

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 546**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 7/18 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2004** **E 04796039 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **12.07.2006** **EP 1677830**

54 Título: **Antagonistas del receptor de bradicinina B1**

30 Prioridad:

22.10.2003 US 513913 P

24.01.2004 US 538929 P

21.10.2004 US 972236

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.02.2013

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
PATENT OPERATIONS, M/S 27-4-A, ONE AMGEN
CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

NG, GORDON;
LI, YUE-SHENG;
GEGG, COLIN, V.;
ASKEW, JR., BENNY, C.;
STORZ, THOMAS;
LU, YUELIE;
D'AMICO, DERIN, C.;
JAROSINSKI, MARK;
LIU CHUAN-FA y
HUANG, QI

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 395 546 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

Antagonistas del receptor de bradicinina B1

Antecedentes de la invención

Más de dos millones de personas en los Estados Unidos solas, están incapacitadas por dolor crónico en cualquier día dado (T. M. Jessell & D. D. Kelly, Pain and Analgesia en PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, tercera edición (E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, ed., (1991)). Desafortunadamente, los tratamientos actuales para el dolor sólo son eficaces parcialmente, y muchos también producen efectos secundarios que alteran el estilo de vida, son debilitantes y/o peligrosos. Por ejemplo, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos ("AINE") tales como aspirina, ibuprofeno e indometacina son eficaces moderadamente frente al dolor inflamatorio pero también son tóxicos a nivel renal, y las dosis altas tienden a provocar irritación gastrointestinal, úlceras, hemorragia, riesgo cardiovascular aumentado y confusión. Los pacientes tratados con opioides experimentan frecuentemente confusión y estreñimiento, y el uso de opioides a largo plazo está asociado con tolerancia y dependencia. Los anestésicos locales tales como lidocaína y mixelitina simultáneamente inhiben el dolor y provocan pérdida de la sensación normal. Además, cuando se usan de manera sistémica, los anestésicos locales están asociados con efectos cardiovasculares adversos. Por tanto, existe actualmente una necesidad no satisfecha en el tratamiento del dolor crónico.

El dolor es una percepción basada en señales recibidas desde el entorno y transmitidas e interpretadas por el sistema nervioso (para su revisión, véase Millan, M. J., The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol 57: 1-164 (1999)). Los estímulos nocivos tales como el calor y el tacto hacen que receptores sensitivos especializados en la piel envíen señales al sistema nervioso central ("SNC"). Este proceso se denomina nocicepción, y las neuronas sensitivas periféricas que lo median son nociceptores. Dependiendo de la intensidad de la señal procedente del/de los nociceptor(es) y la abstracción y elaboración de esa señal por el SNC, una persona puede experimentar o no un estímulo nocivo como doloroso. Cuando la percepción por uno mismo de dolor está calibrada apropiadamente con respecto a la intensidad del estímulo, el dolor sirve para su función protectora pretendida. Sin embargo, determinados tipos de daño tisular provocan un fenómeno, conocido como hiperalgesia o pronocicepción, en el que estímulos relativamente inocuos se perciben como intensamente dolorosos debido a que se han disminuido los umbrales de dolor de la persona. Tanto la inflamación como el daño a los nervios pueden inducir hiperalgesia. Por tanto, las personas aquejadas de estados inflamatorios, tales como quemadura solar, osteoartritis, colitis, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades vasculares del colágeno (que incluyen artritis reumatoide y lupus), y similares, experimentan a menudo sensaciones potenciadas de dolor. De manera similar, traumatismo, cirugía, amputación, absceso, causalgia, enfermedades vasculares del colágeno, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, diabetes, infecciones por herpes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia provocan lesiones en los nervios que dan como resultado un dolor excesivo.

A medida que lleguen a entenderse mejor los mecanismos mediante los cuales los nociceptores transducen las señales externas en condiciones normales e hiperalgésicas, pueden seleccionarse como diana los procesos implicados en la hiperalgesia para inhibir la disminución del umbral de dolor y reducir de ese modo la cantidad de dolor experimentado.

La bradicinina (BK) y el péptido relacionado, calidina (Lys-BK) (véase la tabla 3) median las acciones fisiológicas de las cininas sobre los sistemas cardiovascular y renal. Sin embargo, los péptidos activos, BK y calidina, se degradan rápidamente por peptidasas en el plasma y otros líquidos biológicos y por las liberadas a partir de una variedad de células, de modo que se notifica que la semivida de BK en plasma es de aproximadamente 17 segundos (1). BK y calidina se metabolizan rápidamente en el organismo por la carboxipeptidasa N, que elimina el residuo de arginina carboxiterminal para generar des-Arg-BK o des-Arg-calidina. La des-Arg-calidina se encuentra entre las cininas predominantes en el hombre y median las acciones fisiopatológicas de las cininas en el hombre. Además de ser un péptido proinflamatorio muy potente, se sabe que des-Arg-BK o des-Arg-calidina inducen vasodilatación, permeabilidad vascular y broncoconstricción (para su revisión, véase Regoli y Barabe, Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins, Pharmacological Reviews, 32 (1): 1-46 (1980)). Además, des-Arg-BK y des-Arg-calidina parecen ser mediadores particularmente importantes de la inflamación y el dolor inflamatorio así como que participan en el mantenimiento de los mismos. Existe también un conjunto considerable de pruebas que implican la sobreproducción de des-Arg-calidina en estados en los que el dolor es una característica prominente tal como choque séptico, artritis, angina y migraña.

Los receptores de membrana que median las acciones pleiotrópicas de las cininas son de dos clases distintas, designadas como B1 y B2. Ambas clases de receptores se han clonado y secuenciado a partir de una variedad de especies, incluyendo el hombre (Menke, *et al*, Expression cloning of a human b1 bradykinin receptor. J. Biol. Chem. 269: 21583-21586 (1994); Hess *et al*, Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 260-268 (1992)). Son receptores acoplados a proteínas G típicos que tienen siete supuestas regiones que abarcan la membrana. En diversos tejidos, los receptores de BK se acoplan a cada segundo mensajero conocido. Los receptores B2, que tienen una mayor afinidad por BK, parecen ser la

forma más prevalente de receptor de bradicinina. Esencialmente todas las respuestas fisiológicas normales y muchas respuestas fisiopatológicas a bradicinina están mediadas por los receptores B2.

Los receptores B1, por otro lado, tienen una mayor afinidad por des-Arg-BK (véase la tabla 3) en comparación con BK, mientras que des-Arg-BK es inactiva en los receptores B2. Además, los receptores B1 no se expresan normalmente en la mayor parte de tejidos. Su expresión se induce tras lesión o daño tisular así como en determinadas clases de inflamación crónica o agresión sistémica (Marceau, F., *et al.*, Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30: 1-26 (1995)). Además, las respuestas mediadas por los receptores B1 están reguladas por incremento desde un nivel nulo tras la administración de lipopolisacárido (LPS) bacteriano o citocinas inflamatorias en conejos, ratas y cerdos (Marceau *et al.*, (1998)).

Las propiedades de inducción de dolor de las cininas unidas a la expresión inducible de los receptores B1 hacen que el receptor B1 sea una diana interesante en el desarrollo de agentes antiinflamatorios, antinociceptivos, antihiperálgicos y analgésicos que pueden dirigirse específicamente a tejidos lesionados con acciones mínimas en tejidos normales. Aunque se ha identificado una variedad de antagonistas peptídicos que seleccionan como diana el receptor B1, su desarrollo como analgésicos terapéuticos se ha visto obstaculizado por semividas escasamente eficaces que resultan de la degradación muy rápida por peptidasas del tejido y el suero y un aclaramiento renal eficaz. Más recientemente, análogos peptídicos que tienen sustituyentes de aminoácidos no naturales han mostrado que son resistentes a peptidasas en ensayos de estabilidad *in vitro* (para su revisión, véase Regoli *et al.*, Bradykinin receptors and their antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 348: 1-10 (1998); Stewart, J. M., *et al.*, Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology*, 43: 155-161 (1999); y Stewart, J. M., *et al.*, Metabolism-Resistant Bradykinin Antagonists: Development and Applications. *Biol. Chem.*, 382: 37-41 (2001)).

La conjugación covalente de proteínas con poli(etilenglicol) (PEG) se ha reconocido ampliamente como un enfoque para ampliar significativamente las semividas circulantes *in vivo* de proteínas terapéuticas. La pegilación logra este efecto predominantemente mediante el retardo del aclaramiento renal, puesto que el resto de PEG añade un radio hidrodinámico considerable a la proteína (Zalipsky, S., *et al.*, Use of functionalized poly(ethylene glycol)s for modification of polipeptides., en *Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications.*, J. M. Harris, editor. (1992), Plenum Press: Nueva York. págs. 347-370.). Los beneficios adicionales conferidos a menudo por la pegilación de proteínas incluyen aumento de la solubilidad, resistencia a la degradación proteolítica e inmunogenicidad reducida del polipéptido terapéutico. Las ventajas de la pegilación de proteínas se evidencian por la comercialización de varias proteínas pegiladas incluyendo PEG-adenosina desaminasa (AdagenTM/Enzon Corp.), PEG-L-asparaginasa (OncasparTM/Enzon Corp.), PEG-interferón α -2b (PEG-IntronTM/Schering/Enzon), PEG-interferón α -2a (PEGASYSTM/Roche) y PEG-G-CSF (NeulastaTM/Amgen) así como muchos otros en ensayos clínicos. La pegilación de pequeños péptidos terapéuticos, por otro lado, presenta retos únicos y no se ha aplicado ampliamente. Uno de los mayores obstáculos para la pegilación de péptidos es el requisito esencial de que se conserve la actividad biológica en el conjugado final. Dado que los péptidos terapéuticos comprenden a menudo la secuencia mínima requerida para la actividad y son, por tanto, muy pequeños, son relativamente intolerantes a la sustitución. Los restos de PEG son desproporcionadamente más grandes que el propio péptido y por consiguiente es más probable que interfieran estéricamente con las interacciones de unión péptido:receptor específicas requeridas para la actividad. Por tanto, la capacidad de un péptido para tolerar la pegilación y todavía retener una actividad específica suficiente para ser un agente terapéutico útil es bastante impredecible y debe determinarse empíricamente (Morpurogo, *et al.*, Selective Alkylation and Acylation of α and ϵ Amino Groups with PEG in a Somatostatin Analogue: Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 13: 1238-1243 (2002)).

Raymond *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 180 (1995) 247-357 dan a conocer la cuantificación de des-Arg⁹-bradicinina en un inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia.

El documento DE 24 35 642 da a conocer un método de preparación de ésteres de polietilenglicol.

El documento US 6.407.207 B1 da a conocer proteína receptora BK-2 de bradicinina clonada a partir de línea celular de fibroblastos de pulmón humanos.

El documento US 6.075.120 da a conocer antagonistas de bradicinina heterodiméricos.

UniProt:Q63581 es una entrada de base de datos de cininógeno T (T-KG) de rata.

El documento EP 0 885 899 da a conocer un método de obtención de fragmentos peptídicos usando ácidos orgánicos fluorados.

El documento EP 0 318 162 da a conocer derivados de bis-maleimida.

El documento WO 01/62827 da a conocer derivados de N-maleinidil-colímero.

Claramente, existe una necesidad de nuevos tratamientos seguros y eficaces para la inflamación y el dolor. Sería una ventaja tener un antagonista peptídico específico de B1 que pueda tolerar mejor la exposición sistémica durante

el tratamiento, potenciando la vida circulante (aclaramiento retardado), la solubilidad, la estabilidad, y/o disminuyendo la inmunogenicidad de la molécula. El aumento de la vida circulante daría como resultado un régimen de dosificación menos frecuente y una pauta de dosificación menos frecuente sería más conveniente tanto para médicos como para pacientes, y sería particularmente útil para aquellos pacientes implicados en la autoadministración. Otras ventajas de la dosificación menos frecuente pueden incluir la introducción de menos fármaco en los pacientes y un aumento del cumplimiento.

Sumario de la invención

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes de unión novedosos del receptor B1 con propiedades farmacocinéticas superiores de manera demostrable *in vivo* en comparación con los antagonistas peptídicos de B1 conocidos mientras que antagonizan suficientemente la actividad del receptor B1 de manera que son terapéuticamente útiles en el tratamiento o la prevención de inflamación, dolor y otros estados mediados por B1 incluyendo, pero sin limitarse a, asma y rinitis alérgica. Tales agentes se proporcionan por la presente invención en forma de nuevos antagonistas peptídicos y antagonistas peptídicos conjugados del receptor B1.

Son realizaciones de la presente invención:

1. Una composición de materia de fórmula:

$F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

F es un vehículo unido covalentemente a X^1 o Y^1 ;

L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

n es de 0 a 3; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg, en el que el vehículo se selecciona de polimetililen-glicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicoles y óxidos, polimetilpropilenglicol, poli(óxido de hidroxipropileno), polipropilenglicoles de cadena lineal y de cadena ramificada y derivados de los mismos, polietilenglicol y polipropilenglicol y los monometil éteres, monocetil éteres, mono-n-butil éteres, mono-t-butil éteres y monooleil éteres de los mismos, ésteres de polialquilenglicoles con ácidos carboxílicos y productos de condensación por deshidratación de los polialquilenglicoles con aminas y otros poli(óxidos de alquileo) y glicoles y derivados de los mismos, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo), el copolímero poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), poliviniloxazolidona, polivinilmetiloxazolidona y poli(vinil metil éter), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), poli(metacrilatos de hidroxietilo), poli(acrilamida) y poli(metacrilamida) y otras amidas de los mismos, poli(N,N-dimetilacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(N-acetamidoacrilamida) y poli(N-acetamidometacrilamida) y otros derivados N-sustituídos de las amidas.

2. Una composición de materia de fórmula:

$F'-R_z$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

F' es un vehículo multivalente, que es un PEG multivalente;

R es independientemente en cada caso $-(X^1)-(Y^1)_n$ en la que R se une covalentemente a F';

X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

n es de 0 a 3;

Z es de 2 a 8; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg.

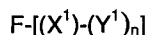
3. La composición de materia de una cualquiera de las realizaciones 1-2, en la que n es 0.

4. La composición de materia de una cualquiera de las realizaciones 1-2, en la que dicho L^1 es un ligador de peptidilo que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 66, inclusive.

5. Uso de la composición de materia según una cualquiera de las realizaciones 1-3 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.
- 5 6. El uso según la realización 5, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.
7. Una composición farmacéutica que comprende una composición de materia según una cualquiera de las realizaciones 1-2, y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición de materia de fórmula:
10 $F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:
 X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;
F es un PEG unido covalentemente a X^1 o Y^1 ;
 L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;
15 n es de 0 a 3; y
 P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg.
9. La composición de materia según la realización 2, en la que n es 0 y Z es 2-8.
10. La composición de materia según la realización 9, en la que Z es 4.
- 20 11. La composición de materia según la realización 8, en la que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del grupo que consiste en:
i. 5.000 Dalton;
ii. 20.000 Dalton;
iii. 24.000 Dalton;
25 iv. 30.000 Dalton;
v. 40.000 Dalton; y
vi. 60.000 Dalton.
12. La composición de materia de la realización 11, en la que dicha composición de materia es capaz de antagonizar la actividad del receptor B1 *in vitro* y tiene una semivida terapéuticamente aceptable *in vivo* en mamíferos.
- 30 13. Uso de la composición de materia según la realización 11, para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.
14. Una composición farmacéutica que comprende la composición de materia según la realización 11 y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 15. El uso según la realización 13, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.
16. Un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma.
- 40 17. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
18. Uso de una composición farmacéutica que comprende un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una
45 enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.

19. El uso de una composición farmacéutica según la realización 18, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.

- 5 Un aspecto de la invención comprende un péptido conjugado de fórmula I: (véase realización (1))



en la que:

F es un vehículo unido covalentemente a X^1 o Y^1 (preferiblemente F es un resto de PEG o un derivado de los mismos);

- 10 X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ligadores;

n es de 0 a 3; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 según la reivindicación 1.

- 15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende materiales portadores excipientes que tienen un péptido conjugado de la invención disperso en los mismos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos terapéuticos de tratamiento que comprenden la administración a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende excipientes y al menos un péptido y/o péptido conjugado de la invención.

- 20 Los péptidos y/o péptidos conjugados de la invención tienen valor terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por la activación de B1, incluyendo, pero sin limitarse a, estados de inflamación y dolor crónicos de origen inflamatorio y neuropático, choque séptico, artritis, osteoartritis, angina, asma, rinitis alérgica y migraña.

Los péptidos y/o péptidos conjugados de la invención pueden usarse para fines terapéuticos o profilácticos formulándolos con materiales portadores farmacéuticos apropiados y administrando una cantidad eficaz a un paciente, tal como un ser humano (u otro mamífero) que lo necesite.

- 25 Péptidos y/o péptidos conjugados útiles adicionales pueden resultar de modificaciones conservativas de las secuencias de aminoácidos de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo dados a conocer en el presente documento. Las modificaciones conservativas producirán péptidos y/o péptidos conjugados que tienen características funcionales, físicas y químicas similares a las de los péptidos y/o péptido conjugado a partir de los

- 30 que se realizan tales modificaciones. Tales formas modificadas de manera conservativa de los péptidos y/o péptidos conjugados dados a conocer en el presente documento también se contemplan como que son una realización de la presente invención.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes tras la consideración de la descripción detallada de la invención que sigue.

- 35 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que una clase de péptidos que se considera generalmente que son bastante intolerantes a la sustitución pueden sustituirse en sus aminoácidos en el extremo N-terminal y/o conjugarse a diversos vehículos en el extremo N-terminal para proporcionar péptidos y/o conjugados peptídicos terapéuticamente útiles con perfiles de eficacia sostenidos de manera drástica en comparación con los péptidos conocidos de la misma clase, y por tanto permiten su uso para tratar la inflamación y el dolor. Por tanto, los péptidos y/o conjugados peptídicos de la presente invención proporcionan una ventaja terapéutica tremenda con respecto a los antagonistas peptídicos de B1 conocidos. Más particularmente, los inventores han encontrado que los inconvenientes descritos previamente en los antagonistas peptídicos de B1 conocidos con respecto a su uso terapéutico pueden superarse sustituyendo aminoácidos en el extremo N-terminal y/o conjugando los antagonistas peptídicos a vehículos tales como, pero sin limitarse a, moléculas de polietilenglicol (PEG) usando ligadores de peptidilo o distintos de peptidilo de tamaño y composición definidos que maximizan la conservación de la actividad antagonista y la especificidad a la vez que prolongan la semivida eficaz *in vivo*. Adicionalmente (o alternativamente), se descubrió que a pesar de la actividad *in vitro* ligeramente reducida conferida a los antagonistas peptídicos de B1 conjugados con polímeros de PEG más grandes, las semividas circulantes ampliadas de los conjugados de PEG grandes proporcionaba una exposición significativamente mayor y una eficacia prolongada *in vivo* en comparación con conjugados peptídicos conjugados con polímeros de PEG más pequeños. Además, los presentes inventores han encontrado que el tamaño de la molécula de PEG unida a un antagonista peptídico del receptor B1 es un

parámetro crítico en la optimización de la actividad antagonista intrínseca y la semivida eficaz *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista peptídico acetilado de B1 demostró eficacia en modelos de dolor *in vivo* relevantes durante un máximo de 4 horas tras la dosificación múltiple. Sorprendentemente, el mismo péptido conjugado con una molécula de PEG de 5 kD y una de 20 kD de la manera dada a conocer en el presente documento demostró eficacia durante hasta 2 días y durante al menos 4 días, respectivamente, tras una única inyección en bolo.

Antes de que se describan el péptido y los antagonistas peptídicos conjugados con vehículo o con PEG del receptor de bradicinina B1 de la presente invención y métodos para preparar y usar tales, ha de entenderse que esta invención no se limita a los péptidos y/o antagonistas peptídicos conjugados particulares descritos, puesto que los péptidos y/o antagonistas peptídicos conjugados y las metodologías contemplados por la presente invención naturalmente pueden variar ligeramente. Ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitativo puesto que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Los péptidos de unión al receptor B1 de bradicinina contemplados para la conjugación a un vehículo para los fines y de la manera tal como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los antagonistas peptídicos de unión a B1 novedosos dados a conocer en el presente documento así como los antagonistas peptídicos de unión a B1 conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a cualquier péptido dado a conocer en una cualquiera de las siguientes publicaciones: Regoli *et al.*, Bradykinin receptors and their antagonists. Eur. J. of Pharma., 348: 1-10 (1998); Neugebauer, W., *et al.*, Kinin B₁ receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. Can. J. Physiol. Pharmacol., 80: 287-292 (2002); Stewart, J. M., *et al.*, Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. Immunopharmacology, 43: 155-161 (1999); Stewart, J. M., *et al.*, Metabolism-Resistant Bradykinin Antagonists: Development and Applications. Biol. Chem., 382: 37-41 (2001); publicación PCT WO 98/07746; y patentes estadounidenses n.ºs: 4.693.993, 4.801.613, 4.923.963, 5.648.336, 5.834.431, 5.849.863, 5.935.932, 5.648.333, 5.385.889, 5.444.048 y 5.541.286.

Los términos usados a lo largo de esta memoria descriptiva se definen tal como sigue, a menos que se limiten de otro modo en casos específicos.

Se tratan los residuos de aminoácido naturales de tres maneras: nombre completo del aminoácido, código de tres letras convencional o código de una letra convencional según la tabla mostrada a continuación.

A = Ala	G = Gly	M = Met	S = Ser
C = Cys	H = His	N = Asn	T = Thr
D = Asp	I = Ile	P = Pro	V = Val
E = Glu	K = Lys	Q = Gln	W = Trp
F = Phe	L = Leu	R = Arg	Y = Tyr

A menos que se indique claramente de otro modo, una designación en el presente documento de un aminoácido natural o no natural pretende englobar tanto el isómero D como el L del aminoácido. Las abreviaturas usadas en el presente documento para aminoácidos no naturales son las mismas que se describen en la patente estadounidense n.º 5.834.431, la publicación PCT WO 98/07746 y Neugebauer, *et al.* (2002). Adicionalmente, la abreviatura "Dab" y "D-Dab" pretenden referirse al isómero L y D del aminoácido no natural, ácido D-2-aminobutírico, respectivamente. La abreviatura "3'Pal" y "D-3'Pal" pretenden referirse al isómero L y D del aminoácido no natural 3'-piridilalanina, respectivamente. Además, la abreviatura "Igl" pretende incluir tanto "Igl^a" como "Igl^b" (α -(1-indanil)glicina y α -(2-indanil)glicina, respectivamente). De manera similar, "Dlgl" pretende incluir tanto "D-Igl^a" como "D-Igl^b" (los isómeros D de α -(1-indanil)glicina y α -(2-indanil)glicina, respectivamente). Preferiblemente, cuando se usa en el presente documento, Igl es Igl^b y D-Igl es D-Igl^b.

