210> 9

15 <211> 13

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

<220>

<223> DISULFURO

30 <222> (9)..(13)

<223>

<220>

<221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

35 <223>

<400> 9

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 5 10

<210> 10

<211> 13

5 <212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

<220>

<223> DISULFURO

<222> (4)..(13)

20 <223>

<220>

<221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

25 <400> 10

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PROTEÍNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X es ácido piroglutámico

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

<220>

<223> MOD RES

10 <222> (13)..(13)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<223> DISULFURO

<222> (4)..(13)

15 <223>

<220>

<221> DISULFURO

<222> (5)..(10)

<223>

20 <400> 11

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa Cys
 1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PROTEÍNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (1)..(1)

<223> X es piroglutamato

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

35 <223> X es D-histidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> X es 4-hidroxiprolina

5 <220>

<223> MOD RES

<222> (1)..(1)

<223> AMIDACIÓN

<220>

10 <223> DISULFURO

<222> (4)..(13)

<223>

<220>

<221> DISULFURO

15 <222> (5)..(10)

<223>

<400> 12

Xaa Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys Xaa Xaa Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Pro Cys

SEC ID N.º: 3

- 5 donde Xaa1 es un residuo de piroglutamato o de D-piroglutamato N-terminal; y Xaa2 es Asn o una deleción; o una secuencia tal en la que uno o más Cys están reemplazados con su D-aminoácido correspondiente y/o Pro está reemplazado con 4-hidroxi prolina, y/o Tyr está reemplazado con 4-metoxitirosina; o una sal, éster o amida de la misma.
- 10 2. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1 o una secuencia tal en la que uno o más Cys están reemplazados con su D-aminoácido correspondiente o una sal, éster o amida del mismo.
3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que Pro se ha reemplazado con 4-hidroxi prolina.
4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 4

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Xaa5

SEC ID N.º: 5

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Xaa4 Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 6

Xaa1 Asn Gly Val Cys Cys Gly Xaa4 Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 7

Xaa1 Asn Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 8

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys-OH

SEC ID N.º: 9

- 15 donde Xaa1 se refiere a ácido piroglutámico, Xaa3 se refiere a 4-hidroxi prolina, Xaa4 se refiere a 4-metoxitirosina, Xaa5 se refiere a D-cisteína y -OH indica un ácido libre C terminal.

5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys-OH

SEC ID N.º: 10

Xaa1 Gly Val Cys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys His Xaa3 Cys

SEC ID N.º: 11

- 20 donde Xaa1 se refiere a ácido D-piroglutámico, Xaa3 se refiere a 4-hidroxi prolina y -OH indica un ácido libre C terminal.

6. Una composición que comprende un péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 conjuntamente con vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 7. La composición de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente uno o más agentes activos diferentes.

8. Un péptido χ -conotoxina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para usar como medicamento.

9. Un péptido χ -conotoxina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en tratar o prevenir enfermedades o afecciones de los sistemas urinario o cardiovascular, o trastornos del humor, o en el tratamiento o control de dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación.

10. Un péptido χ -conotoxina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en tratar el dolor neuropático asociado con cirugía (dolor postoperatorio), de intestino, de cáncer, diabético, del miembro fantasma, de daño nervioso, inflamatorio y dolor asociado con nervios periféricos.
- 5 11. Uso del péptido χ -conotoxina aislado, sintético o recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de afecciones o enfermedades urinarias o cardiovasculares, o trastornos del humor, o para el tratamiento del dolor agudo, crónico y/o neuropático, migraña o inflamación.
- 10 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el dolor neuropático está asociado con cirugía (dolor postoperatorio), de intestino, de cáncer, diabético, del miembro fantasma, de daño nervioso, inflamatorio y dolor asociado con nervios periféricos.
13. El uso de la reivindicación 11 o 12, en el que dicho medicamento se formula para la administración de manera sustancialmente simultáneamente o secuencialmente con otros agentes útiles en el tratamiento de las afecciones, enfermedades o trastornos.

