

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 787**

51 Int. Cl.:

C07K 14/665	(2006.01)
C07K 5/12	(2006.01)
C07K 7/64	(2006.01)
G01N 33/94	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 38/12	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2011 PCT/US2011/043306**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006497**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11804387 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2590992**

54 Título: **Análogos agonistas del receptor opioide mu de las endomorfina**

30 Prioridad:

09.07.2010 US 363039 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2017

73 Titular/es:

**THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND (50.0%)
1440 Canal Street, Suite 1400, No. 8432
New Orleans, LA 70112, US y
UNITED STATES DEPARTMENT OF VETERANS
AFFAIRS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZADINA, JAMES E. y
HACKLER, LASZLO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 632 787 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

Análogos agonistas del receptor opioide mu de las endomorfinas

5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie No. 61/363,039, presentada el 9 de julio de 2010.

10 DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

Una parte del trabajo descrito aquí fue apoyada por un Premio al Científico Senior de Investigación de Carrera y el Financiamiento del Programa de Evaluación del Mérito Competitivo concesión del Departamento de Asuntos de Veteranos a James E. Zadina. El gobierno de los Estados Unidos tiene derechos ciertos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a agonistas peptídicos que se unen al receptor opioide mu (morfina) y su uso en el tratamiento del dolor agudo y crónico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 La activación del receptor opioide mu está entre los medios más eficaces para aliviar una amplia gama de condiciones de dolor. De los receptores opioides recientemente clonados, por ejemplo, mu (3,19,20), delta (6,9) y kappa (12-14), la gran mayoría de los opioides usados clínicamente actúan en el receptor mu. Como se ilustra en los ratones "knock-out" modificados genéticamente, la ausencia del receptor mu elimina los efectos analgésicos de la morfina (8), lo que ilustra su papel central en el alivio del dolor inducido por opioides. La eficacia única de los agonistas mu puede atribuirse a varios factores, incluyendo su presencia en numerosas regiones del sistema nervioso que regulan el procesamiento del dolor y la activación de múltiples mecanismos que limitan la transmisión del dolor (por ejemplo, la inhibición de la liberación de los transmisores excitadores del sistema nervioso periférico y disminuyendo la excitabilidad celular en el sistema nervioso central).

35 Las limitaciones en el uso de opioides resultan de efectos secundarios negativos, incluyendo la responsabilidad por abuso, depresión respiratoria y deterioro cognitivo y motor. Los esfuerzos mayores para desarrollar compuestos que mantienen las propiedades analgésicas mientras reducen los efectos secundarios negativos han tenido un éxito limitado. Esto es evidente a partir de la reciente epidemia de abuso de fármacos recetados. Numerosos intentos de dirigir mecanismos alternativos de alivio del dolor para evitar estos efectos secundarios se han encontrado generalmente con problemas similares, es decir, un perfil de efectos adversos que son diferentes de los opioides, pero a menudo suficientemente graves para justificar la retirada del mercado (por ejemplo, los inhibidores de la COX) o la falta de aprobación para entrar en el mercado (por ejemplo, los antagonistas del receptor de TRP). Más de 100 millones de pacientes anualmente en los Estados Unidos experimentan dolor agudo o crónico y con frecuencia no logran un alivio apropiado de los fármacos existentes debido a la eficacia limitada o los efectos secundarios excesivos.

45 Los pacientes ancianos tienden a mostrar una mayor sensibilidad al dolor intenso y las pautas recientes de la American Geriatric Society sugieren un mayor uso de opioides y la reducción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) (10). El deterioro de la función motora y cognitiva puede ser más debilitante en los ancianos que en los pacientes más jóvenes, particularmente debido al mayor riesgo de fracturas (7). Los opioides con disminución del deterioro motor y cognitivo son, por lo tanto, una creciente necesidad no satisfecha.

55 Se han descrito péptidos endógenos naturales de cerebro bovino y humano que son altamente selectivos para el receptor opioide mu en relación con el receptor delta o kappa (22 y Patente de los Estados Unidos No. 6,303,578 que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad). Estos péptidos son potentes analgésicos y han demostrado una promesa de reducción de la responsabilidad por abuso (21) y de la depresión respiratoria (4,5), como se mide en estudios con roedores. La limitada estabilidad metabólica de los péptidos naturales condujo al desarrollo de análogos tetrapeptídicos de las endomorfinas que contenían D-aminoácidos ciclados (la Patente de los Estados Unidos No. 5,885,958 que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad) de suficiente estabilidad metabólica para producir analgesia potente en roedores después de la administración periférica. Un compuesto de plomo de este grupo presuntamente era 3 veces más potente que la morfina en el alivio del dolor neuropático y mostró reducidas propiedades gratificantes en modelos animales que se correlacionan con el potencial de abuso. Aunque estos resultados son prometedores, es deseable el desarrollo de compuestos adicionales que muestren propiedades iguales o mejores. La presente invención responde a esta necesidad proporcionando análogos peptídicos que tienen una solubilidad y perfiles de efectos secundarios inesperadamente mejores que los materiales descritos anteriormente.

RESUMEN DE LA INVENCION

Una realización de la presente invención está dirigida a análogos pentapéptidos y hexapéptidos de endomorfinas que difieren de los análogos tetrapéptidos previamente descritos teniendo (i) una extensión carboxi terminal con un aminoácido hidrófilo amidado, (ii) una sustitución en posición 2 de aminoácido; o (iii) una combinación de (i) y (ii). Los análogos pentapéptidos y hexapéptidos de la presente invención exhiben una solubilidad incrementada con respecto a los tetrapéptidos manteniendo al mismo tiempo proporciones terapéuticas favorables de efectos analgésicos a efectos secundarios.

Los compuestos de la presente invención son péptidos cíclicos que actúan como agonistas de los receptores opioides mu con alta afinidad. Estos compuestos proporcionan alivio del dolor agudo, dolor crónico, o ambos, y comprenden o consisten en compuestos de fórmula I:

(I) H-Tyr-c[X₁-X₂-X₃-X₄]-X₅. X₁ y X₄ cada uno independientemente es un aminoácido ácido (esto es, un aminoácido que comprende una cadena lateral sustituida con ácido carboxílico) o un aminoácido básico (esto es, un aminoácido que comprende una cadena lateral sustituida con amino), con la condición de que si X₁ es un aminoácido ácido (por ejemplo, D-Asp o D-Glu), entonces X₄ es un aminoácido básico (por ejemplo, Lys, Orn, Dpr, o Dab), y viceversa. Preferiblemente, X₁ es D-Asp, D-Glu, D-Lys, D-Orn, D-Dpr o D-Dab; mientras que X₄ es preferiblemente Asp, Glu, Lys, Orn, Dpr o Dab. X₂ y X₃ cada uno independientemente es un aminoácido aromático (esto es, un aminoácido que comprende un grupo aromático en la cadena lateral del mismo). Por ejemplo, X₂ es preferiblemente Trp, Phe, o N-alkyl-Phe, donde el grupo alquilo preferiblemente comprende 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, esto es, un grupo alquilo (C₁ a C₆). X₃ es preferiblemente Phe, D-Phe, o p-Y-Phe donde Y es NO₂, F, Cl, o Br. X₅ se selecciona del grupo que consiste en -NHR, Ala-NHR, Arg-NHR, Asn-NHR, Asp-NHR, Cys-NHR, Glu-NHR, Gln-NHR, Gly-NHR, His-NHR, Ile-NHR, Leu-NHR, Met-NHR, Orn-NHR, Phe-NHR, Pro-NHR, Ser-NHR, Thr-NHR, Trp-NHR, Tyr-NHR, y Val-NHR; donde R es H o un grupo alquilo (por ejemplo un grupo alquilo (C₁ a C₁₀) tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, o isoheptilo). El péptido de fórmula I es cíclico (mostrado como "c[X₁-X₂-X₃-X₄]" en la fórmula) en virtud de un enlace amida entre el ácido carboxílico y sustituyentes amino de las cadenas laterales de residuos de aminoácidos X₁ y X₄. Por ejemplo, el enlace puede ser un enlace amida formado entre el grupo amino de cadena lateral del D-Lys, D Orn, D-Dpr, D-Dab, Lys, Orn, Dpr, o Dab con el grupo carboxilo de cadena lateral de D-Asp, D-Glu, Asp, o Glu.

En una realización de la invención dirigida a un péptido de fórmula I, X₅ es NHR, R es H, y X₅ puede ser -NH₂ (esto es, el péptido es un péptido amidado), o Ala-NH₂, Arg-NH₂, Asn-NH₂, Asp-NH₂, Cys-NH₂, Glu-NH₂, Gln NH₂, Gly-NH₂, His-NH₂, Ile-NH₂, Leu-NH₂, Met-NH₂, Orn-NH₂, Phe-NH₂, Pro-NH₂, Ser-NH₂, Thr-NH₂, Trp-NH₂, Tyr NH₂, o Val-NH₂, (esto es, el péptido es un hexapéptido amidado). En una realización particular, X₅ es NH₂. En otras realizaciones particulares, X₅ es Ala-NH₂, Arg-NH₂, Asn-NH₂, Asp-NH₂, Cys-NH₂, Glu-NH₂, Gln-NH₂, Gly-NH₂, His NH₂, Ile-NH₂, Leu-NH₂, Met-NH₂, Orn-NH₂, Phe-NH₂, Pro-NH₂, Ser-NH₂, Thr-NH₂, Trp-NH₂, Tyr-NH₂, o Val-NH₂.

Otra realización de la invención se refiere a un péptido de fórmula I, en el que X₁ es D-Asp, D-Glu, D-Lys, o D-Orn; y X₄ es Asp, Glu, Lys, o Orn.

Otra realización de la invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en el que X₅ es NHR y R es un alquilo (C₁ a C₁₀).

Otra realización de la invención se refiere a un péptido de fórmula I, en el que el aminoácido aromático de X₂ es Trp, Phe, o N-alkil-Phe, y el grupo alquilo de N-alkil-Phe es un alquilo (C₁ a C₆). En una realización particular, X₂ es N-metil-Phe (N-Me-Phe).