Por "péptido conjugado con vehículo" o "péptido conjugado" se quiere decir un compuesto que tiene actividad biológica y que cuando se administra a un mamífero proporciona un efecto terapéutico. Las dos partes incluyen (1) al menos un antagonista peptídico de B1 y (2) al menos un vehículo tal como se define a continuación en el presente documento unido covalentemente a un residuo del propio péptido o a un ligador de peptidilo o distinto de peptidilo (incluyendo pero sin limitarse a ligadores aromáticos) que se une covalentemente a un residuo del péptido.

Por "péptido conjugado con PEG" o "péptido pegilado" quiere decirse un compuesto de dos partes que tiene actividad biológica y que cuando se administra a un mamífero proporciona un efecto terapéutico. Las dos partes incluyen (1) al menos un antagonista peptídico de B1 y (2) al menos un resto de polietilenglicol (PEG) unido covalentemente a un residuo del propio péptido o a un ligador de peptidilo o distinto de peptidilo (incluyendo pero sin limitarse a ligadores aromáticos) que se une covalentemente a un residuo del péptido.

Por "polietilenglicol" o "PEG" quiere decirse un compuesto de polialquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o la derivatización con restos de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato,

tresilato, aziridina, oxirano, disulfuro de ortopiridilo, vinilsulfona, yodoacetamida o un resto de maleimida).

PEG es un polímero soluble en agua, bien conocido que está disponible comercialmente o puede prepararse mediante polimerización por apertura de anillo de etilenglicol según métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). En la presente solicitud, el término "PEG" se usa ampliamente para englobar cualquier molécula de polietilenglicol, en forma de mono a polifuncional, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y puede representarse mediante la fórmula:



en la que n es de 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un alquilo C₁₋₄.

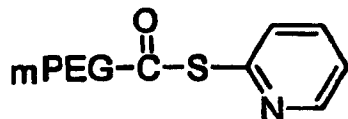
Preferiblemente, un PEG usado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxilo, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi-PEG"). Se observa que cuando X = CH₃, el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula II terminando en OH, se une covalentemente a un resto de activación a través de un enlace a oxígeno de éter. Cuando X = H, ambos extremos del PEG se unen a restos de activación a través de enlaces éter dando lugar a PEG lineales bis-funcionalizados. Cuando se usa en una estructura química, el término "PEG" incluye la fórmula II anterior sin el hidrógeno del grupo hidroxilo mostrado, dejando el oxígeno disponible para reaccionar con un átomo de carbono libre de un ligador para formar un enlace éter. Más específicamente, para conjugar PEG a un péptido, PEG debe estar en forma "activada". PEG activado puede representarse mediante la fórmula III:



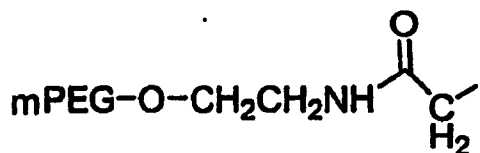
en la que PEG (definido anteriormente) se une covalentemente a un átomo de carbono del resto de activación (A) para formar un enlace éter, y (A) contiene un grupo reactivo que puede reaccionar con un grupo amino, imino o tiol en un residuo de aminoácido de un péptido o un resto de ligador unido covalentemente al péptido.

Se conocen bien en la técnica métodos para la preparación de PEG activados, por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.643.575, 5.919.455, 5.932.462, y la publicación PCT WO 95/06058. Pueden producirse PEG activados adecuados mediante varias reacciones convencionales. Por ejemplo, puede prepararse un éster de N-hidroxisuccinimida de un PEG (M-NHS-PEG) a partir de monometil éter de PEG (que está disponible comercialmente de Union Carbide) mediante reacción con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según el método de Buckmann y Merr, Makromol. Chem., 182: 1379-1384 (1981). Otros PEG activados, tales como PEG-aldehídos, pueden obtenerse a partir de una fuente comercial, por ejemplo, Nektar Therapeutics (Huntsville, Al) o Enzon, Inc. (Piscataway, N. J.). Ejemplos de PEG activados preferidos para los fines de la presente invención son PEG-propionaldehído y PEG-butiraldehído que están disponibles comercialmente de Nektar Therapeutics (Huntsville, Al). PEG-propionaldehído se representa mediante la fórmula PEG-CH₂CH₂CHO y se describe en la patente estadounidense n.º 5.252.714. Además, pueden usarse PEG-aldehídos bifuncionales para preparar conjugados diméricos.

Los PEG reactivos con amina preferidos adicionales incluyen: succinidil-propionato de metoxi-PEG (mPEG-SPA) y succinidil-butanoato de metoxi-PEG (mPEG-SBA), benzotriazolcarbonato de mPEG o p-nitrofenil-carbonato de mPEG que están disponibles en una variedad de pesos moleculares de Nektar Therapeutics (Huntsville, Al), Enzon, Inc. (Piscataway, N. J.), o NOF Corporation (Tokio, Japón). Los restos de PEG activado preferidos adicionales incluyen funcionalidades reactivas con tiol incluyendo, pero sin limitarse a, PEG-vinilsulfonas, representadas por la fórmula PEG-CH₂CH₂SO₂-CH=CH₂, yodoacetato de mPEG y tioésteres de mPEG representados a continuación:



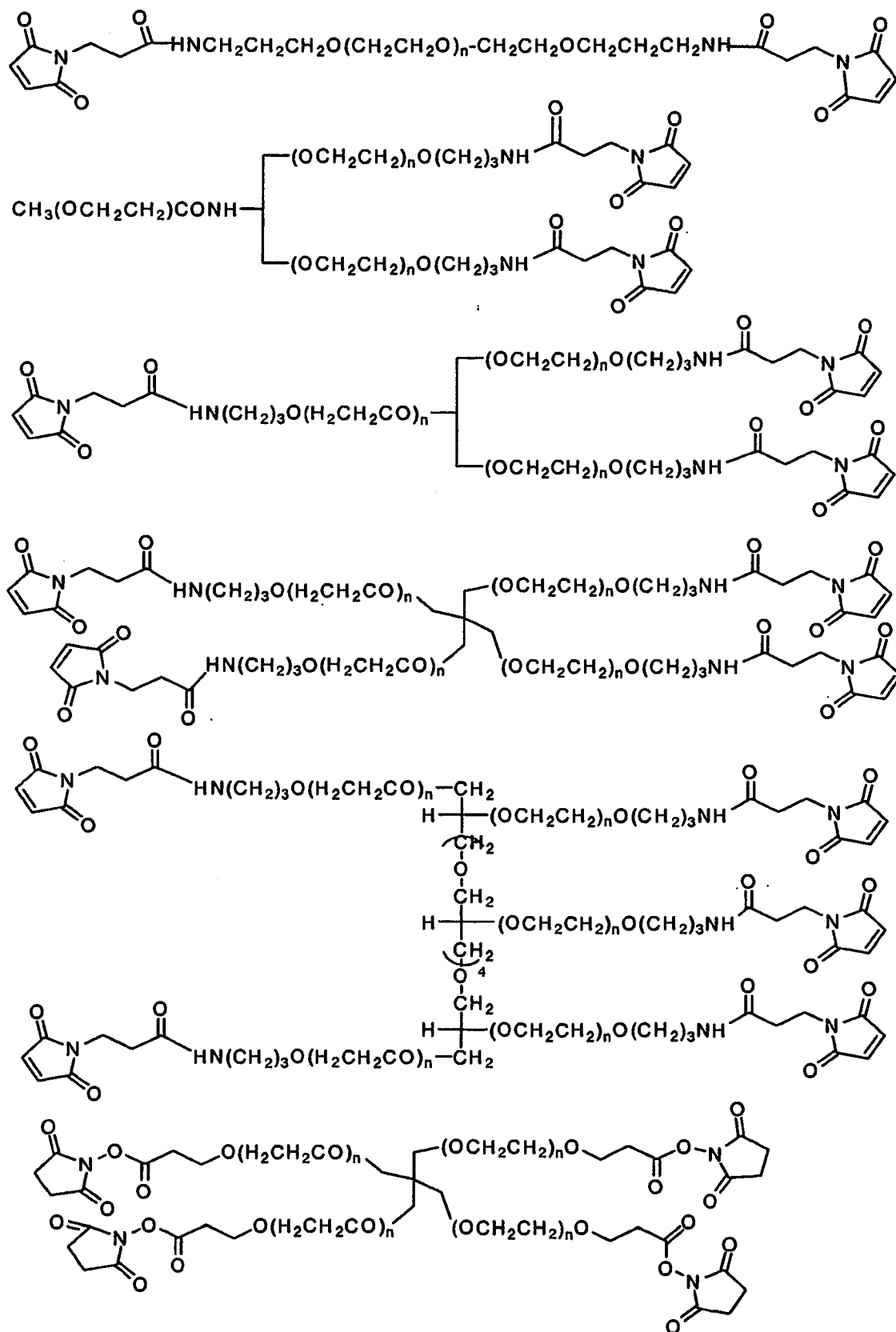
Tioéster de mPEG



yodoacetamida de mPEG

Otro PEG activado preferido para generar los péptidos conjugados con PEG de la presente invención es PEG-maleimida. Compuestos tales como maleimido-monometoxi-PEG son particularmente útiles para generar los péptidos conjugados con PEG de la invención.

Un PEG activado incluso más preferido para generar los péptidos conjugados con PEG de la presente invención es a PEG multivalente que tiene más de un residuo activado. Los restos de PEG multivalente preferidos incluyen, pero no se limitan a, los mostrados a continuación:



Puede usarse cualquier masa molecular para un PEG tal como se desee en la práctica, por ejemplo, de desde aproximadamente 1.000 Dalton (Da) hasta 100.000 Da (n es de 20 a 2300). El número de unidades de repetición " n " en el PEG es aproximado para la masa molecular descrita en Dalton. Se prefiere que la masa molecular combinada

de PEG en un ligador activado sea adecuada para uso farmacéutico. Por tanto, la masa molecular combinada de las moléculas de PEG no debe superar los 100.000 Da.

Preferiblemente, la masa molecular combinada o total de PEG usada en un péptido conjugado con PEG de la presente invención es de desde aproximadamente 3.000 Da hasta 60.000 Da (n total es de desde 70 hasta 1.400), más preferiblemente de desde aproximadamente 8.800 Da hasta 36.000 Da (n total es de aproximadamente 200 a aproximadamente 820). La masa combinada más preferida para PEG es de desde aproximadamente 20.000 Da hasta 24.000 Da (n total es de aproximadamente 450 a aproximadamente 540).

Otros compuestos de polialquilenglicol, tales como polipropilenglicol, pueden usarse en la presente invención. Otros compuestos de polialquilenglicol apropiados incluyen, pero no se limitan a, polímeros cargados o neutros de los siguientes tipos: dextrano, ácidos colomónicos u otros polímeros basados en hidratos de carbono, polímeros de aminoácidos y derivados de biotina.

El término "que comprende" significa que un péptido o péptido conjugado puede incluir entidades moleculares adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos, en cualquiera o ambos de los extremos N o C-terminal de la secuencia dada. Naturalmente, estas entidades moleculares adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del péptido o péptido conjugado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido nativo" se refiere a un antagonista peptídico de B1 no conjugado dado a conocer en el presente documento o conocido en la técnica.

Los términos "derivatizar" y "derivado" o "derivatizado" comprenden procedimientos y péptidos o péptidos conjugados resultantes, respectivamente, en los que (1) el péptido o péptido conjugado tiene una parte cíclica; por ejemplo, entrecruzamiento entre residuos de cisteinilo dentro del péptido conjugado; (2) el péptido o péptido conjugado se entrecruza o tiene un sitio de entrecruzamiento; por ejemplo, el péptido o péptido conjugado tiene un residuo de cisteinilo y por tanto forma dímeros entrecruzados en cultivo o *in vivo*; (3) el extremo N-terminal de un péptido conjugado que tiene un grupo $-NH_2$ terminal se sustituye por $-NRR^1$, $NRC(O)R^1$, $-NRC(O)OR^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR$, un grupo succinimida, o benciloxicarbonil-NH- sustituido o no sustituido, en los que R y R^1 y los sustituyentes de anillo son tal como se definen más adelante en el presente documento; (5) el extremo C-terminal se sustituye por $-C(O)R^2$ o $-NR^3R^4$ en los que R^2 , R^3 y R^4 son tal como se definen más adelante en el presente documento; y (6) péptidos conjugados en los que se modifican restos de aminoácidos individuales a través de tratamiento con agentes que puede reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. Se describen además derivados más adelante en el presente documento.

El término "B1" significa el receptor de bradicinina B1 (véase, Judith M Hall, A review of BK receptors. Pharmac. Ther. 56: 131-190 (1992)). A menos que se indique específicamente de otro modo, B1 o el receptor B1 de bradicinina pretende significar el receptor B1 de bradicinina humano (hB1). Preferiblemente, hB1 es el receptor de tipo natural. Más preferiblemente, hB1 es el receptor de bradicinina descrito en el n.º de registro de GenBank AJ238044.

El término "péptido" tal como se usa generalmente en el presente documento se refiere a moléculas de 4 a 40 aminoácidos, prefiriéndose las moléculas de 10 a 20 aminoácidos y siendo las más preferidas las de 15 a 18 aminoácidos. El término "dipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de dos aminoácidos. El término "tripéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de tres aminoácidos.

También puede usarse el análisis estructural de la interacción proteína-proteína para sugerir péptidos que imitan la actividad de unión de ligandos de proteínas grandes. En tal análisis, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y la orientación relativa de residuos críticos del ligando de proteína a partir del que puede diseñarse un péptido análogo. Véase, por ejemplo, Takasaki *et al.*, Nature Biotech., Volumen 15, páginas 1266-1270 (1997). Estos métodos analíticos también pueden usarse para investigar la interacción entre una proteína receptora y un péptido, péptido conjugado con vehículo o péptido conjugado con PEG de la presente invención, lo que puede sugerir la modificación adicional del péptido o conjugados peptídicos para aumentar su afinidad de unión.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" cuando se usan con referencia a un péptido, péptido conjugado con vehículo o antagonista de B1 de péptido conjugado con PEG se refiere a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado deseado (es decir, para terapia con los péptidos, péptidos conjugados con vehículo y/o antagonistas de B1 de péptido conjugado con PEG de la presente invención. En el contexto de la presente invención, el resultado deseado es una reducción deseada en la inflamación y/o el dolor, por ejemplo, o para soportar una disminución observable en el nivel de una o más actividades biológicas de B1. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del péptido y/o péptido conjugado suficiente para inhibir, durante cierto periodo de tiempo, uno o más de los procesos patológicos definidos clínicamente asociados con el estado en cuestión, por ejemplo, inflamación o dolor, en un sujeto tratado *in vivo* con el/los agente(s). La cantidad eficaz puede variar dependiendo del péptido y/o antagonista de B1 de péptido conjugado específico seleccionado, y también depende de una variedad de factores y condiciones relacionados con el sujeto que va a tratarse y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el péptido y/o antagonista de

B1 de péptido conjugado va a administrarse *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente así como las curvas de dosis-respuesta y los datos de toxicidad obtenidos en trabajo preclínico con animales estarían entre los considerados. Si el/los agente(s) va(n) a ponerse en contacto con las células *in vitro*, también se diseñaría una variedad de estudios preclínicos *in vitro* para evaluar parámetros tales como la captación, semivida, dosis, toxicidad, etc. La determinación de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz para un agente dado está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

El término "farmacológicamente activo" significa que se determina que una sustancia así descrita tiene una actividad que afecta a un parámetro médico o estado patológico (por ejemplo, dolor). En el contexto de la invención, este término se refiere normalmente a una enfermedad o estado o trastorno médico anómalo inducido por B1 o mediado por B1, y más específicamente, al antagonismo de la inflamación o el dolor.

Los términos "antagonista", "inhibidor" y "agonista inverso" (por ejemplo, véase, Rianne A. F. de Ligt, *et. al*, British Journal of Pharmacology 2000, 130, 131) se refieren a una molécula que bloquea, impide, reduce, disminuye o interfiere de alguna manera con la actividad biológica de la proteína de interés asociada. Un "antagonista" o "inhibidor" preferido de la presente invención es una molécula que se une a e inhibe B1 con una Cl_{50} de 500 nM o menos en ensayos *in vitro* de actividad de B1. Un "antagonista" o "inhibidor" más preferido de la presente invención es una molécula que se une a e inhibe B1 con una Cl_{50} de 100 nM o menos en ensayos *in vitro* de actividad de B1. El "antagonista" o "inhibidor" más preferido de la presente invención es una molécula que se une a e inhibe B1 con una Cl_{50} de 50 nM o menos en ensayos *in vitro* de actividad de B1 y previene, mejora o suprime el dolor tal como se mide en al menos un modelo animal *in vivo* generalmente aceptado de dolor y/o inhibe exposiciones bioquímicas en modelos animales *in vivo* de edema, inflamación o dolor.

Adicionalmente, también están englobadas en el presente documento sales fisiológicamente aceptables de los péptidos o péptidos conjugados de la invención. Las expresiones "sales fisiológicamente aceptables" y "sales farmacológicamente aceptables" tal como se usan en el presente documento son intercambiables y pretenden incluir cualquier sal que se sabe o se descubre posteriormente que es farmacéuticamente aceptable (es decir, útiles en el tratamiento de un animal de sangre caliente). Algunos ejemplos específicos son: acetato; trifluoroacetato; hidroxaluros, tales como clorhidrato y bromhidrato; sulfato; citrato; tartrato; glicolato; oxalato; sales de ácidos inorgánicos y orgánicos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico, y similares. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida tal como un grupo carboxilo, entonces se conocen bien pares de cationes farmacéuticamente aceptables adecuados para el grupo carboxilo por los expertos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, de amonio cuaternario, y similares. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables" véase más adelante y Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66: 1 (1977).

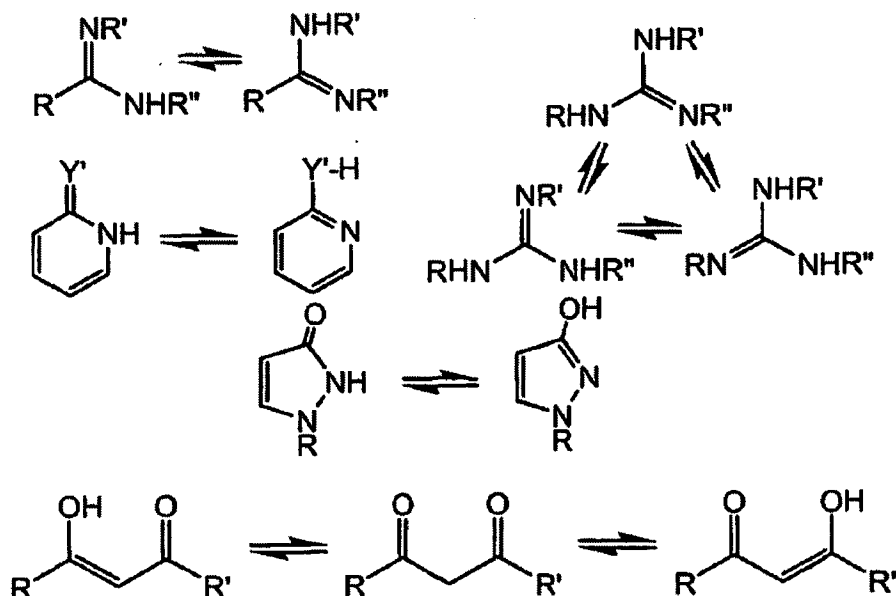
"Grupo protector" se refiere generalmente a grupos bien conocidos en la técnica que se usan para impedir que grupos reactivos seleccionados, tales como carboxilo, amino, hidroxilo, mercapto, y similares, experimenten reacciones no deseadas, tales como nucleófilas, electrófilas, de oxidación, de reducción, y similares. Se indican grupos protectores preferidos en el presente documento cuando es apropiado. Los ejemplos de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, aralquilo, aralquilo sustituido, cicloalquenilalquilo y cicloalqueno sustituido, alquilo, alilo, alilo sustituido, acilo, alcoxycarbonilo, aralcoxycarbonilo, sililo, y similares. Los ejemplos de aralquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo, orto-metilbencilo, trilito y benzhidrido, que pueden estar sustituidos opcionalmente con halógeno, alquilo, alcoxilo, hidroxilo, nitro, acilamino, acilo, y similares, y sales, tales como sales de fosfonio y amonio. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, indanilo, antraceno, 9-(9-fenilfluorenilo), fenantrenilo, durenilo, y similares. Los ejemplos de radicales cicloalquenilalquilo o cicloalquenoilalquilo sustituido, tienen preferiblemente 6-10 átomos de carbono, incluyen, pero no se limitan a, ciclohexenilmetilo, y similares. Los grupos acilo, alcoxycarbonilo y aralcoxycarbonilo adecuados incluyen benciloxycarbonilo, t-butoxycarbonilo, isobutoxycarbonilo, benzoílo, benzoílo sustituido, butirilo, acetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftaloílo, y similares. Puede usarse una mezcla de grupos protectores para proteger el mismo grupo amino, tal como un grupo amino primario puede protegerse mediante tanto un grupo aralquilo como un grupo aralcoxycarbonilo. Los grupos protectores de amino también pueden formar un anillo heterocíclico con el nitrógeno al que están unidos, por ejemplo, 1,2-bis(metilen)benceno, ftalimidilo, succinimidilo, maleimidilo, y similares y en los que estos grupos heterocíclicos pueden incluir además anillos de arilo y cicloalquilo colindantes. Además, los grupos heterocíclicos pueden estar mono, di o tri-sustituidos, tal como nitroftalimidilo. Los grupos amino también pueden protegerse frente a reacciones no deseadas, tales como oxidación, a través de la formación de una sal de adición, tal como clorhidrato, ácido toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, y similares. Muchos de los grupos protectores de amino también son adecuados para proteger grupos carboxilo, hidroxilo y mercapto. Por ejemplo, los grupos aralquilo. Los grupos alquilo también son grupos adecuados para proteger grupos hidroxilo y mercapto, tales como terc-butilo.

Los grupos protectores de sililo son átomos de silicio sustituidos opcionalmente con uno o más grupos alquilo, arilo y aralquilo. Los grupos protectores de sililo adecuados incluyen, pero no se limitan a, trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo, terc-butildimetilsililo, dimetilfenilsililo, 1,2-bis(dimetilsilil)benceno, 1,2-bis(dimetilsilil)etano y difenildimetilsililo. La sililación de un grupo amino proporciona grupos mono o di-sililamino. La sililación de compuestos de aminoalcohol puede conducir a un derivado de N,N,O-trisililo. La eliminación de la función sililo de una función

silil éter se logra fácilmente mediante tratamiento con, por ejemplo, un reactivo de hidróxido metálico o fluoruro de amonio, o bien como una etapa de reacción diferenciada o bien *in situ* durante una reacción con el grupo alcohol. Agentes de sililación adecuados son, por ejemplo, cloruro de trimetilsililo, cloruro de terc-butil-dimetilsililo, cloruro de fenildimetilsililo, cloruro de difenildimetilsililo o sus productos de combinación con imidazol o DMF. Los métodos para la sililación de aminas y la eliminación de grupos protectores de sililo se conocen bien por los expertos en la técnica. Los métodos de preparación de estos derivados de amina a partir de los correspondientes aminoácidos, amidas de aminoácido o ésteres de aminoácido también se conocen bien por los expertos en la técnica de la química orgánica incluyendo química de aminoácidos/ésteres de aminoácido o aminoalcoholes.