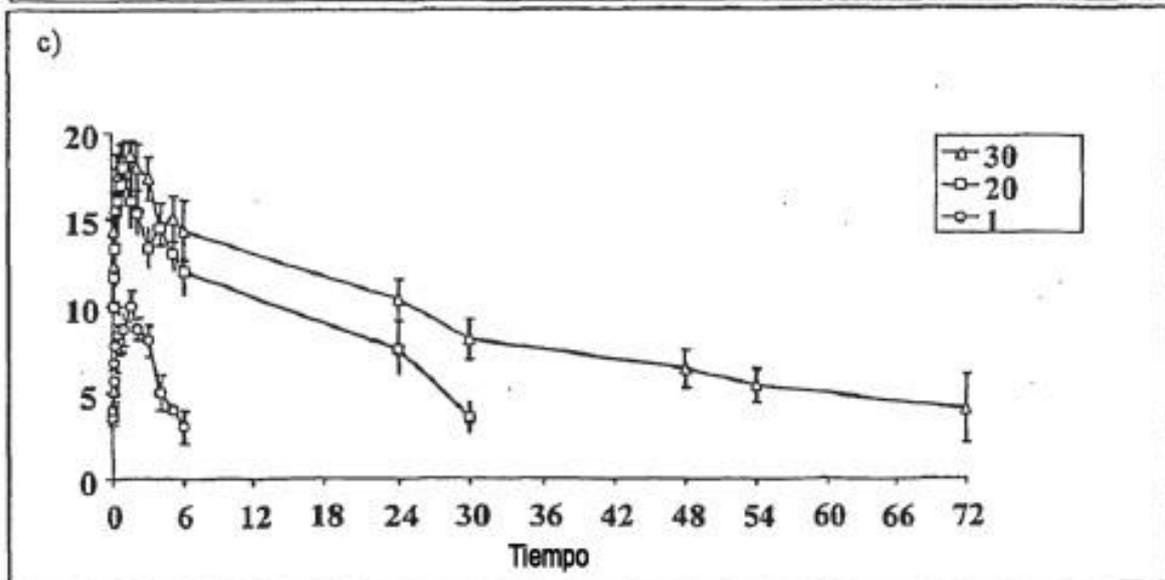
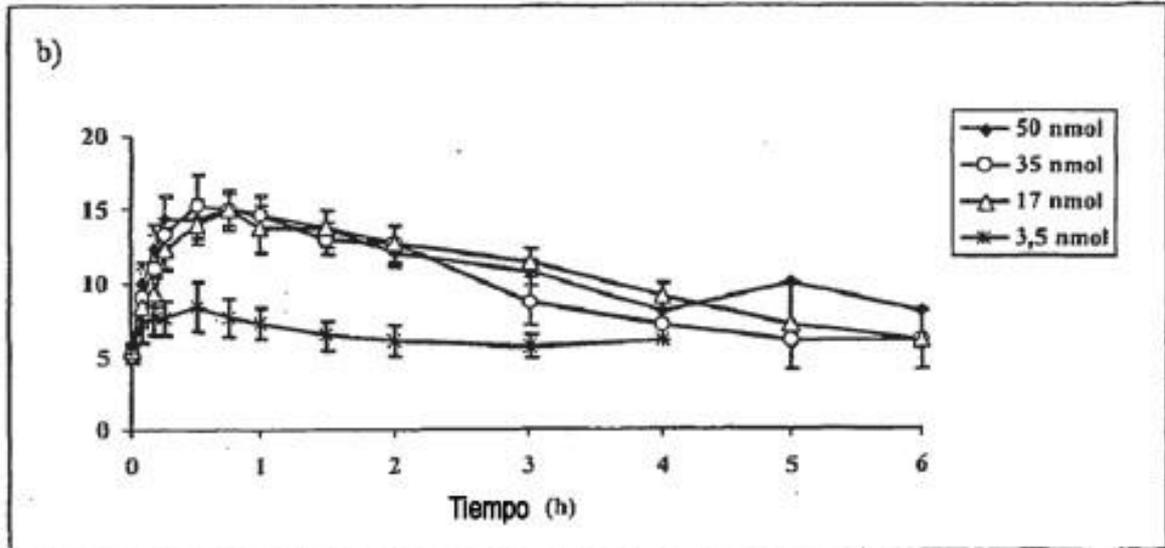
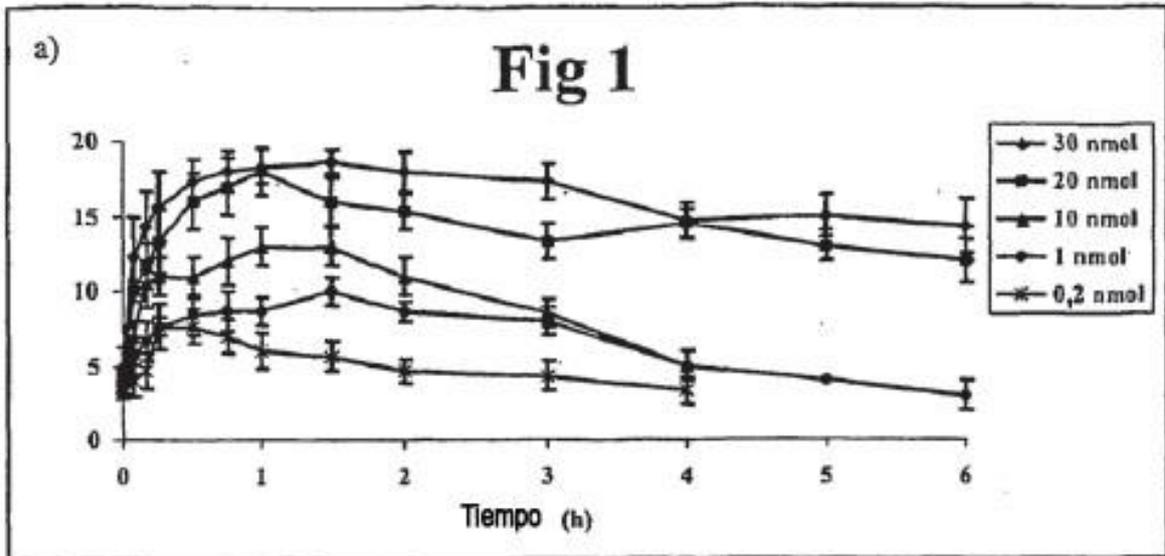


Fig 2