Otra realización de la invención se refiere a un péptido de fórmula I, en el que el residuo de aminoácido aromático de ya sea X₂ o X₃ es Phe, D-Phe, Trp, D-Trp, D-Tyr, N-alkil-Phe, y el grupo alquilo de N-alkil-Phe es alquilo (C₁ a C₁₀) o p-Y-Phe, en el que, Y es NO₂, F, Cl, o Br.

Otra realización de la invención se refiere a un péptido de fórmula I, en el que el aminoácido aromático de X₃ es Phe, D-Phe, o p-Y-Phe, en el que, Y es NO₂, F, Cl, o Br. En una realización particular, X₃ es p-Cl-Phe.

Otra realización de la invención se refiere a un péptido de fórmula I seleccionado del grupo que consiste en:

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-NH₂ (SEQ ID NO:1);

Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-NH₂ (SEQ ID NO:2);

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-Gly-NH₂ (SEQ ID NO:3);

Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-Gly-NH₂ (SEQ ID NO:4);

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Asp]-NH₂ (SEQ ID NO:5);

Tyr-c[D-Glu-N-Me-Phe-Phe-Lys]-NH₂ (SEQ ID NO:6); y

Tyr-c[D-Orn-Phe-p-Cl-Phe-Asp]-Val-NH₂ (SEQ ID NO:7).

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido de fórmula I y un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un diluyente o excipiente).

Incluso otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido de fórmula I en un método de tratamiento de un paciente que tiene una condición que responde a un opioide, o una condición para la cual el tratamiento con opioides es estándar en la técnica. Dicho método comprende o consiste en administrar al paciente una cantidad eficaz de un péptido de fórmula I de la invención. Se pueden seguir realizaciones particulares de este método con el fin de proporcionar al menos un efecto seleccionado de (i) analgesia (alivio del dolor), (ii) alivio de un trastorno gastrointestinal tal como diarrea, (iii) terapia para una dependencia de fármacos opiáceos, y (iv) tratamiento de cualquier condición para la cual se indique un opioide. En algunas realizaciones, los péptidos de fórmula I se pueden usar para tratar dolores agudos o crónicos. Los usos para los péptidos de fórmula I también incluyen, pero no se limitan a, el uso como agentes antimigrañosos, agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores o agentes antiartríticos. Ciertas realizaciones de los métodos de la presente invención, tales como el tratamiento del dolor o la dependencia de fármacos opiáceos, se dirigen a pacientes que tienen antecedentes de abuso de sustancias opiáceas. En ciertas realizaciones de los presentes métodos, el péptido se administra por vía parenteral (por ejemplo, intravenoso). Esta invención también se refiere a un péptido de fórmula I para uso en uno de dichos métodos de tratamiento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de activación o regulación de un receptor opioide mu poniendo en contacto el receptor opioide mu con un compuesto de la invención, así como el uso del péptido de fórmula I en dicho tratamiento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para medir la cantidad de un receptor opioide mu en una muestra usando un péptido de fórmula I. Este método puede comprender o consistir en las siguientes etapas: (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un receptor opioide mu con un péptido de fórmula I para formar un complejo compuesto-receptor, (ii) detectar el complejo, y (iii) cuantificar la cantidad del complejo formado.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido de fórmula I para llevar a cabo un método de ensayo competitivo para detectar la presencia de una molécula que se une a un receptor opioide mu. Este método puede comprender o consistir en las siguientes etapas: (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una molécula que se une a un receptor opioide mu con un receptor opioide mu y un péptido de fórmula I, en el que el compuesto y el receptor forman un complejo compuesto-receptor; (ii) medir la cantidad del complejo formado en la etapa (i); y (iii) comparar la cantidad del complejo medida en la etapa (ii) con la cantidad de un complejo formado entre el receptor opioide mu y el péptido en ausencia de dicha muestra.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-NH₂ (SEQ ID NO:1), que se describe como "Compuesto 1" en la siguiente divulgación. Las fórmulas moleculares estructurales y básicas, así como el peso molecular (PM), se muestran para el compuesto 1.

La figura 2 muestra Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-NH₂ (SEQ ID NO:2), que se describe como "Compuesto 2" en la siguiente divulgación. Las fórmulas moleculares estructurales y básicas, así como el peso molecular (PM), se muestran para el compuesto 2.

50 La figura 3 muestra Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-Gly-NH₂ (SEQ ID NO:4), que se describe como "Compuesto 4" en la siguiente divulgación. Las fórmulas moleculares estructurales y básicas, así como el peso molecular (PM), se muestran para el compuesto 4.

La figura 4 muestra la actividad de unión al receptor opioide para el compuesto 1. (A) unión al receptor mu del "Compuesto 1" (triángulos) o DAMGO (cuadrados). (B) Actividad antagonista del compuesto 1 contra la unión de SNC80 al receptor delta.

La figura 5 muestra los efectos de los compuestos sobre la antinocicepción y la respiración. (A) Efectos de los compuestos 1 y 2 sobre la antinocicepción en comparación con la morfina. ** = p < 0.01. (B) Efectos de los compuestos 1 y 2 sobre el volumen respiratorio minuto (MV) durante un período de 20 minutos en comparación con la morfina. * p < 0.05. *** p < 0.001.

La figura 6 muestra los efectos del compuesto 2 sobre la antinocicepción y el deterioro motor. (A) Se midieron los efectos del compuesto 2 (triángulos rellenos) y sulfato de morfina (MS, cuadrados rellenos) en la antinocicepción mediante la prueba de la sacudida de la cola (TF). También se midieron los efectos del compuesto 2 (triángulos abiertos) y sulfato de morfina (cuadrados abiertos) sobre el comportamiento motor. (* = p < 0.05). (B) El gráfico de

barras muestra la relación del área bajo la curva (AUC) para el porcentaje de deterioro motor con respecto a la AUC para el porcentaje de antinocicepción. Esta proporción es significativamente mayor (*p < 0.05) para la morfina que para el compuesto 2, en consonancia con un deterioro motor mayor en relación con la analgesia para la morfina.

5 La figura 7 muestra los efectos de los compuestos sobre la responsabilidad de abuso de fármacos. (A) Se midieron los efectos del compuesto 1 (triángulos rellenos), morfina (cuadrados rellenos) y vehículo (círculos rellenos) en la antinocicepción mediante la prueba de la sacudida de la cola (TF). * p < 0.05. (B) Las dosis acumulativas de ya sea morfina o compuesto 1 que se demostró que producen antinocicepción máxima como se muestra en (A) se ensayaron en cuanto a la capacidad para inducir preferencia de lugar condicionado (CPP). *** p < 0.01.

10 La figura 8 muestra una gráfica de la presión de la pata requerida para provocar una respuesta de retirada de la pata en momentos antes y después de la cirugía de lesión nerviosa dispuesta para ratas tratadas con el compuesto 2, en comparación con ratas tratadas con morfina o sin analgésico.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se prepararon los péptidos de fórmula I, que son análogos de pentapéptido y hexapéptido cíclicos de endomorfina-1 (Tyr-Pro Trp- Phe-NH₂, SEQ ID NO:8) y endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, SEQ ID NO:9). Ejemplos no limitantes de péptidos con la composición de fórmula I incluyen los compuestos 1-7 a continuación, en los que las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos 2 (X₁) y 5 (X₄) en la secuencia están unidas por un enlace amida entre las cadenas laterales del mismo. Las fórmulas de los compuestos 1-7 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Compuesto	H-Tyr-	X ₁ -	X ₂ -	X ₃ -	X ₄ -	X ₅	SEQ ID NO:
1.	Tyr-	c[D-Lys	Trp	Phe	Glu]	NH ₂	(SEQ ID NO:1)
2.	Tyr-	c[D-Glu	Phe	Phe	Lys]	NH ₂	(SEQ ID NO:2)
3.	Tyr-	c[D-Lys	Trp	Phe	Glu]	Gly-NH ₂	(SEQ ID NO:3)
4.	Tyr-	c[D-Glu	Phe	Phe	Lys]	Gly-NH ₂	(SEQ ID NO:4)
5.	Tyr-	c[D-Lys	Trp	Phe	Asp]	NH ₂	(SEQ ID NO:5)
6.	Tyr-	c[D-Glu	N-Me-Phe	Phe	Lys]	NH ₂	(SEQ ID NO:6)
7.	Tyr-	c[D-Orn	Phe	p-Cl-Phe	Asp]	Val-NH ₂	(SEQ ID NO:7)

25 En algunas realizaciones, los péptidos de fórmula I incluyen péptidos con una fenilalanina N-alquilada en la posición 3 (X₂). Los grupos alquilo apropiados en los péptidos de la presente invención incluyen grupos alquilo (C₁ a C₁₀), preferiblemente grupos alquilo (C₁ a C₆) (por ejemplo, metilo o etilo). El compuesto 6 ilustra un análogo cíclico cuya secuencia de aminoácidos primarios lineal contiene una fenilalanina N-metilada en la posición 3. Otros péptidos de esta invención incluyen compuestos en los que el aminoácido en la posición 4 (X₃) es p-Y-fenilalanina, en la que, Y es NO₂, F, Cl o Br, con el fin de potenciar la unión al receptor y su potencia. Un péptido de ejemplo (Compuesto 7), cuya secuencia de aminoácidos primarios lineal se proporciona en SEQ ID NO: 7, tiene una p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) en la posición 4.

35 Los compuestos 1 (Figura 1), 2 (Figura 2), 5 y 6 son ejemplos de pentapéptidos cíclicos, y los compuestos 3, 4 (Figura 3) y 7 son ejemplos de hexapéptidos cíclicos de la presente invención.

40 Para referencia, las abreviaturas para los aminoácidos descritos en el presente documento incluyen alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), valina (Val), ornitina (Orn), naftilalanina (Nal), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr) y ácido 2,4-diaminobutírico (Dab). Las formas enantioméricas L o D de estos y otros aminoácidos se pueden incluir en los péptidos de fórmula I. Otros aminoácidos, o derivados o formas no naturales de los mismos, tales como los enumerados en el 2009/2010 Aldrich Handbook of Fine Chemicals (incorporado en este documento como referencia en su totalidad, particularmente aquellas secciones en las que se enumeran derivados de aminoácidos y aminoácidos no naturales) se pueden usar en la preparación de compuestos de la invención.