Los grupos protectores se eliminan en condiciones que no afectarán a la parte restante de la molécula. Estos métodos se conocen bien en la técnica e incluyen hidrólisis ácida, hidrogenólisis, y similares. Un método preferido implica la eliminación de un grupo protector, tal como la eliminación de un grupo benciloxicarbonilo mediante hidrogenólisis utilizando paladio sobre carbono en un sistema de disolventes adecuado tal como un alcohol, ácido acético, y similares o mezclas de los mismos. Puede eliminarse un grupo protector de t-butoxi-carbonilo utilizando un ácido inorgánico u orgánico, tal como HCl o ácido trifluoroacético, en un sistema de disolventes adecuado, tal como dioxano o cloruro de metileno. La aminosal resultante puede neutralizarse fácilmente para proporcionar la amina libre. Un grupo protector de carboxilo, tal como metilo, etilo, bencilo, terc-butilo, 4-metoxifenilmetilo, y similares, puede eliminarse en condiciones de hidrólisis e hidrogenólisis bien conocidas por los expertos en la técnica.

Debe observarse que los compuestos de la invención pueden contener grupos que pueden existir en formas tautoméricas, tales como grupos amidina y guanidina cíclicos y acíclicos, grupos heteroarilo sustituidos con heteroátomo ($Y' = O, S, NR$), y similares, que se ilustran en los siguientes ejemplos:



y aunque se nombra, se describe, se presenta y/o se reivindica una forma en el presente documento, todas las formas tautoméricas pretenden estar incluidas inherentemente en tal nombre, descripción, presentación y/o reivindicación.

También se contemplan profármacos de los compuestos de esta invención por esta invención. Un profármaco es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de acción fisiológica *in vivo*, tal como hidrólisis, metabolismo, y similares, para dar un compuesto de esta invención tras la administración del profármaco a un paciente. La idoneidad y las técnicas implicadas en la preparación y el uso de profármacos se conocen bien por los expertos en la técnica. Para una discusión general de profármacos que implican ésteres véanse Svensson y Tunek Drug Metabolism Reviews 165 (1988) y Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985). Los ejemplos de un anión carboxilato enmascarado incluyen una variedad de ésteres, tales como alquílicos (por ejemplo, metílico, etílico), cicloalquílicos (por ejemplo, ciclohexílico), aralquílico (por ejemplo, bencilico, p-metoxibencilico) y alquilcarboniloxialquílico (por ejemplo, pivaloiloximetílico). Se han enmascarado aminas como derivados sustituidos con arilcarboniloximetilo que se escinden por esterasas *in vivo* liberando el fármaco libre y formaldehído (Bundgaard J. Med. Chem. 2503 (1989)). Además, los fármacos que contienen un grupo NH ácido, tal como imidazol, imida, indol, y similares, se han enmascarado con grupos N-aciloximetilo (Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985)). Se han enmascarado grupos hidroxilo como ésteres y éteres. El documento EP 039.051 (Sloan y Little, 4/11/81) da a conocer profármacos de ácido hidroxámico como base de Mannich, su preparación y uso.

Estructura de los péptidos conjugados

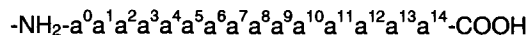
En general. Los péptidos conjugados con vehículo de, o ilustrados por, la presente invención pueden describirse mediante la siguiente fórmula:



en la que:

- 5 X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;
F es un vehículo unido covalentemente a X^1 o Y^1 ;
 L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;
n es de 0 a 3; y
- 10 P^1 y, si está presente, P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1. Las realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones.
Los péptidos conjugados con vehículo de fórmula IV pueden comprender péptidos conjugados en los que P^1 y, si está presente, P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen una secuencia peptídica mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-60 y derivados de las mismas.
- 15 Los péptidos conjugados con vehículo adicionales incluirán péptidos conjugados con vehículo de fórmula IV en la que P^1 y, si está presente, P^2 está definido por la fórmula:
 $NH_2-a^0a^1a^2a^3a^4a^5a^6a^7a^8a^9a^{10}a^{11}a^{12}a^{13}a^{14}-COOH$
en la que:
- 20 a^0 es un aminoácido básico o neutro aromático, alifático, heterocíclico o alicíclico, dipéptido o tripéptido que contiene uno o dos residuos que tienen cadenas laterales básicas, o están ausentes;
 a^1 , a^2 , a^3 y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos básicos o neutros aromáticos, alifáticos, heterocíclicos o alicíclicos;
 a^6 es Ser;
- 25 a^5 , a^7 y a^8 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos o alicíclicos, siempre que al menos uno de a^5 , a^7 y a^8 se seleccione de Chg, Cpg, Igla, Igla, Niga y Nigb de la configuración D o L; y
 a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} y a^{14} son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o están ausentes.
 P^1 y, si está presente, P^2 pueden estar definidos por la fórmula:
 $-NH_2-a^0a^1a^2a^3a^4a^5a^6a^7a^8a^9a^{10}a^{11}a^{12}a^{13}a^{14}-COOH$
- 30 en la que:
- a^0 es un aminoácido básico, un dipéptido que contiene uno o dos residuos con cadenas laterales básicas, o está ausente;
 a^1 es un aminoácido básico;
 a^2 es Pro;
- 35 a^3 es Hyp;
 a^4 es Gly;
 a^5 y a^8 es un indanil-aminoácido;
 a^6 es Ser;
 a^7 es un D-indanil-aminoácido;
- 40 a^8 es Cpg; y
 a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} y a^{14} son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o están ausentes.

P¹ y, si está presente, P² también pueden estar definidos por la fórmula:



en la que:

a⁰ es un aminoácido básico, dipéptido que contiene una o dos cadenas laterales básicas, o están ausentes;

5 a¹ es un aminoácido básico;

a² es Pro;

a³ es Hyp;

a⁴ es Gly;

a⁵ es Cpg;

10 a⁶ es Ser;

a⁷ es DTic;

a⁸ es Cpg; y

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³ y a¹⁴ son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o están ausentes.

15 Los péptidos conjugados con vehículo también pueden incluir péptidos conjugados con vehículo de fórmula IV en la que n=0 y X¹ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos mostrados en SEQ ID NOS: 27-41 y derivados de las mismas.

20 La presente invención también da a conocer péptidos conjugados con PEG que se unen a y antagonizan la actividad de los receptores B1 de bradicinina (B1) y que tienen propiedades farmacocinéticas superiores de manera demostrable *in vivo* en comparación con antagonistas peptídicos de B1 no conjugados. Los péptidos conjugados con PEG de la presente invención pueden describirse mediante la siguiente fórmula (V):



en la que:

X¹ e Y¹ son independientemente en cada caso péptidos de fórmula -L¹-P¹ y -L²-P², respectivamente;

F es un resto de PEG unido covalentemente a X¹ o Y¹;

25 L¹ y L² independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

n es de 0 a 3; y

P¹ y, si está presente, P² son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1.

30 Los péptidos conjugados con PEG de fórmula V comprenderán péptidos conjugados en los que P¹ y, si está presente, P² son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen una secuencia peptídica mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-60 y derivados de las mismas.

Los péptidos conjugados con PEG adicionales incluirán conjugados de PEG de fórmula V en la que P¹ y, si está presente, P² está definido por la fórmula:

35 $-\text{NH}_2-\text{a}^0\text{a}^1\text{a}^2\text{a}^3\text{a}^4\text{a}^5\text{a}^6\text{a}^7\text{a}^8\text{a}^9\text{a}^{10}\text{a}^{11}\text{a}^{12}\text{a}^{13}\text{a}^{14}-\text{COOH}$ en la que:

a⁰ es un aminoácido básico o neutro aromático, alifático, heterocíclico o alicíclico, dipéptido o tripéptido básico, o está ausente;

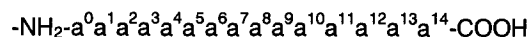
a¹, a², a³ y a⁴ son independientemente en cada caso aminoácidos básicos o neutros aromáticos, alifáticos, heterocíclicos o alicíclicos;

40 a⁵ es Ser;

a⁵, a⁷ y a⁸ son aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos o alicíclicos, siempre que al menos uno de a⁵, a⁷ y a⁸ se seleccione de Chg, Cpg, Igl, Iglb, Niga y Nigb de la configuración D o L; y

$a^9, a^{10}, a^{11}, a^{12}, a^{13}$ y a^{14} son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o están ausentes.

P^1 y, si está presente, P^2 pueden estar definidos por la fórmula:



en la que:

5 a^0 es un aminoácido básico, un dipéptido básico o está ausente;

a^1 es un aminoácido básico;

a^2 es Pro;

a^3 es Hyp;

a^4 es Gly;

10 a^5 y a^8 es un indanil-aminoácido;

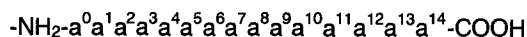
a^6 es Ser;

a^7 es un D-indanil-aminoácido;

a^8 es Cpg; y

$a^9, a^{10}, a^{11}, a^{12}, a^{13}$ y a^{14} son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o están ausentes.

15 P^1 y, si está presente, P^2 pueden estar definidos por la fórmula:



en la que:

a^0 es un aminoácido básico, un dipéptido básico, o está ausente;

a^1 es un aminoácido básico;

20 a^2 es Pro;

a^3 es Hyp;

a^4 es Gly;

a^5 es Cpg;

a^6 es Ser;

25 a^7 es DTic;

a^8 es Cpg; y

$a^9, a^{10}, a^{11}, a^{12}, a^{13}$ y a^{14} son independientemente en cada caso cualquier aminoácido natural o independientemente están ausentes.

30 Los péptidos conjugados con PEG pueden incluir péptidos conjugados con PEG de fórmula V en la que $n=0$ y X^1 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27-41 y derivados de las mismas.

Los péptidos conjugados con PEG incluso más preferidos de la presente invención incluyen en los que $n=0$ y X^1 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27-41 y derivados de las mismas. Los péptidos conjugados con PEG pueden describirse mediante la siguiente fórmula:

35



VI

o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

F' es un vehículo multivalente;

R es independientemente en cada caso $-(X^1)-(Y^1)_n$

en la que R se une covalentemente a F';

X¹ e Y¹ son independientemente en cada caso péptidos de fórmula -L¹-P¹ y -L²-P², respectivamente;

L¹ y L² independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

5 n es de 0 a 3;

Z es de 2 a 8; y

P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1.

10 Los péptidos conjugados con PEG pueden incluir péptidos conjugados con PEG de fórmula VI en la que n es 0, Z es de 4 a 8 y X¹ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 27-41 y derivados de las mismas.

15 También se pretende que sean parte de la presente invención conjugados peptídicos que tienen secuencias peptídicas que son fragmentos (es decir, "subsecuencias"), análogos, y derivados de P¹ y, si está presente, P² tal como se define en el presente documento y en los que tales péptidos conjugados son sustancialmente equivalentes con respecto a la actividad anti-B1 *in vitro* y/o *in vivo* a los conjugados peptídicos dados a conocer específicamente en el presente documento.

20 El término "análogo" pretende significar moléculas que representan una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos derivadas de la disposición lineal de aminoácidos de los péptidos, péptidos conjugados (P¹ no conjugado y, si está presente, P²), y/o cualquier ligador de peptidilo (L) de los péptidos conjugados con vehículo o PEG previstos por las fórmulas (IV) y (V), respectivamente, y que dan como resultado moléculas que son sustancialmente equivalentes con respecto a la actividad anti-B1 *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con un péptido no conjugado análogo o péptido conjugado dado a conocer específicamente en el presente documento.

25 Los análogos peptídicos conjugados del presente documento tendrán normalmente una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de (P) (P¹ y/o, si está presente, P²) o (L) (L¹ y/o, si está presente, L²). Está reconocido generalmente que los cambios de aminoácidos conservativos son los que van a perturbar con menor probabilidad la estructura y/o función de un polipéptido e implican generalmente la sustitución de un aminoácido por otro que es similar en estructura y/o función (por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales similares en tamaño, carga y/o forma).

La naturaleza de estas sustituciones se conoce bien por un experto en la técnica y se resumen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en las tablas 1 y 2.

30 Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Básicos: Arg; Lys; His;

Ácidos: Glu; Asp

Polar: Glu; Asp; Gln; Asn; Ser; Thr

Hidrófilos: Asp; Glu; Asn; Ser; Thr; Tyr

35 Hidrófobos: Ala; Met; Ile; Leu; nor-Leu; Val

Aromáticos: Phe; Trp; Tyr

Pequeños: Gly; Ala; Ser; Thr; Met

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos

Aminoácido	Sustituciones preferidas	Sustitución más preferida
Ala	Gly; Leu; Ile; Asn; Pro	Val
Arg	Ala; Asn; Gln; Ser	Lys
Asn	Arg; Gln; His; Lys; Ser; Tyr	Gln
Asp	Asn; Ser; Thr; Gln	Glu
Cys	Ala	Ser
Gln	Ala; Arg; Glu; Leu; Lys; Met; Ser; Tyr	Asn
Glu	Gln; Ser; Thr; Asn	Asp
Gly		Pro
His	Asn; Gln; Lys; Tyr; Phe	Arg

Ile	Tyr; Val; Met; Ala; Phe; nor-Leu	Leu
Leu	nor-Leu; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys	Asn; Asp; Ala; Glu; Gln; Ser; Tyr	Arg
Met	Ala; Gln; Tyr; Trp; Phe	Leu
Phe	Leu; Val; Ile; Ala; Met	Leu
Pro	Ile; Val	Gly
Ser	Ala; Asn; Asp; Gly; Lys	Thr
Thr	Ala; Gly; Ile; Val; Lys	Ser
Trp	Phe; Tyr; His	Tyr
Tyr	Trp; Thr; Ser	Phe
Val	Ala; Ile; Met; Phe; Tyr; nor-Leu	Leu

El cambio de A, F, H, I, L, M, P, V, W o Y a C es más preferido si la nueva cisteína permanece como tiol libre.

Pueden determinarse sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) por los expertos en la técnica en el momento en que se desean tales sustituciones. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes de la secuencia peptídica, o para aumentar o disminuir la afinidad de la molécula de péptido no conjugado y/o conjugado descrita en el presente documento.

En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos conservativas también engloban residuos de aminoácido que se producen de manera no natural que se incorporan normalmente mediante síntesis química de péptidos.

Tal como se indicó en la sección anterior, los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades comunes de la cadena lateral que pueden ser útiles para modificaciones de secuencia. Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del péptido que son homólogas con ortólogos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula. Además, también pueden realizarse modificaciones usando P o G para el fin de influir en la orientación de la cadena.

Al realizar tales modificaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Cada aminoácido tiene un índice hidropático asignado basándose en sus características de hidrofobicidad y carga, éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático del aminoácido en conferirle una función biológica interactiva en una proteína se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de un intervalo de ± 2 , se prefieren particularmente aquéllos que están dentro de un intervalo de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquéllos que están dentro de un intervalo de $\pm 0,5$.

Se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofiliidad. La mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, tal como está gobernado por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al realizar cambios basándose en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro del intervalo de ± 2 , se prefieren particularmente aquéllos que están dentro de un intervalo de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquéllos que están dentro de un intervalo de $\pm 0,5$. También pueden identificarse epítomos de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones centrales epitópicas".

Un experto podrá determinar análogos adecuados de los péptidos no conjugados y/o conjugados expuestos en el presente documento usando técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica también sabría que pueden sustituirse químicamente aminoácidos similares por residuos que se producen en el péptido nativo a la vez que se conserva la actividad (sustituciones conservativas de residuos de aminoácido). Por tanto, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser objeto de sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del péptido no conjugado o péptido conjugado.

- Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos dentro de la secuencia del péptido no conjugado y/o conjugado que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, puede predecirse la importancia de residuos de aminoácido en una secuencia peptídica. Un experto en la técnica puede optar por sustituir sustituciones de aminoácidos químicamente similares por tales residuos de aminoácido importantes predichos de péptidos no conjugados y/o conjugados de la presente invención.
- 5
- Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moulton J., Curr. Op. in Biotech., 7 (4): 422-427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13 (2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113 (2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276 y Chou *et al.*, Biophys. J., 26: 367-384 (1979). Además, están disponibles actualmente programas informáticos para ayudar a predecir la estructura secundaria.
- 10
- Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el reconocimiento del plegamiento ("threading") (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7 (3): 377-87 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4 (1): 15-9 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84 (13): 4355-8 (1987)), y "ligamiento evolutivo" (Véase Home, citado anteriormente, y Brenner, citado anteriormente).
- 15
- Los análogos peptídicos y/o péptidos conjugados y derivados según la invención serán útiles para los mismos fines para los que son útiles los péptidos y/o péptidos conjugados análogos dados a conocer específicamente en el presente documento (es decir, antagonistas de la actividad de B1 *in vitro* y/o *in vivo*).
- 20
- Péptidos. Los péptidos mostrados en el presente documento incluyen péptidos que comprenden las secuencias mostradas en SEQ ID NOS: 15-35 y 39-54. Las secuencias peptídicas P¹ y, si está presente, P² (P) dentro de los péptidos conjugados con vehículo o PEG de la presente invención incluyen, tal como se mencionó, péptidos que se unen a y antagonizan (por ejemplo, disminuyen) la actividad de B1. Los péptidos conjugados con vehículo o PEG preferidos de la presente invención comprenden al menos una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 5-60 y derivados de las mismas. Más preferiblemente, los péptidos conjugados con
- 25
- vehículo o PEG de la presente invención comprenden al menos una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 27-41 y derivados de las mismas.

Tabla 3 - Péptidos de bradicinina

Receptor/efecto	Péptido	Secuencia peptídica											
Agonista de B2/B1	Bradicinina , BK (SEQ ID NO:1)				Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
Agonista de B2	Calidina , Lys-BK (SEQ ID NO:2)		Lys		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
Agonista de B2	Met-Lys-BK (SEQ ID NO:3)	Met	Lys		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
Agonista de B1	des-Arg-BK (SEQ ID NO:4)				Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	
Antagonista de B1	[Leu8]-Des-Arg9-BK (SEQ ID NO:5)				Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Leu	
Antagonista de B1	DALK (SEQ ID NO:6)		Lys		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Leu	
Antagonista de B2	(SEQ ID NO:7)		DArg		Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	Dtic	Oic	Arg
Antagonista de B1/B2	(SEQ ID NO:8)		DArg		Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	Dtic	Oic	
Antagonista de B2	(SEQ ID NO:9)		DArg		Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	DHpe	Oic	Arg
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:10)	Ac	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1/B2	(SEQ ID NO:11)		DArg		Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Digl	Oic	Arg
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:12)		Lys	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Digl	Oic	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:13)		Lys	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1/B2	(SEQ ID NO:14)		DArg		Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Df5f	Igl	Arg
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:15)		DOrnLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:16)		DOrnLys		Arg	Pro	Thz	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:17)		3PalLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:18)		4PalLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:19)		Cha		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:20)		2-Nal	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg		
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:21)		Lys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:22)		DlysLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:23)		Lys	DOrn	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:24)		Lys	Cha	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:25)		Lys	Abu	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:26)		Lys	2-Nal	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:43)		D-Dab	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:44)	Ac	D-Dab	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:45)		DOrnLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:46)	Ac	DOrnLys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:47)	D-3'Pa 1	Lys		Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	

Antagonista de B1	(SEQ ID NO:48)	Ac	D-3'Pa 1	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:49)		D-2-	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:50)		D-2-	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:51)			DOrn	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:52)	Ac		DOrn	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:53)			DOrn	Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:54)	Ac		DOrn	Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:55)			Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:56)	Ac		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:57)			Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:58)	Ac		Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:59)			Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	
Antagonista de B1	(SEQ ID NO:60)	Ac		Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Me-Phe	Ser	D-β-Nal	Ile	

Vehículos. El término "vehículo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que impide la degradación y/o aumenta la semivida, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o aumenta la actividad biológica de una proteína o péptido terapéutico. Se conocen en la técnica vehículos útiles en el contexto de la presente invención (por ejemplo, véase la publicación PCT WO 98/07746), y están todos fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, los vehículos preferidos incluyen, pero no se limitan a, polimetililen-glicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicoles y óxidos, polimetilpropilenglicol, poli(óxido de hidroxipropileno), polipropilenglicoles de cadena lineal y de cadena ramificada y derivados de los mismos, polietilenglicol y polipropilenglicol y los monometil éteres, monocetil éteres, mono-n-butil éteres, mono-t-butil éteres y monooleil éteres de los mismos, ésteres de polialquilenglicoles con ácidos carboxílicos y productos de condensación por deshidratación de los polialquilenglicoles con aminas y otros poli(óxidos de alquileo) y polialquilenglicoles y derivados de los mismos, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo), el copolímero poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), poliviniloxazolidona, poli(vinilmetiloxazolidona) y poli(vinil metil éter), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), poli(metacrilatos de hidroxietilo), poli(acrilamida) y poli(metacrilamida) y otras amidas de los mismos, poli(N,N-dimetilacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(N-acetamidoacrilamida) y poli(N-acetamidometacrilamida), y otros derivados N-sustituídos de las amidas.

Un aspecto de la invención requiere la presencia de al menos un vehículo (F) unido a un resto de ligador distinto de peptidilo o un residuo de aminoácido de un ligador de peptidilo que se fusiona covalentemente a un antagonista peptídico de B1. En el contexto de la presente invención, un vehículo preferido constituye una molécula de PEG, tal como se define en el presente documento. Un vehículo incluso más preferido constituye una molécula de PEG multivalente, tal como se define en el presente documento.

Las moléculas conjugadas con vehículo o PEG dadas a conocer específicamente o a las que se hace referencia en el presente documento pueden modificarse ligeramente dentro de las regiones indicadas mediante (X¹)-(Y¹)_n (tal como se definió anteriormente) para formar un análogo según la invención, siempre que se mantenga sustancialmente el antagonismo de B1.

Como entre los péptidos conjugados con vehículo o PEG de la presente invención y análogos de los mismos, se prefiere que no más de tres residuos no terminales en la región (P) sean diferentes. Más preferiblemente, los análogos contemplados por la presente invención incluyen moléculas con hasta dos sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en cualquier locus no terminal particular de la región (P) del péptido conjugado con vehículo o PEG de la presente invención. Lo más preferiblemente, la divergencia en la secuencia entre un péptido conjugado con vehículo o PEG de la presente invención y un análogo contemplado del mismo, particularmente en la región (P) especificada, es en forma de una o más "modificaciones conservativas".