50 En la fórmula I, X₁ puede ser, por ejemplo, D-Asp, D-Glu, D-Lys, D-Orn, D-Dpr o D-Dab, y X₄ puede ser, por ejemplo, Asp, Glu, Lys, Orn, Dpr o Dab. En general, un aminoácido o derivado de los mismos puede ser utilizado como X₁ o X₄ si este contiene ya sea un grupo amino o un grupo carboxilo en su cadena lateral. En algunas realizaciones, el aminoácido utilizado para X₁ puede ser una forma D-enantiomérica de tal aminoácido.

55 X₂ y X₃ en la fórmula I son aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales aminoácidos son aminoácidos aromáticos no sustituidos o sustituidos seleccionados del grupo que consiste en fenilalanina, heteroarilalanina, naftilalanina (Nal), homofenilalanina, histidina, triptófano, tirosina, arilglicina, heteroarilglicina, tiroxina, aril-beta-alanina y heteroaril-beta-alanina. Ejemplos de versiones sustituidas de estos aminoácidos aromáticos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 7,629,319, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Como se usa

en este documento, "aminoácido aromático" se refiere a un α -aminoácido que comprende un grupo aromático (incluyendo grupos hidrocarburo aromático y heterocíclico aromático) en la cadena lateral de los mismos.

En algunas realizaciones, X_2 en la fórmula I puede ser N-alkil-Phe, donde el grupo alquilo comprende 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Alternativamente, el grupo alquilo puede comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 carbonos, por ejemplo. El grupo alquilo puede ser un grupo metilo (esto es, X_2 es N-Me-Phe), etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, o isoheptilo, o cualquier otra forma ramificada del mismo, por ejemplo. Por definición, el grupo alquilo de N-alkil-Phe está unido al grupo α -amino de fenilalanina. Este grupo alfa amino está implicado en un enlace amida con el residuo X_1 en ciertos péptidos de la invención; por lo tanto, el grupo alfa amino de X_2 (cuando N-alkil-Phe) como existe en tales péptidos es una amina terciaria.

En algunas realizaciones X_3 en la fórmula I es para-Y-Phe (p-Y-Phe), donde Y es NO_2 , F, Cl, o Br, por ejemplo. Por ejemplo, X_3 puede ser p-Cl-Phe. Alternativamente, los grupos NO_2 , F, Cl, o Br se pueden unir en las posiciones orto o meta del anillo fenilo de Phe. Cualquier aminoácido aromático incorporado en los compuestos de la invención tal como a X_2 o X_3 pueden tener los anteriores grupos unidos a los mismos en las posiciones orto, meta, o para.

Solubilidad.

La solubilidad de los péptidos de fórmula I (por ejemplo, en solución salina o solución reguladora fisiológica) por lo general se mejora con relación a los análogos tetrapéptidos de la técnica anterior de las endomorfina. La adición de un aminoácido hidrófilo y el término C amidado a las secuencias tetrapeptídicas relativamente hidrófobas Tyr-c-[D-Lys-Trp-Phe] (SEQ ID NO:10) y Tyr-c-[D-Lys-Phe Phe] (SEQ ID NO:11), dio como resultado una mejora inesperadamente alta en la solubilidad manteniendo o mejorando la funcionalidad. Por ejemplo, el compuesto 1 era soluble en agua, solución salina y 20% de PEG/solución salina a aproximadamente 43, 21 y 90 mg/mL, respectivamente, en comparación con menos de aproximadamente 2 mg/mL para los compuestos descritos anteriormente. Aunque los aumentos de la solubilidad están asociados con propiedades de suministro farmacéuticas mejoradas, una mayor solubilidad también se asocia a menudo con una actividad funcional reducida (por ejemplo, unión al receptor) que puede depender de la lipofilia. Sorprendentemente, sin embargo, como se describe en los ejemplos a continuación, las propiedades funcionales de los compuestos de la invención no se reducen, y de hecho generalmente se mejoran.

Métodos de preparación de los péptidos de fórmula I

Los péptidos de fórmula I se pueden preparar por métodos convencionales de fase en solución (2) o en fase sólida (18) con el uso de grupos protectores y agentes de acoplamiento apropiados; las referencias 2 y 20 se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. Tales métodos generalmente utilizan diversos grupos protectores sobre los diversos residuos de aminoácidos de los péptidos. Se emplea un método de desprotección apropiado para eliminar todos los grupos protectores o específicos, incluyendo la separación de la resina si se aplica la síntesis en fase sólida. Los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los péptidos de fórmula I se sintetizaron en resina de Rink Amide a través de la química de Fmoc. Se utilizó un grupo t-butilo para la protección de la cadena lateral Tyr, Glu, Asp y se usó Boc para la protección de la cadena lateral Lys, Orn y Trp. Todos los materiales se obtuvieron de EMD Biosciences, Inc (San Diego, CA). El péptido se ensambló sobre resina de Rink Amide por eliminación repetitiva del grupo protector Fmoc y acoplamiento de aminoácido protegido. Se usaron HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio, CAS # 94790-37-1) y HOBT (N-hidroxibenzotriazol, CAS # 2592-95-2) como reactivos de acoplamiento en N,N-dimetilformamida (DMF) y diisopropiletilamina (DIPEA) como base. La resina se trató con un cóctel acuoso de ácido trifluoroacético y triisopropilsilano (cóctel TFA/TIS/ H_2O) para la escisión y la eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral. El péptido en bruto se precipitó con éter dietílico y se recogió por filtración.

Ciclación de los precursores lineales de Fmoc-Tyr-c[X_1 - X_2 - X_3 - X_4]- X_5 : Se disolvieron aproximadamente 1 mmol de péptido en aproximadamente 1000 mL de DMF y se adicionaron aproximadamente 2 mmol de DIPEA a la solución, seguido de una solución de HBTU (aproximadamente 1.1 mmol) y HOBT (aproximadamente 1.1 mmol) en aproximadamente 100 mL de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El solvente se eliminó a vacío. El residuo sólido resultante se lavó con ácido cítrico al 5%, NaCl saturado, NaHCO_3 saturado y agua. El sólido final se lavó con éter dietílico y se secó a alto vacío.

Preparación de péptidos Tyr-c[X_1 - X_2 - X_3 - X_4]- X_5 . Los sólidos obtenidos anteriormente se disolvieron en piperidina al 20%/DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. El solvente se eliminó a vacío. Los residuos se disolvieron en acetonitrilo acuoso al 10% ($\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$) y se liofilizaron.

La purificación de los péptidos liofilizados crudos se realizó con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC). El sistema de HPLC Gold 32 Karat (Beckman) que consiste en el módulo 126 de solvente programable y el módulo 168 de detector de conjunto de diodos se usó en la purificación y el control de pureza de los péptidos. La HPLC de fase inversa se realizó usando un gradiente hecho de dos solventes: (A) 0.1% de TFA en

agua y (B) 0.1% de TFA en acetonitrilo. Para los ensayos preparativos, se utilizó una columna VYDAC® 218TP510 (250 x 10 mm, Alltech Associates, Inc.) con un gradiente de 5-20% de solvente B en el solvente A durante un periodo de 10 min, 20-25% de B durante un periodo de 30 minutos, 25-80% de B durante un periodo de 1 minuto y elución isocrática durante 9 minutos a una velocidad de flujo de aproximadamente 4 mL/min, midiéndose las absorciones tanto a 214 como a 280 nm. Se utilizó el mismo gradiente para los ensayos analíticos en una columna VYDAC®218TP54 (250 x 4.6 mm) a una velocidad de flujo de aproximadamente 1 mL/min.

Preparaciones farmacéuticas.

La presente invención también proporciona preparaciones farmacéuticas que contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los péptidos en un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un diluyente, agente formador de complejos, aditivo, excipiente, adyuvante y similares). El péptido puede estar presente por ejemplo en una forma de sal, una forma de microcristal, una forma de nanocristal, una forma de cocrystal, una forma de nanopartícula, una forma de micropartícula o una forma anfifílica. El portador puede ser un portador orgánico o inorgánico que es apropiado para aplicaciones externas, entéricas o parenterales. Los péptidos de la presente invención se pueden combinar, por ejemplo, con los portadores no tóxicos habituales, farmacéuticamente aceptables para comprimidos, pellas, cápsulas, liposomas, supositorios, aerosoles intranasales, soluciones, emulsiones, suspensiones, aerosoles, sistemas (15) de administración de productos químicos dirigidos, y cualquier otra forma apropiada para su uso. Ejemplos no limitativos de portadores que se pueden usar incluyen agua, glucosa, lactosa, goma acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílica coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores apropiados para su uso en preparaciones de fabricación, en forma sólida, semisólida, líquida o en aerosol. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas útiles para tratar el dolor y afecciones relacionadas, como se describe en este documento. Las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un péptido de fórmula I en combinación con un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución reguladora acuosa a un pH fisiológicamente aceptable (por ejemplo, pH 7 a 8.5), un vehículo de nanopartículas basado en polímero, un liposoma, y similares. Las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar en cualquier forma de dosificación apropiada, tal como una forma de dosificación líquida, gel, sólida, cremosa o en pasta. En una realización, las composiciones se pueden adaptar para dar una liberación sostenida del péptido.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, aquellas formas apropiadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, vaginal, parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa), espinal (epidural, intratecal) y central (intracerebroventricular). Las composiciones pueden, cuando sea apropiado, proporcionarse convenientemente en unidades de dosificación discretas. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Algunos modos de administración preferidos incluyen intravenosa (iv), tópica, subcutánea, oral y espinal.

Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para administración oral incluyen cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de uno o más de los péptidos, como un polvo o gránulos. En otra realización, la composición oral es una solución, una suspensión o una emulsión. Alternativamente, los péptidos se pueden proporcionar como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, cargas, lubricantes, desintegrantes, colorantes, agentes aromatizantes, conservantes o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, si se desea. Las preparaciones líquidas orales incluyen, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos o aceitosos. Alternativamente, las composiciones se pueden proporcionar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo apropiado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), conservantes y similares. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones para administración oral dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición y que son bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral, espinal o central (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua) o inyección en fluido amniótico se puede proporcionar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen, dosis, y preferiblemente incluyen un conservante añadido. Las composiciones para administración parenteral pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones, y pueden contener excipientes tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes y agentes dispersantes. Alternativamente, los péptidos se pueden proporcionar en forma de polvo, obtenidos por aislamiento aséptico de un

sólido estéril o por liofilización a partir de una solución, para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril, sin pirógenos, antes de su uso. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones para administración parenteral dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición y que son bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 10 milimolar.