Ligadores. El término "ligador" tal como se usa en el presente documento se refiere a L¹ y, si está presente, L² tal como se muestra en cualquiera de la fórmula IV y V (citadas anteriormente) y se abrevia en el presente documento mediante (L). Preferiblemente, (L) tiene naturaleza de peptidilo (es decir, está compuesto por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos) y está compuesto por desde 1 hasta 9 aminoácidos. Más preferiblemente, (L) está compuesto por desde 1 hasta 9 aminoácidos, seleccionándose los aminoácidos de los veinte aminoácidos que se producen de manera natural. En una realización incluso más preferida, los 1 a 9 aminoácidos del ligador de peptidilo se seleccionan de cisteína, glicina, alanina, prolina, arginina, asparagina, glutamina y lisina. Incluso más preferiblemente, un ligador de peptidilo está compuesto por una mayoría de aminoácidos que no están impedidos

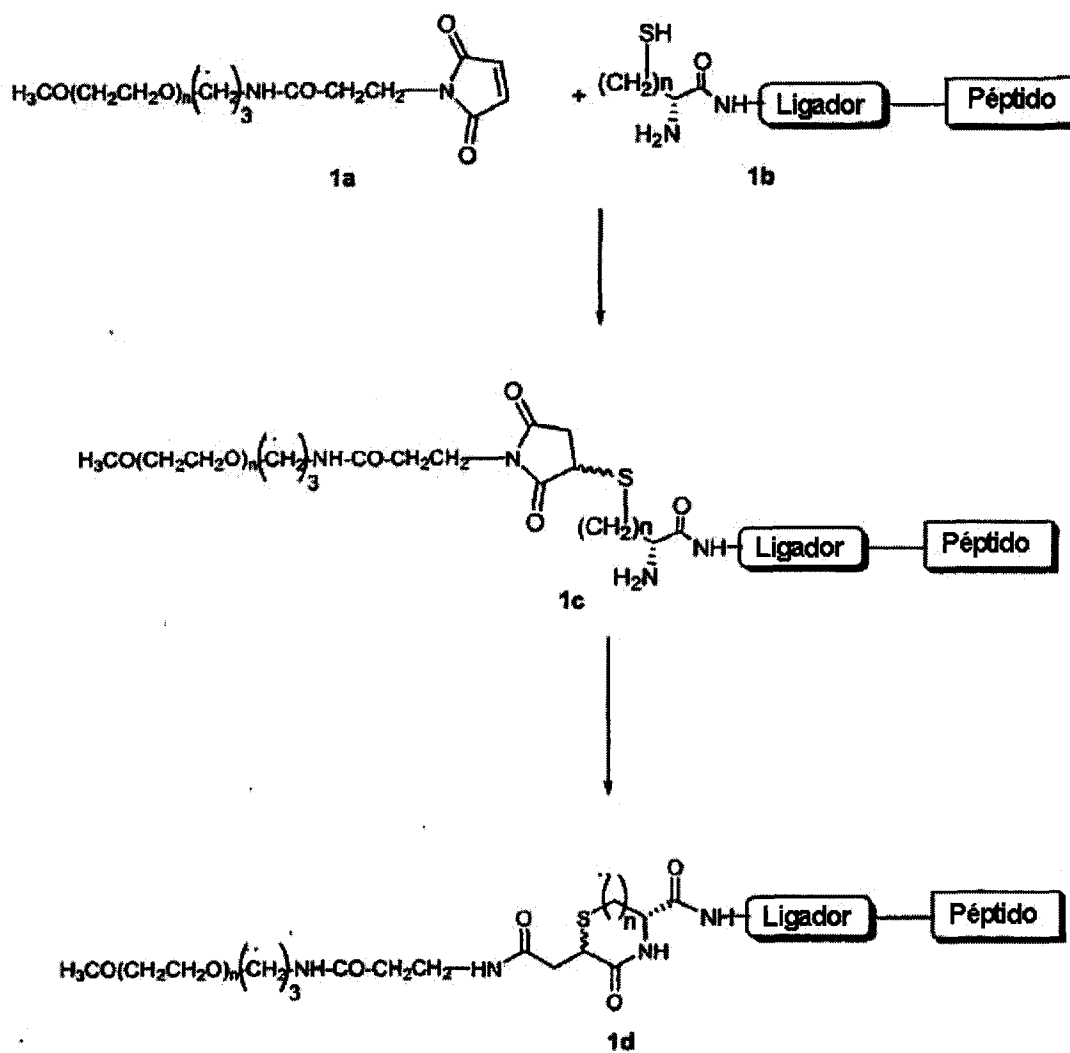
estéricamente, tales como glicina y alanina unidos mediante un enlace peptídico. Por tanto, ligadores de peptidilo preferidos son poli(Gly)₁₋₈, es decir, particularmente (Gly)₃ (SEQ ID NO: 61), (Gly)₅ (SEQ ID NO: 62) y (Gly)₇ (SEQ ID NO: 63), así como poli(Gly-Ala)₂₋₄ y poli(Ala)₁₋₈. Otros ejemplos específicos de ligadores de peptidilo incluyen (Gly)₅Lys (SEQ ID NO: 64), y (Gly)₅LysArg (SEQ ID NO: 65). Otras combinaciones de Gly y Ala también se prefieren.

5 Para explicar la nomenclatura anterior, por ejemplo, (Gly)₅Lys significa Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys. Un ligador de peptidilo puede contener una N cisteína-terminal, otro tiol, o nucleófilo para la conjugación con un vehículo. Un ligador más preferido contiene un residuo de cisteína u homocisteína N-terminal, u otro resto de 2-amino-etanotiol o 3-amino-propanotiol para la conjugación a vehículos funcionalizados con maleimida, yodoacetamida o tioéster. El

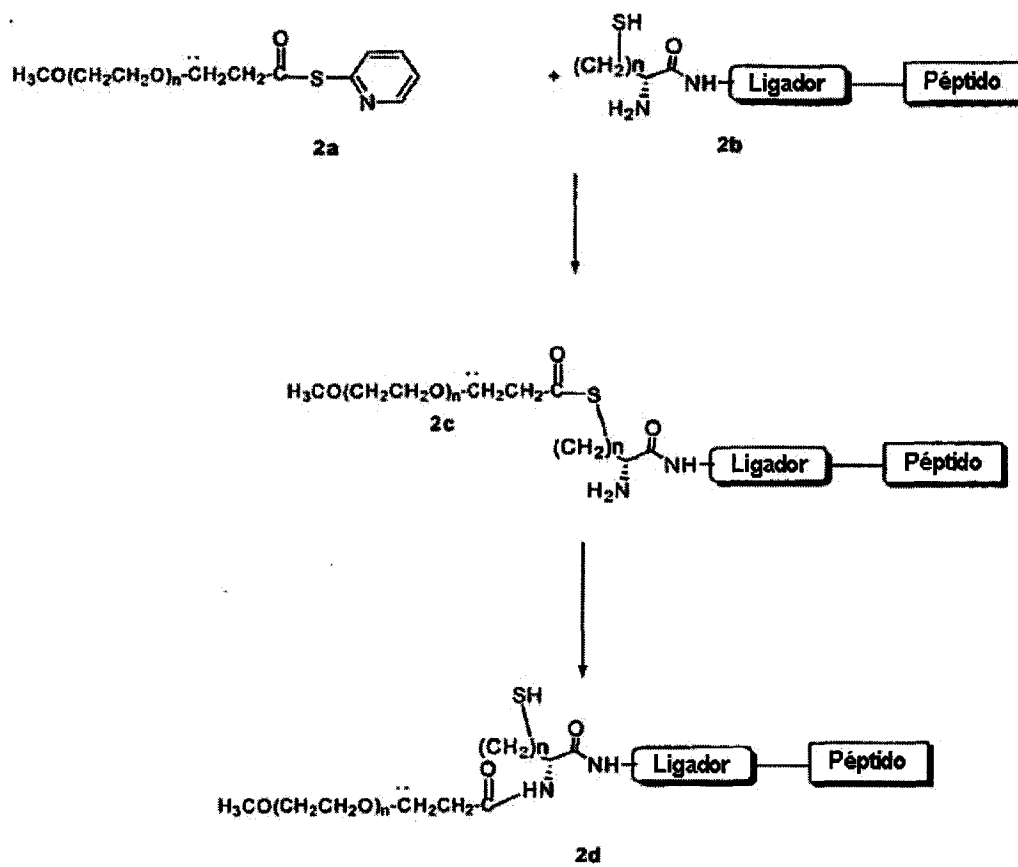
10 tratamiento del aducto de 3-sulfanil-succinimida inicial (1c) formado mediante la reacción de un péptido con maleimida-PEG activado, con base en exceso convierte el aducto de succinimida menos estable en la forma hidrolíticamente estable 6-metilcarbamoil-5-oxo-tiomorfolin-3-carboxamida (1d, esquema 1).

Alternativamente, pueden usarse tioéster o yodoacetamido-PEG disponibles comercialmente (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) para la conjugación quimioselectiva tal como se representa en los esquemas 2 y 3.

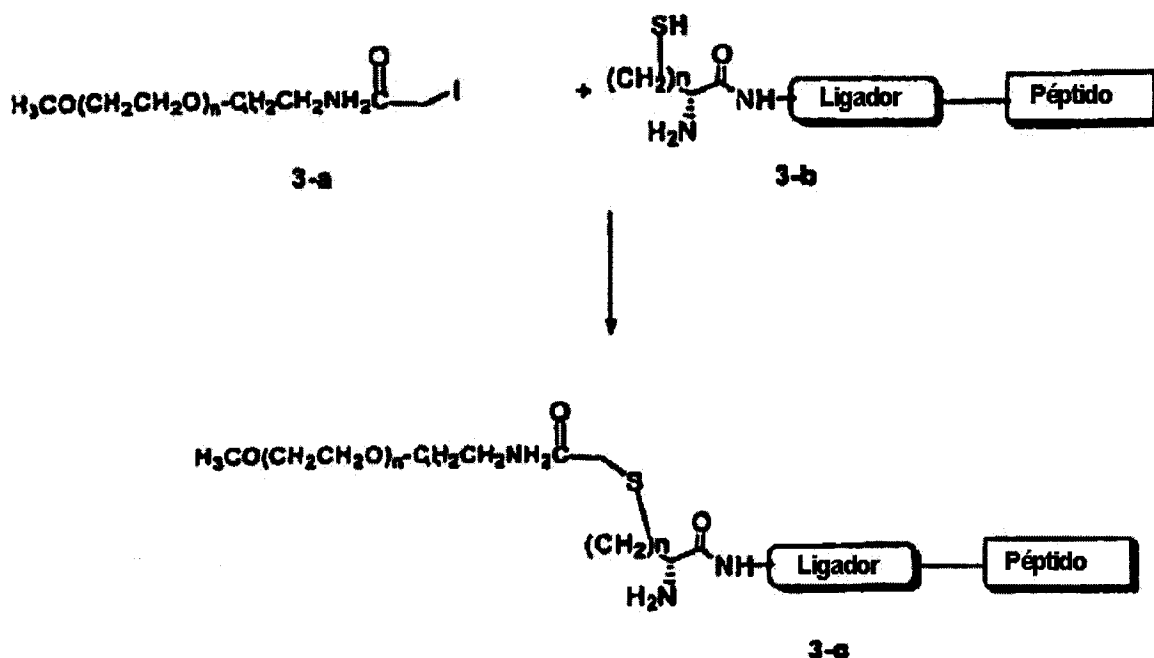
ESQUEMA 1



Esquema 2

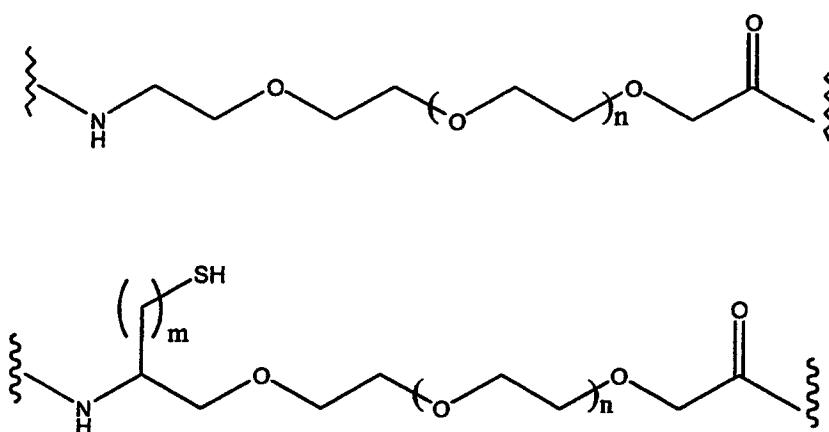


Esquema 3



Otro ligador preferido es un ligador grande y flexible que comprende una secuencia Gly/Ser/Thr al azar (GSGSATGGSGSTASSGSGSATH; SEQ ID NO: 66) que se estima que tiene aproximadamente el tamaño de una molécula de PEG de 1 k. Adicionalmente, un ligador de peptidilo puede comprender un segmento distinto a peptidilo tal como una molécula alifática de 6 carbonos de fórmula $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ (ligador rígido: -AEAAAKEAAAKEAAAKAGG-; SEQ ID NO: 67).

Alternativamente, puede estar presente un ligador distinto de peptidilo que contiene un nucleófilo reactivo en X^1 y, si está presente, Y^1 . Por ejemplo, podrían usarse ligadores de alquilo tales como $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s\text{-C(O)-}$, en la que $s = 2-20$. Estos ligadores de alquilo pueden sustituirse adicionalmente mediante cualquier grupo no impedido estéricamente tal como alquilo inferior (por ejemplo, $\text{C}_1\text{-C}_6$) acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etc. Ligadores distintos de peptidilo a modo de ejemplo son los ligadores de PEG (mostrados a continuación):



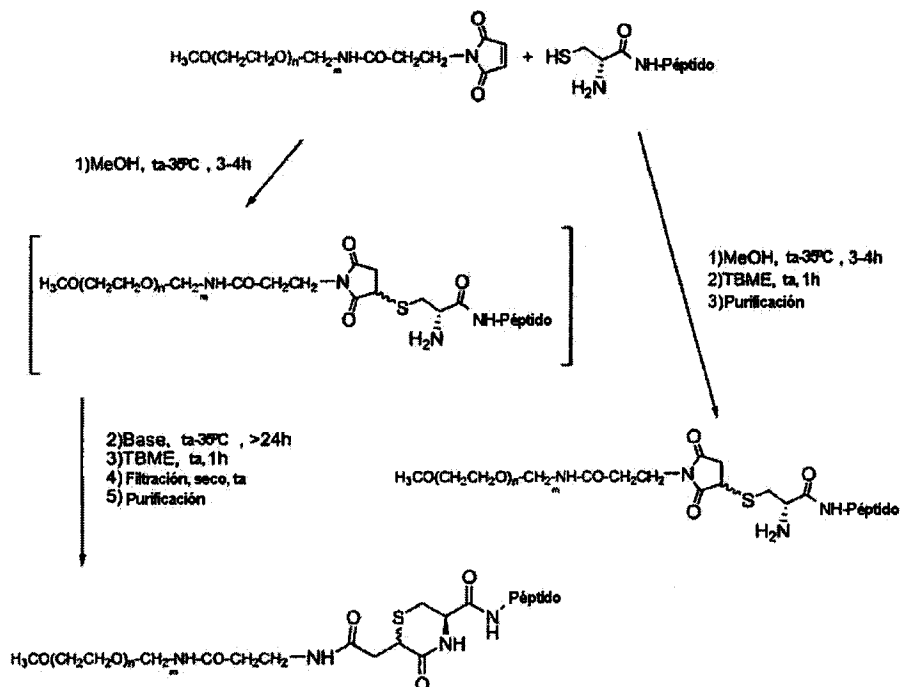
en las que n es tal que el ligador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kiloDalton (kD), preferiblemente de 100 a 500 kD m es = 1-3. Preferiblemente, un ligador distinto de peptidilo es aromático. Los ligadores pueden alterarse para formar derivados de la misma manera tal como se describe en el presente documento.

Además, pueden unirse restos de PEG a la amina N-terminal o aminas de cadenas laterales seleccionadas o bien mediante alquilación reductora usando PEG-aldehídos o bien acilación usando ésteres de hidroxisuccinimido o carbonato de PEG. Cualquiera de los ligadores descritos anteriormente puede usarse en este enfoque. Alternativamente, puede unirse un PEG funcionalizado de manera adecuada directamente a cualquiera de los

antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 tal como se muestran como SEQ ID NOS: 5-26 o SEQ ID NOS: 43-60 o directamente a un residuo de aminoácido de un ligador de peptidilo que se fusiona covalentemente a cualquiera de los antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 tal como se muestran como SEQ ID NOS: 5-26 o 43-60.

- 5 Se apreciará que, puesto que el vehículo y/o los péptidos diana pueden ser multivalentes, es posible mediante el procedimiento de la invención producir una variedad de estructuras vehículo:péptido. A modo de ejemplo, un vehículo univalente y un péptido univalente producirán un conjugado 1:1; un péptido bivalente y un vehículo univalente pueden formar conjugados en los que los conjugados peptídicos llevan dos restos de vehículo mientras que un vehículo bivalente y un péptido univalente pueden producir especies en las que dos entidades peptídicas se unen a un único resto de vehículo; el uso de vehículos de valencia superior puede conducir a la formación agrupaciones de entidades peptídicas unidas a un único resto de vehículo mientras que péptidos de valencia superior pueden llegar a recubrirse con una pluralidad de restos de vehículo. Los restos de péptido pueden tener más de un grupo reactivo que reaccionará con el vehículo activado y siempre debe considerarse la posibilidad de formación de estructuras complejas; cuando se desea formar estructuras sencillas tales como aductos 1:1 de vehículo y péptido, o usar vehículos bivalentes para formar aductos de péptido:vehículo:péptido, será beneficioso usar razones predeterminadas de material peptídico y vehículo activado, concentraciones predeterminadas de los mismos y llevar a cabo la reacción en condiciones predeterminadas (tales como duración, temperatura, pH, etc.) de modo que se forme una proporción del producto descrito y luego separar el producto descrito de los otros productos de reacción. Las condiciones de reacción, proporciones y concentraciones de los reactivos pueden obtenerse mediante experimentos de ensayo y error relativamente sencillos que están dentro de las capacidades de un experto habitual con la ampliación a escala apropiada, según sea necesario. La purificación y separación de los productos se logra de manera similar mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. Sin embargo, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un antagonista peptídico conjugado con vehículo" o "un antagonista peptídico conjugado con PEG" incluye mezclas de tales conjugados y la referencia a "el método de tratamiento" incluye la referencia a uno o más métodos de tratamiento del tipo que conocerán los expertos en la técnica o conocerán tras la lectura de esta memoria descriptiva, y así sucesivamente.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 Se realizan pegilaciones convencionales a través de la conjugación de mPEG-maleimida con el grupo tiol de péptidos y polipéptidos que tienen residuos del aminoácido cisteína en tampón fosfato con o sin disolvente orgánico. La alta solubilidad de péptidos y polipéptidos pegilados y la posible inestabilidad del anillo de pirrolidin-2,5-diona en agua han dificultado la aplicación de este método a la producción y purificación a gran escala de proteínas y péptidos pegilados. Por tanto, se dan a conocer en el presente documento condiciones no acuosas novedosas para la conjugación de mPEG-maleimida con el grupo tiol de péptidos y polipéptidos que tienen residuos de cisteína. El procedimiento novedoso da como resultado rendimientos de moderados a altos de péptidos y polipéptidos pegilados y combina la adición de Michael y aminólisis en un recipiente (esquema 4). Ambas condiciones dan como resultado el aislamiento directo de péptidos y polipéptidos pegilados a través de una precipitación.
- 35

Esquema 4



En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, el metanol (MeOH) puede sustituirse por un disolvente que comprende uno o más de los siguientes disolventes: metanol, etanol, alcohol isopropílico, n-propanol, n-butanol, diclorometano (DCM), acetonitrilo (AcN), tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAc) y N-metilpirrolidona (NMP).

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, TBME puede sustituirse por un disolvente que comprende uno o más de los siguientes disolventes: dietil éter, metil isopropil éter y diisopropil éter.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, la reacción 1) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C. Preferiblemente, la reacción 1) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C. Más preferiblemente, la reacción 1) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C. Lo más preferiblemente, la reacción 1) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, la reacción 2) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C. Preferiblemente, la reacción 2) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C. Más preferiblemente, la reacción 1) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C. Lo más preferiblemente, la reacción 2) tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, la reacción de precipitación tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo durante al menos 10 minutos. Más preferiblemente, la reacción de precipitación tal como se representa en el esquema 4 puede llevarse a cabo durante al menos 60 minutos. Lo más preferiblemente, la reacción de precipitación tal como se representa en el esquema 4 se lleva a cabo durante aproximadamente 60 minutos.

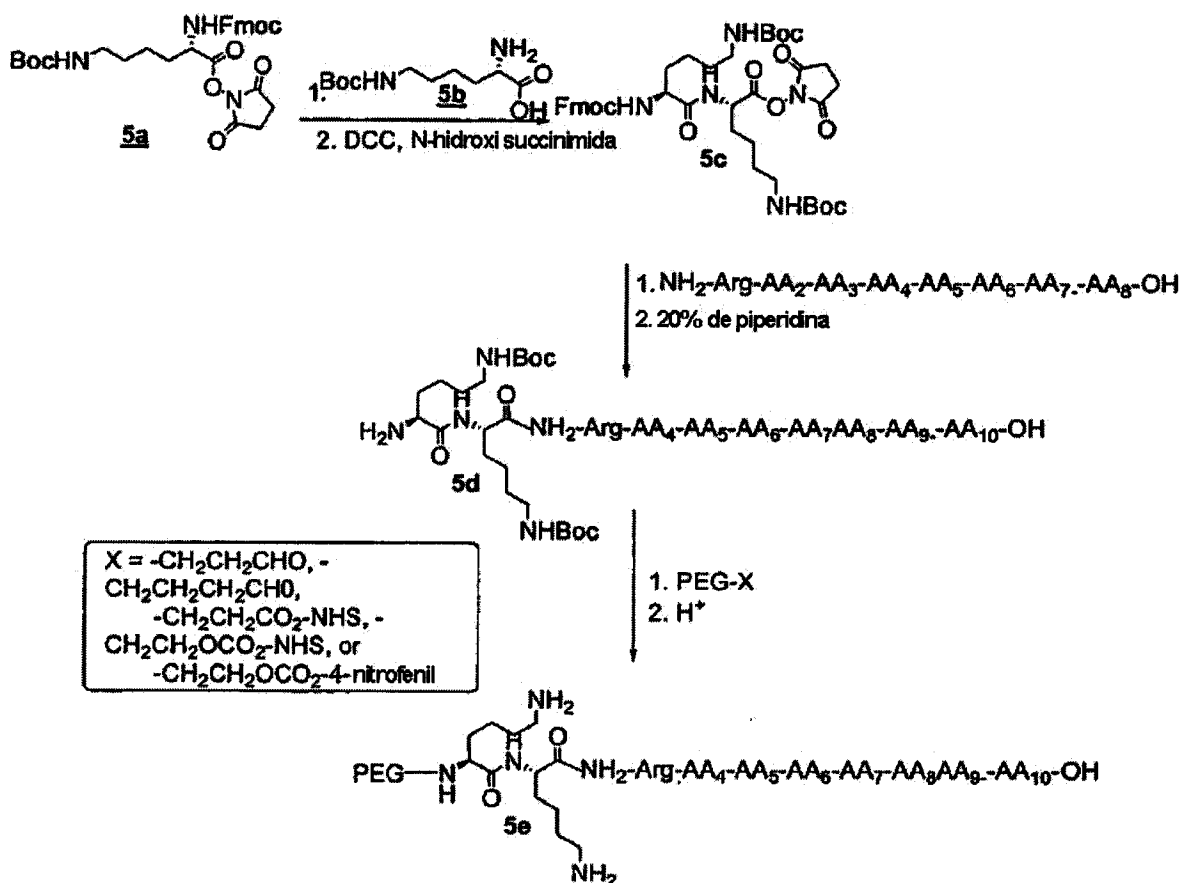
En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, la reacción de precipitación, filtración y/o purificación puede llevarse a cabo más de una vez.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 4, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, las reacciones de precipitación y/o purificación pueden llevarse a cabo más de una vez.

Péptidos parcialmente protegidos son reactivos especialmente útiles para esta estrategia ya que permiten la

modificación selectiva de sitios específicos de péptidos polifuncionales. Los grupos protectores se eliminan de los conjugados de PEG usando métodos de desprotección establecidos bien conocidos por los expertos en la técnica de la síntesis de péptidos. Pueden prepararse péptidos parcialmente protegidos adecuados para esta aplicación usando estrategias de protección ortogonales bien conocidas por los expertos en la técnica de síntesis de péptidos. Una ilustración de la síntesis de y la conjugación de un antagonista peptídico parcialmente protegido del receptor de bradicinina B1 se representa en el esquema 5. Pueden prepararse análogos en los que las aminas de cadenas laterales sirven como sitios de conjugación a partir de aminoácidos básicos protegidos de manera ortogonal fácilmente disponibles.

Esquema 5



10 Pueden conjugarse formas parcialmente protegidas de péptidos antagonistas de B1 tales como las enumeradas en la tabla 3 (SEQ ID NOS: 5-60) a restos de PEG usando métodos similares.

15 En una realización del procedimiento representado en el esquema 5, las cadenas laterales de amina de los péptidos parcialmente protegidos 5c se enmascaran mediante restos de terc-butilcarbamoilo (Boc) y se hacen reaccionar los péptidos resultantes con cualquiera de los PEG-aldehídos descritos anteriormente en un disolvente orgánico tal como 1,2-dicloroetano (DCE), N,N-dimetil-formamida (DMF) o mezclas de los mismos. La formación de la imina intermedia puede acelerarse mediante la adición de un agente de deshidratación tal como tamices moleculares de 4 Å en polvo. Tras agitar a temperatura ambiente durante 1-24 horas, se reduce la imina resultante mediante la adición de 1-4 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

20 En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C. Preferiblemente, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C. Más preferiblemente, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C. Pueden llevarse a cabo la mayor parte de las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a

temperatura ambiente.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, las cadenas laterales de amina de los péptidos parcialmente protegidos 5c se enmascaran mediante restos de terc-butilcarbamoilo (Boc) y se hacen reaccionar los péptidos resultantes con cualquiera de los reactivos de PEG de éster de N-hidroxisuccinimida o p-nitrofenilo de PEG descritos anteriormente en un disolvente orgánico tal como 1,2-dicloroetano (DCE), N,N-dimetil-formamida (DMF), diclorometano, N-metilpirrolidina (NMP) o mezclas de los mismos. Los ésteres de PEG activados pueden ser variedades o bien monofuncionales o bien lineales bifuncionales que están disponibles comercialmente de proveedores tales como Nektar o NOF. Además, el éster activado de PEG polifuncional ramificado, que contiene 3-6 restos de éster de hidroxisuccinimida o p-nitrofenilo es especialmente útil en la preparación de conjugados de la presente invención.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, oscilando los tiempos de reacción entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 10 días. Preferiblemente, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C, oscilando los tiempos de reacción entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 5 días. Más preferiblemente, pueden llevarse a cabo reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C, oscilando los tiempos de reacción entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 días. Pueden llevarse a cabo la mayor parte de las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c tal como se representa en el esquema 5 a temperatura ambiente oscilando los tiempos de reacción entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 días.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, puede llevarse a cabo la eliminación de los grupos protectores de cadena lateral tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente -20°C a aproximadamente 60°C. Puede realizarse esta reacción en un disolvente compatible tal como diclorometano usando entre aproximadamente el 5% de ácido trifluoroacético (TFA) y el 50% de TFA en volumen. Preferiblemente, puede llevarse a cabo la eliminación de grupos protectores mediada por ácido tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, usando de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 25% de TFA en volumen. Más preferiblemente, puede llevarse a cabo la eliminación de grupos protectores mediada por ácido tal como se representa en el esquema 5 a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 25°C usando de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% de TFA en volumen en diclorometano. Lo más preferiblemente, puede llevarse a cabo la eliminación de grupos protectores mediada por ácido tal como se representa en el esquema 5 a temperatura ambiente usando aproximadamente el 20% en volumen en diclorometano.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, pueden purificarse los productos 5d representados en el esquema 4 mediante HPLC de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico o diálisis con membrana. Más preferiblemente, puede usarse una combinación de dos o más de las técnicas de purificación mencionadas anteriormente o bien en combinación o bien secuencialmente para proporcionar conjugados purificados de la presente invención.

En otra realización del procedimiento representado en el esquema 5, junto con cualquiera de las realizaciones anteriores o a continuación, puede llevarse a cabo el método de purificación más de una vez.

Derivados. También se contemplan en el presente documento derivados de los péptidos y/o péptidos conjugados de la presente invención. Tales derivados pueden mejorar adicionalmente la solubilidad, absorción, semivida biológica, y similares, de los péptidos conjugados con vehículo o PEG dados a conocer en el presente documento. Los restos añadidos pueden eliminar o atenuar alternativamente cualquier característica no deseable de los péptidos y/o péptidos conjugados dados a conocer en el presente documento. Los derivados a modo de ejemplo incluyen péptidos conjugados con vehículo o PEG, en los que:

1. Los péptidos y/o péptido conjugado o alguna parte de los mismos es cíclico. Por ejemplo, la parte de péptido de un péptido y/o péptido conjugado puede modificarse para contener dos o más residuos de cisteína (por ejemplo, en el ligador de peptidilo), que podrían ciclarse mediante la formación de enlaces disulfuro. Para citas a referencias sobre la preparación de derivados ciclados, véase el documento WO 00/24782.

2. El péptido y/o péptido conjugado con vehículo o PEG se entrecruza o se hace que pueda entrecruzarse entre moléculas. Por ejemplo, la parte de péptido de un péptido conjugado puede modificarse para contener un residuo de Cys y de ese modo puede formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar.

3. Se sustituyen una o más uniones peptidilo [-C(O)NR-] (enlaces peptídicos) por una unión distinta a peptidilo. Uniones distintas a peptidilo a modo de ejemplo son -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-], fosfonato, -CH₂-sulfonamida

$[-CH_2-S(O)_2NR-]$, urea $[-NHC(O)NH-]$, $-CH_2$ -amina secundaria y péptido alquilado $[-C(O)NR^6-]$ en la que R^6 es alquilo inferior].

4. El residuo de cisteína N-terminal de un péptido conjugado en X^1 puede sustituirse por un grupo de derivado N-terminal. Los grupos de derivados N-terminales a modo de ejemplo incluyen $-NHR^1$ en la que R^1 es monoalquilo.

5 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para el entrecruzamiento de los péptidos conjugados con vehículo o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo) y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivatización tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]-propioimidato de metilo proporcionan productos intermedios fotoactivables que pueden formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, se emplean matrices insolubles en agua reactivas tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537 y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Los grupos de hidrato de carbono (oligosacárido) pueden unirse convenientemente a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, se unen oligosacáridos con unión a O a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos con unión a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-Aaa-Ser/Thr, en la que Aaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Aaa es preferiblemente uno de los diecinueve aminoácidos que se producen de manera natural distintos a prolina. Las estructuras de los oligosacáridos con unión a N y con unión a O y los residuos de azúcar que se encuentran en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal tanto de oligosacáridos con unión a N como con unión a O y, en virtud de su carga negativa, pueden conferir propiedades ácidas al péptido conjugado glicosilado. Tal(es) sitio(s) pueden incorporarse en el ligador de los péptidos conjugados con vehículo de la invención. Tales sitios pueden glicosilarse adicionalmente mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

Otras posibles modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, oxidación del átomo de azufre en cisteína, metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina y/o histidina (Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)).

A menos que se dé a conocer de otro modo en el presente documento, la síntesis de los péptidos y/o péptidos conjugados descritos en el presente documento, incluyendo la preparación de derivados de aminoácidos apropiados, su activación y acoplamiento para formar péptidos y métodos para la purificación de péptidos y la determinación de su pureza están incluidos en el conjunto general de conocimiento de la química de péptidos, tal como se describe generalmente en Houben-Weyl "Methoden der Organischen Chemie" Vol. 16, partes I y II, (1974) para la síntesis en fase de disolución. Para la síntesis mediante el método en fase sólida, también se conocen técnicas adecuadas en la técnica, e incluyen las descritas en Merrifield, *Chem. Polypeptides*, páginas 335-361 (Katsyannis y Panayotis editores) (1973); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, Volumen 85, página 2149 (1963); Davis *et al.*, *Biochem. Intl.*, Volumen 10, páginas 394-414 (1985); Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (1969); la patente estadounidense n.º 3.941.763; Finn *et al.*, *The Proteins* (3ª edición), Volumen 2, páginas 105-253 (1976); y Erickson *et al.*, *The Proteins* (tercera edición), Volumen 2, páginas 257-527 (1976). Un químico experto en la técnica de síntesis de péptidos podría sintetizar los péptidos descritos mediante métodos en disolución convencionales o mediante métodos en fase sólida manuales o automáticos. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales debido a su rentabilidad.

Composiciones farmacéuticas

En general. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la invención, por ejemplo, para su uso en la prevención o el tratamiento de la inflamación y el dolor (incluyendo, pero sin limitarse a, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas). Los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la invención también tienen valor terapéutico para la prevención o el tratamiento de otros estados dolorosos asociados con o mediados por la activación de B1, incluyendo, pero sin limitarse a, síndrome de dolor talámico, diabetes, toxinas y quimioterapia, choque séptico, artritis, síndromes mixtos vasculares y no vasculares, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, trastornos inflamatorios del intestino, trastornos inflamatorios oculares, trastornos vesicales inflamatorios o inestables, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorias, quemadura solar, carditis, enfermedad inflamatoria del intestino, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, disfunción o daño tisular epitelial, herpes simple, dolor debido a neuropatía diabética, neuralgia posherpética, causalgia, dolor mantenido por el sistema simpático, síndromes de desaferenciación, cefalea tensional, angina, migraña, dolor quirúrgico, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, rinitis alérgica, asma, reacciones cutáneas alérgicas, prurito,

vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, úlcera gástrica, úlceras duodenales o rinitis vasomotora o alérgica.

La invención también prevé el uso de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la presente invención para la prevención o el tratamiento de dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en brotes, síndromes mixtos vasculares y no vasculares, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, trastornos inflamatorios del intestino, trastornos inflamatorios oculares, trastornos vesicales inflamatorios o inestables, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorias, quemadura solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor debido a neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido por el sistema simpático, síndromes de desaferenciación, asma, rinitis alérgica, disfunción o daño tisular epitelial, herpes simple, neuralgia posherpética, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, úlcera gástrica, úlceras duodenales y trastornos bronquiales.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de uno o más de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno tal como dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en brotes, síndromes mixtos vasculares y no vasculares, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, trastornos inflamatorios del intestino, trastornos inflamatorios oculares, trastornos vesicales inflamatorios o inestables, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorias, quemadura solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor debido a neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido por el sistema simpático, síndromes de desaferenciación, asma, rinitis alérgica, disfunción o daño tisular epitelial, herpes simple, neuralgia posherpética, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, úlcera gástrica, úlceras duodenales y trastornos bronquiales.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto del dolor y/o la inflamación, incluyendo dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático o tras cirugía. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: incluyendo disminución de la intensidad, alivio de uno o más síntomas asociados con el dolor y/o la inflamación incluyendo cualquier aspecto del dolor y/o la inflamación (tal como acortamiento de la duración del dolor y/o la inflamación, y/o reducción de la sensación o la sensibilidad al dolor).

Tales composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden ser para la administración mediante inyección, o para la administración oral, pulmonar, nasal, transdérmica u otras formas de administración. En general, la invención engloba composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de al menos un péptido y/o al menos un péptido conjugado con vehículo de la invención (en cantidades eficaces para prevenir, mejorar o suprimir el dolor o cualquiera de los otros estados médicos proporcionados en el presente documento) junto con diluyentes, excipientes, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes de solubilización (por ejemplo, Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimerosal, alcohol bencílico) y sustancias espesantes (por ejemplo, lactosa, manitol); la incorporación del material en preparaciones particuladas de péptidos conjugados con vehículo poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc. o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Tales composiciones pueden influir adicionalmente en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de los péptidos conjugados con vehículo de la presente invención. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición., Mack Publishing Co., Easton, PA, páginas 1435-1712 (1990). Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o como un polvo secado (tal como forma liofilizada). También se contemplan formulaciones implantables de liberación sostenida, como son las formulaciones transdérmicas.

Formas de dosificación orales. Se contemplan para su uso en el presente documento formas de dosificación sólidas orales, que se describen generalmente en el capítulo 89 de Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente. Las formas de dosificación sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas, trociscos o pastillas para chupar, sellos

- o microgránulos. Además, puede usarse la encapsulación liposómica o proteínica para formular las presentes composiciones (tal como, por ejemplo, las microesferas proteínicas notificadas en la patente estadounidense n.º 4.925.673). Puede usarse la encapsulación liposómica, y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.013.556). Se facilita una descripción de posibles formas de dosificación sólidas en el capítulo 10 de Marshall, K., *Modern Pharmaceutics*, editado por G. S. Banker y C. T. Rhodes (1979). En general, la formulación incluirá un péptido conjugado con vehículo de la invención, así como componentes inertes que permite la protección frente al entorno del estómago y la liberación del péptido conjugado con vehículo en el intestino.
- También se contemplan específicamente formas de dosificación orales de los propios péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la invención. A este respecto, si es necesario, los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo pueden modificarse químicamente de modo que la administración oral sea eficaz.
- También es posible usar una sal de un aminoácido alifático modificado, tal como N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprilato de sodio (SNAC), como portador para potenciar la absorción de los péptidos conjugados con vehículo de la invención. Véase la patente estadounidense n.º 5.792.451, titulada "Oral Drug Delivery Composition and Methods".
- Los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la invención pueden incluirse en la formulación como productos multiparticulados finos en forma de gránulos o microgránulos de un tamaño de partícula de aproximadamente un milímetro. La formulación del material para la administración en cápsula también podría ser como un polvo, como tapones ligeramente comprimidos, o incluso como comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse mediante compresión.
- Los colorantes y agentes aromatizantes pueden estar incluidos todos ellos. Por ejemplo, el péptido y/o péptido conjugado con vehículo o cualquier derivado de los mismos puede formularse (tal como mediante encapsulación en liposomas o microesferas) y luego estar contenido adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.
- Puede diluirse o aumentarse el volumen del péptido y/o péptido conjugado con vehículo de la invención con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente, manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También pueden usarse determinadas sales inorgánicas como cargas, incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.
- Pueden incluirse disgregantes en la formulación del agente terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el disgregante disponible comercialmente basado en almidón, Explotab. También pueden usarse glicolato sódico de almidón, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes, y éstas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, goma karaya o goma tragacanto. El ácido algínico y su sal de sodio también son útiles como disgregantes.
- Pueden usarse aglutinantes para mantener los componentes de la composición farmacéutica juntos para formar un comprimido duro, e incluyen materiales procedentes de productos naturales tales como goma arábiga, goma tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinilpirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) podrían usarse ambas en disoluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.
- Puede incluirse un agente antifricción en la formulación para impedir la adherencia durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como una capa entre el agente terapéutico y la pared del troquel, y éstos pueden incluir, pero sin limitarse a: ácido esteárico, incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, ceras y aceites vegetales. También pueden usarse lubricantes solubles tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.
- Podrían añadirse deslizantes que podrían mejorar las propiedades de flujo del péptido conjugado con vehículo durante la formulación y ayudar a la reorganización durante la compresión. Tales deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.
- Para ayudar a la disolución del péptido y/o péptido conjugado con vehículo de la invención en el entorno acuoso, podría añadirse un surfactante como agente humectante. Tales surfactantes pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y pueden incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de posibles detergentes no iónicos que pueden incluirse en la formulación como surfactantes son laurómacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de sacarosa de ácidos grasos, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos surfactantes pueden

estar presentes en la formulación o bien solos o bien como una mezcla en diferentes razones.

También pueden incluirse aditivos en la formulación para potenciar la captación de los péptidos y/o péptido conjugado con vehículo. Los aditivos que tienen potencialmente esta propiedad incluyen diversos ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

- 5 Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. El péptido y/o péptido conjugado con vehículo de la invención puede incorporarse en una matriz inerte que permite la liberación mediante mecanismos de o bien difusión o bien lixiviación, por ejemplo, gomas. También pueden incorporarse matrices de degradación lenta en la formulación, por ejemplo, alginatos o polisacáridos. Otra forma de una liberación controlada del péptido y/o péptido conjugado con vehículo de la invención es mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco se encierra en una membrana semipermeable que permite que entre agua y que empuja el fármaco hacia fuera a través de una única pequeña abertura debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retardada.

- 10 Formas de administración pulmonar. También se contempla en el presente documento la administración pulmonar de una composición farmacéutica según la invención. El péptido y/o péptido conjugado con vehículo (o derivados de los mismos) se administra a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hasta el torrente sanguíneo. Los informes relativos a la administración pulmonar de macromoléculas que pueden ser útiles a este respecto incluyen Adjei *et al.*, *Pharma. Res.*, Volumen 7, páginas 565-569 (1990); Adjei *et al.*, *Internatl. J. Pharmaceutics*, Volumen 63, páginas 135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Volumen 13 (supl. 5), s. 143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard *et al.*, *Annals Int. Med.*, Volumen 3, páginas 206-12 (1989) (α 1-antitripsina); Smith *et al.*, *J. Clin. Invest.*, Volumen 84, páginas 1145-1146 (1989) (α 1-proteinasa); Oswein *et al.*, "Aerosolization of Proteins", *Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II*, Keystone, Colorado (1990) (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs *et al.*, *J. Immunol.*, Volumen 140, páginas 3482-3488 (1988) (interferón- γ y factor de necrosis tumoral α); y la patente estadounidense n.º 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos).

- 25 Se contempla para su uso en la práctica de la invención una amplia variedad de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, estando familiarizados con todos ellos los expertos en la técnica. Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles comercialmente adecuados para la práctica de la invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medidas Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

- 30 Todos los dispositivos de este tipo requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo descritos en el presente documento y/o derivados de los mismos. Normalmente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de diluyentes, excipientes adyuvantes y/o portadores útiles en terapia.

- 35 Los portadores farmacéuticamente aceptables para estas composiciones pulmonares incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros componentes para su uso en las formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Pueden usarse surfactantes naturales o sintéticos. Puede usarse PEG (incluso aparte de su uso en la derivatización del péptido). También pueden usarse dextranos, tales como ciclodextrano, sales biliares, celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tal como en una formulación de tampón.

Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de portadores.

- 45 Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, o bien del tipo de chorro o bien ultrasónico, comprenderán normalmente el péptido y/o péptido conjugado con vehículo descrito disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 miligramos (mg) de agente biológicamente activo por mililitro (ml) de disolución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización del péptido y la regulación de la presión osmótica). La formulación de nebulizador también puede contener un surfactante, para reducir o impedir la agregación inducida en superficie de la proteína provocada por la atomización de la disolución en la formación del aerosol.

- 50 Las formulaciones para su uso con un dispositivo de inhalador de dosis medidas comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el péptido y/o péptido conjugado con vehículo descrito suspendido en un propelente con la ayuda de un surfactante. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidroclofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los surfactantes adecuados incluyen trioleato de sorbitano y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como surfactante.

Las formulaciones para la dispensación desde un dispositivo de inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo descritos y también pueden incluir un agente de espesante, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, del 50 al 90% en peso de formulación.

- 5 Formas de administración nasal. También se contempla la administración nasal del péptido y/o péptidos conjugados con vehículo. La administración nasal permite el paso del péptido y/o péptidos conjugados con vehículo de la invención al torrente sanguíneo directamente tras la administración del producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquéllas con dextrano o ciclodextrano. También se contempla la administración mediante el transporte a través de otras
- 10 membranas mucosas.

Administración en bomba. En determinadas realizaciones de la presente invención, se contempla la administración localizada de los péptidos y/o péptidos conjugados de la presente invención para tratar o prevenir trastornos mediados por B1. Un método de administración localizada contemplado por la invención es la inyección del agente en un sitio local en el que actúa el agente.

- 15 Otro método para la administración localizada incluye insertar un catéter para dirigir el/los fármaco(s) hasta el sitio corporal deseado, y usar una bomba para impulsar un/unos fármaco(s) a través del catéter. Las bombas de fármacos que se llevan puestas de manera externa usadas con un catéter implantado de manera interna se conocen bien por los expertos en la técnica.

- Aún otro método para la administración localizada incluye dispositivos de administración de fármacos implantables. Se han desarrollado bombas implantables para tratar las desventajas de las técnicas que usan una bomba externa y los sistemas de catéter se conocen bien por los expertos en la técnica. Las bombas de administración de fármacos implantables incluyen a menudo un depósito para almacenar el fármaco, un orificio de inyección para permitir la inyección de nuevas preparaciones farmacológicas así como la retirada del fármaco antiguo a intervalos regulares del depósito, y opcionalmente un catéter para administrar el fármaco al sitio deseado. Los dispositivos implantables
- 20 preferidos incluyen, pero no se limitan a, el implante Duros (Alza Corporation, Mountain View, CA), el sistema de infusión SynchroMed I o II (Medtronic, Inc., Minneapolis), y similares.

Adicionalmente (o alternativamente), la presente invención proporciona péptidos y/o péptidos conjugados para su uso en cualquiera de las diversas formulaciones de liberación lenta o sostenida o formulaciones de micropartículas mencionadas previamente antes en el presente documento y/o conocidas por el experto.