Las composiciones farmacéuticas para la administración tópica de los péptidos a la epidermis (superficies mucosa o cutánea) se pueden formular como ungüentos, cremas, lociones, geles o como un parche transdérmico. Tales parches transdérmicos pueden contener potenciadores de penetración tales como linalol, carvacrol, timol, citral, mentol, t-anetol y similares. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, incluir una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes, gelificantes, colorantes apropiados y similares. Las lociones y cremas pueden incluir una base acuosa u oleosa y por lo general también contienen uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes colorantes y similares. Los geles incluyen preferiblemente una base portadora acuosa e incluyen un agente gelificante tal como polímero de ácido poliacrílico reticulado, un polisacárido derivado (por ejemplo, carboximetilcelulosa), y similares. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones para administración tópica a la epidermis dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición y que son bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para administración tópica en la boca (por ejemplo, administración bucal o sublingual) incluyen comprimidos para deshacer en la boca que comprenden el péptido en una base aromatizada, tal como sacarosa, goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el péptido en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido apropiado. Las composiciones farmacéuticas para administración tópica en la boca pueden incluir agentes potenciadores de la penetración, si se desea. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones de administración oral tópica dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición y que son bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar.

Una composición farmacéutica apropiada para administración rectal comprende un péptido de la presente invención en combinación con un portador o vehículo sólido o semisólido (por ejemplo, crema o pasta). Por ejemplo, tales composiciones rectales se pueden proporcionar como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos o portadores apropiados incluyen manteca de cacao y otros materiales comúnmente utilizados en la técnica. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones de administración rectal dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición, y que son bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar.

De acuerdo con una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención apropiadas para la administración vaginal se proporcionan como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen un péptido de la invención en combinación con portadores como se conocen en la técnica. Alternativamente, las composiciones apropiadas para la administración vaginal se pueden administrar en una forma de dosificación líquida o sólida. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones de administración vaginal dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la composición y que son bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una

concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar.

5 Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración intranasal también están abarcadas por la presente invención. Tales composiciones intranasales comprenden un péptido de la invención en un vehículo y un dispositivo de administración apropiado para administrar una pulverización líquida, un polvo dispersable o gotas. Las gotas se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que comprende también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizadores líquidos se suministran convenientemente desde un envase presurizado, un insuflador, un nebulizador u otros medios convenientes para 10 suministrar un aerosol que comprende el péptido. Los envases presurizados comprenden un propelente apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado como es bien conocido en la técnica. Las dosificaciones de aerosol se pueden controlar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada del péptido. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas para la administración por inhalación o insuflación se pueden proporcionar en forma de una composición en polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón. Dicha composición en polvo se puede proporcionar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas, cartuchos, paquetes de gelatina o envases blíster, a partir de los cuales el polvo se puede administrar con la ayuda de un inhalador o insuflador. Los aditivos, excipientes y similares por lo general se incluirán en las composiciones de administración intranasal dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas para su uso o función previstos en la 15 composición y que son bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Los péptidos de la presente invención se incluirán en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. Por ejemplo, una composición típica puede incluir uno o más de los péptidos en una concentración en el intervalo de al menos aproximadamente 0.01 nanomolar a aproximadamente 1 molar, preferiblemente al menos aproximadamente 1 nanomolar a aproximadamente 100 milimolar. 25

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir uno o más otros agentes terapéuticos, por ejemplo, como terapia de combinación. El agente terapéutico adicional se incluirá en las composiciones dentro de un intervalo de concentración terapéuticamente útil y eficaz, según se determina mediante métodos rutinarios que son bien conocidos en las técnicas médica y farmacéutica. La concentración de cualquier agente terapéutico adicional particular puede estar en el mismo intervalo que el típico para el uso de ese agente como monoterapia, o la concentración puede ser inferior a una concentración de monoterapia típica si hay una sinergia cuando se combina con un péptido de la presente invención. 30

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de los péptidos de fórmula I para el tratamiento del dolor, tratamiento del malestar asociado con trastornos gastrointestinales, y tratamiento de la dependencia de fármacos. Métodos para proporcionar analgesia (aliviar o reducir el dolor), aliviar trastornos gastrointestinales tales como diarrea y terapia para la dependencia de fármacos en pacientes, tales como mamíferos, incluyendo humanos, comprenden administrar a un paciente que sufre de una de las condiciones antes mencionadas, una cantidad eficaz de un péptido de fórmula I. La diarrea puede ser causada por una serie de fuentes, tales como enfermedades infecciosas, cólera, o un efecto o efecto secundario de diversos fármacos o terapias, incluyendo los utilizados para la 40 terapia contra el cáncer. Preferiblemente, el péptido se administra por vía parenteral o enteral. La dosificación de la cantidad efectiva de los péptidos puede variar dependiendo de la edad y condición de cada paciente individual que se va a tratar. Sin embargo, las dosis unitarias apropiadas varían por lo general de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 100 mg. Por ejemplo, una dosis unitaria puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.2 mg a aproximadamente 50 mg. Dicha dosis unitaria se puede administrar más de una vez al día, por ejemplo, dos o tres veces al día. 45

Todas las realizaciones de los péptidos de fórmula I pueden estar en el estado "aislado". Por ejemplo, un péptido "aislado" es uno que ha sido completa o parcialmente purificado. En algunos casos, el compuesto aislado formará parte de una mayor composición, sistema de solución reguladora o mezcla de reactivos. En otras circunstancias, el péptido aislado se puede purificar a homogeneidad. Una composición puede comprender el péptido o compuesto a un nivel de al menos aproximadamente 50, 80, 90 o 95% (sobre una base molar o en peso) de todas las otras especies que también están presentes en el mismo. Se pueden usar mezclas de los péptidos de fórmula I en métodos de práctica proporcionados por la invención. 50 55

Realizaciones adicionales de la presente invención están dirigidas a métodos de utilización de los péptidos de fórmula I descritos en este documento en formulaciones medicinales o como agentes terapéuticos, por ejemplo. Estos métodos pueden implicar el uso de un solo péptido o múltiples péptidos en combinación (esto es, una mezcla). De acuerdo con lo anterior, ciertas realizaciones de la invención son derivadas a medicamentos que comprenden los péptidos de fórmula I, y los métodos de fabricación de tales medicamentos. 60

Como se usa en este documento, los términos "reducir", "inhibir", "bloquear", "prevenir", "aliviar" o "aliviar" cuando se hace referencia a un compuesto (por ejemplo, un péptido) significan que el compuesto reduce la ocurrencia, la gravedad, el tamaño, el volumen o los síntomas asociados de una condición, evento o actividad en al menos aproximadamente 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65

60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, o 100% en comparación con cómo la condición, el suceso o la actividad existirían sin la aplicación del compuesto o una composición que comprende el compuesto. Los términos "aumentar", "elevar", "aumentar", "favorecer la expresión", "mejorar" o "activar" cuando se hace referencia a un compuesto significan que el compuesto aumenta la ocurrencia o actividad de una condición, evento o actividad en al menos aproximadamente 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 750%, o 1000% en comparación con cómo la condición, el suceso o la actividad normalmente existirían sin la aplicación del compuesto o una composición que comprende el compuesto.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la invención. Se debe apreciar por los expertos en el arte que las técnicas descritas en los ejemplos, que representan técnicas conocidas para funcionar bien en la práctica de la invención, se pueden considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en el arte deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas descritas y obtener incluso un resultado semejante o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Los ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Ejemplo 1: Unión y activación de receptores opioides humanos.

Los péptidos de fórmula I mostraron una afinidad sorprendentemente alta (subnanomolar) para el receptor opioide mu humano con unión selectiva con respecto a los receptores opioides delta y kappa. Los compuestos se probaron en ensayos de unión convencionales usando ³H-DAMGO (D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol]-enkefalina tritlada, CAS # 78123-71-4), ³H-DPDP (CAS # 88373-73-3) y ³H-U69593 (CAS # 96744-75-1) para marcar receptores mu, delta y kappa, respectivamente, en membranas de células CHO que expresan receptores clonados humanos. Como se muestra en la tabla 2, la endomorfin-1 (EM1, SEQ ID NO: 8) y la endomorfin-2 (EM2, SEQ ID NO: 9) son los agonistas mu endógenos más selectivos reportados previamente. Los análogos basados en estos opioides naturales muestran una mayor afinidad por el receptor mu, aunque con menos selectividad. Los análogos tetrapéptidos de endomorfin descritos anteriormente (la Patente de los Estados Unidos No. 5,885,958; ck1, Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe] (SEQ ID NO:10); ck2, Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe] (SEQ ID NO:11)) mostraron la mayor afinidad de los compuestos probados. Los péptidos de fórmula I, que incluyen un aminoácido hidrófilo y carboxi-terminal amidado (Compuestos 1, 2, 5) conservaron una alta afinidad, pero aumentaron la selectividad para el receptor mu.

Tabla 2: Compuesto de unión a los receptores opioides.

	Ki (nM)	Selectividad			
		Mu	Delta	Kappa	Delta/Mu
Morfina	0.92	242	56	264	61
DAMGO	0.78	589	334	754	429
EM1	2.07	1215	>10000	587	>5000
EM2	1.32	5704	>10000	4328	>5000
ck1	0.32	28	35	90	111
ck2	0.36	3	12	9	33
Compuesto 1	0.49	132	128	267	260
Compuesto 2	0.73	69	71	94	98
Compuesto 5	0.43	140	29	328	67

Activación del receptor: ensayo funcional de GTP γ S. La activación funcional de los tres receptores opioides se ensayó en ensayos estándar en los que se usó el análogo de GTP no hidrolizable ³⁵S-GTP γ S para cuantificar la activación de receptores opioides humanos clonados expresados en membranas celulares. La figura 4A muestra que el compuesto 1 es un agonista de eficacia total con una potencia significativamente mayor que el compuesto de referencia, DAMGO. La figura 4B muestra que el compuesto 1 exhibe una eficacia total inesperada como un antagonista delta; esto es, es capaz de inhibir la activación delta producida por una dosis de ED₈₀ del agonista delta de referencia, SNC80 (CAS # 156727-74-1). La tabla 3 muestra que todos los agonistas probados son activadores potentes del receptor mu, con valores de EC₅₀ (concentración efectiva media) a concentraciones de nanomolar a subnanomolar. Se encontró que todos los compuestos eran agonistas de eficacia completa (>90%) en el receptor mu. Las endomorfina y los compuestos de fórmula I de la invención muestran una notable selectividad para la activación del receptor, con una activación delta inferior al 50% a concentraciones de hasta 10 μ M, lo que refleja una selectividad >100000. Los compuestos 1 y 3, sin embargo, mostraron un antagonismo delta de eficacia completa; el compuesto 1 exhibió este antagonismo a una concentración relativamente baja.