- 30 Dosificaciones. Pueden determinarse dosificaciones eficaces de los péptidos y/o péptidos conjugados de la invención que van a administrarse a través de procedimientos bien conocidos por las personas en la técnica que tratan parámetros tales como semivida biológica, biodisponibilidad y toxicidad. En realizaciones preferidas, se determina un intervalo de dosificación eficaz por un experto en la técnica usando datos de estudios de rutina *in vitro* e *in vivo* bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de cultivo celular *in vitro*, tales como los ensayos a modo de ejemplo descritos en el ejemplo 6 a continuación proporcionarán datos a partir de los cuales un experto en la técnica puede determinar fácilmente la concentración inhibidora media (CI) o la concentración eficaz media (CE) del péptido o el péptido conjugado necesaria para bloquear cierta cantidad de actividad inducida por B1 (por ejemplo, el 50%, CI_{50} ; o el 90%, CI_{90}). Pueden seleccionarse entonces dosis apropiadas por un experto en la técnica usando datos farmacocinéticos de uno o más modelos animales de rutina, tales como los datos farmacocinéticos a modo de ejemplo descritos en el ejemplo 9, a continuación, de modo que se obtiene una concentración plasmática mínima (C_{min}) del péptido que es igual a o supera el valor de CI determinado. El régimen de dosificación implicado en un método para tratar la enfermedad o el trastorno implicado lo determinará el médico encargado, considerando diversos factores que modifican la acción de los agentes terapéuticos, tales como la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad del estado que está
- 35 tratándose, el momento de la administración y otros factores clínicos. Generalmente, el régimen diario debe estar en el intervalo de 1,0-10000 microgramos (μg) del péptido y/o péptido conjugado con vehículo por kilogramo (kg) de peso corporal, preferiblemente 1,0-1000 μg por kilogramo de peso corporal, y lo más preferiblemente 1,0-150 μg por kilogramo de peso corporal.

- 50 Terapia de combinación. En otro aspecto, la presente invención incluye usos medicinales para tratar (o, en otras realizaciones, prevenir) el dolor y/o la inflamación, o cualquier estado o trastorno asociado con la activación de B1, van a administrarse una cantidad de péptido y/o péptido conjugado de la presente invención y una cantidad de un AINE. El término "AINE" se refiere a un compuesto antiinflamatorio no esteroideo. Las cantidades relativas y las razones de antagonista peptídico y/o antagonista peptídico conjugado y AINE pueden variar. En algunas realizaciones, va administrarse suficiente cantidad del/de los péptido(s) y/o péptido(s) conjugado(s) de modo que se permita la reducción de la dosis normal de AINE requerida para efectuar el mismo grado de mejora del dolor o la inflamación. En algunas realizaciones, se administrará suficiente cantidad de un/unos péptido(s) y/o péptido(s) conjugado(s) de la presente invención de modo que se permita la reducción de la dosis normal de AINE requerida para efectuar el mismo grado de mejora del dolor o la inflamación en al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos
- 60

aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80% o al menos aproximadamente el 90%, o más. Esta reducción puede reflejarse en cuanto a la cantidad administrada en una administración dada y/o la cantidad administrada a lo largo de un periodo de tiempo dado (frecuencia reducida).

En otro aspecto, la invención proporciona medios para potenciar el tratamiento con AINE de dolor o inflamación, van a administrarse una cantidad eficaz de un AINE junto con una cantidad eficaz de al menos un péptido y/o al menos un péptido conjugado de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, "administración junto con" también pretende englobar cualquier circunstancia en la que van a administrarse un AINE y un péptido y/o péptido conjugado de la presente invención en una cantidad eficaz a un individuo. "Administración junto con", tal como se usa en el presente documento, comprende la administración simultánea y/o la administración en diferentes momentos. La administración junto con también engloba la administración como una coformulación (es decir, el péptido y/o péptido conjugado de la presente invención y el AINE están presentes (combinados) en la misma composición) y/o la administración como composiciones independientes. Se entiende que el/los péptido(s) y/o péptido(s) conjugado(s) de la presente invención y al menos un AINE pueden administrarse a diferentes frecuencias y/o intervalos de dosificación. Por ejemplo, un péptido conjugado de la presente invención puede administrarse semanalmente, mientras que un AINE puede administrarse con más frecuencia. Se entiende que el/los péptido(s) y/o péptido(s) conjugado(s) de la presente invención y el AINE pueden administrarse usando la misma vía de administración o diferentes vías de administración, y que pueden cambiarse diferentes regímenes de dosificación a lo largo del transcurso de la(s) administración/administraciones. La administración puede ser incluso antes de la aparición de dolor o inflamación. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona medios para tratar, reducir la incidencia de, paliar y/o retardar el desarrollo o la progresión de dolor y/o inflamación en un individuo, comprendiendo dichos medios administrar una cantidad eficaz de al menos un péptido y/o al menos un péptido conjugado de la presente invención junto con una cantidad eficaz de al menos un AINE que van a administrarse. Tales medios incluyen tratar o prevenir cualquier dolor y/o inflamación de cualquier etiología, incluyendo dolor y/o inflamación en el que generalmente está prescrito el uso de un AINE. Tales medios también son adecuados para tratar o prevenir cualquier estado o trastorno mencionado previamente antes en el presente documento o a continuación en el presente documento que está mediado por o asociado con la activación de B1. En algunas realizaciones, el dolor y/o la inflamación es dolor tras cirugía. En algunas realizaciones, el dolor y/o la inflamación están asociados con quemaduras o heridas. En otras realizaciones, el dolor y/o la inflamación están asociados con artritis reumatoide. En otras realizaciones, el dolor y/o la inflamación están asociados con osteoartritis. En otras realizaciones, el dolor y/o la inflamación están asociados con neuralgia posherpética. En algunas realizaciones, el AINE se selecciona del grupo que consiste en aspirina, paracetamol, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, Naprosyn, diclofenaco, ketoprofeno, tolmetina, sulindac, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, diflunisal, Rufenisal, piroxim, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, rofecoxib, DUP-697, flosulida, meloxicam, ácido 6-metoxi-2-naftilacético, MK-966, nabumetona, nimesulida, NS-398, SC-5766, SC58215, T-614 o combinaciones de los mismos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para fines ilustrativos únicamente y no pretenden, ni deben interpretarse, como limitativos de la invención en modo alguno. Pueden sintetizarse compuestos según la invención según uno o más de los siguientes métodos. Debe indicarse que los procedimientos generales se muestran en lo que se refiere a la preparación de compuestos que tienen estereoquímica no especificada. Sin embargo, tales procedimientos pueden aplicarse generalmente a aquellos compuestos de una estereoquímica específica, por ejemplo, cuando la estereoquímica alrededor de un grupo es (S) o (R). Además, los compuestos que tienen una estereoquímica (por ejemplo, (R)) pueden utilizarse a menudo para producir aquellos que tienen estereoquímica opuesta (es decir, (S)) usando métodos bien conocidos, por ejemplo, mediante inversión.

Ejemplo 1: Síntesis y purificación de antagonistas peptídicos del receptor B1 y antagonistas peptídicos del receptor B1 conjugados con PEG.

Se sintetizaron diversos péptidos de la invención usando técnicas de síntesis bien conocidas en la técnica. Un método preferido de síntesis de diversos péptidos de la invención usa una estrategia con Fmoc con activación de carbodiimida tal como se describe a continuación.

Parte 1: Disolver Fmoc-aminoácido en resina usando la química de la carbodiimida.

Se disolvió Fmoc-aminoácido (3-4 equivalentes) en mezcla de NMP/DCM seca (se usó NMP o DMF para ayudar a la disolución completa). Se añadió una disolución de N-hidroxibenzotriazol (HOBt, mismos equivalentes que el aminoácido) en NMP a la disolución de aminoácido. Se añadió una disolución de N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC, mismos equivalentes que el aminoácido) en DCM a la disolución de aminoácido. Se mezcló la disolución durante aproximadamente 20 minutos. Entonces se añadió la disolución de ácido activada a resina (si era necesario, se eliminaron los precipitados antes de la adición). Se agitó la reacción hasta que la resina fue negativa mediante la prueba con ninhidrina. Tras la finalización del acoplamiento, se recogió la resina y se lavó con DMF varias veces.

Parte 2: Eliminar el Fmoc N-terminal de péptido-resina.

Se trató la resina de peptidilo protegido con Fmoc, con piperidina/DMF (2/8) durante 3 minutos. Se escurrió la resina

y se repitió el tratamiento durante 15 min. Se lavó la resina con DMF y luego DCM varias veces. Se secó al aire la resina si la siguiente etapa implicaba la escisión del péptido de la resina tal como se describe en la etapa 3.

Parte 3: Escisión de TFA y desprotección.

5 Se puso la resina secada de la parte 2 en un matraz y se añadieron 10-25 ml/g de resina de cóctel de escisión (el 95% de TFA, el 2,5% de agua, el 1,5% de triisopropilsilano y el 1% de etanoditol). Tras agitar la reacción durante 3-4 horas, se eliminó la resina mediante filtración a presión reducida y se lavó dos veces con TFA. Se concentraron los filtrados combinados hasta ~20% mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se enfrió el líquido hasta -50°C, y se precipitó con un volumen de 10 veces de éter seco y frío. Se recogió el precipitado. Entonces se disolvió el péptido en una mezcla de agua/acetonitrilo que contenía el 0,5% de TFA y se liofilizó. Entonces se purificó el producto en bruto usando HPLC C18, con un gradiente desde el 10% de acetonitrilo/0,1% de TFA en agua hasta el 10 50% de acetonitrilo/0,1% de TFA en agua. Para 1 g de producto en bruto, se usó una columna C18 de 250x50 mm a una velocidad de flujo de 90 ml/min en una HPLC prep. de Agilent con detección con doble longitud de onda a 215 y 254 nm. Se fraccionó la inyección y se analizó cada fracción mediante espectrometría de masas. Se reunieron los tubos basándose en la espectrometría de masas, se concentraron a presión reducida para eliminar el acetonitrilo y se liofilizaron para obtener los antagonistas peptídicos de B1 como polvos de color blanco. Se logró la 15 caracterización mediante HPLC-EM y determinación de masas Maldi-TOF.

Se prepararon diversos péptidos conjugados con PEG de la invención tal como sigue.

20 Se sintetizaron diversos antagonistas peptídicos del receptor B1 de bradicinina activos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 5-60) con diferentes ligadores de peptidilo en el extremo N-terminal, y que contienen cada uno una penúltima cisteína usando los métodos mencionados anteriormente (por ejemplo, SEQ ID NOS: 27-41). Estos análogos peptídicos se derivatizaron con diferentes tamaños y configuraciones de poli(etilenglicol) (PEG) a través de acoplamiento dirigido al sitio del polímero activado por maleimida al tiol de la cisteína N-terminal de los análogos peptídicos usando, por ejemplo, el método A o el método B descritos a continuación. Se purificaron los conjugados de PEG-péptido resultantes mediante cromatografía de intercambio iónico, se concentraron mediante liofilización o diafiltración y se dializaron en tampón antes del bioensayo *in vitro* e *in vivo*. 25

Método A:

30 Se prepararon péptidos conjugados con PEG haciendo reaccionar un péptido que contiene cisteína con PEG-maleimida en NaHPO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5 a 2,5-5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de un exceso molar de 1,2 veces de maleimida:tiol. Se agitó la reacción a temperatura ambiente (20-25°C) durante 1-1,5 h. Una vez completa, se extinguió la reacción con un exceso molar de 10 veces de β-mercaptoetanol (β-ME):maleimida y se permitió agitar 30-60 minutos adicionales a temperatura ambiente.

35 Se monitorizó el avance de la reacción usando HPLC de fase inversa (RP-HPLC) mediante inyección de 5 µl de la reacción a una columna C4, de 4,6 x 250 mm, 5 micrómetros (Grace Vydac, Columbia, MD; n.º de cat.: #214TP54). Se eluyen el péptido sin reaccionar y el conjugado de PEG-péptido con un gradiente lineal del 5-90% de acetonitrilo en el 0, 1% de ácido trifluoroacético. Normalmente, > 90% del análogo peptídico se consume en la reacción.

Los polímeros de PEG activados por maleimida lineales (PM = 5 kD o 20 kD, PD=1,01-1,02) los proporcionó Shearwater Corp. o NOF Corp. (Tokio, Japón).

Purificación:

40 Se purificaron los péptidos conjugados con PEG mediante cromatografía de intercambio catiónico usando columnas de SP Sepharose HP (Amersham Biosciences) preequilibradas con NaOAc 10 mM, el 20% de EtOH, pH 4. Antes de la carga, se diluyeron las mezclas de reacción 10 veces con el 20% de EtOH y se ajustó el pH a 3,5 con ácido acético glacial. Se cargaron las mezclas de reacción diluidas hasta una columna de tamaño apropiado de manera que no se superase una razón de péptido:resina de 2,5 mg/ml.

45 Entonces se lavó la columna con 2 volúmenes de columna (VC) de NaOAc 10 mM, el 20% de EtOH, pH 4 y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-200 mM en NaOAc 10 mM, el 20% de EtOH, pH 4 a lo largo de 10-20 VC. Se detectaron el péptido sin modificar y el conjugado de PEG-péptido monitorizando la absorbancia o bien a 254 nm o bien a 220 nm. En estas condiciones, se eliminaron por lavado el PEG y β-ME en exceso en la fracción no retenida y no unida, el conjugado eluyó en un pico ancho que comenzaba en NaCl ~50 mM y el péptido libre se resolvió bien, eluyendo a NaCl ~200 mM.

50 Se evaluaron las fracciones de picos eluidas mediante RP-HPLC y se combinaron basándose en la homogeneidad y los tiempos de retención que concordaban con el conjugado de PEG-péptido. Se concentró el pico de conjugado combinado mediante secado, luego se reconstituyó con agua y se dializó frente a tampón. Alternativamente, puede usarse diafiltración para concentrar y realizar el intercambio de tampón del conjugado.

55 Se analizaron las combinaciones finales de conjugados de PEG-péptido mediante RP-HPLC y fueron normalmente ~98% de conjugado. Se determinaron la composición y las concentraciones de conjugado mediante una

combinación de análisis de aminoácidos, secuenciación de péptidos y espectroscopía de absorbanza.

Se monitorizó la estabilidad en disolución de los compuestos representados por 1c en el esquema 1 a la temperatura ambiental en solución salina tamponada con fosfato de pH=7,2 (PBS) con el tiempo usando el método CEX descrito anteriormente (figura 1 (A)). Se mostró que el compuesto 1c se convertía rápidamente en 1d así como en dos productos que resultan de la hidrólisis del resto de succinimida (estructuras determinadas mediante una combinación de experimentos de IR, EM/EM y RMN).

Método B:

Se disolvió mPEG-maleimida (1,0 eq.) a 30°C en MeOH anhidro en un matraz de fondo redondo de 3 bocas equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura y una entrada de N₂. Tras la disolución total de mPEG-maleimida, se añadió un péptido que contenía un residuo de cisteína N-terminal (1,3 eq.) a la disolución transparente y se agitó a t.a. durante 3 h. La HPLC de fase inversa muestra la desaparición de mPEG-maleimida y un nuevo pico para el aducto de 3-sulfanil-succinimida inicial. A continuación, se añadieron diez equivalentes de diisopropil-etilamina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) a la disolución y se agitó a 25°C durante al menos 24 horas. Se monitorizó la reacción mediante cromatografía de intercambio iónico usando TOSHAAS SP-5PW (20 µm) como fase estacionaria. El análisis CEX indicó una conversión superior al 98% quedando menos del 1,5% del aducto de 3-sulfanil-succinimida. Se añadió terc-butil metil éter (TBME) (el doble del volumen de metanol usado en la reacción) y se agitó la disolución turbia resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró por filtración el precipitado de color blanco y se secó a vacío a temperatura ambiente durante la noche para proporcionar el producto ligado en bruto de 6-metil-carbamoil-5-oxo-tiomorfolin-3-carboxamida (1d).

Purificación:

Se purificó el producto en bruto anterior mediante RP-HPLC usando el sistema MeOH-H₂O-AcOH (c18 YMC ODS NQ como fase estacionaria) para proporcionar el producto ligado de 6-metil-carbamoil-5-oxo-tiomorfolin-3-carboxamida con una pureza > 98% mediante cromatografía de fase inversa analítica. Se combinaron las fracciones puras y se concentraron hasta sequedad a vacío y se disolvió el residuo de color blanco resultante en la mínima cantidad de MeOH caliente (~30°C) suficiente para proporcionar una disolución transparente, luego se trató con TBME (el doble del volumen de MeOH usado). Se agitó la disolución turbia resultante a temperatura ambiente durante 1 hora y se retiró por filtración el precipitado, se secó a vacío a temperatura ambiente durante al menos 16 horas. Se obtiene el producto puro (1d) como un producto de color blanquecino con un rendimiento global del 74% con una pureza > 98% por CEX y RPC. Se determinaron la composición del conjugado y el contenido peptídico mediante una combinación de análisis de aminoácidos, secuenciación de péptidos, métodos de RMN multinuclear y espectroscopía de absorbanza. Se monitorizó la estabilidad en disolución del compuesto 1d a la temperatura ambiental en solución salina tamponada con fosfato de pH =7 (PBS) con el tiempo usando el método CEX descrito anteriormente. Este compuesto probó ser significativamente más estable, sin cambios significativos observados a lo largo de seis días.

Se realizó cromatografía de fase inversa analítica (RP) e intercambio catiónico (CEX) con sistemas Agilent 1100 HPLC con detector de red de diodos o longitud de onda variable e inyector automático termostatzado. Se exponen brevemente condiciones cromatográficas convencionales a continuación.

1. Condiciones del método de RP-HPLC

Columna: YMC ODS-AQ, 3 µm, 120 Å, 4,6 x 100 mm

Temp. de columna 40°C

Fases móviles: A) 0,1% de TFA en agua
B) 0,1% de TFA en MeOH

Velocidad de flujo: 1,1 ml/min

Gradiente: Tiempo % de B

0	5
10	40
30	95
35	95
35,1	5
40	5

Detección: UV a 220 nm

Volumen de inyección: 20 µl o 50 µl dependiendo de la concentración de la muestra

Concentración de la muestra: de 2,5 a 10 mg/ml

Diluyente de muestra: PBS de Dulbecco y otros tampones usados en los estudios de estabilidad

5 2. Método de cromatografía de intercambio catiónico analítico general

Columna: TOSOH, TSK-GEL, SP-5PW, 10 µm, 7,5 x 75 mm

Temp. de columna 25°C

Fases móviles: A) NaH₂PO₄ 20 mM en agua/EtOH (8:2), pH de 3,5

B) NaH₂PO₄ 20 mM y NaCl 0,5 M en agua/EtOH (8:2), pH de 3,5

10 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: Tiempo B%

0 0

3 0

25 45

15 40 100

45 100

45,1 0

50 0

Detección: UV a 220 nm

20 Volumen de inyección: de 10 a 50 µl dependiendo de la concentración de la muestra

Concentración de la muestra: de 2,5 a 10 mg/ml

Diluyente de muestra: PBS de Dulbecco y otros tampones usados en los estudios de estabilidad

Ejemplo 2: Síntesis y purificación de antagonistas peptídicos del receptor B1 conjugados con PEG usando tioésteres de PEG.

25 Se prepararon péptidos conjugados con PEG haciendo reaccionar un péptido que contiene cisteína con PEG-maleimida en NaHPO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7 a 2,5-5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de un exceso molar de 1,2 veces de maleimida:tiol. Se agitó la reacción a temperatura ambiente (20-25°C) durante 18-26 h. Una vez completa, se extinguió la reacción con un exceso molar de 10 veces de β-mercaptoetanol (β-ME):maleimida y se permitió agitar 30-60 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se purificaron las reacciones tal como se describe para el método A en el ejemplo 1 anteriormente.

Ejemplo 3: Síntesis y purificación de antagonistas peptídicos del receptor B1 conjugados con PEG usando tioésteres o yodoacetatos de PEG.

35 Se prepararon péptidos conjugados con PEG haciendo reaccionar un péptido que contiene un residuo de cisteína N-terminal con PEG-OPTE (tioéster de ortopiridilo) en NaHPO₄ 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7 a 2,5-5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de un exceso molar de 1,2 veces de PEG activado:péptido. Se agitó la reacción a temperatura ambiente (20-25°C) durante 18-26 h. Una vez completa, se extinguió la reacción con un exceso molar de 10 veces de cisteína:reactivo de PEG en exceso y se permitió agitar 30-60 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se purificaron las reacciones tal como se describe en el método A del ejemplo 1 anteriormente.

40 Alternativamente, puede usarse PEG-yodoacetamida tal como se describió anteriormente para formar conjugados en los que se une el resto de PEG mediante una unión tioéter (esquema 3). En este caso, se usan 1,5 equivalentes molares de la reacción de PEG activado y se aumenta el tiempo de reacción hasta 24 horas, se extingue la reacción con 10 equivalentes molares de β-mercaptoetanol purificado tal como se describió en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 4: Síntesis y purificación de antagonistas peptídicos del receptor B1 conjugados con PEG usando PEG-propionaldehído.

Pueden modificarse selectivamente de manera N-terminal con PEG antagonistas peptídicos del receptor B1 tales como una cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-60 y 27-41 usando el método descrito en la patente estadounidense 5.824.784. Por ejemplo, se disolvió el péptido mostrado en SEQ ID NO: 6 (245 mg, 0,14 mmol) en 10 ml de disolución que contenía NaH_2PO_4 100 mM y NaCNBH_3 60 mM. Se enfrió la mezcla hasta 4°C con agitación superior y se trató con 2,35 g de mPEG-propionaldehído 20 K (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL). Se agitó la mezcla durante 3 días, luego se purificó mediante cromatografía RP y CEX tal como se describe en el método B del ejemplo 1.

Alternativamente, pueden hacerse reaccionar PEG que contienen funcionalidades reactivas con amina con antagonistas peptídicos de B1 parcialmente protegidos según los métodos ilustrados en el esquema 5. Tras la reacción de conjugación, se escinden los grupos protectores de cadena lateral usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida y en disolución, y se purificaron los constructos de PEG-péptido resultantes tal como se describió anteriormente. También pueden hacerse reaccionar PEG-aldehídos multifuncionales (3-6 grupos reactivos) con cantidades molares en exceso de péptidos protegidos para proporcionar constructos de PEG multivalentes en los que se unen múltiples péptidos de una manera definida regioquímica y estequiométricamente.

Ejemplo 5: Síntesis y purificación de antagonistas peptídicos del receptor B1 conjugados con PEG usando PEG-N-hidroxi-succinimidias.

Pueden pegarse selectivamente antagonistas peptídicos del receptor B1 tales como una cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-60 en un átomo de nitrógeno de cadena lateral o N-terminal específico usando antagonistas peptídicos de B1 parcialmente protegidos según los métodos ilustrados en el esquema 5. Por ejemplo, se combinó una disolución de decapeptido parcialmente (1,43 g, 1,025 mmol) en 2,5 ml de DMF anhidra con 3,5 g (0,18 mmol) de Sunbright PTE-200GS (glutarato de succinimidilo de 4 brazos de 20 kD, NOF, Tokio, Japón) y 1,0 ml de diisopropiletilamina en 25 ml de diclorometano. Se agitó la disolución incolora resultante a temperatura ambiente durante 2 días, luego se evaporó a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en 25 ml de agua desionizada y se puso en una membrana de diálisis de punto de corte de PM de 10.000 (Pierce, Rockford IL, EE.UU.). Se dializó el compuesto frente a agua durante 24 horas (3 cambios de tampón), luego se liofilizó para proporcionar el producto de PEG tetravalente protegido. Se disolvió el sólido de color blanco resultante en 60 ml de diclorometano y se trató con 20 ml de TFA anhidro. Tras agitar a temperatura ambiente durante 2 días, se evaporó la mezcla de reacción a presión reducida, luego se disolvió y se dializó como anteriormente. Se liofilizó el material dializado, luego se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico tal como se describió previamente para proporcionar el producto tetravalente como un sólido de color blanco. De un modo similar, pueden usarse PEG que contienen 1-6 restos de glutarato de succinimidilo para preparar constructos peptídicos mono o polifuncionales.

Tabla 4a: Péptidos X¹

SEQ ID NO:	Secuencia del péptido X ¹
27	{N} CGGGKRPPGFSPL {C}
28	{N} CGGGGGKRPPGFSPL {C}
29	{N} CGGGGGKKRPPGFSPL {C}
30	{N} CGGGGGKKRPPGFSPL {C}
31	{N} CG-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -KRPPGFSPL {C}
32	{N} CGGGGGKKRPPG [AMeF] S [D-ss-Na] I {C}
33	{N} CGGGGGKKRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
34	{N} CGGGGGGGKKRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
35	{N} ac-CGGGGGGKKRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
36	{N} KKRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
37	{N} acil-KKRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
38	{N} CKRPPGFSPL {C}
39	{N} CGGGGG [DOm] KRP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
40	{N} CGGGGG [DOm] KRP [Thz] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}
41	{N} CGGGGGK [DOm] RP [Hyp] G [Cpg] S [DTic] [Cpg] {C}

Tabla 4b: Péptido Y¹

SEQ ID NO:	Secuencia del péptido Y ¹
42	{N} GGGGGKKRPPGFSPL {C}

Ejemplo 6: Actividad de inhibición de B1 *in vitro* de antagonistas peptídicos conjugados con PEG-péptido de la actividad de B1

Se identificaron péptidos y/o péptidos conjugados que podían inhibir selectivamente la actividad de B1 en comparación con la actividad de B2 usando ensayos tales como los descritos en las secciones A, B y C a

continuación.

A. Ensayo *in vitro* de la función del receptor B1 humano usando el flujo de calcio:

La activación del receptor B1 unido a G_q da como resultado un aumento en el calcio intracelular. Por tanto, puede usarse la fotoproteína sensible a calcio, aequorina, como indicador de la activación del receptor B1. La aequorina es una fotoproteína de 21 kDa que forma un complejo bioluminiscente cuando se une al cofactor cromóforo coelenterazina. Tras la unión del calcio a este complejo, una reacción de oxidación de coelenterazina da como resultado la producción de apoaequorina, coelenteramida, CO_2 y luz que puede detectarse mediante luminometría convencional

Se estableció una línea celular estable de CHO D-/receptor B1 humano (n.º de registro de GenBank AJ238044) /aequorina y se mantuvieron las células en suspensión en frascos de agitación que contenían una razón 1:1 de DMEM y HAM F12 (Gibco 11765-047), con alto contenido en glucosa (Gibco 11965-084), 10% de suero dializado inactivado por calor (Gibco 26300-061), 1X aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-050), 1X glutamina-pen-estrep. (Gibco 10378-016) e higromicina, 300 µg/ml (Roche 843555). De quince a veinticuatro horas antes del ensayo con luminómetro, se sembraron en placa 25.000 células/pocillo (2,5E6 células/10 ml/placa) en placas de ensayo de fondo transparente y lados de color negro de 96 pocillos (Costar n.º 3904).

Se eliminan los medios de los pocillos y se sustituyen por 60 µl de F12 de HAM libre de suero con HEPES 30 mM (pH 7,5) y coelenterazina 15 µM (coelenterazina h luciferina n.º 90608; Assay Designs (Ann Arbor, MI). Entonces se incuban las placas durante 1,5-2 horas. Se preparan placas de compuestos para CI_{50} de 10 puntos que contienen diluciones 1:3 o 1:5 de compuestos antagonistas y una placa de activador agonista (concentración final de des-Arg10-calidina 20 nM, CE_{80}) usando F12 de HAM con HEPES 30 mM, pH 7,5. Tras la incubación con coelenterazina, se usa una plataforma de luminómetro de destello automatizado para dispensar los compuestos antagonistas de B1 a la placa de células, una cámara CCD situada bajo la placa de células toma 12 imágenes de la placa de células a intervalos de 5 segundos para determinar si hay cualquier actividad agonista con los compuestos. Entonces se añade el agonista de hB1, des-Arg10-calidina, a la placa de células y se registran otras 12 imágenes para determinar la CI_{50} del/de los antagonista(s).

B. Ensayo *in vitro* de la función del receptor hB2 usando el flujo de calcio:

Se analiza el flujo de calcio intracelular inducido por la activación del receptor hB2 usando una línea celular recombinante de hB2 (CHO-K1) adquirida de PerkinElmer (Wellesley, MA; n.º de catálogo: RBHB2COOOEA) en un lector de placas de obtención de imágenes fluorométricas (FLIPR). Se cultivan las células en un matraz T225 que contiene mezcla de nutrientes F12 de HAM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA; n.º de catálogo: 11765-047), 10% de suero bovino fetal clon II (HyClone, Logan, UT; n.º de catálogo: SH3006603), piruvato de sodio 1 mM (disolución madre 100 mM, Invitrogen Corp., n.º de catálogo: 12454-013), y Geneticin 0,4 mg/ml (G418; Geneticin activo 50 mg/ml, Invitrogen, n.º de catálogo: 10131-207). Se cambia el medio de cultivo cada 2 días. 24 horas antes del ensayo FLIPR, se lavan las células hB2/CHO una vez con PBS (Invitrogen) y se añaden 10 ml de Versene (1:5000, Invitrogen, n.º de catálogo: 15040-066) a cada matraz. Tras una incubación de 5 minutos a 37°C, se elimina el Versene y se desprenden las células del matraz y se resuspenden en medio de cultivo. Se cuentan las células y se siembran en placa 25.000 células/pocillo en placas de ensayo de fondo transparente y lados de color negro de 96 pocillos (Costar, Acton, MA; n.º de catálogo: 3904). Se incuban las células en un incubador de CO_2 a 37°C durante la noche.

Se aspiran los medios de las células y se sustituyen por 65 µl de tampón de carga de colorante. Se prepara el tampón de carga diluyendo una disolución madre de Fluo-4 AM 0,5 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) disuelto en DMSO que contiene el 10% [p/v] de ácido plurónico hasta una concentración de 1 µM en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) transparente que contiene el 0,1% de BSA, HEPES 20 mM y probenecid 2,5 mM (el probenecid inhibe la actividad de la proteína transportadora de aniones, y por tanto mejora la carga de colorante en las células). Se cargan con colorante las células durante 1 hora a temperatura ambiente. Se elimina el colorante en exceso lavando las células dos veces con tampón de ensayo. El tampón de ensayo consiste en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contiene HEPES 20 mM, el 0,1% de BSA y probenecid 2,5 mM. Tras los ciclos de lavado, se deja un volumen de 100 µl en cada pocillo, y la placa está lista para someterse a ensayo en el sistema FLIPR. Se preparan placas de compuestos antagonistas POC (concentración final de 10 µM) de punto único o placas de compuestos para CI_{50} de diez puntos que contienen diluciones 1:3 ó 1:5 de compuestos antagonistas y una placa de activador agonista (concentración final de bradicinina de 0,3 nM, CE_{80}) usando tampón de ensayo. Se cargan la placa de células y las placas de compuestos sobre el FLIPR y durante el ensayo se toman simultáneamente lecturas de fluorescencia de los 96 pocillos de la placa de células. Se toman diez lecturas de 1 segundo para establecer una línea base para cada pocillo, luego se añaden 25 µl rápidamente (50 µl/s) de la placa de antagonistas de B1. Se mide la señal de fluorescencia a intervalos de 1 segundo (1 minuto) seguido por de 6 segundos (2 minutos) durante un total de 3 minutos para determinar si existe cualquier actividad agonista con los compuestos. Entonces se añade el agonista de B2, bradicinina, a la placa de células y se registran otros 3 minutos para determinar el porcentaje de inhibición a 10 µM (placas POC) o la CI_{50} del antagonista.

Los valores de CI_{50} para los péptidos conjugados con vehículo o PEG sometidos a prueba en el ensayo con

aequorina de hB1 fueron en promedio la actividad ligeramente reducida *in vitro* conferida a los péptidos conjugados con polímeros de PEG más grandes. Por ejemplo, el péptido representado por SEQ ID NO: 36 y su forma acetilada representada por SEQ ID NO: 37, dio como resultado una CI_{50} de 3,0 nM (+/- 5 nM, n=8) y 3,2 nM (+/- 3,2 nM, n=9), respectivamente en el receptor hB1. Sin embargo, el mismo péptido conjugado con PEG tal como se describe en el presente documento demostró un aumento de aproximadamente 10 veces en la CI_{50} . Las formas nativa, acetilada y de conjugado con PEG del péptido eran inactivas hasta 10 μ M en el ensayo FLIPR de hB2. Ninguno de los compuestos mostró actividad agonista en o bien el receptor hB1 o bien hB2.

C. Ensayos *in vitro* basados en tejido de péptidos de unión al receptor hB1:

Se determinaron la actividad antagonista y selectividad por el receptor de bradicinina B1 de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículo de la presente invención con el ensayo de contractilidad de vena umbilical humana (VUH) *in vitro* descrito a continuación:

Se suspendieron vasos desnudos de endotelio en baños de órganos de 20 ml que contenían una solución salina fisiológica convencional oxigenada (95% de O_2 y 5% de CO_2) y precalentada (37°C) de la siguiente composición (en mM): NaCl 118,0, KCl 4,7, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 2,5, KH_2PO_4 1,2, $NaHCO_3$ 25,0 y glucosa 11,0 (pH 7,4). Se prepararon disoluciones de alto contenido en K^+ (KCl 80 mM) mediante la sustitución equimolar de NaCl por KCl. También estaban presentes Hoe 140 (1 μ M), mergetpa (1 μ M) y captopril (10 μ M) en la totalidad de los experimentos para bloquear los receptores B2 y para impedir la degradación del péptido, respectivamente. Se conectaron los tejidos a transductores de fuerza para registros de la tensión isométrica, luego se permitió que se equilibrasen durante un tiempo suficiente bajo una tensión en reposo óptima. Se llevaron a cabo los experimentos usando sistemas de órganos aislados semiautomatizados que presentan ocho baños de órganos cada uno, con adquisición de datos multicanal. Se expusieron los tejidos en primer lugar a una disolución de alto contenido en K^+ (KCl 80 mM) para obtener una contracción de control. Tras lavados y un período de equilibrio de 60 min. posterior, se expusieron los tejidos a concentraciones crecientes acumulativas del agonista de referencia Lys-desArg9-BK para obtener curvas de concentración-respuesta en ausencia (preparaciones de control) o presencia de diversas concentraciones de los compuestos de prueba o el agonista de referencia Lys-desArg9[Leu8]-BK (preparaciones de prueba), que se añadieron 15 min. antes de las exposición a Lys-desArg9-BK. Se generó una curva de concentración-respuesta a Lys-desArg9-BK en cada preparación.

El parámetro medido fue el cambio máximo en tensión inducido por cada concentración de agonista y se expresaron los resultados como un porcentaje de las respuestas de control a KCl. Se calcularon los valores de CE_{50} del agonista (concentración que produce una respuesta que es la mitad de la máxima) mediante análisis de regresión lineal de sus curvas de concentración-respuesta. Se evaluaron las potencias antagonistas de los compuestos de prueba y Lys-desArg9 [Leu8]-BK en cuanto a los valores de pA_2 (-log de la concentración que produce un desplazamiento hacia la derecha de dos veces de la curva de concentración de agonista-respuesta), que se calcularon según Van Rossum (Van Rossum, J. M., Cumulative dose-response agonist curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 143:299-330 (1963)). Se calcularon los valores de pA_2 usando sólo concentraciones de antagonista que provocaban un desplazamiento hacia la derecha significativo de la curva de concentración de agonista-respuesta. Se facilitan los valores de pA_2 como la media $\pm$ e. e. m. de tres determinaciones. Se determinó la significación estadística de las diferencias usando la prueba de la t de Student y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

D. Actividad de inhibición de B1 *in vitro* de péptidos y/o péptidos conjugados

También puede evaluarse la eficacia de los péptidos y/o péptidos conjugados como inhibidores de la actividad de B1 (es decir, "neutralización" de B1) midiendo la capacidad de cada péptido y/o péptido conjugado para bloquear la liberación de sustancia P y CGRP estimulada por B1 y la señalización de calcio en cultivos neuronales de ganglio de la raíz dorsal (GRD).

Cultivos neuronales de ganglio de la raíz dorsal. Se diseccionan los ganglios de la raíz dorsal uno a uno en condiciones asépticas de los segmentos espinales de ratas embrionarias de 19 días de edad (E19) que se extirpan quirúrgicamente del útero de ratas Sprague-Dawley anestesiadas de manera terminal, con embarazo programado (Charles River, Wilmington, MA). Se recogen los GRD en medios L-15 enfriados con hielo (GibcoBRL, Grand Island, NY) que contienen el 5% de suero de caballo inactivado por calor (GibcoBRL), y se elimina cualquier tejido conjuntivo suelto y los vasos sanguíneos. Se enjuagan los GRD dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (DPBS), pH 7,4 (GibcoBRL). Se disocian entonces los GRD en una suspensión de células individuales usando un sistema de disociación de papaína (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). Brevemente, se incuban los GRD en una disolución de digestión que contiene 20 U/ml de papaína en solución salina equilibrada de Earle (EBSS) a 37°C durante cincuenta minutos. Se disocian las células mediante trituración a través de pipetas Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación que consiste en MEM/F12 de HAM, 1:1, inhibidor de ovomucoide 1 mg/ml y ovoalbúmina 1 mg/ml, y el 0,005% de desoxirribonucleasa I (ADNasa). Se sedimentan las células disociadas a 200 x g durante cinco minutos y se resuspenden en EBSS que contiene inhibidor de ovomucoide 1 mg/ml, ovoalbúmina 1 mg/ml y el 0,005% de ADNasa. Se centrifuga la suspensión celular a través de una disolución en gradiente que contiene inhibidor de ovomucoide 10 mg/ml, ovoalbúmina 10 mg/ml a

200 x g durante seis minutos para eliminar los residuos celulares, y luego se filtra a través de una malla de nailon de 88 µm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para eliminar cualquier grumo. Se determina el número de células con un hemocitómetro, y se siembran las células en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-ornitina 100 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) y laminina de ratón 1 µg/ml (GibcoBRL) a 10×10^3 células/pocillo en medio completo. El medio completo consiste en medio esencial mínimo (MEM) y F12 de HAM, 1:1, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y el 10% de suero de caballo inactivado por calor (GibcoBRL). Se mantienen los cultivos a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Para controlar el crecimiento de células no neuronales, se incluyen en el medio 5-fluoro-2'-desoxiuridina (75 µM) y uridina (180 µM).

Tratamiento con B1 y péptidos anti-B1 y/o péptidos conjugados anti-B1. Dos horas tras la siembra en placa, se tratan las células con β-B1 humano recombinante o β-B1 de rata recombinante a una concentración de 10 ng/ml (0,38 nM). Se aplican controles positivos que comprenden anticuerpo anti-B1 diluido en serie (R & D Systems, Minneapolis, MN) a cada placa de cultivo. Se añaden péptidos de prueba o péptidos conjugados de prueba (por ejemplo, del ejemplo 1) a diez concentraciones usando diluciones en serie de 3,16 veces. Se diluyen todas las muestras en medio completo antes de añadirse a los cultivos. El tiempo de incubación es generalmente de aproximadamente 40 horas antes de la medición de la expresión de VR1.

Medición de la expresión de VR1 en neuronas de GRD. Se fijan cultivos con el 4% de paraformaldehído en solución salina equilibrada de Hanks durante quince minutos, se bloquean con Superblock (Pierce, Rockford, IL), y se permeabilizan con el 0,25% de Nonidet P-40 (Sigma) en solución salina tamponada con Tris.HCl (Sigma) (TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se enjuagan los cultivos una vez con TBS que contiene el 0,1% de Tween 20 (Sigma) y se incuban con IgG de conejo anti-VR1 (preparada en Amgen) durante una hora y media a temperatura ambiente, seguido por incubación de anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Eu (Wallac Oy, Turku, Finlandia) durante una hora a temperatura ambiente. Se aplican lavados con TBS (3 x cinco minutos con agitación lenta) tras cada incubación con anticuerpo. Se añade disolución de potenciación (150 µl/pocillo, Wallac Oy) a los cultivos. Entonces se mide la señal de fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal (Wallac Oy). Se determina la expresión de VR1 en muestras tratadas con los péptidos conjugados con vehículo mediante comparación con una curva patrón de titulación de B1 de desde 0-1000 ng/ml. Se determina el porcentaje de inhibición (en comparación con la máxima inhibición posible) del efecto de B1 sobre la expresión de VR1 en neuronas de GRD comparando con controles que no se tratan con B1.

Se relacionó directamente la actividad funcional y de unión al receptor dañadas para cada uno de los antagonistas de B1 de péptido conjugado con PEG, con el tamaño del grupo PEG añadido y osciló entre reducciones de ~5-200 veces en potencia. Los ligadores de poliglicina de ~5-7 residuos funcionaron bien para conservarse funcionales mientras que ligadores más largos o bien mostraron poca mejora ("ligador flexible") o bien demostraron ser un detrimento para la actividad ("ligador rígido"). Finalmente, la tabla 8 ilustra la amplitud de esta aplicación con una variedad de diferentes antagonistas de B1 de péptido conjugado con PEG.

Tabla 8: Afinidad de unión (K_i) y potencia funcional (C₁₅₀) en el receptor B1 humano (hB1) para antagonistas peptídicos y antagonistas peptídicos pegilados

Reactivo de PEG activado	Péptidos por PEG	Péptido (X') - (Y') _{0.61}	K _i de hB1 (nM)	C ₁₅₀ de hB1 (nM)
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 28	114	110
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 29	252	237
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 30	230	61
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NOS: 29 + 42	22	54
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 32	9	69
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 33	75	98
MeO-20K-propionaldehído ^b	1	SEQ ID NO: 13	1	35
Maleimida-20K-maleimida ^a	2	SEQ ID NO: 33	11	77
MeO-20K SPA ^c	1	SEQ ID NO: 13	10	52
Tetrakis-20K-SPA ^c	4	SEQ ID NO: 13	0,14	10
Tetrakis-20K-SPA ^d	4	SEQ ID NO: 13	0,14	10
ninguno	NA	SEQ ID NO: 13	0,10	0,5
ninguno	NA	SEQ ID NO: 15	0,19	1
ninguno	NA	SEQ ID NO: 49	0,77	0,5
ninguno	NA	SEQ ID NO: 50	0,2	6
ninguno	NA	SEQ ID NO: 22	0,38	2
Ninguno	NA	SEQ ID NO: 37	0,8	1

a: Generado mediante el procedimiento en un recipiente descrito en el esquema 4;

b: aminación reductora en el residuo N-terminal, amina épsilon;

c: acilado en el residuo N-terminal, amina épsilon;

d: acilado en el residuo N-terminal, amina alfa

Ejemplo 7: Determinación de la estabilidad de péptidos y/o péptidos conjugados

A. Ensayo de microvellosidades de borde en cepillo de riñón de rata

Se preparan membranas de riñón según el procedimiento expuesto por Booth *et al.* (Biochemical Journal, 142:575 (1974)). Se determinan las concentraciones de proteínas mediante el método de Bradford (Anal. Biochemistry, 72:248-254 (1976)).

5 B. Ensayo de homogeneizado S9 de pulmón humano o de rata

Se prepara pulmón humano o de rata tal como se describe por Skidgel *et al.* (Biochemical Pharmacology 33:3471 (1984)).

Se preparan los compuestos de prueba a una concentración de 1 mM en una disolución de PBS (pH = 7,1). Se añaden los compuestos de prueba a una preparación de tejido del procedimiento A o B (concentración de proteína final de 2 mg/ml) y se incuban a 37°C. A diversos puntos de tiempo, se precipita la proteína con acetonitrilo, HCl 0,1 M en acetonitrilo o el 10% de TFA en agua. Se retira el precipitado mediante centrifugación, y se filtra adicionalmente el filtrado a través de una membrana de 0,1 µM. Entonces se analiza la muestra mediante HPLC de fase inversa (Novapak HR C18 4,6 x 300 mm (Waters Corporation, Milford, MA) flujo = 1 ml/min., gradiente lineal desde 10% de ACN (0,1% de ácido fórmico)-90% de agua (0,1% de ácido fórmico) hasta 50% de ACN (0,1% de ácido fórmico)-50% de agua (0,1% de ácido fórmico) a lo largo de 20 minutos) con detección mediante espectroscopía de masas. Se ajusta la concentración del compuesto de prueba a tiempo T con relación al patrón interno a una función de pérdida de primer orden ($[\text{compuesto}]_t = [\text{compuesto}]_0 (1 - e^{-(k)t})$); "[compuesto]₀" y "[compuesto]_t" son la concentración de compuesto de prueba a tiempo cero y la concentración de compuesto de prueba en el tiempo en el que se retira la muestra, respectivamente; la variable "t" es el tiempo en el que se retira la muestra para el análisis; y k es la velocidad de cambio de concentración del compuesto de prueba). Se determina la variable "k" usando un enfoque de regresión no lineal suministrado por el paquete de software estadístico JMP. Dado que la concentración del compuesto de prueba disminuye con el tiempo, los valores de "k" son negativos. Se calcula la semivida a partir del valor derivado del modelo de "k" usando la siguiente fórmula: $T_{1/2} = (\ln 2)/k$

25 Ejemplo 8: Actividad antinociceptiva *In vivo* de péptidos anti-B1 y péptidos anti-B1 conjugados con vehículo en modelos de dolor en rata y mono

A. Modelo de dolor neuropático en rata. Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho (de 200 g) con anestesia inhalatoria con isoflurano y se ligan estrechamente los nervios espinales lumbares izquierdos a nivel de L5 y L6 (sutura de seda 4-0) de manera distal al ganglio de la raíz dorsal y antes de la entrada al nervio ciático, tal como describieron por primera vez Kim y Chung (An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 50:355-363, (1992)). Se cierran las incisiones y se permite que se recuperen las ratas. Este procedimiento da como resultado alodinia mecánica (táctil) en la pata trasera izquierda según se evalúa mediante el registro de la presión a la que se retiró la pata afectada (de manera ipsilateral con respecto al sitio de la lesión nerviosa) a partir de estímulos graduados (filamentos de von Frey que oscilan entre 4,0 y 148,1 mN) aplicados de manera perpendicular a la superficie plantar de la pata (entre las almohadillas plantares) a través de jaulas de observación de tela metálica. Se determinó un umbral de retirada de la pata (URP) aumentando y disminuyendo secuencialmente la intensidad del estímulo y analizando los datos de retirada usando una prueba no paramétrica de Dixon, tal como se describe por Chaplan, S. R., *et al.* (Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J. Neurosci. Meth, 53:55-63 (1994)).