50

Tabla 3: Activación del receptor opioide por compuestos.

	Agonista EC ₅₀ (nM)			Selectividad		Antagonista Delta	
	mu	delta	kappa	delta/mu	kappa/mu	IC50	eficacia
MS ^a	3.90	1245	2404	319	616		
DAMGO	1.98	3641	13094	1839	6613		
ck1	0.21	138	469.51	658	2236		
ck2	0.15	7	206.11	44	1374		
EM1	1.82	>100000	>100000	>50000	>50000	4287	100
EM2	8.44	>100000	>100000	>10000	>10000	30000	88
Comp. 1	0.15	>100000	963.79	>500000	6425	105	93
Comp. 2	0.99	>100000	12114.00	>100000	12236	2750	51
Comp. 5	0.22	>100000	740.34	>400000	3365	557	100

^asulfato de morfina

5 Activación del receptor: reclutamiento de betaarrestina. La betaarrestina es una proteína intracelular que se recluta
 al receptor opioide mu después de la activación por agonistas. Se ha demostrado que activan vías de señalización
 intracelular que en muchos casos son independientes de las vías mediadas por proteínas G bien conocidas.
 Recientemente se ha demostrado que los ratones con deficiencia genética de betaarrestina exhiben respuestas
 alteradas a la morfina, incluyendo aumento de la analgesia y disminución de los efectos secundarios tales como
 10 tolerancia, depresión respiratoria y estreñimiento (16). Estos resultados indican que los efectos analgésicos y
 secundarios de la morfina son separables mediante la manipulación de procesos de señalización celular. Estos
 hallazgos también apoyan el concepto reciente conocido de modos diversos como "selectividad funcional",
 "agonismo sesgado", "señalización dirigida por agonistas" y otras descripciones. De acuerdo con este concepto, los
 agonistas capaces de producir una cascada diferente de señalización en un receptor dado podrían producir un perfil
 diferente de los efectos deseados y no deseados en relación con otros agonistas para ese receptor. Se probaron
 15 tres de los análogos de esta invención y mostraron patrones de reclutamiento de betaarrestina (que varían desde
 alta potencia con baja eficacia hasta potencia moderada con eficacia significativa) que eran diferentes entre sí y de
 la morfina. Junto con los perfiles diferenciales analgésicos/efectos secundarios relativos a la morfina descritos en
 ejemplos anteriores, los resultados de la betaarrestina sugieren que estos compuestos presentan una "selectividad
 funcional", favoreciendo la analgesia frente a efectos secundarios adversos.

20 Más allá del valor de alta selectividad agonista mu (esto es, exclusión de posibles efectos secundarios resultantes de
 la activación de múltiples receptores), se espera que el antagonismo delta atenúe la tolerancia, la dependencia y la
 recompensa inducida por los opioides. Como se demostró por primera vez en 1991 (1) y apoyado en numerosos
 estudios desde entonces, los antagonistas delta pueden reducir la tolerancia y la dependencia inducida por la
 25 morfina, manteniendo o mejorando la analgesia. Estudios recientes (11) también han mostrado propiedades de
 recompensa reducidas del agonista mu/antagonistas delta como se refleja en la prueba de preferencia de lugar
 acondicionado (CPP) descrita a continuación. La actividad de los péptidos de fórmula I (por ejemplo, el compuesto 1)
 como agonistas mu/antagonistas delta, así como en los dímeros del receptor mu/delta indican que los péptidos
 30 producirán analgesia eficaz con tolerancia, dependencia y recompensa reducidas (18).

Ejemplo 2: Proporcionar analgesia de mayor duración, pero con depresión respiratoria reducida, con respecto a la
 morfina después de la administración intravenosa.

35 La depresión respiratoria es un problema importante de seguridad en el uso de opioides. Un opioide que proporciona
 analgesia tan eficaz como la producida por la morfina, pero con menos depresión respiratoria, sería un avance
 importante para el uso seguro de los analgésicos opioides. La eficacia después de la administración sistémica, tal
 como la inyección intravenosa (i.v.), es inusual para los compuestos basados en péptidos, y sería crítica para la
 utilidad clínica de la misma. Se probaron dos péptidos (compuestos 1 y 2) para determinar sus efectos de sulfato
 40 amorfo sobre la respiración (ventilación minuciosa) y la duración de la antinocicepción con respecto a la morfina. Las
 ratas con catéteres yugulares permanentes se colocaron en un aparato de pletismógrafo de cuerpo entero
 BUXCO™ para determinar múltiples parámetros respiratorios. Durante 20 minutos después de inyección i.v. de
 vehículo (solución salina), se determinó la ventilación minuciosa inicial. A los animales se les inyectó luego morfina o
 compuesto de ensayo y se determinaron los cambios desde la línea de base durante 20 minutos, el período de
 45 inhibición máxima de la ventilación minuciosa por todos los compuestos. Se usó la prueba estándar de sacudida de
 la cola (TF) para determinar la antinocicepción. Se realizó una prueba inicial antes de colocar el animal en la cámara
 BUXCO™, al final de la prueba respiratoria de 20 minutos, y cada 20 minutos después, hasta que la latencia de TF
 volviera a situarse por debajo de 2 veces la TF inicial. Las latencias iniciales fueron de 3-4 segundos y un tiempo de
 corte ("antinocicepción máxima") se estableció a 9 segundos para evitar el daño tisular.

50 La figura 5A muestra que las dosis de 10 mg/kg de los compuestos 1 y 2 produjeron antinocicepción
 significativamente más larga que todos los otros tratamientos (**=p <0.01) y dosis de 5.6 mg/kg produjeron
 antinocicepción similar a la dosis de 10 mg de morfina. A pesar del mayor efecto antinociceptivo de los compuestos
 1 y 2, se observó una inhibición significativamente menor (* p < 0.05) de respiración en ambas dosis del compuesto

1 y en la dosis de 5.6 mg/kg del compuesto 2 (Figura 5B). Estos resultados indican un perfil terapéutico inesperado y claramente más seguro para los péptidos de fórmula I sobre el analgésico opioide estándar actual.

Ejemplo 3: Proporcionar analgesia de mayor duración que la morfina con deterioro reducido de coordinación neuromotora y función cognitiva.

El deterioro neuromotor y cognitivo son características de los opioides que son de particular importancia en dos poblaciones, esto es, las tropas militares de combate, donde el escape de peligro inmediato puede requerir habilidades motoras y cognitivas intactas, y los ancianos, donde estos impedimentos pueden exacerbar la función comprometida. Incluyendo el deterioro del equilibrio, lo que puede conducir a un mayor riesgo de fracturas.

Ejemplo 3a: Coordinación neuromotora.

La figura 6A ilustra que el compuesto 2 produce antinocicepción significativamente mayor, pero redujo significativamente el deterioro motor relativo a la morfina (MS). Ambos compuestos se administraron por dosis intravenosas (i.v.) acumulativas en ratas. Se administraron dosis cada vez mayores de un cuarto de registro cada 20 minutos, y se realizó una prueba de sacudida de la cola (TF) (una prueba de latencia para retirar la cola de un haz de luz caliente) seguida de una prueba de rotarod aproximadamente 15 minutos después de cada inyección. Se realizaron dosis cada vez mayores hasta que cada animal mostró un efecto posible máximo mayor del 90% (% MPE) en la prueba TF, determinado como: $[(\text{latencia a TF menos latencia inicial})/(\text{tiempo (corte) máximo de 9 s, para evitar daño del tejido menos inicial})] \times 100$. Después se colocó el animal sobre una varilla que giraba a velocidades que ascendían a 13 revoluciones por minuto (RPM) durante 3 minutos, y se determinó la latencia para caer de la varilla. Sólo se probaron los animales que permanecieron consistentemente en la varilla durante los 180 segundos completos durante el entrenamiento en el estado no experimentado del fármaco. El % de inhibición posible máxima (% MPI) de coordinación motora se determinó como $100 - (\text{latencia a caer}/180 \times 100)$.

Los dos compuestos mostraron un comienzo similar a la antinocicepción máxima, pero el compuesto 2 produjo antinocicepción significativamente mayor, como se refleja por latencias TF significativamente (* $p < 0.05$) más largas que los del grupo de morfina a 135 y 155 minutos (Figura 6A). A pesar de esta mayor antinocicepción, el deterioro motor fue significativamente menor que el de la morfina (Figura 6B, * $p < 0.05$). El deterioro del comportamiento motor por la morfina fue significativamente superior que el de los controles con vehículo (* $p < 0.05$) mientras que el del compuesto 2 no lo fue.

Ejemplo 3b: Alteración cognitiva.

Una prueba estándar ampliamente utilizada de la función cognitiva es el Morris Water Maze (MWM). Durante el entrenamiento, las ratas aprenden para encontrar una plataforma de escape escondida basándose en la memoria espacial. La latencia promedio de la plataforma, así como la distancia media de la plataforma (una medida no afectada por la velocidad de natación), disminuyen a medida que se adquiere la tarea y proporcionan índices de memoria espacial. Después de 4 días de entrenamiento, una inyección de morfina produjo un deterioro de la memoria espacial, como se refleja por un aumento significativo en la latencia y la distancia media de la plataforma. Por el contrario, el compuesto 2, a dosis que proporcionan antinocicepción igual o mayor que la morfina, no produjo deterioro significativo. Estos resultados indican un perfil terapéutico inesperado y superior de los péptidos de fórmula 1 con respecto a la función cognitiva con relación al analgésico opioide estándar actual.