Las ratas normales y las ratas con cirugía simulada (nervios aislados pero no ligados) soportan al menos 148,1 mN (equivalente a 15 g) de presión sin responder. Las ratas con los nervios espinales ligados responden a tan sólo 4,0 mN (equivalente a 0,41 g) de presión sobre la pata afectada. Las ratas se incluyen en el estudio sólo si no presentaban disfunción motora (por ejemplo, arrastre o caída de las patas) y su URP era inferior a 39,2 mN (equivalente a 4,0 g). Al menos siete días tras la cirugía, se tratan las ratas con péptidos de prueba o péptidos conjugados con vehículo de prueba (habitualmente una dosis de examen de aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg, respectivamente) o diluyente control (PBS) una vez mediante inyección s.c. y se determinó el URP cada día posteriormente durante 7 días.

B. Modelo de dolor inflamatorio mediante CFA en rata. Se anestesiaron ligeramente ratas Sprague-Dawley macho (de 200 g) con anestesia inhalatoria con isoflurano y se les inyecta en la pata trasera izquierda adyuvante completo de Freund (CFA), 0,15 ml. Este procedimiento da como resultado alodinia mecánica (táctil) en la pata trasera izquierda según se evalúa mediante el registro de la presión a la que se retira la pata afectada a partir de estímulos graduados (filamentos de von Frey que oscilan entre 4,0 y 148,1 mN) aplicados de manera perpendicular a la superficie plantar de la pata (entre las almohadillas plantares) a través de jaulas de observación de tela metálica. Se determina el URP aumentando y disminuyendo secuencialmente la intensidad del estímulo y analizando los datos de retirada usando una prueba no paramétrica de Dixon, tal como se describe por Chaplan, S. R., *et al.* (1994). Las ratas se incluyen en el estudio sólo si no presentan disfunción motora (por ejemplo, arrastre o caída de las patas) o piel fragmentada y su URP es inferior a 39,2 mN (equivalente a 4,0 g). Al menos siete días tras la inyección de CFA, se tratan las ratas con péptidos de prueba o péptidos conjugados con vehículo de prueba (habitualmente una dosis de examen de aproximadamente 60 mg/kg) o disolución control (PBS) una vez mediante inyección s.c. y se determina el URP cada día posteriormente durante 7 días. Se convirtió el umbral de retirada de la pata (URP)

promedio en el porcentaje del máximo efecto posible (% MEP) usando la siguiente fórmula: $\% \text{ MEP} = 100 * (\text{URP de ratas tratadas} - \text{URP de ratas control}) / (15 - \text{URP de ratas control})$. Por tanto, el valor de punto de corte de 15 g (148,1 mN) es equivalente al 100% del MEP y la respuesta de control es equivalente al 0% del MEP.

Se espera que péptidos y péptidos conjugados con vehículo preferidos de la presente invención produzcan un efecto antinociceptivo con una relación PD a una dosis de examen de aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg, respectivamente.

B. Modelo de inflamación con LPS en mono verde. Puede evaluarse la eficacia de péptidos y/o péptidos conjugados como inhibidores de la actividad de B1 en monos verdes macho (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) expuestos localmente a agonistas de B1 esencialmente tal como se describe por deBlois y Horlick (British Journal of Pharmacology. 132:327-335 (2002)), que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad).

Con el fin de determinar si los antagonistas peptídicos conjugados con PEG de la presente invención inhiben el edema inducido por B1, se llevaron a cabo los estudios descritos a continuación con monos verdes macho (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) en la granja experimental Caribbean Primates Ltd. (St Kitts, las Antillas). Se revisaron y se aceptaron los procedimientos por los Comités de Cuidado de Animales del CR-CHUM (Montreal, Canadá) y de Caribbean Primates Ltd. (St Kitts, las Antillas). Se anestesiaron (50 mg de ketamina kg^{-1}) animales que pesaban $6,00 \pm 5$ kg (n=67) y se pretrataron con una única inyección intravenosa de LPS (90 $\mu\text{g kg}^{-1}$) o solución salina (1 ml) a través de la vena safena.

1. Estudios de inflamación

Se evaluó el edema inducido por cinina mediante el ensayo del pliegue de piel ventral (Sciberras *et al.*, 1987). Brevemente, a monos anestesiados se les inyectó captopril (1 mg kg^{-1} 30 min. antes del ensayo). Se administró una única inyección subcutánea de dKD, BK o el vehículo (amastatina 2 mM en 100 μl de lactato de Ringer) en la zona ventral y se monitorizó el aumento en el grosor de los pliegues de piel durante 30-45 min. usando un calibre calibrado. Se expresan los resultados como la diferencia entre el grosor del pliegue de piel antes y después de la inyección subcutánea. Se usaron captopril y amastatina para reducir la degradación de cininas en el extremo carboxilo y amino-terminal, respectivamente.

ANÁLISIS DE SCHILD DE ANTAGONISTA

Se determinó la relación dosis-respuesta para el edema inducido por dKD (1-100 nmol) a las 24 h tras LPS en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de PEG-antagonista peptídico. Se usó BK (30 nmol) como control positivo.

TRANSCURSO TEMPORAL DE ANTAGONISTA

Se determinó el transcurso temporal de inhibición por el antagonista a las 4, 24, 48, 72 y/o 96 h tras la administración en bolo única. Se usó BK (30 nmol) como control positivo.

FÁRMACOS

Clorhidrato de ketamina, LPS, amastatina y captopril procedían de Sigma (MO, EE.UU.). Todos los péptidos procedían de Phoenix Pharmaceuticals (CA, EE.UU.).

ESTADÍSTICA

Se presentan los valores como la media $\pm$ el error estándar de la media (e. e. de la media). En estudios de edema, se restó el grosor antes de la inyección de los pliegues de piel de los valores tras la exposición subcutánea. Se obtuvieron ajustes de curvas y cálculos de CE_{50} usando el software Delta Graph 4.0 para Apple Computers. Se compararon los datos mediante un análisis de la varianza de dos vías seguido por una prueba de la t de Student para datos independientes, de una cola con corrección de Bonferroni. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

La administración de LPS a monos verdes aumentó desde un nivel nulo su sensibilidad a un agonista del receptor B₁ en un ensayo de formación de edema. Comparativamente, no se vieron afectadas las respuestas al agonista del receptor B₂ BK.

Sorprendentemente, una única dosis subcutánea a 10 mg/kg de un péptido conjugado con PEG de 5 kD representativo y un péptido conjugado con PEG de 20 kD del mismo análogo peptídico fue suficiente para aliviar una respuesta inflamatoria inducida por el agonista de B1 preestablecida y suprimir las exposiciones a agonista diarias sucesivas durante 3 y 4 días, respectivamente. No se observó taquifilaxia con la exposición a B1 hasta 96 h. También se determinó que el efecto era selectivo en B1 en vez de en B2. Además, el conjugado de PEG de 5 K inhibió el edema en respuesta a una exposición a dKD de manera más prolongada que el péptido no conjugado (es decir, péptido nativo), aunque la rápida aparición y la eficacia eran comparables para ambas moléculas hasta 1,25 horas.

Ejemplo 9: Estudios farmacocinéticos en rata

Se dosificaron diversos péptidos o péptidos conjugados (en un medio acuoso) como un bolo a ratas Sprague-Dawley macho por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.). Se recogieron muestras de sangre a diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 0, 15, 30 minutos y/o 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 240 y/o 320 horas tras la inyección) en tubos heparinizados. Se retiró el plasma de las células sedimentadas tras la centrifugación y o bien se congelaron o bien se procesaron inmediatamente. Se cuantificó el compuesto de interés en el plasma mediante un método de ELISA o de CL-EM/EM específico de analito. Se calcularon diversos parámetros farmacocinéticos convencionales tales como aclaramiento (CL), aclaramiento aparente (CL/F), volumen de distribución (Vss), tiempo de residencia medio (MRT), área bajo la curva (AUC) y semivida terminal ($t_{1/2}$) mediante el método no compartimental (por ejemplo, véase la tabla 9).

Tabla 9: Antagonistas peptídicos y antagonistas peptídicos pegilados de B1. Estudios farmacocinéticos en rata

Reactivo de PEG activado	Péptidos por PEG	Péptido	$t_{1/2}$ (h)	AUC 0 - Inf
MeO-20K-maleimida ^a	1	SEQ ID NO: 33	-	28387
MeO-20K-propionaldehído ^b	1	SEQ ID NO: 13	33,7 ^c	16877 ^c
Maleimida-20K-maleimida ^a	2	SEQ ID NO: 33	25,6 ^c	28580 ^c
MeO-20K SPA ^d	1	SEQ ID NO: 13	27,3 ^c	10701 ^c
Tetrakis-20K-SPA ^d	4	SEQ ID NO: 13	28,7 ^e	8475 ^e
Tetrakis-20K-SPA ^f	4	SEQ ID NO: 13	30,8 ^e	63239 ^e
ninguno	NA	SEQ ID NO: 13	1,2 ^g	255 ^g
ninguno	NA	SEQ ID NO: 15	2,76 ^c	7720 ^c
ninguno	NA	SEQ ID NO: 13	0,6 ^h	9 ^h
ninguno	NA	SEQ ID NO: 49	1,0 ⁱ	13862 ⁱ
ninguno	NA	SEQ ID NO: 50	2,0 ⁱ	5529 ⁱ
ninguno	NA	SEQ ID NO: 22	1,0 ⁱ	7891 ⁱ
Ninguno	NA	SEQ ID NO: 37	0,4 ⁱ	1122 ⁱ
Ninguno	NA	SEQ ID NO: 37	0,6 ^g	18288 ^g

a: Generado mediante el procedimiento en un recipiente descrito en el esquema 4;

b: aminación reductora en el residuo N-terminal, amina épsilon;

c: 1 mpk por vía s.c.;

d: acilado en el residuo N-terminal, amina épsilon;

e: 0,5 mpk por vía s.c.;

f: acilado en el residuo N-terminal, amina alfa

g: 30 mpk por vía s.c.; h: 1 mpk por vía i.v.; e i: 3 mpk por vía i.v.;

El alcance de la invención se define en las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Amgen Inc.
- 5 <120> Antagonistas del receptor de bradicinina B1
- <130> EP42077HV015pau
- 10 <140> Documento EP 04 796 039.8
<141> 22-10-2004
- <150> Documento PCT/US2004/034976
<151> 22-10-2004
- 15 <150> Documento 10/972.236
<151> 21-10-2004
- <150> Documento 60/538.929
<151> 24-01-2004
- 20 <150> Documento 60/513.913
<151> 22-10-2003
- <160> 60
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Humana
- 30 <400> 1
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5
- 35 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Humana
- 40 <400> 2
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10
- <210> 3
<211> 11
<212> PRT
- 45 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido artificial
<400> 3
Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10
- 50 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Humana
- 55 <400> 4
Arg Pro Pro Gly phe ser Pro Phe
1 5
- <210> 5
<211> 8
<212> PRT
- 60 <213> Artificial
<220>

- <223> Péptido artificial
- <400> 5
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5
- 5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Péptido artificial
- <400> 6
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5
- 15 <210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Péptido artificial
- <220>
<221> misc_feature
- 25 <222> (1)..(1)
<223> Xaa en la posición 1 se define como DArg
- <220>
<221> misc_feature
- 30 <222> (4)..(4)
<223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
- <220>
<221> misc_feature
- 35 <222> (6)..(6)
<223> Xaa en la posición 6 se define como Thi
- <220>
<221> misc_feature
- 40 <222> (8)..(8)
<223> Xaa en la posición 8 se define como DTic
- <220>
<221> misc_feature
- 45 <222> (9)..(9)
<223> Xaa en la posición 9 se define como Oic
- <400> 7
Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10
- 50 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> Péptido artificial
- <220>
<221> misc_feature
- 60 <222> (1)..(1)
<223> Xaa en la posición 1 se define como DArg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Thi
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DTic
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como Oic
 20
 <400> 8
 xaa Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 5
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido artificial
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DArg
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Thi
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DHpe
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como Oic
 55
 <400> 9
 xaa Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa Arg
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>

<223> Péptido artificial
 <220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como MePhe
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como D-beta-Nal
 <400> 10
 Lys Lys Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5 10
 20 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DArg
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Igl
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DIgl
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como Oic
 <400> 11
 Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
 1 5 10
 55 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Igl

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DIgl

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Oic

20 <400> 12
 Lys Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1. 5 10

25 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

50 <400> 13
 Lys Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 5 10

55 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DArg

<220>

- <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
- 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como lgl
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como Df5f
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como lgl
- 20 <400> 14
 Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
- 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
- 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Cpg
- 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
- 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
- 55 <400> 15
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 10 <223> Xaa en la posición 5 se define como Thz

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 20 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 25 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

<400> 16
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 40 <223> Xaa en la posición 1 se define como 3Pal

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 45 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 50 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 55 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 60 <223> Xaa en la posición 10 se define como CPg

<400> 17
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10

5 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como 4Pal
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
 35 <400> 18
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Péptido artificial
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como Cha
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Cpg
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DTic
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como Cpg

5 <400> 19
 Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como 2Nal

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Cpg

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DTic

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como Cpg

40 <400> 20
 Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Hyp

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Cpg

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DTic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 5 <223> Xaa en la posición 9 se define como Cpg

 <400> 21
 Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 5
 10 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> Péptido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 20 <223> Xaa en la posición 1 se define como DLys

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 25 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 30 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 35 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 40 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

 <400> 22
 xaa Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 5 10
 45 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Péptido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 55 <223> Xaa en la posición 2 se define como DOrn

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 60 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

- <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
- <220>
<221> misc_feature
5 <222> (9)..(9)
<223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
- <220>
10 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
- <400> 23
Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10
- 15 <210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Péptido artificial
- <220>
25 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa en la posición 2 se define como Cha
- <220>
30 <221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
- <220>
35 <221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
- <220>
40 <221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
- <220>
45 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
- <400> 24
Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10
- 50 <210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> Péptido artificial
- <220>
60 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa en la posición 2 se define como Abu
- <220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
 20 <400> 25
 Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 se define como 2Nal
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
 55 <400> 26
 Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

- <400> 27
 Cys Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10
- 5 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Péptido artificial
- <400> 28
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10 15
- 15 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Péptido artificial
- <400> 29
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10 15
- 25 <210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> Péptido artificial
- <400> 30
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro
 1 5 10 15
- 35 Leu
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Péptido artificial
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 45 <223> Ligador (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂) entre la posición 2 y 3
- <400> 31
 Cys Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10
- 50 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 55 <220>
 <223> Péptido artificial
- <220>
 <221> misc_feature

<222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como MePhe

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como D-beta-Nal

10 <400> 32
 Cys Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido artificial

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa en la posición 11 se define como Hyp

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como Cpg

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como DTic

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa en la posición 16 se define como Cpg

40 <400> 33
 Cys Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido artificial

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como Hyp

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como Cpg

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa en la posición 17 se define como Dtic
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa en la posición 18 se define como Cpg

5 <400> 34
 cys gly gly gly gly gly gly lys lys arg pro xaa gly xaa ser
 1 5 10 15

xaa xaa
 <210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido artificial

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa en la posición 11 se define como Hyp

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Cpg

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como DTic

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa en la posición 16 se define como Cpg

40 <400> 35
 cys gly gly gly gly gly lys lys arg pro xaa gly xaa ser xaa xaa
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido artificial

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

60 <220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

10 <400> 36
 Lys Lys Arg Pro Xaa Gly xaa Ser xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT

15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Acilación

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

45 <400> 37
 Lys Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT

50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

55 <400> 38
 Cys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT

60 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido artificial

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como DOrn

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa en la posición 11 se define como Hyp

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como Cpg

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como DTic

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa en la posición 16 se define como Cpg

30 <400> 39
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10 15

 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido artificial

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como DOrn

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa en la posición 11 se define como Thz

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como Cpg

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como DTic

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa en la posición 16 se define como Cpg

 <400> 40

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10 15

5 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido artificial

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como DOrn

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa en la posición 11 se define como Hyp

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 se define como Cpg

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa en la posición 15 se define como DTic

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa en la posición 16 se define como Cpg

35 <400> 41
 Cys Gly Gly Gly Gly Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10 15

40 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 42
 Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10 15

45 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Péptido artificial

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como D-Dab

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

<220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

15 <400> 43
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Péptido artificial

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como D-Dab

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

<400> 44
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10

55 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 10 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 20 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 25 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

 <400> 45
 xaa Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
 1 . 5 10

 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30

 <220>
 <223> Péptido artificial
 35

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 40 <223> Acetilación

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 50 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 55 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 60 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

<400> 46
xaa Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
1 5 10

5 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature

15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como D-3'Pal

<220>
 <221> misc_feature

20 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

<220>
 <221> misc_feature

25 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

<220>
 <221> misc_feature

30 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

<220>
 <221> misc_feature

35 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

<400> 47
xaa Lys Arg Pro xaa Gly xaa Ser xaa xaa
1 5 10

40 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> MOD_RES

50 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

<220>
 <221> misc_feature

55 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como D-3'Pal

<220>
 <221> misc_feature

60 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

<220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

15 <400> 48
 Xaa Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como D-Lys

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 se define como D-2-Nal

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg

55 <400> 49
 Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Artificial
 <220>

<223> Péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 se define como D-2-Nal
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 se define como Hyp
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Cpg
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como DTic
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en la posición 10 se define como Cpg
 <400> 50
 Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10
 30 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal
 <400> 51
 Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5
 60 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal
 30
 <400> 52
 xaa Arg xaa Pro Gly xaa Ser xaa Ile
 1 5
 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Péptido artificial
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Oic
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Me-Phe
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como D-beta-Nal
 60
 <400> 53
 xaa Lys Arg xaa Pro Gly xaa Ser xaa Ile
 1 5 10
 <210> 54

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 se define como Oic

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa en la posición 7 se define como Me-Phe

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como D-beta-Nal

<400> 54
 Xaa Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5 10

35 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal

<400> 55
 Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
 1 5

50 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Péptido artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 60 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal
 5
 <400> 56
 Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal
 35
 <400> 57
 Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5
 <210> 58
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido artificial
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 se define como DOrn
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic
 60
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 9 se define como D-beta-Nal

 <400> 58
Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5
 10 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Péptido artificial

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal

 <400> 59
Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5
 35 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Péptido artificial

 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetilación

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 se define como Oic

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 se define como Me-Phe

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa en la posición 8 se define como D-beta-Nal

<400> 60

Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia de fórmula:

$F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

F es un vehículo unido covalentemente a X^1 o Y^1 ;

L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

n es de 0 a 3; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg, en el que el vehículo se selecciona de polimetililen-glicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicoles y óxidos, polimetilpropilenglicol, poli(óxido de hidroxipropileno), polipropilenglicoles de cadena lineal y de cadena ramificada y derivados de los mismos, polietilenglicol y polipropilenglicol y los monometil éteres, monocetil éteres, mono-n-butil éteres, mono-t-butil éteres y monooleil éteres de los mismos, ésteres de polialquilenglicoles con ácidos carboxílicos y productos de condensación por deshidratación de los polialquilenglicoles con aminas y otros poli(óxidos de alquileo) y glicoles y derivados de los mismos, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vínfico), poli(acetato de vinilo), el copolímero poli(acetato de vinilo-co-alcohol vínfico), poliviniloxazolidona, polivinilmetiloxazolidona y poli(vinil metil éter), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), poli(metacrilatos de hidroxietilo), poli(acrilamida) y poli(metacrilamida) y otras amidas de los mismos, poli(N,N-dimetilacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(N-acetamidoacrilamida) y poli(N-acetamidometacrilamida) y otros derivados N-sustituidos de las amidas.

2. Una composición de materia de fórmula:

$F'-R_z$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

F' es un vehículo multivalente, que es un PEG multivalente;

R es independientemente en cada caso $-(X^1)-(Y^1)_n$ en la que R se une covalentemente a F';

X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

n es de 0 a 3;

z es de 2 a 8; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg.

3. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que n es 0.

4. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicho L^1 es un ligador de peptidilo que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 66, inclusive.

5. Uso de la composición de materia según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.

6. El uso según la reivindicación 5, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.

7. Una composición farmacéutica que comprende una composición de materia según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición de materia de fórmula:

$F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que:

X^1 e Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de fórmula $-L^1-P^1$ y $-L^2-P^2$, respectivamente;

F es un PEG unido covalentemente a X^1 o Y^1 ;

L^1 y L^2 independientemente en cada caso están ausentes o son ligadores que tienen desde 0 hasta 9 residuos de aminoácido;

5

n es de 0 a 3; y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas peptídicos del receptor de bradicinina B1 que tienen la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg.

9. La composición de materia de la reivindicación 2, en la que n es 0 y Z es 2-8.

10. La composición de materia de la reivindicación 9, en la que Z es 4.

10

11. La composición de materia de la reivindicación 8, en la que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del grupo que consiste en:

i. 5.000 Dalton;

ii. 20.000 Dalton;

iii. 24.000 Dalton;

15

iv. 30.000 Dalton;

v. 40.000 Dalton; y

vi. 60.000 Dalton.

20

12. La composición de materia de la reivindicación 11, en la que dicha composición de materia es capaz de antagonizar la actividad del receptor B1 *in vitro* y tiene una semivida terapéuticamente aceptable *in vivo* en mamíferos.

13. Uso de la composición de materia según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.

14. Una composición farmacéutica que comprende la composición de materia según la reivindicación 11 y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

25

15. El uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.

30

16. Un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg, o una sal fisiológicamente aceptable de la misma.

17. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

35

18. Uso de una composición farmacéutica que comprende un antagonista peptídico del receptor de bradicinina B1 que comprende la secuencia DOrn Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg y al menos un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o un estado asociado con o mediado por la actividad de B1.

40

19. El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 18, en el que la enfermedad o el estado se selecciona del grupo que consiste en inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte inferior de la espalda, dolor debido a traumatismo, dolor quirúrgico, trastornos inflamatorios del intestino, asma y rinitis alérgica.