Ejemplo 4: Proporcionar analgesia de mayor duración, pero recompensa reducida, con relación a la morfina.

Los opioides siguen siendo el tratamiento estándar para el alivio del dolor intenso, pero la desviación de los medicamentos para uso de no dolor se ha convertido en un serio problema nacional (véase U.S. Department of Health and Human Services Substance Abuse and Mental Health Services Administration, found at world wide website oas.samhsa.gov/2k9/painRelievers/nonmedicalTrends.pdf). Los esfuerzos considerables en la academia y la industria se han centrado en las versiones "a prueba de manipulaciones" de los medicamentos opiáceos, pero ha habido poco éxito en el desarrollo de opioides que proporcionan una analgesia altamente eficaz con un mínimo potencial de abuso. El paradigma de la preferencia de lugar acondicionado (CPP) es un modelo ampliamente aceptado para demostrar propiedades gratificantes de los fármacos, y todas las clases principales de fármacos abusados producen CPP, incluyendo opiáceos como la morfina y la heroína. En resumen, los animales primero se les permite, el día 1, explorar libremente un aparato de 3 compartimentos consistente en una "caja de inicio" pequeña y dos compartimentos más grandes que son perceptualmente distintos (rayas grises frente a rayas blancas y negras en este ejemplo). Durante los tres días siguientes, a los animales se les administra una inyección i.v. del fármaco y se confinan a un compartimento, y el vehículo se administra en el otro. El momento en el que se administra el fármaco o el vehículo (a.m. o p.m.) se contrabalancea, así como el compartimento en el que se administra el fármaco (preferido o no preferido, como se determinó durante la prueba basal). Este diseño imparcial permite detectar tanto la preferencia de fármaco como la aversión al fármaco. Después de tres días de acondicionamiento (Días 2, 3 y 4), el animal tiene libre acceso a todos los compartimentos en el día 5 en estado libre de fármaco y el cambio en tiempo absoluto y la proporción de tiempo pasado en el compartimento emparejado de fármaco se determinan. Un aumento significativo en el tiempo o la proporción de tiempo pasado en el

compartimiento emparejado de fármaco en el día de prueba de postcondicionamiento con respecto a la prueba de referencia de precondicionamiento se interpreta como una preferencia de lugar condicionado, reflejo de propiedades gratificantes y potenciales responsabilidades por abuso.

- 5 Cuando se probaron las dosis acumulativas de ya sea morfina o del compuesto 1 que se demostró que producían antinocicepción máxima (Figura 7A) para determinar la capacidad de inducir CPP (Figura 7B), la morfina produjo un incremento significativo (**p <0.01) en el tiempo gastado en el lado del fármaco, mientras que el compuesto 1 no lo hizo, aunque se observó una antinocicepción significativamente mayor (*p <0.05) (Figura 7A) con el compuesto 1 desde 140-180 minutos después de su inyección. Estos hallazgos son consistentes con menos responsabilidad por
10 abuso de los nuevos análogos relativos a la morfina.

Ejemplo 5: Alivio del dolor crónico.

- 15 El dolor crónico afecta a una gran proporción de la población. Una forma de dolor crónico, dolor neuropático, es particularmente difícil de tratar. La figura 8 muestra que el compuesto 2 proporciona un potente alivio inesperado del dolor neuropático inducido por el modelo de lesión nerviosa preservada (SNI) en la rata. Antes de la cirugía SNI ("pre-cirugía"), se requería una presión media de aproximadamente 177 g aplicada a la pata trasera con un dispositivo Randall-Selitto para provocar una respuesta de retirada de la pata. Aproximadamente de 7-10 días después de la cirugía, los animales mostraron hiperalgesia, indicada por una reducción de la presión media (a
20 aproximadamente 70 g) necesaria para provocar la retirada. La morfina y el compuesto 2 se administraron por administración intratecal en dosis elegidas para producir un alivio total de la hiperalgesia. La dosificación acumulativa demostró que la ED₅₀ para el retorno a la respuesta inicial prequirúrgica era de aproximadamente 1.4 µg para la morfina y aproximadamente 0.018 µg para el compuesto 2. En una base molar, el compuesto 2 era 160 veces más potente que la morfina contra el dolor neuropático. Resultados similares se observaron después de otras
25 formas de dolor crónico incluyendo dolor postincisional (postoperatorio) e inflamatorio inducido por el Adyuvante de Freund Completo (CFA). Los ejemplos anteriores son ilustrativos, pero no exhaustivos, en cuanto a los tipos de dolor agudo o crónico para el cual los péptidos de fórmula I son eficaces.

- 30 La administración crónica de morfina se ha mostrado en varios estudios para producir una respuesta inflamatoria en la médula espinal, reflejada por una mayor activación de las células gliales (astroglia y microglia) e "hiperalgesia inducida por opioides". Cuando la morfina y el compuesto 1, a dosis que producían antinocicepción similar después de la dosificación inicial, se administraron dos veces al día durante tres días, la morfina produjo mayor activación glial que el compuesto 1. Estos resultados sugieren que los compuestos de fórmula 1 inducirán menos efectos
35 secundarios asociados con respuestas inflamatorias en comparación con la morfina.

Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en este documento, incluyendo el mejor modo conocido para los inventores para llevar a cabo la invención. Las variantes de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en el arte al leer la descripción anterior.

40 REFERENCIAS

En esta solicitud se hace referencia a las siguientes referencias:

- 45 (1) Abdelhamid E. E., Sultana M., Portoghese P. S. and Takemori A. E. (1991) Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 299-303;
- (2) Bodanszky M. (1993) *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*. Springer-Verlag, New York;
- 50 (3) Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J. A. and Yu L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mopioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12;
- (4) Czaplá M. A., Gozal D., Alea O. A., Beckerman R. C. and Zadina J. E. (2000) Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 162, 994-999;
- 55 (5) Czaplá M. A. and Zadina J. E. (2005) Reduced suppression of CO₂-induced ventilatory stimulation by endomorphins relative to morphine. *Brain Res.* 1059, 159-166;
- (6) Evans C. J., Keith D. E., Jr., Morrison H., Magendzo K. and Edwards R. H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955;
- 60 (7) Gianni W., Ceci M., Bustacchini S., Corsonello A., Abbatecola A. M., Brancati A. M., Assisi A., Scuteri A., Cipriani L. and Lattanzio F. (2009) Opioids for the treatment of chronic non-cancer pain in older people. *Drugs Aging* 26 Suppl 1, 63-73;
- 65 (8) Kieffer B. L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci* 20, 19-26;

- (9) Kieffer B. L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C. and Hirth C. G. (1992) The μ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S A* 89, 12048-12052;
- 5 (10) Kuehn B. M. (2009) New pain guideline for older patients: avoid NSAIDs, consider opioids. *JAMA* 302, 19;
- (11) Lenard N. R., Daniels D. J., Portoghese P. S. and Roerig S. C. (2007) Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 75-82;
- 10 (12) Meng F., Xie G. X., Thompson R. C., Mansour A., Goldstein A., Watson S. J. and Akil H. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat κ opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S A* 90, 9954-9958;
- (13) Minami M., Toya T., Katao Y., Maekawa K., Nakamura S., Onogi T., Kaneko S. and Satoh M. (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat κ -opioid receptor. *FEBS Lett.* 329, 291-295;
- 15 (14) Nishi M., Takeshima H., Fukuda K., Kato S. and Mori K. (1993) cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for κ -subtypeselective ligands. *FEBS Lett.* 330, 77-80;
- (15) Prokai-Tatrai K., Prokai L. and Bodor N. (1996) Brain-targeted delivery of a leucine-enkephalin analogue by retrometabolic design. *J. Med Chem.* 39, 4775-4782;
- 20 (16) Raehal, KM, JKL Walker, and LM Bohn (2005) Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1195-1201
- (17) Rozenfeld R. and Devi L. A. (2010) Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci* 31, 124-130;
- 25 (18) Stewart J. M. and Young J. D. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Company;
- (19) Thompson R. C., Mansour A., Akil H. and Watson S. J. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron* 11, 903-913;
- 30 (20) Wang J. B., Johnson P. S., Persico A. M., Hawkins A. L., Griffin C. A. and Uhl G. R. (1994) Human m opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.* 338, 217-222;
- 35 (21) Wilson A. M., Soignier R. D., Zadina J. E., Kastin A. J., Nores W. L., Olson R. D. and Olson G. A. (2000) Dissociation of analgesic and rewarding effects of endomorphin-1 in rats. *Peptides* 21, 1871-1874; and
- (22) Zadina J. E., Hackler L., Ge L. J. and Kastin A. J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the opiate receptor. *Nature* 386, 499-502.

LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND U.S. DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS ZADINA, James E. HACKLER, Laszlo
- <120> Análogos agonistas de los receptores opioides Mu de las endomorfina
- 50 <130> TU-386-PCT
- <150> 61/363,039
- <151> 2010-07-09
- 55 <160> 11
- <170> FastSEQ der Windows Version 4.0
- 60 <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 787 T3

<220>

<223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Lys2 y Glu5

<221> VARIANTE

5 <222> 2

<223> Xaa=D-Lys

<400> 1

Tyr Xaa Trp Phe Glu
1 5

10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Glu2 y Lys5

20 <221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa=D-Glu

<400> 2

25

Tyr Xaa Phe Phe Lys
1 5

<210> 3

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Lys2 y Glu5

35 <221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa=D-Lys

<400> 3

40

Tyr Xaa Trp Phe Glu Gly
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Glu2 y Lys5

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa=D-Glu

55

<400> 4

Tyr Xaa Phe Phe Lys Gly
1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Lys2 y Asp5
 <221> VARIANTE
 10 <222> 2
 <223> Xaa=D-Lys
 <400> 5

 Tyr Xaa Trp Phe Asp
 1 5
 15
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Glu2 y Lys5
 <221> VARIANTE
 25 <222> 2
 <223> Xaa=D-Glu
 <221> VARIANTE
 30 <222> 3
 <223> Xaa=N-Methyl-Phe
 <400> 6

 Tyr Xaa Xaa Phe Lys
 1 5
 35
 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido cíclico, enlace amida de cadena lateral entre D-Orn2 y Asp5
 <221> VARIANTE
 45 <222> 2
 <223> Xaa=D-Orn
 <221> VARIANTE
 50 <222> 4
 <223> Xaa=para-cloro-Phe
 <400> 7

 Tyr Xaa Phe Xaa Asp Val
 1 5
 55
 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

ES 2 632 787 T3

<400> 8

Tyr Pro Trp Phe
1

5 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 9

Tyr Pro Phe Phe
1

15 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido cíclico, enlace amida entre Phe4 y cadena lateral de D-Lys2

<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa=D-Lys

25 <400> 10

Tyr Xaa Trp Phe
1

30 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Péptido cíclico, enlace amida entre Phe4 y cadena lateral de D-Lys2

<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa=D-Lys

40 <400> 11

Tyr Xaa Phe Phe
1

45

REIVINDICACIONES

1. Un péptido cíclico de fórmula I:

5 (I) H-Tyr-c[X₁-X₂-X₃-X₄]-X₅,

en la que

X₁ y X₄ cada uno independientemente es un aminoácido ácido o un aminoácido básico;

10 X₂ es Trp;

X₃ es independientemente un aminoácido aromático;

15 X₅ es NHR, Ala-NHR, Arg-NHR, Asn-NHR, Asp-NHR, Cys-NHR, Glu-NHR, Gln-NHR, Gly-NHR, His-NHR, Ile- NHR, Leu-NHR, Met-NHR, Orn-NHR, Phe-NHR, Pro-NHR, Ser-NHR, Thr-NHR, Trp-NHR, Tyr-NHR, o Val- NHR, en la que R es H o un grupo alquilo; y existe un enlace amida entre un grupo amino y un grupo ácido carboxílico en las cadenas laterales de aminoácidos X₁ y X₄; con la condición de que cuando X₁ es un aminoácido ácido, entonces X₄ es un aminoácido básico; y cuando X₁ es un aminoácido básico, entonces X₄ es un aminoácido ácido.

20 2. El péptido de la reivindicación 1, en la que:

(i) X₁ se selecciona del grupo que consiste en D-Lys, D-Orn, Lys, y Orn; y X₄ se selecciona del grupo que consiste en D-Asp, D-Glu, Asp, y Glu; o

25 (ii) X₁ se selecciona del grupo que consiste en D-Asp, D-Glu, Asp, y Glu; y X₄ se selecciona del grupo que consiste en D-Lys, D-Orn, Lys, y Orn.

30 3. El péptido de la reivindicación 1, en el que X₃ es p-Cl-Phe.

4. El péptido de la reivindicación 1, en el que X₁ es un D-aminoácido.

35 5. El péptido de la reivindicación 1, en el que R es H y X₅ es Ala-NH₂, Arg-NH₂, Asn-NH₂, Asp-NH₂, Cys-NH₂, Glu-NH₂, Gln-NH₂, Gly-NH₂, His-NH₂, Ile-NH₂, Leu-NH₂, Met-NH₂, Orn-NH₂, Phe-NH₂, Pro-NH₂, Ser-NH₂, Thr-NH₂, Trp-NH₂, Tyr-NH₂, o Val-NH₂.

6. El péptido de la reivindicación 1, en el que el grupo alquilo es un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, o isoheptilo.

40 7. El péptido de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-NH₂ (SEQ ID NO:1),

45 Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-Gly-NH₂ (SEQ ID NO:3), y

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Asp]-NH₂ (SEQ ID NO:5).

50 8. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en medicina.

55 10. Un método *in vitro* de activación de un receptor opioide mu, en el que el método comprende poner en contacto el receptor opioide mu con un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Un método para medir la cantidad de un receptor opioide mu en una muestra, que comprende:

60 (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un receptor opioide mu con un péptido para formar un complejo compuesto-receptor, en el que el péptido es un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

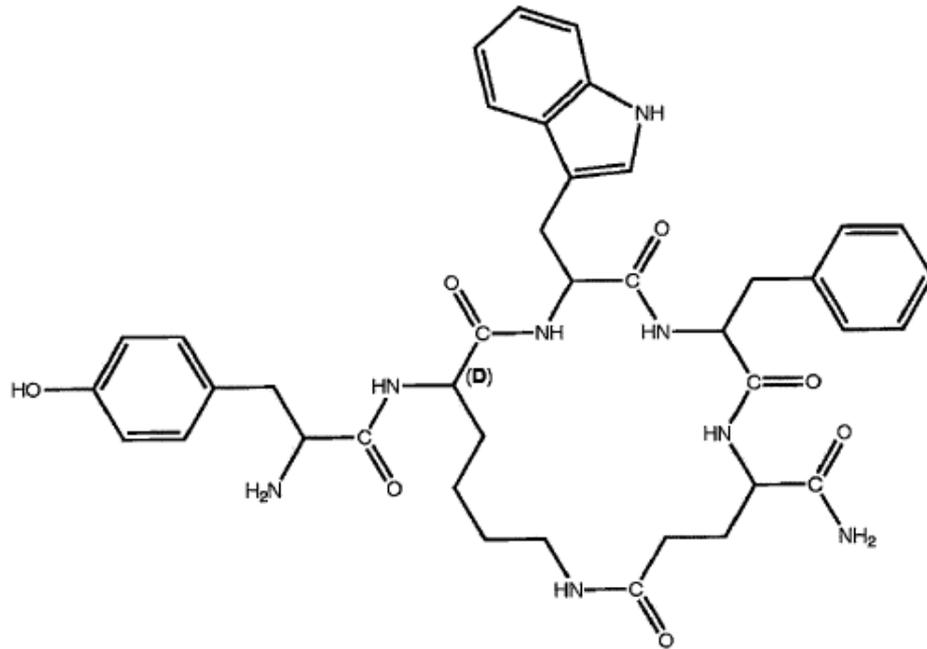
(ii) detectar el complejo formado en la etapa (i); y

(iii) cuantificar la cantidad del complejo detectada en la etapa (ii).

65

12. Un método de ensayo competitivo para detectar la presencia de una molécula que se une a un receptor opioide mu que comprende:
- 5 (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una molécula que se une a un receptor opioide mu con un receptor opioide mu y un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el péptido y receptor forman un complejo compuesto receptor;
- (ii) medir la cantidad del complejo formado en la etapa (i); y
- 10 (iii) comparar la cantidad del complejo medida en la etapa (ii) con la cantidad de un complejo formado entre el receptor opioide mu y el péptido en ausencia de la muestra.
13. Un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento del dolor.
- 15 14. El uso de un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

Tyr-c[D-Lys-Trp-Phe-Glu]-NH₂
(SEQ ID NO:1)

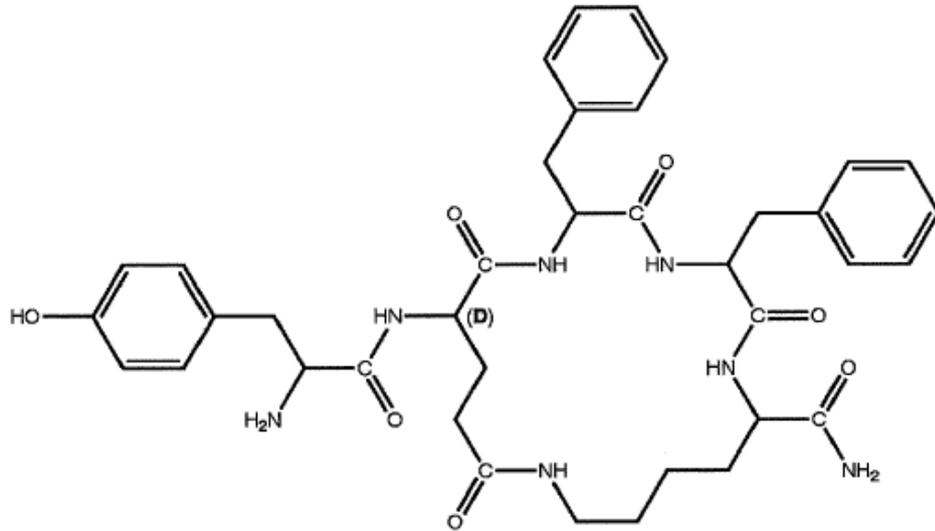


C₄₀H₄₈N₈O₇

MW=752.3646

FIG. 1

Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-NH₂
(SEQ ID NO:2)

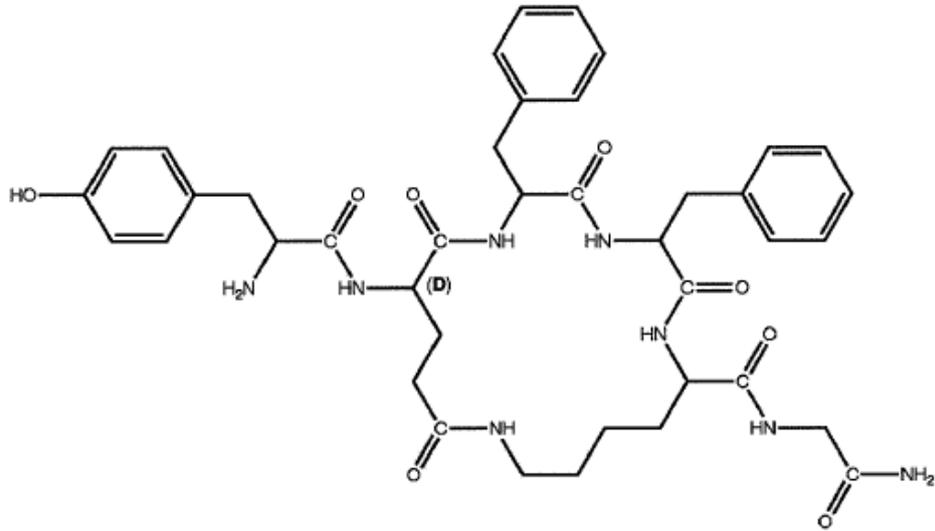


C₃₈H₄₇N₇O₇

MW=713.3535

FIG. 2

Tyr-c[D-Glu-Phe-Phe-Lys]-Gly-NH₂
(SEQ ID NO:4)



C₄₀H₅₀N₈O₈

MW=770.3752

FIG. 3

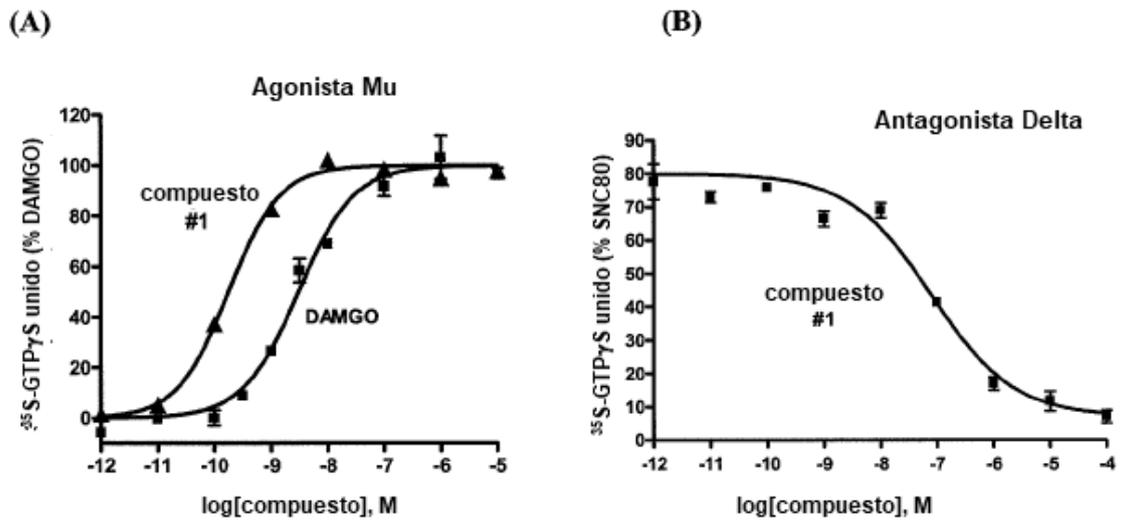


FIG. 4

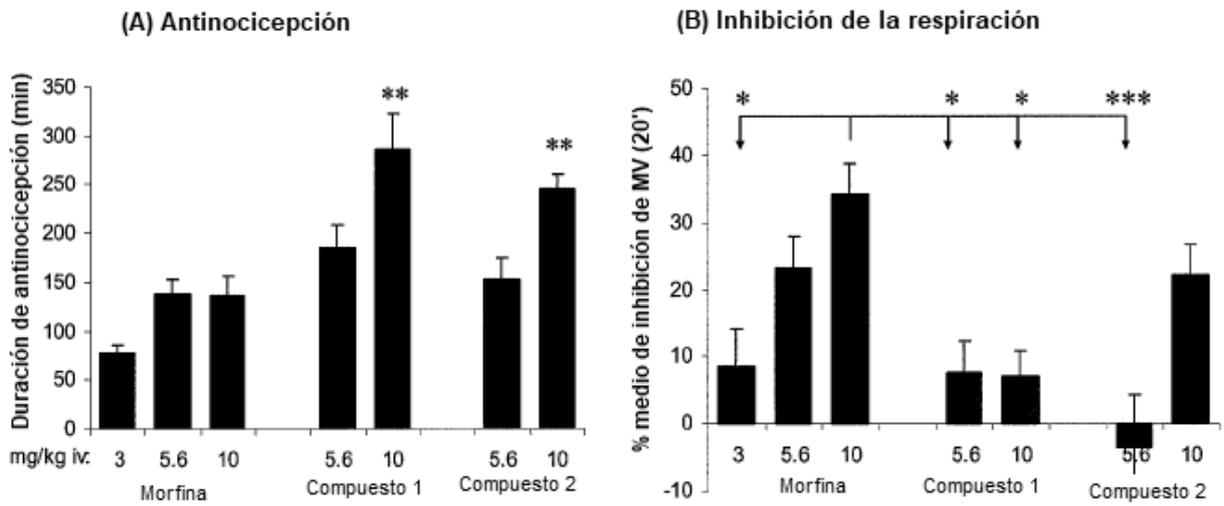


FIG. 5

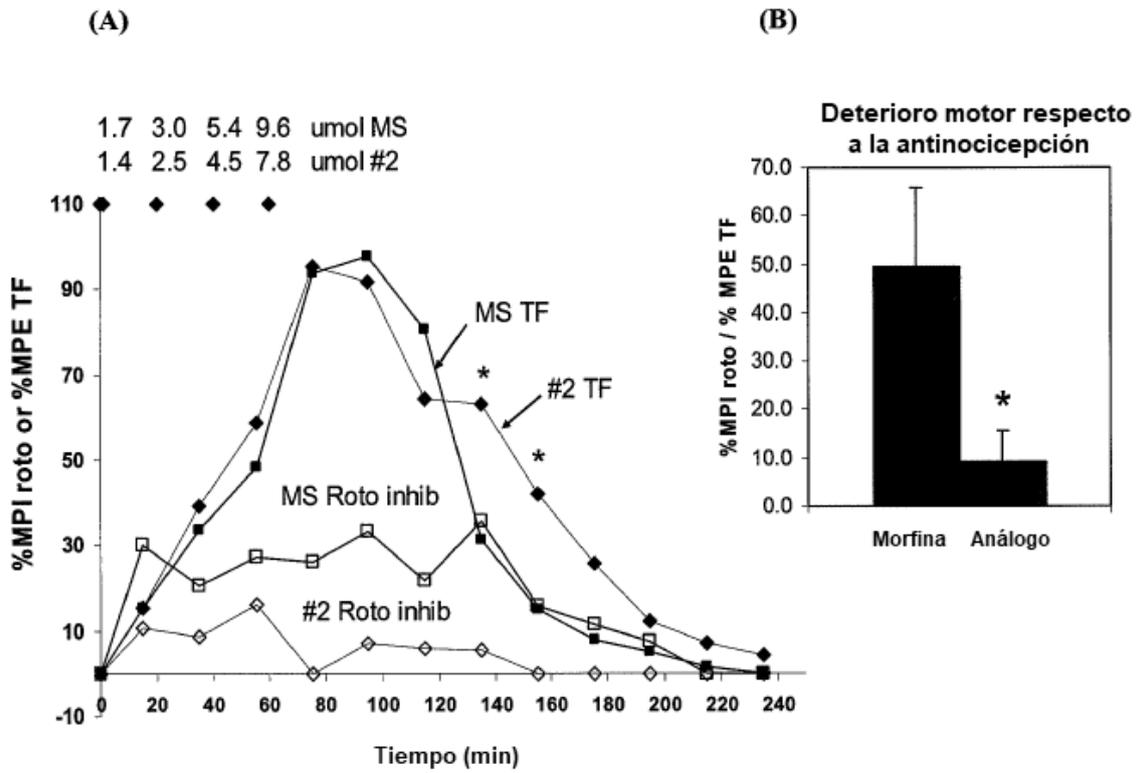


FIG. 6

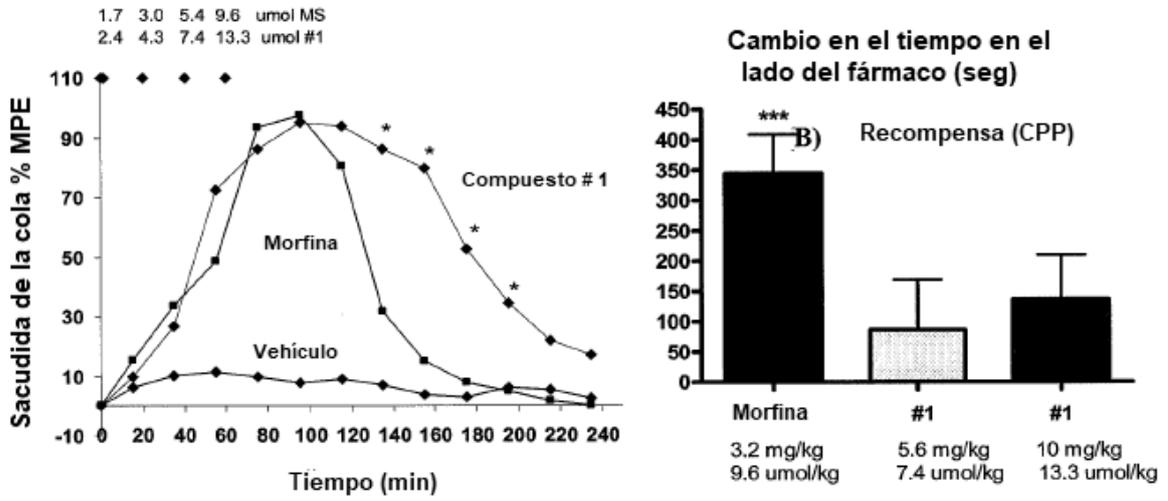


FIG. 7

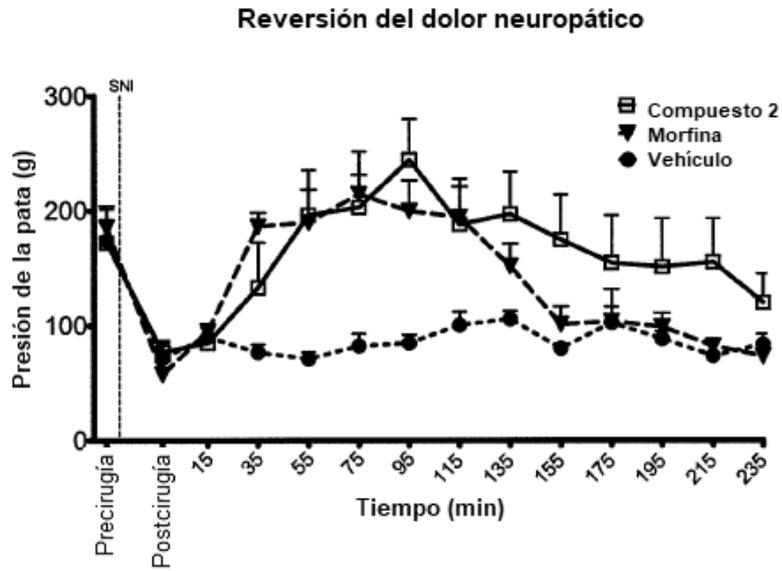


FIG. 8